

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ALFAHERPESVÍRUS BOVINO 1, 5 E ALFAHERPESVÍRUS BUBALINO 1 EM
TONSILAS PALATINAS DE BÚFALOS SAUDÁVEIS E ANÁLISES
FILOGENÉTICAS.**

PORTO ALEGRE

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ALFAHERPESVÍRUS BOVINO 1, 5 E ALFAHERPESVÍRUS BUBALINO 1 EM
TONSILAS PALATINAS DE BÚFALOS E ANÁLISES FILOGENÉTICAS.

Autora: Bruna Simone Paredes Galarza

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias, na área de concentração de
Microbiologia – Virologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehle

PORTO ALEGRE

2024

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Paredes Galarza, Bruna Simone
ALFAHERPESVÍRUS BOVINO 1, 5 E ALFAHERPESVÍRUS
BUBALINO 1 EM TONSILAS PALATINAS DE BÚFALOS E ANÁLISES
FILOGENÉTICAS. / Bruna Simone Paredes Galarza. --
2024.
84 f.
Orientador: Paulo Michel Roehle.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Alfaherpesvírus bovino 1. 2. Alfaherpesvírus
bovino 5. 3. Alfaherpesvírus bubalino 1. 4. Búfalos
d'água (Bubalus bubalis). 5. Análises filogenéticas.
I. Roehle, Paulo Michel, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bruna Simone Paredes Galarza

ALFAHERPESVÍRUS BOVINO 1, 5 E ALFAHERPESVÍRUS BUBALINO 1 EM
TONSILAS PALATINAS DE BÚFALOS E ANÁLISES FILOGENÉTICAS.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2024.

APROVADA POR:

Prof. Dr. Paulo Michel Roehle

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Membro da Comissão

Prof. Dr. Mario Celso Sperotto Brum

Membro da Comissão

Dra. Carla Rosane Rodenbusch

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Júlio e Silvia, e aos meus irmãos Agadir e Renata, por todo amor, apoio e incentivo ao longo do caminho que me trouxe até aqui.

Ao meu orientador, professor Paulo Roche, pela oportunidade de fazer parte deste grupo de pesquisa. Agradeço seus sábios conselhos, paciência, compreensão, e por sempre apoiar tanto meu trabalho.

À Professora Ana Cláudia Franco e Professor Fabrício Campos, por suas sugestões, críticas úteis, ensinamentos e incentivo consistente ao longo deste trabalho de pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos aos meus amigos e colegas do laboratório, Alanis, Bruno, Camila, Francine, Lina, Martha, Michelen, Mônica, Nicole, Nicolas, Raíssa, Raquel, pelo apoio que me deram ao longo dos dois anos. Eles têm sido uma fonte constante de alegria. Obrigada por compartilhar comigo suas histórias de vida e sua amizade.

Aos colegas colaboradores da Universidade Federal do Pará, pelas amostras concedidas; e ao Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) da Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul (SESRS), especialmente ao Richard, pela ajuda no sequenciamento das amostras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram de alguma forma para a minha formação e realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

Os alfaherpesvírus são patógenos importantes em ruminantes, capazes de causar consideráveis prejuízos na criação desses animais. No Brasil, búfalos d'água (*Bubalus bubalis*), bovinos (*Bos taurus taurus*) e zebuínos (*Bos taurus indicus*) têm sido criados em proximidade, representando preocupação e criando oportunidades para infecções interespecies. O alfaherpesvírus bovino 1 (BoAHV1) possui distribuição geográfica que se assemelha à distribuição da criação bovina mundial. Por outro lado, o alfaherpesvírus bovino 5 (BoAHV5) apresenta uma distribuição geográfica peculiar, que parece estar relacionada à proximidade de criação entre bovinos e bubalinos. Já o alfaherpesvírus bubalino 1 (BuAHV1) é apenas ocasionalmente reportado em bovinos. Em bubalinos, os alfaherpesvírus já identificados são o BuAHV1 e o BoAHV1, não havendo relatos na literatura sobre infecções com BoAHV5 nessa espécie. Como estes são vírus recentemente identificados em búfalos, a susceptibilidade desses animais a infecções por BoAHV1, BoAHV5 e BuAHV1, o papel dos búfalos na transmissão interespecie e as consequências que tais infecções (ou coinfeições) possam acarretar em bubalinos ainda são pouco entendidas. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de BoAHV1, BoAHV5 e BuAHV1 em tonsilas palatinas de búfalos d'água clinicamente saudáveis. Um total de 293 amostras foram coletadas no estado do Pará. As amostras foram analisadas por *nested* PCR (nPCR) tendo como alvo uma região do gene da glicoproteína C (*UL44*). O segmento amplificado foi sequenciado para confirmação do tipo viral. Análises filogenéticas foram realizadas, buscando identificar as relações evolutivas entre esses vírus e outros disponíveis no GenBank. Foram detectadas duas amostras positivas para BoAHV1, 11 amostras positivas para BoAHV5, 4 amostras positivas para BuAHV1 e uma amostra com uma coinfeição com BoAHV1 e BoAHV5. Filogeneticamente, as sequências de BuAHV1 detectadas estão mais relacionadas com as sequências indianas de BuAHV1 (OQ669139, OQ669137, OQ608621, OQ669138) do que com as sequências de origem italiana (OQ442798) ou australiana (NC_043504). As análises filogenéticas também demonstraram que os BoAHV5 encontrados estão mais intimamente relacionados a BuAHV1 do que a BoAHV1. Portanto, fica aqui evidenciado que não apenas BoAHV1 e BuAHV1, como também o BoAHV5, podem infectar búfalos d'água. Este é o primeiro relato de detecção de BoAHV5 em bubalinos, assim como o primeiro caso descrito de coinfeição com BoAHV1 e BoAHV5 nesta espécie. No entanto, não foi possível isolar vírus em nenhuma das amostras, apesar de cinco passagens consecutivas em cultivos celulares, sugerindo que os vírus encontram-se em latência. Tendo em vista estes achados, fica evidenciado que os búfalos podem ser considerados prováveis reservatórios para esses vírus e que mais genomas, especialmente de BoAHV5 e BuAHV1, precisam ser sequenciados para uma melhor compreensão da relação filogenética desses vírus.

Palavras-chave: búfalos d'água, herpesvírus, glicoproteína C, tonsilas palatinas, BoAHV1, BoAHV5, BuAHV1

ABSTRACT

*Herpesviruses are significant pathogens in ruminants, capable of causing considerable losses to animal breeding. In Brazil, water buffaloes (*Bubalus bubalis*), bovines (*Bos taurus taurus*) and zebu (*Bos taurus indicus*) are often raised together on farms, posing a risk factor and creating opportunities for cross-infections. Bovine alphaherpesvirus 1 (BoAHV1) has a geographical distribution that resembles cattle farming around the world. On the other hand, bovine alphaherpesvirus 5 (BoAHV5) shows a peculiar geographical distribution, which seems to correspond to close proximity farming of buffalo and cattle. The bubaline alphaherpesvirus 1 (BuAHV1) is occasionally reported in cattle. In buffaloes, BoAHV1 and BuAHV1 have already been reported. To date, there are no records of BoAHV5 infections in these animals. Thus, susceptibility of buffaloes to BoAHV1, BoAHV5, and BuAHV1 infections and its role for interspecies transmission is largely unknown. The aim of this study was to investigate the presence of BoAHV1, BoAHV5, and BuAHV1 in palatine tonsils of apparently healthy water buffaloes. A total of 293 tonsil samples were analyzed by nested PCR targeting a region of the glycoprotein C gene (UL44). After, positive samples were sequenced for viral type confirmation. Phylogenetic analyses of the amplified fragments were conducted to identify the evolutionary relationships among these viruses. BoAHV1 was detected in two samples, BoAHV5 in 10 samples, and BuAHV1 in four samples. Additionally, a coinfection between BoAHV1 and BoAHV5 was identified in one of the positive samples. Phylogenetically, the sequences of BuAHV1 detected in this study were closer related to the Indian sequences (OQ669139, OQ669137, OQ608621, OQ669138) than to the Italian sequence (OQ442798) or the Australian reference sequence (NC_043504) deposited in GenBank. Moreover, phylogenetic analyses demonstrated that the BoAHV5 found in this study were more closely related to BuAHV1 than to BoAHV1. Thus, in this work we showed that not only BoAHV1 and BuAHV1 but also BoAHV5 can infect water buffaloes. This is the first report of BoAHV5 detection. This is also the first BoAHV1/BoAHV5 coinfection detection in water buffaloes. Infectious virus could not be recovered from palatine tonsils tissues, even after five blind passages in cell culture, suggesting that these are latent infections. Therefore, buffaloes can be considered a reservoir for these viruses. Furthermore, for a better understanding of the phylogenetic relationship of these viruses, further studies sequencing complete genomes are necessary due to the small number of deposited sequences, especially for both BoAHV5 and BuAHV1.*

Keywords: *Water buffalo, herpesvirus, glycoprotein C, palatine tonsils, BoAHV1, BoAHV5, BuAHV1.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Classificação taxonômica dos búfalos e dos bovinos. Em verde se destacam a espécie e as raças de búfalos que se encontram no Brasil. Em azul se destacam o gênero, a espécie, as subespécies e as principais raças dos bovinos que se encontram no Brasil.18

FIGURA 2. Partícula viral de um herpesvírus. a) Morfologia de uma partícula viral do alfaherpesvírus humano 1 (HuAHV1; vírus do herpes simples; HSV1) visualizada por microscopia eletrônica. b) Representação esquemática do vírion e suas principais estruturas. As setas coloridas indicam as glicoproteínas (setas rosas), o envelope lipídico (setas vermelhas), o tegumento (setas pretas), o capsídeo (setas azuis) e o genoma (seta amarela).....21

FIGURA 3. Representação esquemática do genoma dos alfaherpesvírus. As sequências únicas longa (UL) e única curta (US) estão representadas pelos retângulos (em verde claro) e a orientação dos genes (setas menores no interior dos retângulos) está indicada pelas orientações das setas. a us é flanqueada por duas sequências repetidas invertidas (IR e TR, respectivamente), que estão representadas pelos pentágonos brancos.22

FIGURA 4. Ciclo de replicação dos alfaherpesvírus. As fases do ciclo replicativo do HuAHV1 são ilustradas na figura. (1) Adsorção: ligação entre as glicoproteínas gC/gB a receptores a proteoglicanos de heparan sulfato. (2) Interação entre a gD e a nectina 1. (3) Fusão e penetração medida pelas glicoproteínas gB, gH e gL. (4) Desnudamento e liberação do genoma no interior do núcleo. (5a, 5b) o nucleocapsídeo é transportado até os poros nucleares. (7) O genoma viral e liberado no núcleo. (8, 9) Transcrição do genoma pela ação da rna polimerase II e replicação do genoma. (10,11,12) Transcrição dos genes *alfa*, *beta* e *gama*. (13,14) Os concatâmeros são clivados durante o processo de montagem. (16,17,18) Morfogênese do capsídeo, seguida do empacotamento do genoma. (19) Brotamento do nucleocapsídeo com a membrana nuclear interna. (20) Fusão do envelope dos vírions primários com a membrana exterior nuclear e liberação dos capsídeos virais no citoplasma. (21, 22) Maturação final no citoplasma por envelopamento secundário do capsídeo via brotamento em vesículas derivadas do complexo de golgi. (23) Transporte dos vírions em vesículas até a liberação na superfície celular. (24) Liberação dos vírions por exocitose.25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCB	Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
BEHV	<i>Bovine encephalitis herpesvirus</i>
BoAHV1	Alfaherpesvírus bovino 1
BoAHV2	Alfaherpesvírus bovino 2
BoAHV5	Alfaherpesvírus bovino 5
BoGHV4	Gammaherpesvírus bovino 4
BoGHV6	Gammaherpesvírus bovino 6
BTV	Vírus da língua azul
BuAHV1	Alfaherpesvírus bubalino 1
CpAHV1	Alfaherpesvírus caprino 1
CRB	Complexo respiratório bovino
CvAHV1	Alfaherpesvírus de cervos 1
CVE	Exantema vesicular coital
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
E	<i>Early gene</i>
ECP	Efeito citopático
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EqAHV1	Alfaherpesvírus equino 1
EqAHV4	Alfaherpesvírus equino 4
EqAHV9	Alfaherpesvírus equino 9
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FSC	<i>Fetal Calf Serum</i>
G+C	Guanina e citosina
gB	Glicoproteína B
gC	Glicoproteína C

gD	Glicoproteína D
gE	Glicoproteína E
GenBank	Banco de dados do NCBI
gG	Glicoproteína G
gH	Glicoproteína H
gI	Glicoproteína I
gK	Glicoproteína K
gL	Glicoproteína L
gM	Glicoproteína M
HCl	Ácido clorídrico
HuAHV1	Alfaherpesvírus humano 1
HuAHV1	Alfaherpesvírus humano 1
HuAHV2	Alfaherpesvírus humano 2
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of viruses</i>
IE	<i>Immediaty early gene</i>
IPV	Vulvovaginite pustular
IR	Sequência repetida interna
L	<i>Late gene</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MCF	Febre catarral maligna (<i>Malignant catarral fever</i>)
MDBK	<i>Mardin-Darby Bovine Kidney</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	Sequenciamento de nova geração (<i>Next-Generation Sequencing</i>)
nPCR	<i>Nested PCR</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PF	<i>Primer forward</i>

PR	<i>Primer reverse</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SN	Soroneutralização
TAE	Tampão (<i>tris-acetate-EDTA</i>)
TR	Sequência repetida terminal
UL	<i>Unique long</i>
<i>UL1</i>	Glicoproteína L (envelope)
<i>UL10</i>	Glicoproteína M (envelope)
<i>UL22</i>	Glicoproteína H
<i>UL27</i>	Glicoproteína B
<i>UL44</i>	Glicoproteína C
<i>UL53</i>	Glicoproteína K
US	<i>Unique short</i>
<i>US4</i>	Glicoproteína G
<i>US6</i>	Glicoproteína D
<i>US8</i>	Glicoproteína E
<i>US9</i>	Proteína do vírion (tegumento)
WOAH	<i>World Organization for Animal Health</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
g	Gramma
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
%	Porcentagem
kb	Quilobase
U	Unidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Objetivos	16
1.1.1	Objetivo Geral	16
1.1.2	Objetivos específicos	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.2	História dos búfalos	17
2.3	Classificação dos herpesvírus	19
2.4	Estrutura do vírion	20
2.5	Genoma	21
2.6	Replicação viral	22
2.6.1	Adsorção	22
2.6.2	Fusão e penetração.....	22
2.6.3	Expressão gênica e replicação do genoma	23
2.6.4	Morfogênese e liberação.....	23
2.7	Latência	23
2.8	Alfaherpesvírus bubalino 1 (BuAHV1)	26
2.9	Alfaherpesvírus bovino 1 (BoAHV1)	27
2.10	Alfaherpesvírus bovino 5 (BoAHV5)	28
2.11	Coevolução	30
2.12	Recombinações	30
2.13	Diagnóstico	31
2.13.1	Detecção de anticorpos	31
2.13.2	Detecção do vírus ou antígenos virais	32
2.13.3	Detecção de genomas	32
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

Os herpesvírus são importantes patógenos em ruminantes, podendo causar perda considerável na criação desses animais. O alfaherpesvírus bovino 1 (BoAHV1), o alfaherpesvírus bovino 5 (BoAHV5) e o alfaherpesvírus bubalino 1 (BuAHV1) são classificados na ordem *Herspesvirales*, família *Orthoherspesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Gatherer *et al.*, 2021). Os herpesvírus causam, na grande maioria das situações, infecções inaparentes; assim, a prevalência das infecções é invariavelmente superior aos casos onde doenças clinicamente aparentes são detectadas.

O BoAHV1 é associado a uma variedade de quadros clínicos. É o agente causador da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), uma doença respiratória caracterizada principalmente por rinotraqueíte e conjuntivite, e que foi a primeira condição que levou ao isolamento do vírus (Kahrs, 1977; Graham *et al.*, 2013). A infecção genital por BoAHV1 é caracterizada por balanopostite e, em fêmeas, é caracterizada por vulvovaginite pustular (IPV) e pela indução de abortos e outros problemas reprodutivos, como perdas embrionárias e fetais (Nandi *et al.*, 2009; Graham *et al.*, 2013; Chothe *et al.*, 2018). O vírus pode ser transmitido pelo sêmen, através de monta natural ou inseminação artificial, sendo uma causa importante de comprometimento de partidas de sêmen. A infecção por BoAHV1 é reconhecida a nível mundial como uma das principais infecções bovinas de importância econômica, especialmente devido à diminuição da eficiência reprodutiva e a consequente queda na produtividade dos rebanhos (Gibbs & Rweyemamu, 1977; Ackermann & Engels, 2006; Biswas *et al.*, 2013; WOA, 2024).

O BoAHV5 causa principalmente meningoencefalite, quase que invariavelmente fatal, em bovinos. Quando clinicamente aparente, as infecções pelo BoAHV5 são geralmente identificadas em bezerros jovens, onde a mortalidade pode chegar a 100%. Os sinais clínicos em bovinos afetados incluem apatia, anorexia, fraqueza seguida de sinais neurológicos, como incoordenação, tremor muscular, cegueira, andar em círculos, decúbito, pressão de cabeça, convulsões e morte (Ely *et al.*, 1996; Megid *et al.*, 2015). Ocasionalmente, o BoAHV5 foi associado a distúrbios reprodutivos em fêmeas afetadas (Del Médico *et al.*, 2005; Kirkland *et al.*, 2009; Favier *et al.*, 2012).

Como todo herpesvírus, o BoAHV5, após a infecção primária, estabelece uma infecção latente que permanece no animal até sua morte. Tanto o BoAHV5 quanto o BoAHV1 estabelecem infecções latentes nos mesmos sítios: os gânglios trigêmeos e paravertebrais

lombares e sacrais, tonsilas, células sanguíneas e linfonodos. Sob situações estressantes, essas infecções podem ser reativadas, excretando vírus através das secreções nasais, oculares e genitais, de acordo com o sítio de infecção original (Winkler *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2005; Del Médico *et al.*, 2009; Favier *et al.*, 2014).

Já o BuAHV1, usualmente causa infecções assintomáticas em bubalinos (Scicluna *et al.*, 2007; Scicluna *et al.*, 2010). Entretanto Amoroso *et al.* (2013) reportaram a detecção de BuAHV1 em tecidos provenientes de um feto bubalino abortado, o que sugere que, como os alfaherpesvírus de bovinos, a maioria das infecções sejam assintomática, embora o vírus possa causar doença eventualmente.

Apesar dos bovinos serem considerados hospedeiros naturais de BoAHV1 e BoAHV5, os búfalos d'água são espécies suscetíveis a infecções tanto naturais quanto experimentais por BoAHV1 (Scicluna *et al.*, 2010; Fusco *et al.*, 2015). Entretanto, até a presente data não foram reportadas infecções por BoAHV5 em búfalos d'água.

No cenário atual da pecuária no Brasil, búfalos e bovinos são frequentemente criados juntos em fazendas mistas, gerando oportunidades para infecções cruzadas. Especificamente no caso dos herpesvírus, alguns alfaherpesvírus de ruminantes podem, ocasionalmente, atravessar a barreira das espécies; nessas condições, bovinos e búfalos podem se infectar com esses vírus, podendo ser geradas oportunidades para que ocorram recombinações ou outras formas de intercâmbio genético (Camero *et al.*, 2019; Lechmann *et al.*, 2021). Esse tema, portanto, focando a origem e as relações evolutivas entre BuAHV1, BoAHV1 e BoAHV5, ainda precisa ser mais detalhadamente examinado. Estudos anteriores revelaram que o BoAHV5 apresenta maior similaridade antigênica com o BuAHV1 do que com o BoAHV1 (D'Arce *et al.*, 2002; Romera *et al.*, 2022). Interessantemente, há indiscutíveis diferenças na distribuição geográfica mundial de BoAHV1 e BoAHV5. O BoAHV1 é prevalente em todo o mundo, sendo encontrado praticamente em todas as regiões de criação de bovinos e zebuínos. Enquanto isso, a prevalência do BuAHV1 em bubalinos parece ser restrita em sua distribuição geográfica, tendo sido relatado em países como Austrália, Irã, Itália, Argentina e Índia (St George & Philpott, 1972; Maidana *et al.*, 2014; De Carlo *et al.*, 2004; Hedayat *et al.*, 2020). Por sua vez, o BoAHV5 aparenta ter uma distribuição geográfica particular, que parece estar relacionada ao contato, passado ou atual, entre bubalinos e bovinos ou zebuínos (Gonçalves, 2023). Como tal, o vírus é endêmico na América do Sul, sendo sua ocorrência reportada principalmente na Argentina (Maidana *et al.*, 2011), Brasil (Rissi *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2009), Uruguai (Puentes *et al.*, 2016) e Colômbia (Vargas *et al.*, 2016). Em vista disso, o foco do presente trabalho foi

investigar a ocorrência das infecções por BoAHV1, BoAHV5 e BuAHV1 em tonsilas palatinas de búfalos e buscar analisar as relações filogenéticas entre esses vírus.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

- Contribuir para o conhecimento da biologia e epidemiologia dos herpesvírus de ruminantes em búfalos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Pesquisar ácidos nucleicos de herpesvírus em amostras de tonsilas palatinas de búfalos;
- Investigar a presença de herpesvírus infeccioso nas tonsilas palatinas;
- Utilizar uma PCR para detecção e diferenciação de herpesvírus bubalino (BuAHV1) e bovinos (BoAHV1 e BoAHV5) em tonsilas palatinas;
- Realizar análises bioinformáticas com os genomas de herpesvírus identificados e investigar possíveis interações entre estes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2 História dos búfalos

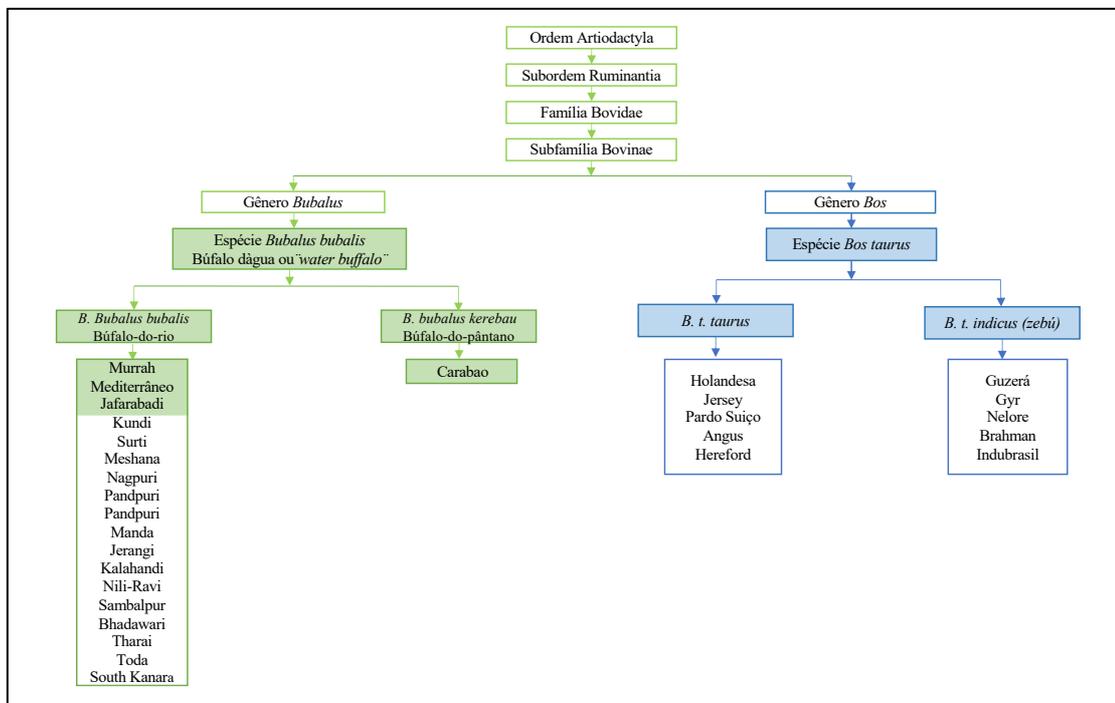
O búfalo d'água (*Bubalus bubalis*), também conhecido como búfalo-doméstico ou búfalo-asiático, é originário do continente asiático. Acredita-se que foram domesticados há cerca de 3.000 anos A.C., na região em que hoje se encontram a Índia, o Iraque e a China (Minervino *et al.*, 2020). A partir desses países, esses animais se espalharam para o resto do mundo. No Brasil, os búfalos foram introduzidos no final do século XIX. Aqui, esses animais foram e ainda são mantidos como fonte de produção de carne, de leite e como animais de tração (Grazziotto *et al.*, 2020).

Atualmente, existem 204 milhões de búfalos no mundo, dos quais 199,92 milhões (98%) encontram-se no continente asiático; 1,8 milhões (0,9%) nas Américas; 1,63 milhões (0,8%) na África; 0,41 milhões (0,2%) na Europa; e 0,2 milhões (0,1%) na Oceania (FAO, 2014). O Brasil tem a maior população de bubalinos no continente americano: em 2022, segundo dados oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE), a população de búfalos no país era de 1.598.268 cabeças. Esses animais estão distribuídos nas cinco regiões que formam o território nacional, sendo que a região norte do país registra o maior número de búfalos, com 889.950 mil cabeças. Entre os estados do norte, o Pará conta com 664.672 búfalos – dos quais 452.228 encontram-se na Ilha de Marajó, a maior ilha fluvial do país –, tornando-o o estado com o maior rebanho de bubalinos do país. Além disso, o Pará ainda é o segundo estado no país em número de cabeças de gado bovino (IBGE, 2022).

Assim como os bovinos taurinos e zebuínos são subespécies diferentes (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*), os búfalos d'água podem ser divididos em duas subespécies, os quais evoluíram em regiões geográficas separadas: o búfalo de pântano (*B. bubalus kerebeau*), originário na Indochina, e o búfalo de rio (*B. bubalus bubalis*), originário do noroeste da Índia. Os búfalos de pântano predominam no sudeste asiático, Austrália e nos estados do noroeste da Índia. Para essa espécie, é reconhecida apenas a raça Carabao, originária das Filipinas (Minervino *et al.*, 2020). Esta raça foi introduzida na Guiana Francesa e, posteriormente, na Ilha de Marajó (Pará) no ano de 1890. Essa foi a primeira importação de búfalos realizada no Brasil. Já para os búfalos de rio, são reconhecidas 18 raças diferentes (Jafarabadi, Murrah, Mediterrâneo, Nili-Ravi, Kundi, Surti, Meshana, Nagpuri, Pandpuri, Manda, Jerangi, Kalahandri, Sambalpur, Bhadawari, Tharai, Toda, South Karana), das quais três (Mediterrâneo,

Murrah e Jafaradi) são encontradas no Brasil. A raça Mediterrânea se originou na Itália, no século oito, e se estabeleceu na Europa e demais zonas mediterrâneas, de onde foi posteriormente exportada para vários países da América e Ásia (Borghese, 2005). No ano de 1895, ocorreu a segunda exportação de búfalos para a Ilha de Marajó, dessa vez de animais da raça Mediterrâneo. Já as raças Murrah e Jafarabadi são provenientes de Haryana e Gujarat, na região noroeste da Índia. Ambas foram introduzidas no Brasil no ano de 1961 (ABCB, 2011).

Figura 1. Classificação taxonômica dos búfalos e dos bovinos. Em verde se destacam a espécie e as raças de búfalos que se encontram no Brasil. Em azul se destacam o gênero, a espécie, as subespécies e as principais raças dos bovinos que se encontram no Brasil.



Fonte: O próprio autor, 2023.

O búfalo d'água é conhecido por sua robustez e grande adaptabilidade a diferentes topografias, solos e fatores climáticos. No entanto, o contato entre os búfalos d'água com o gado bovino ou outros animais domésticos e selvagens, assim como seu acesso a diferentes ecossistemas, os expõe a diferentes enfermidades infecciosas, assim como expõe os animais autóctones a microrganismos originários de bubalinos (Lechmann *et al.*, 2017).

Sabe-se que alguns vírus tendem a causar doenças de baixa gravidade ou infecções assintomáticas em seus hospedeiros naturais. Entretanto, em alguns casos, eles podem causar doença grave e letal quando a infecção ocorre em outras espécies animais que não são os seus

hospedeiros naturais. Exemplos destes vírus em ruminantes são o vírus da febre catarral maligna (MCFV), o BoAHV1, e o vírus da língua azul (BTV). Portanto, quando animais exóticos como os búfalos domésticos entram em contato com espécies endêmicas como os bovinos, ovinos e caprinos, existe a possibilidade de produzir infecções nesses animais (Lechmann *et al.*, 2017).

Diferentes tipos de herpesvírus de ruminantes já foram detectados em búfalos: o alfaherpesvírus bovino 2 (BoAHV2), o gammaherpesvírus bovino 4 (BoGHV4), gammaherpesvírus bovino 6 (BoGHV6), o BoAHV1, e o BuAHV1 (Villanueva *et al.*, 2018). Os herpesvírus, em função do ciclo biológico que apresentam e, particularmente, o BoAHV1 e BuAHV1, são potenciais candidatos a causar infecções cruzadas entre bovinos e bubalinos. Como no Brasil a criação de búfalos d'água e de gado bovino em sistemas de produção mistos tem aumentado, o risco de transmissão de infecções virais entre as espécies é iminente (Scheffer, 2015).

2.3 Classificação dos herpesvírus

A família *Orthoherpesviridae* é composta por um grupo extenso de vírus DNA de dupla fita que infecta uma ampla gama de hospedeiros, incluindo mamíferos, aves e répteis. A família *Orthoherpesviridae* pertence a ordem *Herpesvirales*, juntamente com as famílias *Alloherpesviridae* (compostas por vírus de peixes e anfíbios) e *Malacoherpesviridae* (composta por vírus de moluscos) (Gatherer *et al.*, 2021).

A família *Orthoherpesviridae* se divide em três subfamílias denominadas *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (Davison *et al.*, 2009). Esta classificação em subfamílias se deve às diferenças na composição e arquitetura do genoma, na gama de hospedeiros e características da infecção latente. Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* possuem um amplo espectro de hospedeiros, com um ciclo de replicação curto que resulta em uma infecção de rápida propagação e lise celular. *In vivo*, estabelecem latência principalmente, mas não exclusivamente, nos corpos dos neurônios dos gânglios usualmente envolvendo os gânglios neuronais que inervam a região primo-infectada. Frequentemente, são encontrados em estado latente nos gânglios trigêmeos e paravertebrais. Os membros da subfamília *Betaherpesvirinae* possuem uma gama restrita de hospedeiros, limitada a uma única espécie ou gênero. O ciclo de replicação é relativamente longo e apresentam infecção de desenvolvimento lento, em que as células aumentam de tamanho antes da lise celular. *In vivo*, a latência se estabelece em macrófagos dos tecidos linforreticulares, nos rins e

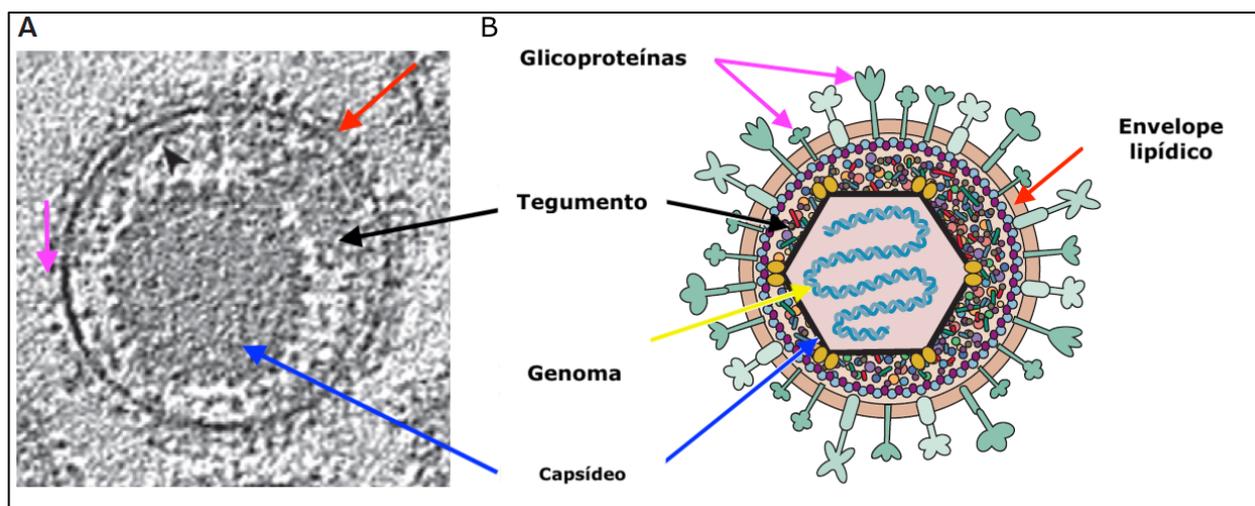
em glândulas secretoras. Os membros da subfamília *Gammaherpesvirinae* também possuem uma gama restrita de hospedeiros e caracterizam-se por sua replicação em linfócitos T e B. *In vivo*, eles estabelecem infecções latentes em tecidos linfóides, podendo causar doenças linfoproliferativas e neoplasias (Roizman & Pellet, 2011; Sorel & Dewals, 2019).

A subfamília *Alphaherpesvirinae* é a maior das subfamílias da família *Orthoherpesviridae* em relação ao número de espécies conhecidas. Compreende muitos vírus estreitamente relacionados, tanto de humanos como de animais. Esta subfamília abriga os gêneros *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus*, *Scutavirus* e *Italovirus* (Gatherer *et al.*, 2021). O gênero *Varicellovirus* abriga 20 espécies, entre as quais, de particular interesse nesta dissertação, *Varicellovirus bovinealpha1* (*bovine alphaherpesvirus 1* ou alfa herpesvírus bovino 1, BoAHV1), *Varicellovirus bovinealpha5* (*bovine alphaherpesvirus 5* ou alfa herpesvírus bovino 5, BoAHV5) e *Varicellovirus bubalinealpha1* (*bubaline alphaherpesvirus 1* ou alfa herpesvírus bubalino 1, BuAHV1) (Gatherer *et al.*, 2021).

2.4 Estrutura do vírion

Todos os herpesvírus compartilham características básicas na estrutura do vírion. As partículas virais são compostas por quatro estruturas: genoma ou “*core*”, capsídeo, tegumento e envelope. O genoma dos herpesvírus é composto por uma molécula de DNA de dupla fita linear, o qual é envolto pelo capsídeo (Mettenleiter, 2022). O capsídeo é uma estrutura proteica de simetria icosaédrica e possui um diâmetro de aproximadamente 100 nm. Ele é formado por 162 capsômeros, sendo 12 pentaméricos e 150 hexaméricos, os quais estão conectados por complexos heterotriméricos para formar as treliças da estrutura T=16 icosaédrica (Antione *et al.*, 2006; Pellet & Roizman, 2007). O capsídeo, está rodeado por uma camada protéica denominada tegumento, que é composta por várias proteínas virais e celulares. As proteínas do tegumento viral estão separadas em duas estruturas, a camada “interna” e a camada “externa”. A camada interna é composta por duas proteínas conservadas que estão relacionadas intimamente com o capsídeo. Por outro lado, a camada externa está associada com o domínio citoplasmático das proteínas de membrana viral. As proteínas do tegumento são importantes nos estágios de infecção inicial (*early*) e tardia (*late*). O envelope viral é uma bicamada lipídica derivada da membrana nuclear do hospedeiro e forma a camada externa do vírion (Barber *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2020). Esta estrutura contém glicoproteínas virais que são essenciais para a entrada do vírus na célula (Figura 2).

Figura 2. Partícula viral de um herpesvírus. A) Morfologia de uma partícula viral do alfaherpesvírus humano 1 (HuAHV1; vírus do herpes simples; HSV1) visualizada por microscopia eletrônica. B) Representação esquemática do vírion e suas principais estruturas. As setas coloridas indicam as glicoproteínas (setas rosas), o envelope lipídico (setas vermelhas), o tegumento (setas pretas), o capsídeo (setas azuis) e o genoma (seta amarela).



Fonte: Adaptado de Flint *et al.*, 2015.

2.5 Genoma

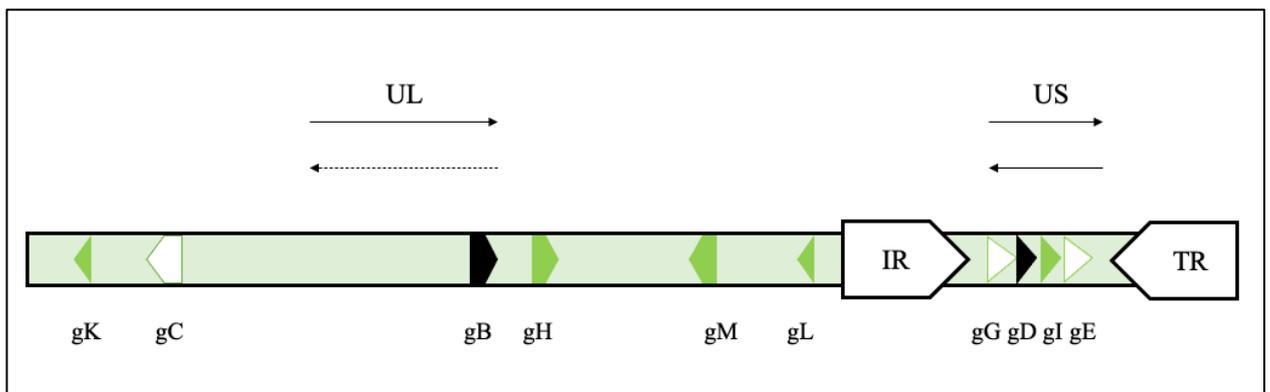
Os genomas de BoAHV1, BoAHV5 e BuAHV1 apresentam uma disposição denominada tipo “D”, que consiste em duas sequências únicas, denominados como única longa ou “*unique long*” (UL) e única curta ou “*unique short*” (US) (Figura 3). O segmento US ainda é flanqueado por duas sequências curtas repetidas e invertidas, sendo uma interna (IR) e outra terminal (TR) (Pellet & Roizman, 2007).

O genoma viral dos alfaherpesvírus tem aproximadamente 130 - 150 kilobases (Kb) e codificam em torno de 70 genes diferentes, dos quais pelo menos 10 codificam glicoproteínas. Seis destes genes estão localizados na região UL e codificam as proteínas: gK (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10) e gL (UL1). As quatro glicoproteínas restantes são encontradas na região US e codificam as proteínas: gG (US4), gI (US9), gD (US6) e gE (US8) (Schwyzer & Ackermann, 1996).

O genoma do BuAHV1 contém 137.452 pares de bases (pb), o genoma do BoAHV1 contém 135.301 pb e o BoAHV5, 137.821 pb. Os genomas destes vírus apresentam um alto conteúdo de G+C (aproximadamente 75%). Análises dos genomas completos mostraram uma identidade nucleotídica de 76.7% para o BoAHV1 e BuAHV1, 82% para o BoAHV1 e

BoAHV5, e 92% para o BoAHV5 e BuAHV1. Tanto BoAHV5 quanto BuAHV1 não possuem a região UL0.5 homologa do BoAHV1 (Tikoo *et al.*, 1995; Delhon *et al.*, 2003; Scheffer *et al.*, 2017).

Figura 3. Representação esquemática do genoma dos alfa herpesvírus. As sequências únicas longa (UL) e única curta (US) estão representadas pelos retângulos (em verde claro) e a orientação dos genes (setas menores no interior dos retângulos) está indicada pelas orientações das setas. A US é flanqueada por duas sequências repetidas invertidas (IR e TR, respectivamente), que estão representadas pelos pentágonos brancos.



Fonte: O próprio autor, 2023

2.6 Replicação viral

2.6.1 Adsorção

O primeiro estágio da infecção viral é a adsorção. Este processo refere-se a um passo da ligação do vírus nas células, quando ocorre uma interação entre os receptores celulares e as glicoproteínas do envelope viral. A primeira interação envolve a ligação de baixa afinidade entre as glicoproteínas gC/gB a receptores da superfície celular como o proteoglicanos de heparan sulfato. Esta interação fraca é seguida por outra interação de alta afinidade entre a gD e receptores celulares específicos como a nectina 1. A gC e a gD se encontram entre as primeiras proteínas virais a ter contato com as células do hospedeiro (Krummenacher *et al.*, 2004).

2.6.2 Fusão e penetração

As proteínas gB, gH e gL se encarregam de mediar o processo de fusão do envelope viral com a membrana celular. Essas proteínas, que constituem o mecanismo básico de fusão

(gB, gH, gL), são conservadas entre todos os herpesvírus. Após a fusão, no citoplasma, o capsídeo dissocia do envelope viral e das proteínas do tegumento e o nucleocapsídeo é transportado até os poros nucleares, permitindo a liberação do DNA viral e posterior replicação viral (Mettenleiter *et al.*, 2009).

2.6.3 Expressão gênica e replicação do genoma

Uma vez no núcleo, a transcrição do genoma começa pela ação da RNA polimerase II celular. A transcrição do genoma, que tem a sua sequência regulada sob a forma de uma cascata, inclui a expressão de três classes de genes: “*immediate early*” (IE) ou *alpha*, “*early*” (E) ou *beta*, e “*late*” (L) ou *gamma*. Os genes *alpha* codificam proteínas que regulam a replicação viral. Já os genes *beta* codificam as proteínas que sintetizam e empacotam o DNA viral. Por fim, os genes *gamma* contêm a sequência de DNA das proteínas estruturais, que constituem os vírions e estão envolvidas na morfogênese dos mesmos (Muylkens *et al.*, 2007).

2.6.4 Morfogênese e liberação

Nesta etapa, as proteínas do capsídeo são traduzidas no citoplasma e são levadas ao núcleo, onde se organizam e se empacotam juntamente com o DNA viral. Os capsídeos, recém formados, deixam o núcleo por brotamento através da membrana nuclear interna, onde adquirem um envelope primário. Posteriormente, após a fusão com a membrana nuclear externa, esse envelope é perdido, liberando os capsídeos virais no citoplasma. No citoplasma, as partículas virais adquirem o envelope viral por brotamento em vesículas derivadas do complexo de Golgi. Uma vez envelopados, ocorre a liberação dos vírions maduros através da fusão das vesículas com a membrana plasmática, um processo chamado de exocitose (Figura 4). Como ocorre com todos os membros da subfamília *Alfaherpesvirinae*, a célula é lisada no processo de infecção, e o vírus se propaga de célula a célula (Mettenleiter *et al.*, 2009).

2.7 Latência

Os alfaherpesvírus possuem a capacidade de estabelecer infecções latentes por toda a vida dos hospedeiros infectados. Ocasionalmente, situações que interfiram no equilíbrio imune do hospedeiro causando estresse podem levar reativar as infecções latentes, permitindo a

replicação de vírus infeccioso e criando a possibilidade da transmissão do vírus a outros hospedeiros suscetíveis. Para o estabelecimento da latência, após a infecção e replicação local nas células que sofreram a infecção primária, os capsídeos invadem as terminações nervosas sensoriais que inervam os tecidos infectados. A seguir, o capsídeo é transportado via fluxo axonal retrógrado para os corpos celulares neurais dos gânglios trigêmeos (quando a infecção ocorre por via respiratória) e gânglios sacrais (quando a infecção ocorre por via genital) estabelecendo a latência (Roizman & Pellet, 2001). Embora os gânglios trigêmeos sejam o principal sítio de latência para o BoAHV1 e outros membros da subfamília *Alfaherpesvirinae*, a infecção latente pode se estabelecer em sítios não neuronais. Como exemplo, foi demonstrado que o BoAHV5 pode estabelecer latência em tonsilas palatinas, leucócitos e mucosas nasais e traqueal (Vogel *et al.*, 2003; Favier *et al.*, 2014). Por outro lado, ainda são necessários mais estudos relacionados a sítios de latência do BuAHV1.

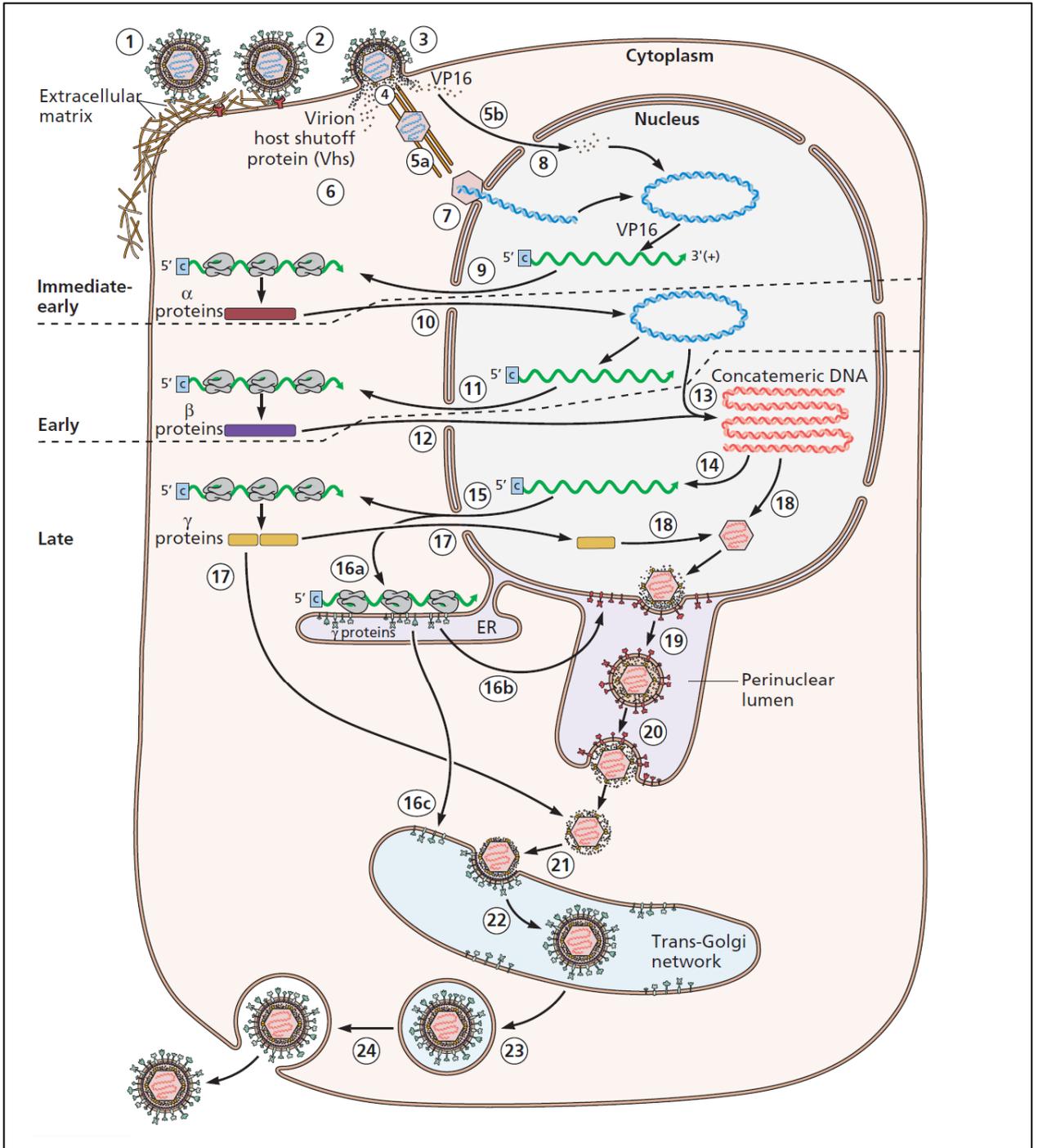
Enquanto na infecção aguda todos os genes virais são expressos, a latência é caracterizada pela mínima expressão de genes, ausência de tradução de proteínas virais líticas e ausência de produção de vírus infeccioso (Bratanich *et al.*, 1992; Geiser *et al.*, 2002; Jaber *et al.*, 2010).

A manutenção da latência é uma fase que dura toda a vida do hospedeiro e é definido como um período em que o vírus infeccioso não é detectado por procedimentos padrão de isolamento de vírus. A manutenção de uma infecção latente requer que o genoma viral seja perpetuado e a célula mantida viva. Muitos membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, incluindo HSV1 e BoAHV1/BoAHV5, expressam níveis abundantes de um transcrito associado à latência (LAT) e transcrito relacionado a latência (LRT) respectivamente em neurônios durante este estágio de latência (Winkler *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2006; Silvestro & Bratanich, 2016; Martinez-Cuesta *et al.*, 2022; Ostler & Jones, 2023). Os produtos do gene LR ajudam a manter a latência inibindo a apoptose e a expressão gênica viral (Bratanich *et al.*, 1992; Geiser *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 2004).

As células com vírus em latência formam um reservatório que periodicamente pode reativar-se, entrando no ciclo de replicação lítico. Essa reativação se inicia mediante a estímulos externos: naturais (estresse, parto, desmame, transporte) ou induzidos (tratamentos com corticoesteróides), que estimulam a expressão de genes virais. Uma vez que novas partículas são formadas, os vírus fazem o caminho anterógrado até os dendritos axonais, chegando até o sítio de infecção inicial, onde ocorre uma lesão. A capacidade dos herpesvírus de reativar-se a partir da latência resulta em infecção recorrente e transmissão viral, o que explica as altas taxas

de disseminação e prevalência dos herpesvírus nas diferentes espécies susceptíveis (Ostler & Jones, 2023).

Figura 4. Ciclo de replicação dos alfa herpesvírus. As fases do ciclo replicativo do HuAHV1 são ilustradas na figura. (1) Adsorção: ligação entre as glicoproteínas gC/gB a receptores a proteoglicanos de heparan sulfato. (2) Interação entre a gD e a nectina 1. (3) Fusão e penetração mediada pelas glicoproteínas gB, gH e gL. (4) Desnudamento e liberação do genoma no interior do núcleo. (5a, 5b) O nucleocapsídeo é transportado até os poros nucleares. (7) O genoma viral é liberado no núcleo. (8, 9) Transcrição do genoma pela ação da RNA polimerase II e replicação do genoma. (10,11,12) Transcrição dos genes *alfa*, *beta* e *gama*. (13,14) Os concatâmeros são clivados durante o processo de montagem. (16,17,18) Morfogênese do capsídeo, seguida do empacotamento do genoma. (19) Brotamento do nucleocapsídeo com a membrana nuclear interna. (20) Fusão do envelope dos vírions primários com a membrana exterior nuclear e liberação dos capsídeos virais no citoplasma. (21, 22) Maturação final no citoplasma por envelopamento secundário do capsídeo via brotamento em vesículas derivadas do complexo de Golgi. (23) Transporte dos vírions em vesículas até a liberação na superfície celular. (24) Liberação dos vírions por exocitose.



Fonte: Adaptado de Flint *et al.*, 2015.

2.8 Alfaherpesvírus bubalino 1 (BuAHV1)

O hospedeiro natural do BuAHV1 é o búfalo d'água (*Bubalus bubalis*), porém em condições experimentais, outros membros da família *Bovidae*, como os bovinos e as cabras, são suscetíveis à infecção por BuAHV1 (Maidana *et al.*, 2016; Camero *et al.*, 2017; Camero *et al.*, 2019). O BuAHV1 foi isolado pela primeira vez do prepúcio de um búfalo saudável (*Bubalus*

bubalis) na Austrália, em 1972 (St George & Philpott, 1972). Anos depois, o BuAHV1 foi isolado na Argentina (Maidana *et al.*, 2014), Itália (De Carlo *et al.*, 2004) e no Irã (Hedayat *et al.*, 2020) a partir de suabes nasais e vaginais de búfalos naturalmente e submetidos a imunossupressão com dexametasona, mas que não apresentavam sinais clínicos.

O BuAHV1 está associado a doença respiratória caracterizada por febre, tosse, secreção nasal e ocular, diarreia (Petrini *et al.*, 2012); assim com também a infecção subclínica em búfalos (St George & Philpott, 1972; De Carlo *et al.*, 2004; Scicluna *et al.*, 2007; Petrini *et al.*, 2012; Maidana *et al.*, 2014). No entanto, também foi detectado DNA de BuAHV1 em tecidos provenientes de abortos de búfalos, o que sugere possível envolvimento em problemas reprodutivos (Amoroso *et al.*, 2013). Em condições experimentais, a rinite foi reportada como a principal manifestação clínica em bovinos e em cabras (Maidana *et al.*, 2016; Camero *et al.*, 2019).

2.9 Alfaherpesvírus bovino 1 (BoAHV1)

Os bovinos são os hospedeiros naturais do BoAHV1; não obstante, a presença de anticorpos tem sido reportada em outras espécies animais domésticas e selvagens da ordem Artiodactyla, como as cabras, ovelhas, búfalos, iaques, cervos e gazelas (Yatsentyuk *et al.*, 2022). Estes achados sugerem que estas espécies também são susceptíveis a infecção por este BoAHV1.

O BoAHV1 foi descrito pela primeira vez na Alemanha no século XIX, mas era reconhecido apenas como uma doença venérea referida como exantema vesicular coital (CVE). Até a década de 50, as principais manifestações reconhecidas causadas por CVE eram vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) em fêmeas e balanopostite pustular infecciosa (IPB) em machos. Posteriormente, no ano de 1955 em Los Angeles, Califórnia, foi relatada uma nova condição clínica associada ao BoAHV1, a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), que foi caracterizada como uma doença respiratória emergente do gado bovino adulto e juvenil (Graham, 2013).

O BoAHV1 é um vírus mundialmente distribuído em bovinos, sendo um agente patológico de elevada importância veterinária. As infecções BoAHV1 podem ser representadas por um iceberg, no sentido de que a maioria delas são assintomáticas ou inaparentes. A infecção com quadro clínico aparente, por sua vez, quando introduzida em um rebanho não previamente exposto pode ser evidenciada por alta morbidade e baixa mortalidade. O BoAHV1 se

subdivide em três subtipos: BoAHV 1.1, BoAHV 1.2a e BoAHV1.2b. Essas subdivisões são baseadas nos perfis obtidos a partir da digestão do genoma desses vírus com enzimas de restrição. Associações entre estes subtipos virais e suas manifestações clínicas têm sido relatadas, embora estas associações não sejam muitas vezes claras. Assim, o BoAHV1.1 está associado a IBR e abortos e o subtipo BoAHV1.2 está associado a uma ampla variedade de manifestações clínicas, incluindo IPV, IPB, conjuntivites, abortos e IBR. Finalmente, os subtipos BoAHV1.2a e BoAHV1.2b se diferenciam clinicamente entre eles pela associação do subtipo 2a a abortos, o que não ocorre com o subtipo 2b. O BoAHV1 é também um dos principais agentes etiológicos do complexo respiratório bovino (CRB) e, eventualmente, pode também causar encefalites fatais (Boswas *et al.*, 2013; Kaur & Chandra, 2016; Maidana *et al.*, 2020).

A patogenia das doenças associadas ao BoAHV1 depende do subtipo e da rota de infecção do vírus. A porta de entrada do BoAHV1 é a mucosa do trato respiratório superior ou a mucosa genital; a transmissão do vírus ocorre por aerossóis ou pelo contato direto entre um hospedeiro infectado e um susceptível. A infecção do trato genital ocorre por contato direto via cobertura ou monta natural ou por inseminação artificial com sêmen contaminado. O vírus é excretado a través de secreções nasais, oculares, placenta de animais abortados e pelo sêmen (Engels & Ackermann, 1996; Oliveira *et al.*, 2011).

Atualmente, o BoAHV1 segue sendo endêmico e ocorre esporadicamente em rebanhos de gado em todo o mundo. Porém, Dinamarca, Finlândia, Noruega, Suécia, Áustria, Alemanha e Suíça apresentam status de países livres de IBR através de vacinação e eliminação de animais positivos (Iscaro *et al.*, 2021). Infecções causadas por BoAHV1 têm sido reportadas na África, Austrália e Ásia. Na América do Sul, as infecções por BoAHV1 apresentam um caráter endêmico com índices de prevalência elevados e variáveis: Uruguai (37%) (Guarino *et al.*, 2008), Equador (43,2%) (Carbonero *et al.*, 2011), Brasil (46,6-84,5%) (Fernandes *et al.*, 2019), Peru (51%) (Stahl *et al.*, 2002) e Venezuela (67%) (Obando *et al.*, 1999).

2.10 Alfaherpesvírus bovino 5 (BoAHV5)

Os bovinos são os hospedeiros naturais do BoAHV5; entretanto, estudos experimentais em ovelhas e cabras demonstraram que estas espécies animais são susceptíveis a infecções com o BoAHV5. Não obstante, a transmissão do vírus entre estas espécies para os bovinos não foi estudada. Enquanto a ocorrência natural de anticorpos de BoAHV5 tem sido relatada em

ovelhas, não há relatos da ocorrência do vírus em animais selvagens (Del Médico *et al.*, 2009; Yatsentyuk *et al.*, 2022).

O primeiro caso de meningoencefalites bovina causada por BoAHV5 foi reportado na Austrália em 1962 (French, 1962). O isolado viral naquele momento foi considerado como uma variante neuropatogênica do BoAHV1 e foi chamado de *bovine encephalitis herpesvirus* (BEHV) ou subtipo 3 de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1.3). Porém, posteriormente, estudos comparativos de BoAHV1 e de BoAHV1.3 demonstram diferentes padrões de restrição enzimática do DNA viral e reatividade cruzada com anticorpos monoclonais (Metzler *et al.*, 1986; d'Offay *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1993; Whetstone *et al.*, 1993). Dessa forma, com base nas diferenças genéticas e antigênicas entre esses vírus, Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*International Committee on Taxonomy of viroses* (ICTV) no ano 1992, reclassificou o BoAHV1.3 como uma nova espécie viral: o BoAHV5 (Roizmann *et al.*, 1992).

Atualmente, se reconhecem três subtipos de BoAHV5: subtipo A (que tem como protótipo a cepa australiana N569), o subtipo B (cepa argentina A663, um recombinante entre BoAHV1 e BoAHV5) e o subtipo C (cepas brasileiras). Até o presente momento, nenhuma associação entre manifestações clínicas e subtipos virais foram definidas (Maidana *et al.*, 2011; Paim *et al.*, 2022).

O BoAHV5 causa meningoencefalites em animais jovens (acima de 8 meses), cujo o curso é rápido e, muitas vezes, fatal. Esta doença neurológica causa varias manifestações clínicas que incluem: anorexia; fraqueza; e sinais neurológicos, como incoordenação, tremor muscular, cegueira, andar em círculos, decúbito, pressão de cabeça, convulsões e morte (Ely *et al.*, 1996; Del Médico *et al.*, 2009; Megid *et al.*, 2015). Ocasionalmente, o BoAHV5 mostrou estar associado a distúrbios reprodutivos em fêmeas afetadas (Del Médico *et al.*, 2009; Kirkland *et al.*, 2009; Favier *et al.*, 2012).

O BoAHV5 parece ter uma distribuição geográfica restrita, detectando-se principalmente na América do Sul, especialmente no Brasil (Rissi *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2009), Uruguai (Pentes *et al.*, 2016), Argentina (Maidana *et al.*, 2011) e Colômbia (Vargas *et al.*, 2016). Porém, surtos esporádicos de meningoencefalites por BoAHV5 tem sido registrados em outros países como Austrália (Kessell, Finnie, & Windsor, 2011), Índia (Kumar *et al.*, 2020), Hungria (Bartha *et al.*, 1969), Irã (Sharifzadeh *et al.*, 2015), Canadá (Gough & James, 1975) e nos Estados Unidos (Barenfus *et al.*, 1963).

2.11 Coevolução

Os herpesvírus vêm coevoluindo com seus hospedeiros ao longo do tempo. Todas as espécies de animais estudadas até o momento demonstraram estar infectadas com pelo menos uma espécie da ordem *Herpesvirales* (Azab *et al.*, 2018; Brito *et al.*, 2021). Na natureza, cada herpesvírus está altamente associado e adaptado a uma única espécie hospedeira. Em função do longo tempo da coevolução, os herpesvírus tendem a passar despercebidos ou causar doenças de baixa gravidade em seus hospedeiros naturais. No entanto, a evolução dos alfa herpesvírus, revelada através de estudos de análises filogenéticas, a ocorrência de recombinações interespecíficas e passagens (*spillovers*) entre hospedeiros, favorecendo a aparição de vírus recombinantes emergentes que poderiam infectar diferentes espécies (Davison, 2002). Eventualmente, entretanto, a troca de espécies pode causar doença grave e letal quando a infecção ocorre em outras espécies animais que não são os seus hospedeiros naturais. Um exemplo disso em bovinos é a febre catarral maligna (MCF) que causa infecção letal em bovinos, enquanto que, em ovelhas e cabras, o vírus causa infecção subclínica (Lechmann *et al.*, 2021). Outro exemplo de *spillover* em humanos é o herpesvírus B de primatas do gênero *Macaca*, que quando infecta humanos, pode causar doença (Huff & Barry, 2003).

2.12 Recombinações

Recombinações interespecíficas têm sido reportadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* entre os alfa herpesvírus humanos 1 e 2 (HuAHV1 e HuAHV2). Também têm sido relatadas recombinações entre os alfa herpesvírus de equinos (EqAHV), particularmente entre o EqAHV1 e EqAHV4, e entre EqAHV4 e EqAHV9 (Tau *et al.*, 2023). Em bovinos, a primeira evidência de recombinações interespecíficas *in vitro* entre BoAHV1 e BoAHV5 foi reportada por Meurens *et al.* (2004). Nesse estudo, foram inoculados alfa herpesvírus de ruminantes com alta similaridade genética. Após a coinfeção em bovinos com os dois vírus, foi possível detectar um ponto de recombinação entre BoAHV1 e BoAHV5. Não foi possível a detecção de recombinações de BoAHV1 com alfa herpesvírus de caprinos (CpAHV1) ou com alfa herpesvírus de cervos (CvAHV1) (Davison, 2002; Meurens *et al.*, 2004; Thiry *et al.*, 2006).

Maidana *et al.* (2017) reportaram a primeira evidência de recombinação natural entre duas espécies de alfa herpesvírus de bovinos. Nesse estudo, três isolados de campo foram identificados como recombinantes entre BoAHV1 e BoAHV5; adicionalmente, foram detectados dois pontos de recombinação no gene *UL27* que codifica a gB. Estes achados

indicam que o subtipo BoAHV5b deveria ser considerado um recombinante natural entre o BoAHV1.2 e o BoAHV5 (Maidana *et al.*, 2017). Recentemente, Romera *et al.* (2022) obtiveram os genomas completos desses recombinantes naturais, e as análises feitas demonstraram um segundo evento de recombinação em dois dos três vírus nos genes *UL11* (que codifica uma proteína do tegumento), *UL10* (gM) e parte do *UL9* (helicase). Essas novas recombinações parecem ter sido originadas independentemente do primeiro evento recombinante envolvendo a gB (Del Médico *et al.*, 2009; Romera *et al.*, 2022). Estes estudos expõem que a co-circulação e a coinfeção de vírus relacionados dentro de um rebanho parecem ser pré-requisitos para que a recombinação ocorra.

A origem e as relações evolutivas de BuAHV1, BoAHV1 e BoAHV5 ainda não foram profundamente examinadas. Estudos prévios revelaram que o BoHV5 apresenta similaridade antigênica maior com BuAHV1 do que com BoAHV1 (Ros & Belak, 1999; De Carlo *et al.*, 2004; Amoroso *et al.*, 2013; Maidana *et al.*, 2014).

2.13 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da infecção por herpesvírus bubalinos e bovinos é baseado no histórico da propriedade, sinais clínicos e lesões observadas no exame clínico do animal suspeito. As principais formas de diagnóstico laboratoriais são as técnicas sorológicas, o isolamento viral em cultivos celulares e os métodos moleculares, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Roehle, 1997; Franco *et al.*, 2012).

2.13.1 Detecção de anticorpos

Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA), a técnica de soro neutralização (SN) é considerado o teste “*gold standard*” ou “padrão ouro” no diagnóstico de infecções por BoAHV1 e BoAHV5, mesmo não permitindo a diferenciação precisa entre essas espécies e os seus subtipos virais. Reações cruzadas entre BoAHV1 e BuAHV1 em SN também têm sido reportadas (Nogarol *et al.*, 2014; Scheffer *et al.* 2023a; 2023b). Títulos de anticorpos neutralizantes não permitem a diferenciação entre infecções causadas por BoAHV1, BoAHV5 e BuAHV1 (Teixeira *et al.*, 1998; Caruso *et al.*, 2016; WOA, 2018; Scheffer *et al.*, 2023).

Assim, até pouco tempo atrás, a identificação e discriminação entre BoAHV1, BoAHV5 e BuAHV1, em animais infectados não era possível devido à alta similaridade antigênica entre

os alfaherpesvírus de ruminantes. Um ELISA indireto baseado na expressão da gE, desenvolvido por Nogarol *et al.* (2014), permitiu a diferenciação entre BoAHV1 e BuAHV1; porém, não permitiu a diferenciação entre o BoAHV5 e BuAHV1, devido a alta similaridade que estes vírus apresentam na suas gE (97%). No entanto, Scheffer *et al.* (2023) desenvolveram um ELISA para múltiplos antígenos (mAgELISA) que permite a diferenciação entre estes vírus. A sensibilidade do teste foi de 96,5% e a especificidade é de 96,1%.

2.13.2 Detecção do vírus ou antígenos virais

O isolamento viral é um método tradicional de diagnóstico, porém atualmente utilizado quase que exclusivamente na pesquisa. O BoAHV1, o BoAHV5 e o BuAHV1 produzem efeito citopático (ECP) em cultivos celulares. O ECP causado por estes vírus se caracteriza por uma desorganização nuclear, arredondamento e desprendimento celular, formação de focos infecciosos com o aspecto de cachos de uvas, lise e corpúsculos intracelulares (Franco *et al.*, 2012).

2.13.3 Detecção de genomas

Os testes moleculares, aqui definidos como aqueles que buscam a identificação de genomas ou segmentos de genomas, têm sido amplamente empregados para a detecção de alfaherpesvírus de ruminantes (Maidana *et al.*, 2020; Degalp *et al.*, 2020). A PCR tem sido o método de diagnóstico mais explorado principalmente devido à sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez de execução (Claus *et al.*, 2005; Esteves *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2009; Diallo *et al.*, 2011). A PCR pode ser adaptada para permitir a diferenciação de diferentes alfaherpesvírus. Uma PCR multiplex convencional que permite a discriminação entre os BoAHV1, BoAHV5 e BuAHV1, com base na amplificação de três regiões alvo dos genomas desses três herpesvírus foi desenvolvida por Oberto *et al.* (2002).

Antes do advento da PCR, a análise de genomas virais com enzimas de restrição (REA) era bastante utilizada. Pode ainda ser útil na identificação e diferenciação entre amostras (Brake & Studdert, 1985; Pidone *et al.*, 1999; D'arce *et al.*, 2002; D'arce *et al.*, 2002; Maidana *et al.*, 2011; Maidana *et al.*, 2020).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve como objetivo investigar a presença de DNA de BoAHV1, BoAHV5 e BuAHV1 nas tonsilas palatinas de búfalos d'água (*Bubalus bubalis*) aparentemente saudáveis, utilizando uma nested PCR (nPCR) tendo como alvo uma região da glicoproteína C (*UL44*), bem como realizar análises genômicas com estes vírus com vistas a determinar o grau de proximidade filogenética entre eles. Foram examinadas tonsilas palatinas de animais abatidos em matadouro no estado do Pará. Um total de 293 amostras de tonsilas palatinas de búfalos d'água foram coletadas. Extrações de DNA revelaram segmentos gnômicos de BoAHV1, BuAHV1 e o BoAHV5 em 19 (6,4%) das amostras. Fica, portanto, evidenciado que BoAHV1, BoAHV5 e BuAHV1 podem infectar búfalos d'água e, portanto, esses animais podem ser considerados reservatórios destes vírus. Análises filogenéticas realizadas neste estudo demonstraram que as três sequências de BoAHV1 agruparam no mesmo grupo que as sequências de referência de BoAHV1.1; das 12 sequências obtidas para BoAHV5, 11 delas agruparam com as sequências de América do sul (Argentina e Brasil) e uma agrupou junto com a sequência de origem Australiana. Todas as quatro sequências de BuAHV1 agruparam com as sequências de origem Indiana. Finalmente, todas as sequências de BuAHV1 obtidas neste estudo, pareceram mais proximamente relacionadas com as sequências dos BoAHV5 que das sequências dos BoAHV1. Para uma melhor compreensão da relação filogenética desses vírus, devido ao pequeno número de genomas depositados em banco de dados para BoAHV5 e para BuHV1, são necessários estudos adicionais sequenciando genomas completos desses vírus.

A identificação de BoAHV5 em bubalinos sugere que estes animais podem servir como fonte de infecção para bovinos e zebuínos, embora não seja possível definir qual seria a espécie de origem dos “spillovers”. O que parece evidente é que a maior similaridade entre BuAHV1 e BoAHV5 sugere que bubalinos podem possivelmente atuar como hospedeiros para a geração de recombinantes. Isto, no entanto, requer futuros estudos para confirmação. Não foi possível a detecção de vírus infeccioso por isolamento viral nas tonsilas palatinas, o que sugere que os bubalinos neste estudo estavam latentemente infectados.

Este é o primeiro relato tanto de detecção de BoAHV5 quanto de um caso de coinfeção natural entre BoAHV1 e BuAHV5 em búfalos d'água. No Brasil, búfalos e bovinos são frequentemente criados juntos em fazendas mistas, o que se torna uma preocupação, para criar recombinações interespecíficas ou *spillovers*. Portanto, como os búfalos podem ser considerados um reservatório para esses vírus, é importante testar esses animais para prevenir a disseminação do vírus entre os animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br/abcb.html>>. Acesso em: 10 jul. 2023.

AKCERMANN, M; ENGELS, M. Pro and contral IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 3-4, p. 293-302.

AMOROSO, M. *et al.* Bubaline herpesvirus 1 associated with abortion in a Mediterranean water buffalo. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 813-816, 2013.

ANTINONE, S. *et al.* The Herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus. **Journal of Virology**, v. 80, n.11, p. 5494-5498, 2006.

AZAB, B. *et al.* How Host Specific Are Herpesviruses? Lessons from Herpesviruses Infecting Wild and Endangered Mammals. **The Annual Review of Virology**, v. 5, n. 1, p. 53-68, 2018.

BARBER, K. *et al.* Protein Composition of the Bovine Herpesvirus 1.1 Virion. **Veterinary Sciences**, v. 4, n. 1, 2017.

BARENFUS, M. *et al.* Isolation of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus from Calves with Meningoencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 143, p. 725–728, 1963.

BARTHA, A. *et al.* Occurrence of encephalitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in hungary. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 19, n. 2, p. 145–151, 1969.

BISWAS, S. *et al.* Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) – a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. **The Veterinary Quarterly**, v. 33, n. 2, p. 68-81, 2013.

BORGHESE, A. Buffalo production and research. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2005.

BRAKE, F.,STUDDERT, M.J. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, p. 331-334, 1985.

BRATANICH, A. C., HANSON, N.D., JONES, C. J. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits the activity of immediate-early transcription unit 1. **Virology**, v. 191, n. 2, p. 988-991, 1992.

BRITO, A. *et al.* Intrahost speciations and host switches played an important role in the evolution of herpesviruses. **Virus Evolution**, v. 7, n.1, 2021.

- CAMERO, M. *et al.* Goats are susceptible to Bubaline alphaherpesvirus 1 infection: Results of an experimental study. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 50, p. 97-100, 2017.
- CAMERO, M. *et al.* Bubaline alphaherpesvirus 1 induces a latent/reactivable infection in goats. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 62, p. 54-57, 2019.
- CAMPOS, F. *et al.* High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 67-73, 2009.
- CARBONERO, A. *et al.* Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 100, n. 1, p. 84-88, 2011.
- CARUSO, C. *et al.* Prevalence of antibodies against Bubaline herpesvirus (BuHV-1) among Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*) with implications in buffalo trade. **The Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 4, p. 184-188, 2016.
- CLAUS, M. *et al.* Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 128, n. 1-2, p. 183-188, 2005.
- CHOTHE, M. *et al.* Whole-Genome Sequences of 18 Bovine Alphaherpesvirus 1 Field Isolates from Pennsylvania and Minnesota. **Genome Announcements**, v. 6, n. 17, 2018.
- COLLINS, J. K. *et al.* Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.1 and bovine encephalitis herpesvirus type 1.3. **The Journal of General Virology**, v. 74, p. 1509–1517, 1993.
- D'ARCE, R.C. *et al.* Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 315-324, 2002.
- DAGALP, S. *et al.* Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) strains from cattle with diverse clinical cases in Turkey. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 2, p. 555-564, 2020.
- DAVISON, A. *et al.* Evolution of the herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 69-88, 2002.
- DAVISON, A. *et al.* The Order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v. 154, n. 1, p. 171-177, 2009.
- DE CARLO, E. *et al.* Molecular characterisation of a field strain of bubaline herpesvirus isolated from buffaloes (*Bubalus bubalis*) after pharmacological reactivation. **The Veterinary Record**, v. 154, n.6, p. 171-174, 2004.
- DELHON, G. *et al.* Genome of Bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347, 2003.

DEL MÉDICO, M. *et al.* Biology of bovine herpesvirus 5. **Veterinary Journal**, v. 184, n. 2, p. 138-145, 2009.

DEL MÉDICO, M. *et al.* Characterization of interspecific recombinants generated from closely related bovine herpesviruses 1 and 5 through multiple PCR sequencing assays. **Journal of Virological Methods**, v. 161, n. 1, p. 75-83, 2009.

DIALLO, I.; CORNEY, B.; RODWELL, B. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 175, n. 1, p. 46-52, 2011.

D'OFFAY, J. M. *et al.* Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 4, p. 534–539, 1993.

ELY, R.W. *et al.* Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 4, p. 487-492, 1996.

ENGELS, M., ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 3–15, 1996.

ESTEVEZ, P. *et al.* Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). **Virus Research**, v. 131, n. 1, p. 16-22, 2008.

FAO. Gateway to dairy production and products. Dairy animals: Buffaloes. **Food and Agriculture Organization of the United States**, 2024.

FAVIER, P., MARIN, M.S., PÉREZ, S.E. Role of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in diseases of cattle. Recent findings on BoHV-5 association with genital disease. **Open Veterinary Journal**, v. 2, n. 1, p. 46-53, 2012.

FAVIER, P. *et al.* Latency of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in tonsils and peripheral blood leukocytes. **Veterinary Journal**, v. 202, n. 1, p. 134-140, 2014.

FERNANDES, L. *et al.* Bayesian estimation of herd-level prevalence and risk factors associated with T BoHV-1 infection in cattle herds in the State of Paraíba, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 169, 2019.

FRANCO, A.C. *et al.* Herpesviridae, p.517-584. In: Flores E.F. (Ed.), **Virologia Veterinária**. Editora UFSM, 1136 pp. Santa Maria, 2017.

FRENCH, E. L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, p. 216-221, 1962.

FUSCO, G. *et al.* First report of natural BoHV-1 infection in water buffalo. **The Veterinary Record**, v. 177, n. 6, 2015.

GATHERER, D. ICTV Virus Taxonomy Profile: Herpesviridae 2021. **Journal of General Virology**, v. 102, n. 10, 2021.

GEISER, V. *et al.* The latency related (LR) gene of bovine herpes virus 1 (BHV-1) can inhibit the ability of BICP0 to activate productive infection. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2965-2971, 2002

GIBBS, E.; RWEYEMAMU, M. Bovine herpesvirus. Part 1. Bovine herpesvirus. **Veterinary Bulletin**, v. 47, n. 5, p. 317-343, 1977.

GONÇALVES, M. Análises filogenéticas de genomas de alphaherpesvírus bovino tipo 1 e 5 e alphaherpesvírus bubalino tipo 1. 65f. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós Graduação em Saúde Animal (PPGSA), Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, 2023.

GOUGH, A.; JAMES, D. Isolation of IBR virus from a heifer with meningoencephalitis. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 16, n.10, p. 313–314, 1975.

GRAHAM, D. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle—a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. **Irish Veterinary Journal**, v. 66, n. 1, 2013.

GRAZZIOTTO, N. *et al.* Susceptibilidad de los búfalos de agua frente a diferentes enfermedades infecciosas. **Veterinaria**, v. 31, n. 4, p. 215-223, 2020.

GUARINO, H. *et al.* Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 85, n. 1-2, p. 34-40, 2008.

HEDAYAT, N. *et al.* Isolation and identification of bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) from latently infected water buffalo (*Bubalus bubalis*) from Iran. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 1, p. 217-226, 2020.

HENDERSON, G. *et al.* The latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavage during productive infection. **Journal of Neurovirology**, v. 10, n. 1, p. 64–70, 2004.

HUFF, J. L., & BARRY, P. A. B-virus (Cercopithecine herpesvirus 1) infection in humans and macaques: potential for zoonotic disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 246-250, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Rebanho de Bubalinos (Búfalos). **Estatística da Produção Pecuária**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bubalinos/br>>. Acesso em: 05 set. 2023.

ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*). **Virus Taxonomy Profile: Orthoherpesviridae 2021**. Disponível em:<<https://ictv.global/report/chapter/orthoherpesviridae/orthoherpesviridae>>. Acesso em: 07 oct. 2023.

- ISCARO, C. *et al.* Control programs for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in European countries: an overview. **Animal Health Research Reviews**, v. 22, n.2, p. 136-146, 2021.
- JABER, T., WORKMAN, A., JONES, C. J. Small noncoding rnas encoded within the bovine herpesvirus 1 latency-related gene can reduce steady-state levels of infected cell protein 0 (BICP0). **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6297-6307, 2010.
- JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 79–95, 2003.
- JONES, C. *et al.* Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. **Veterinary Microbiolgy**, v. 113, n. 3-4, p. 199-210, 2006.
- KAHRS R. F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 10, p. 1055–1064, 1977.
- KAUR, G.; CHANDRA, M. Herpesvirus in Bovines: Importance of Bovine Herpesvirus Type 1. **InTech Open**, 2016.
- KESSELL, A.; FINNIE, L.; WINDSOR, P. Neurological diseases of ruminant livestock in Australia. IV: viral infections. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 9, p. 331-337, 2011.
- KIRKLAND, P.D. *et al.* Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. **The Veterinary Record**, v. 165, n. 4, p. 111-113, 2009.
- KRUMMENACHER, C. *et al.* Comparative usage of herpesvirus entry mediator A and nectin-1 by laboratory strains and clinical isolates of herpes simplex virus. **Virology**, n. 322, n. 2, p. 286-299, 2004.
- KUMAR, N. *et al.* Isolation and characterization of bovine herpes virus 5 (BoHV5) from cattle in India. **PloS ONE**, v. 15, n. 4, 2020.
- LECHMANN, L. *et al.* Viral infections shared between water buffaloes and small ruminants in Switzerland. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 33, n. 5, p. 894-905, 2021.
- LOVATO, L. *et al.* Infection of Cattle with a Bovine Herpesvirus 1 Strain That Contains a Mutation in the Latency-Related Gene Leads to Increased Apoptosis in Trigeminal Ganglia during the Transition from Acute Infection to Latency. **Journal of Virology**, v. 77, n. 8, p. 4848-4857, 2003.
- MACCIOTTA, N. *et al.* The distribution of runs of homozygosity in the genome of river and swamp buffaloes reveals a history of adaptation, migration and crossbred events. **Genetics, Selection, Evolution**, v. 53, n. 20, 2021.
- MAIDANA, S. *et al.* Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. **BMC Veterinary Reserch**, v. 7, n.8, 2011.

- MAIDANA, S. *et al.* First report of isolation and molecular characterization of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) from Argentinean water buffaloes. **Archives of Virology**, v. 159, n. 11, p. 2917-2923, 2014.
- MAIDANA, S. *et al.* Cattle are a potential reservoir of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1). **Veterinary Record Open**, v.3, n. 1, 2016.
- MAIDANA, S. *et al.* Evidence of natural interspecific recombinant viruses between bovine alphaherpesviruses 1 and 5. **Virus Research**, v. 242, p. 122-130, 2017.
- MAIDANA, S. *et al.* A new molecular method for the rapid subtyping of bovine herpesvirus 1 field isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 1, p. 112-117, 2020.
- MARTÍNEZ-CUESTA, L. *et al.* Expression of apoptosis-related genes at different stages of BoHV-1 and 5 infection of bovine neural tissue. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, p. 90-91, 2022
- MEGID, J. *et al.* Outbreak Control and Clinical, Pathological, and Epidemiological Aspects and Molecular Characterization of a Bovine Herpesvirus Type 5 on a Feedlot Farm in São Paulo State. **BioMed Research International**, 2015.
- METTENLEITER, T. Herpesvirus Assembly and Egress. **Journal of Virology**, v.76, n. 4, p. 1537-1547, 2002.
- METTENLEITER, T.; KLUPP, B.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: An update. **Virus Research**, v. 143, n. 2, p. 222-234, 2009.
- METZLER, A. E., SCHUDEL, A. A., ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v. 87, n. 3-4, p. 205–217, 1986.
- MEURENS, F. *et al.* Interspecific Recombination between Two Ruminant Alphaherpesviruses, Bovine Herpesviruses 1 and 5. **Journal of Virology**, v. 78, n. 18, p. 9828-9836, 2004.
- MINERVINO, A. *et al.* Bubalus bubalis: A Short Story. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, 2020.
- MUYLKENS, B. *et al.* Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, P. 181-209, 2007.
- MWEENE, A.S. *et al.* Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. **The Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 3, p. 165–174, 1996.
- NANDI, S. *et al.* Bovine herpes virus infectious in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 85-98.
- NOGAROL, C. *et al.* Expression and antigenic characterization of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) glycoprotein E and its potential application in the epidemiology and control of

alphaherpesvirus infections in Mediterranean water buffalo. **Journal of Virological Methods**, v. 207, p. 16–21, 2014.

OBANDO, R.C. et al. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 41, p. 271-278, 1999.

OBERTO, F. *et al.* Qualitative PCR Assay for the Discrimination of Bubaline Herpesvirus 1, Bovine herpesvirus 1 and Bovine Herpesvirus 5. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, 2022.

OLIVEIRA, M. *et al.* Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v. 75, n.6, p. 1393-1145, 2011.

OSTLER, J.; JONES, C. The Bovine Herpesvirus 1 Latency-Reactivation Cycle, a Chronic Problem in the Cattle Industry. **Viruses**, v. 15, n. 2, 2023.

PAIM, W. *et al.* Complete Genome Sequences of Two Bovine Alphaherpesvirus 5 Subtype C Strains from Southeast Brazil. **Microbiology Resource Announcements**, v. 11, n. 2, 2022.

PELLET, P; ROIZMAN, B. The Family Herpesviridae: A brief introduction. **Fields Virology**, v. 2, p. 2479-2499, 2007.

PEREZ, S. *et al.* Latency-Related Gene Encoded by Bovine Herpesvirus 1 Promotes Virus Growth and Reactivation from Latency in Tonsils of Infected Calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 393-401, 2005.

PIDONE, C.L. *et al.* Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 46, n. 7, p. 453-456, 1999.

PUENTES, R. *et al.* Comparison between DNA Detection in Trigeminal Nerve Ganglia and Serology to Detect Cattle Infected with Bovine Herpesviruses Types 1 and 5. **PloS ONE**, v. 11, n. 5, p. 251-260, 2016.

RISSI, D.R. et al. Meningoencephalitis by bovine herpesvirus-5. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 27, n. 7, 2007.

ROEHE, P. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 41-44, 1997.

ROIZMANN, B. *et al.* The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v. 123, n. 3-4, p. 425-449, 1992.

ROMERA, S. *et al.* Whole-genome analysis of natural interspecific recombinant between bovine alphaherpesviruses 1 and 5. **Virus Research**, v. 309, 2022.

ROS, C.; BELAK, S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1247-1253, 1999.

- SCHEFFER, C. Relações genômicas e sorológicas entre o alfaherpesvírus bubalino tipo 1 (BuHV1) e os alfaherpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV1) e 5 (BoHV5). 89f. **Dissertação de Doutorado**. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- SCHEFFER, C. Genome sequence of bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) isolated in Australia in 1972. **Archives of Virology**, v. 162, n. 5, p. 1169–1176, 2017.
- SCHEFFER, C. *et al.* An ELISA to Detect Antibodies to Bovine Alphaherpesviruses 1 and 5 and Bubaline Alphaherpesvirus 1 in Cattle Sera. **Veterinary Science**, v. 10, n. 2, 2023.
- SCHEFFER C. *et al.* Neutralizing antibodies to bovine and bubaline alphaherpesviruses in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 1231-1237, 2023.
- SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 17-29, 1996.
- SCICLUNA, M.T. *et al.* Epidemiological situation of Herpesvirus infections in buffalo herds: Bubaline Herpesvirus1 or Bovine Herpesvirus1? **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 845-849, 2007.
- SCICLUNA, MT. *et al.* Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of Bovine Herpesvirus 1 infection?. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 81-88, 2010.
- SHARIFZADEH, A. *et al.* Bovine herpesvirus type 5 in semen samples from bulls in Iran. **Archives of Virology**, v. 160, n. 1, p. 235–239, 2015.
- STAHL, K. *et al.* Bulk milk testing for antibody seroprevalences to BVDV and BHV-1 in a rural region of Peru. **Preventive Veterinary Medicine**, V. 56, P. 193–202, 2002.
- ST GEORGE, T.; PHILPOTT, M. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 3, 1972.
- TAU, R. *et al.* Comprehensive Analysis of Equid Herpesvirus Recombination: An Insight Into the Repeat Regions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 130, 2023.
- TEIXEIRA, M. F. B. *et al.* Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 4, n. 1, p. 61-65, 1998.
- TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Advances in Virus Research**, v. 45, p. 191–223, 1995.
- THIRY, J. *et al.* Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 169-190, 2006.

TURNER, A. *et al.* Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. **Journal of Virology**, v. 72, n.1, p. 873-875, 1998.

VARGAS, D. *et al.* Serological evaluation of bovine herpesvirus 1 and 5 in cattle-breeding systems on Colombia's high plains. **Revista MVZ Córdoba**, vol. 21, n. 2, p. 5381-5389, 2016.

VILLANUEVA, M. *et al.* Emerging Infectious Diseases in Water Buffalo - An Economic and Public Health Concern, **Intech Open**, 2018.

VOGEL, F.S. *et al.* Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, 2003.

WANG, P. *et al.* Detection of bovine herpesvirus-1 in peripheral blood mononuclear cells eight months postinfection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 5, p. 424-427, 2001.

WHETSTONE, C. A., SEAL, B. S., MILLER, J. M. Variability occurs in the inverted repeat region of genomic DNA from bovine herpesvirus 1 respiratory, genital and bovine herpesvirus 5 encephalitic isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 38, n. 1-2, p. 181-189, 1993.

WINKLER, M.T. *et al.* Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. **Journal of Virology**, v. 74, n. 11, p. 5337-5346, 2000.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). INFECTIOUS RHINOTRACHEITIS / INFECTIOUS PUSTULAR VULVOVAGINITIS. **WOAH terrestrial manual**. Disponível em:
<https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.11_IBR_IPV>.
Acesso em: 17 dec. 2024.

WU, L. *et al.* Alphaherpesvirus Major Tegument Protein VP22: Its Precise Function in the Viral Life Cycle. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 1908, 2020.

YATSENYUK, S. *et al.* The first study on the occurrence of bovine herpesviruses in the wild fauna of the Moscow region, Russia. **Veterinary World**, v. 15, n. 8, p. 2052-2058, 2022.