



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Lilian Gonçalves do Nascimento

**Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5:  
revisão e situação atual no Brasil**

Monografia apresentada para a conclusão do  
Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília.

BRASÍLIA - DF  
JULHO/2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Lilian Gonçalves do Nascimento

**Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5:  
revisão e situação atual no Brasil**

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Orientadora

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Perecmanis

BRASÍLIA - DF  
JULHO/2016

Nascimento, Lilian Gonçalves do

Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5: revisão e situação atual no Brasil/ Lilian  
Gonçalves do Nascimento; Orientação de Simone Perecmanis. –  
Brasília, 2016.

51 p.: il

Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária, 2016.

Herpesvírus bovino 1 2. Herpesvírus bovino 5 3. Encefalites

### **Cessão de direitos**

Nome do Autor: Lilian Gonçalves do Nascimento

Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5: revisão e situação atual no Brasil

Ano: 2016.

É concedida a Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Lilian Gonçalves do Nascimento

CPF: 035.804.481-29

AOS 4 bloco E apt. 504 - Octogonal

70660-045 – Brasília/DF – Brasil

(61) 98136-7320. liliang.nascimento@gmail.com

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: NASCIMENTO, Lilian Gonçalves do

Título: Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5: revisão e situação atual no Brasil

Monografia apresentada para a conclusão do  
Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília.

Aprovado em: 07/07/2016

Banca Examinadora

Profa. Dra. Simone Perecmanis

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Fabrício Souza Campos

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dr. Bruno Stéfano Lima Dallago

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eliane e Leonardo, que sempre acreditaram no meu potencial e nunca mediram esforços para me proporcionar a melhor educação possível. E aos meus irmãos, Otto e Alice, que apesar de ainda não entenderem o que está acontecendo, são uma parte muito importante de mim.

Ao Matheus, meu melhor amigo, namorado e companheiro de tantos anos. Obrigada por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. E a sua família que já considero minha.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB que me proporcionaram momentos felizes e de grande aprendizagem. Em especial ao Prof. Dr. Fernando Pacheco, que me despertou a paixão pela biologia molecular e por todos os ensinamentos durante os trabalhos de iniciação científica.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Perecmanis, por me receber de braços abertos em seu laboratório na reta final da graduação. Obrigada por todos os conselhos e por estar sempre disposta a me ajudar.

A toda a equipe do LVCA-FIOCRUZ por terem me recebido de braços abertos e me ajudarem durante a realização do estágio supervisionado, especialmente ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, Dr. Túlio Fumian e Dr. Eduardo Volotão por estarem sempre dispostos a me ajudar durante este período. Não poderia deixar de agradecer a técnica Janaína e aos alunos de iniciação científica: Mariana, Pedro, Thati e Christian pela amizade e por tornar o ambiente de trabalho mais descontraído.

A todos os amigos e colegas que conheci durante o curso de medicina veterinária, especialmente Patrícia, Thalita, Paula, Beto, Igor pela amizade, parceria e por me aturarem durante todos esses anos. E a todos os amigos que fiz graças ao *Ciências Sem Fronteiras*, que me permitiu conhecer pessoas incríveis e ter uma das experiências mais ricas da minha vida.

E por fim, ao meu cachorro, Thomas, por me mostrar a forma mais pura de amor.

*“Viver é desenhar sem borracha.”*

*Millôr Fernandes*

## RESUMO

Nascimento, L.G. Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5: revisão e situação atual no Brasil. 2016. 39 p. Monografia - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

As doenças que causam alterações no sistema nervoso central são de grande importância para a espécie bovina devido aos prejuízos anuais de centenas de milhões de dólares, provocados pela morte de milhares de animais. O herpesvírus bovino 5 (BoHV-5), agente etiológico da meningoencefalite herpética, é um importante patógeno de bovinos jovens e adultos e um dos principais agentes associados a encefalites virais em bovinos. O herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) pode apresentar-se na forma respiratória e genital estando também associado a abortos e encefalites. Tanto o BoHV-1 quanto o BoHV-5, pertencem a subfamília *Alphaherpesvirinae* e ao gênero *Varicellovirus*, e compartilham diversas propriedades biológicas, antigênicas e moleculares. Por conta da semelhança entre eles, o diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser associado a testes sorológicos ou moleculares para a confirmação do diagnóstico. O BoHV-1 apresenta-se distribuído de forma endêmica no Brasil, mas sua prevalência varia de acordo com finalidade do rebanho e com a região. Entretanto, pouco se sabe sobre sua incidência nos quadros de encefalite. Diferentemente da maioria dos diagnósticos sorológicos, a utilização de técnicas moleculares permitiu a diferenciação entre o BoHV-1 e o BoHV-5. Apesar da produção de vários estudos, não se conhece a prevalência do BoHV-5 no rebanho brasileiro, mas da mesma forma que ocorre no BoHV-1, há indícios de diferenças na incidência nas diferentes regiões. Desta forma, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão sobre o BoHV-1 e o BoHV-5 e avaliar a situação desses agentes no rebanho brasileiro.

**PALAVRAS CHAVE:** Herpesvírus bovino; BoHV-1; BoHV-5; Encefalites.

## ABSTRACT

Nascimento, L.G. Bovine herpesvirus type 1 and 5: review and current situation in Brazil. 2016. 39 p. Monografia Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Diseases responsible for changes in the central nervous system are of extreme importance for bovine species due to the losses of hundreds of millions of dollars every year, caused by the death of thousands of animals. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5), the etiological agent of herpes encephalitis, is an important pathogen in young cattle and in adults, being one of the main agents associated with viral encephalitis. Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) may present itself in a respiratory or genital disease, and have also being associated with encephalitis. Both, BoHV-1 and BoHV-5, belong to the subfamily *Alphaherpesvirinae* and genus *Varicellovirus*, and share several biological, antigenic and molecular properties. Due their similarity, the clinical and epidemiological diagnosis must be associated with serological or molecular tests to confirm the diagnosis. The BoHV-1 presents an endemic distribution in Brazil, but its prevalence varies according to the purpose of livestock and on region. However, little is known about its incidence in cases associated with encephalitis. Unlike most of serologic diagnosis, the use of molecular techniques allowed the differentiation between the BoHV-1 and BoHV-5. Despite of all the studies produced, the prevalence of BoHV-5 in the Brazilian herd is still unknown, however, just like the BoHV-1, there are evidences of difference in its incidence in the different regions. Therefore, the goal of this paper is to conduct a review of BoHV-1 and BoHV-5 and assess the situation of these agents in the Brazilian herd.

**KEYWORDS:** Bovine herpesvirus; BoHV-1; BoHV-5; Encephalitis.



## SUMÁRIO

### **PARTE I: Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5: revisão e situação atual no Brasil**

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Classificação viral.....	12
2.2. Genoma do BoHV-1 e BoHV-5 e suas glicoproteínas virais.....	16
2.3. Replicação viral.....	19
2.3.1. Início da infecção viral.....	19
2.3.2. Replicação lítica.....	19
2.3.3. Latência.....	21
2.4. Patogenia e enfermidades relacionadas ao BoHV-1 e BoHV-5.....	23
2.4.1. Rinotraqueíte infecciosa bovina.....	23
2.4.2. Vulvovaginite pustular infecciosa e balanopostite pustular infecciosa.....	23
2.4.3. Encefalite.....	24
2.4.4. Diagnóstico diferencial.....	24
2.5. Métodos diagnóstico.....	26
2.5.1. Isolamento Viral.....	26
2.5.2. Diagnóstico Sorológico.....	26
2.5.3. Diagnóstico Molecular.....	27
2.6. Epidemiologia.....	29
2.6.1. Situação no Brasil – BoHV-1.....	29
2.6.2. Situação no Brasil – BoHV-5.....	31
2.6.3. Conclusão.....	34

### **PARTE II RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO**

1. INTRODUÇÃO.....	36
2. LABORATÓRIO DE VIROLOGIA COMPARADA E AMBIENTAL.....	36
3. CONCLUSÃO.....	40
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>41</b>

## **PARTE I: Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5: revisão e situação atual no Brasil**

### **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo com quase 214 milhões de cabeças (MAPA, 2015), sendo responsável por cerca de 19,6% da movimentação de carne bovina mundial (USDA, 2016). Isso exige do país o cumprimento de regras de biossegurança com relação as doenças infectocontagiosas e zoonóticas. Dentre estas, as doenças que causam alterações no sistema nervoso central (SNC) são de grande importância para a espécie bovina, por acarretarem prejuízos anuais de centenas de milhões de dólares, provocados pela morte de milhares de animais (BRASIL, 2009).

Após o surgimento da encefalopatia espongiforme bovina (EEB) na Inglaterra em 1986 (WELLS et al., 1987) e sua associação com uma nova variante da doença de Creutzfeldt-Jacob (vCJD) em humanos (WILL et al., 1996; ALMOND & PATTISON, 1997) a vigilância sobre as doenças de quadro neurológico exigiu aprimoramento do diagnóstico diferencial.

Apesar de nunca ter sido notificado no país um caso clássico de EEB (OIE, 2016) é de extrema importância que o Brasil seja capaz a identificar todas as doenças que possam afetar o SNC de bovinos, possuindo assim um sistema eficaz para a diferenciação das possíveis causas de encefalites (CLAUS et al., 2002)

Vários estudos retrospectivos das doenças que acometem o SNC vêm sendo realizado em diversas regiões do Brasil nos últimos anos, mas apesar da importância do diagnóstico, uma parcela significativa dos casos apresentou um resultado inconclusivo. Nos casos que foram possíveis definir a etiologia a maioria está relacionado a alterações inflamatórias produzidas por vírus, estando associados principalmente ao vírus da raiva e ao herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) (RIET-CORREA et al. 1998; SANCHES et al., 2000; LEMOS, 2005; GALIZA et al., 2010; RIBAS et al., 2013; SOUZA, 2013).

O BoHV-5 é o agente etiológico da meningoencefalite viral bovina, uma enfermidade frequentemente detectada em animais jovens (RISSI et al., 2007). Em função da similaridade morfológica, molecular e antigênica com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), o BoHV-5 ficou durante muitos anos conhecido como uma variante neuropática do BoHV-1, sendo previamente denominado BoHV-1.3 (ROIZMAN et al,1992).

O BoHV-1 é um importante patógeno em bovinos, sendo responsável por grandes perdas econômicas (HAGE et al. 1996), estando relacionado a uma ampla gama de manifestações clínicas que envolvem, principalmente, o trato respiratório e o trato genital, podendo também estar relacionado a abortos (KAHRS, 2001) e, mais raramente, a casos de encefalites (ROELS et al., 2000; SILVA et al., 2007).

A similaridade genotípica e fenotípica entre esses dois herpesvírus dificulta a diferenciação desses agentes, mas já existem técnicas capazes de diferenciá-los. Apesar de já ter sido produzido vários trabalhos no país com esse intuito, ainda não se sabe a real prevalência do herpesvírus 1 e 5 no rebanho nacional.

Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão sobre o BoHV-1 e o BoHV-5 e avaliar a situação desses agentes no rebanho brasileiro.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

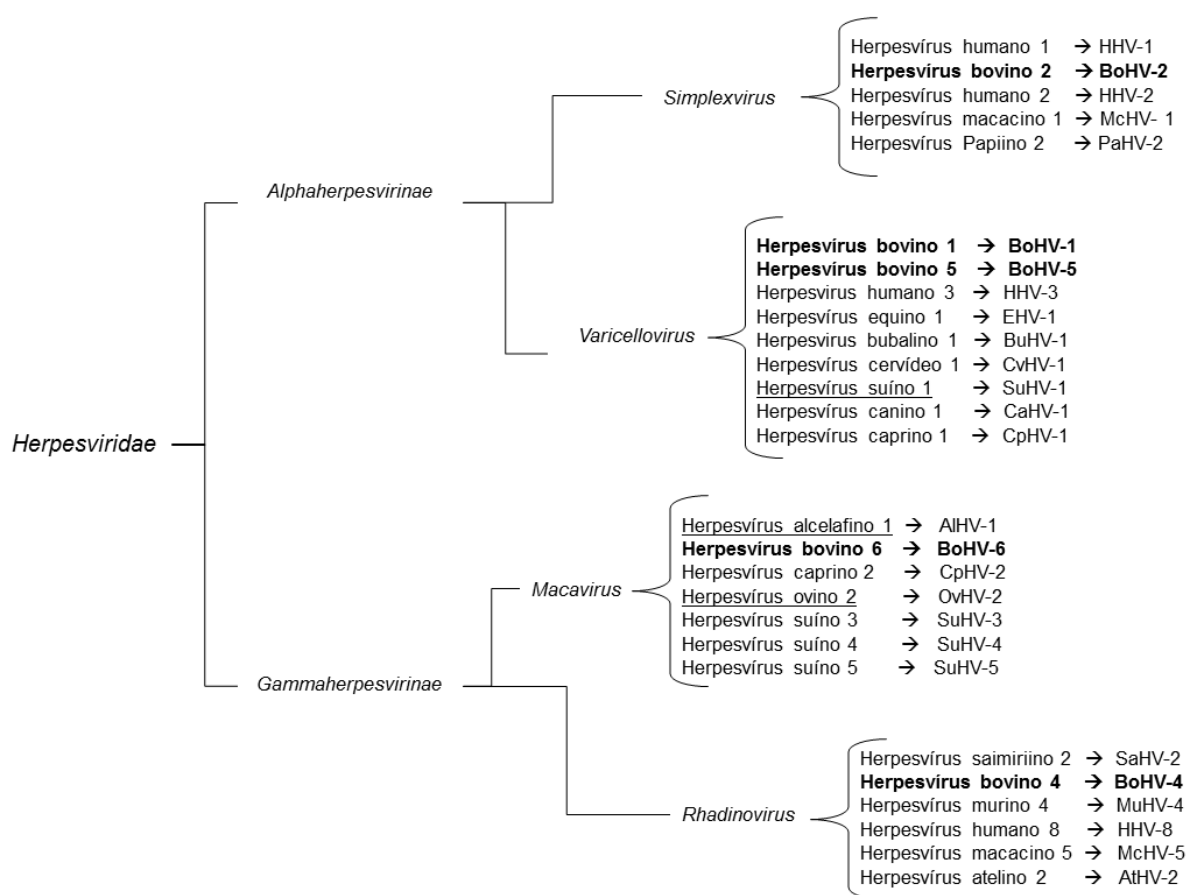
### 2.1. Classificação viral

Taxonomicamente, a ordem *Herpesvirales* é composta por três famílias, 19 gêneros e 103 espécies. A família *Hesperviridae* é dividida em três subfamílias, chamadas de *Alpha-*, *Beta-* e *Gammaherpesvirinae*, onde estão classificados os herpesvírus de mamíferos, aves e répteis (ICTV, 2015). Os vírus da família *Herpesviridae* tem coevoluído com seus hospedeiros por milhares de anos sendo extremamente adaptados a eles e, de modo geral, estão estritamente relacionados com uma única espécie hospedeira. Possuem uma baixa patogenicidade em seus hospedeiros naturais, mas podem ser extremamente patogênicos quando ocasionalmente afetam outras espécies, podendo causar doença grave ou até morte (ROIZMAN & PELLET, 2013; DAVISON, 2002).

Diferentemente das outras subfamílias, a *Alphaherpesvirinae* é caracterizada por possuir uma ampla gama de hospedeiros. Possui um ciclo replicativo curto, disseminação rápida em cultivo celular e destruição eficiente das células infectadas, além da capacidade de estabelecerem infecção latente principalmente, mas não exclusivamente, em gânglios sensoriais. Esta subfamília abriga importantes patógenos humanos e animais, como os herpesvírus humano 1, 2 e 3, os herpesvírus bovino 1, 2, 4 e 5, o herpesvírus equino 1, o herpesvírus caprino 1 e o herpesvírus suíno 1, que é responsável pela doença de Aujeszky, também conhecida como pseudorraiva (ROIZMAN & PELLET, 2013) (Figura 1).

A subfamília *Betaherpesvirinae* é caracterizada por possuir uma gama restrita de hospedeiros. O seu ciclo reprodutivo pode ser longo, durando mais de 7 dias, e a infecção em cultura de células progride lentamente, com as células infectadas apresentando citomegalia. Podem estabelecer latência em glândulas secretórias, células linforeticulares, rins e outros tecidos. Fazem parte desta subfamília o gênero *Citomegalovírus*, *Muromegalovirus*, *Proboscivirus* e *Roseolovirus* (ROIZMAN & PELLET, 2013), mas não existe nenhum vírus nesta subfamília que tenha a capacidade de infectar bovinos.

A subfamília *Gammaherpesvirinae* também possui uma gama restrita de hospedeiros. São caracterizados por causar latência em tecidos linfóides, e possuem tropismo por linfócitos do tipo B e T. Esta subfamília atualmente é composta por quatro gêneros: *Lymphocryptovirus*, *Macavirus*, *Percavirus* e *Rhadinovirus* (ROIZMAN & PELLET, 2013). O herpesvírus ovino 2 e o herpesvírus alcelafino 1, pertencentes ao gênero *Macavirus* são os principais agentes causadores da febre catarral maligna (FMC) em bovinos (OIE, 2013) (Figura 1).



**Figura 1** – Classificação taxonômica de algumas espécies de herpesvírus. Em destaque as espécies de herpesvírus descritas em bovinos (negrito). Sublinhado, os herpesvírus de outras espécies que causam doenças em bovinos (SuHV-1 – Pseudoraiva ; OvHV-2 e AIHV-1-febre catarral maligna).

Até o presente momento foram descritos cinco espécies diferentes de herpesvírus bovinos. Dentro da subfamília *Gammaherpesvirinae* temos os herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4), pertencente ao gênero *Rhadinovirus* e o herpesvírus bovino tipo 6 (BoHV-6), pertencente ao gênero *Macavirus*. Na

subfamília *Alphaherpesvirinae* temos o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2), pertencente ao gênero *simplexvirus* e, os herpesvírus bovino tipo 1(BoHV-1) e herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), pertencentes ao gênero *Varicellovirus*. (ICTV, 2015).

O BoHV-4 já foi detectado no rebanho bovino em diversos países (METZLER & WYLER, 1986; PARK & KENDRICK, 1973; CASTRUCCI et al., 1986; MEHROTRA et al., 1986), sendo encontrado em bovinos em condições clínicas variadas: peritonite, infertilidade, metrite, vulvovaginite, fetos abortados, morte súbita de neonatos, pneumonia (CASTRUCCI et al., 1987; VAN OPDENBOSCH et al., 1988). Entretanto, o vírus também já foi isolado em animais aparentemente saudáveis (FRAZIER et al., 2002; MONGE et al., 2006). Devido ao observado em estudos experimentais e com base na epidemiologia observada, a alta prevalência do vírus em animais que apresentam metrite, abortos e/ou infertilidade em relação a prevalência em fêmeas saudáveis, sugere que este vírus esteja relacionado a distúrbios reprodutivos (NAEEM et al., 1989; BILGE-DAGALP et al., 2007; GUR & DOGAN, 2010).

BoHV-6, também conhecido como herpesvirus linfotrópico bovino (Bovine lymphotropic herpesvirus – BLHV, em inglês), foi isolado pela primeira vez de leucócitos de bovinos com linfossarcoma nos Estados Unidos (VAN DER MAATEN & BOOTHE, 1972), sendo posteriormente reportado na Europa e no Canadá, em casos de vacas que sofreram de metrite crônica pós-parto não responsiva a tratamento convencional com antibiótico (COBB et al. 2006; BANKS et al. 2008, GARIGLIANY et al. 2013) e em fetos abortados (GAGNON et al. 2010). Seu modo de transmissão ainda é desconhecido e sua relação com doenças linfoproliferativas e sua associação com outras doenças em bovinos ainda não foi totalmente elucidada (BANKS et al., 2008).

O BoHV-2 possui duas apresentações clínicas distintas, podendo causar mamilite herpética, caracterizada por lesões vesiculares nos tetos que podem ocasionalmente se disseminar pelo úbere ou pode apresentar-se como dermatose nodular atípica que causa lesões generalizadas na pele (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977).

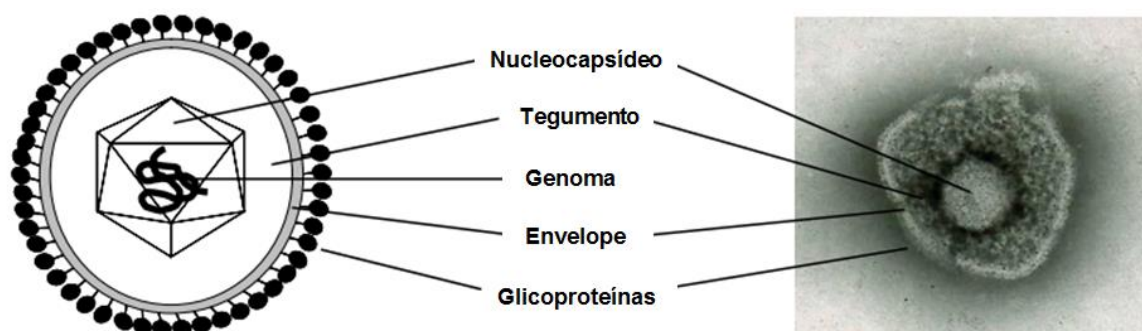
As afecções causadas pelo BoHV-1 estão geralmente relacionadas com problemas de ordem respiratória e reprodutiva, causando perdas significativas na pecuária (HAGE et al. 1996). O BoHV-1 é dividido em dois subtipos, o BoHV-1.1 e BoHV-1.2, sendo o BoHV-1.2 ainda subdividido em BoHV-1.2a e BoHV-1.2b. O BoHV-1.1, geralmente mais virulento, está associado a cepas que causam doença respiratória clássica, já o subtipo BoHV-1.2a corresponde ao grupo associado a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), balanopostite pustular infecciosa (IPB), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e abortos, enquanto o BoHV-1.2b também se associa às doenças respiratórias, IPV/IPB, porém não há relatos de casos associados a abortos (MILLER et al., 1991).

O BoHV-5 tem sido isolado de animais com doença neurológica, principalmente, em bovinos jovens (RISSI et al., 2007). Durante muitos anos foi considerado como um subtipo de BoHV-1, sendo classificado como BoHV-1.3, devido às suas semelhanças estruturais, biológicas, antigênicas e moleculares (TEIXEIRA et al., 1998).

O BoHV-1 e o BoHV-5 podem estar associados a outras síndromes clínicas, sendo detectados em diferentes circunstâncias. O BoHV-5, por exemplo, já foi isolado no sêmen de touros com doença genital (KIRKLAND et al., 2009), no sêmen de touros saudáveis (GOMES et al., 2003), em tecidos de fetos abortados e em órgãos (baço e pulmão) de animais com infecções sistêmicas (SUAREZ-HEINLEIN et al., 1993). Já o BoHV-1 foi detectado no encéfalo de bovinos com ou sem doença neurológica (FURUOKA et al., 1995; ELY et al., 1996; ROELS et al., 2000; PENNY et al., 2002; SILVA et al., 2007).

## 2.2. Genoma do BoHV-1 e BoHV-5 e suas glicoproteínas virais

Morfologicamente, os herpesvírus são caracterizados com base na estrutura do seu vírion, possuindo a mesma arquitetura básica. Um núcleo composto por um genoma linear de DNA fita dupla contido no interior de um capsídeo icosaédrico, composto de 161 capsômeros que envolvem e protegem o DNA, formando um nucleocapsídeo. Esta estrutura está embebida em um material amorfo denominado tegumento que contém várias proteínas virais, envolvido por um envelope formado por uma bicamada lipídica onde estão inseridas na superfície as glicoproteínas virais (ROIZMAN & PELLET, 2013) (figura 2).



**Figura 2** - Esquema e microscopia eletrônica de um vírion de um *alphaherpesvirus* mostrando sua organização genômica e morfologia, com seus principais componentes indicados (Adaptado de THIRY et al., 2006).

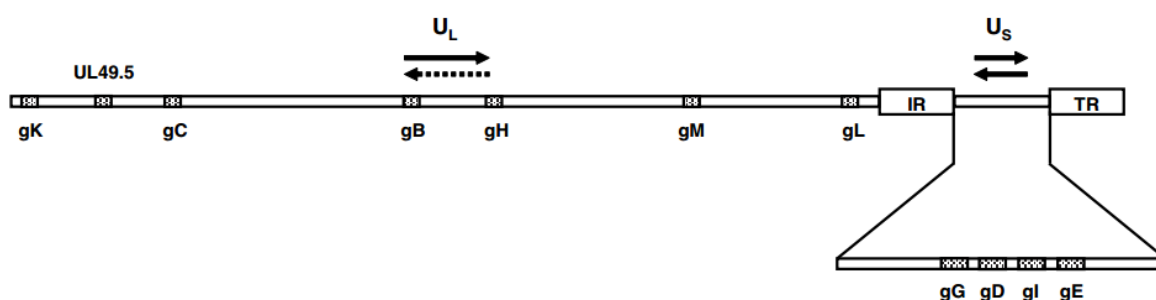
O tamanho do genoma viral é característico de cada espécie de herpesvírus, que são classificados em seis grupos de acordo com a presença de sequências repetidas e pelo conteúdo das bases guanina e citosina (G+C). (ROIZMAN et al., 1992).

O genoma do BoHV-1 possui 135.872 pares de bases (pb) e o do BoHV-5 138.390pb (DELHON et al., 2003) e apresentam, respectivamente, 75% e 72% de conteúdo G+C. Ambos possuem um genoma linear, com organização genômica do grupo D, que é composta de duas sequências únicas: uma única longa (“*unique long*” - UL) e uma única curta (“*unique short*” - US), sendo a US flanqueada por sequências terminais repetidas inseridas de forma invertida no genoma: região repetida interna (IR) região repetida terminal (TR) (ROIZMAN et al., 1992) (figura 3).



As glicoproteínas dos herpesvírus desempenham um importante papel na interação vírus-célula, sendo essenciais em várias etapas do ciclo viral, como no reconhecimento, adsorção, penetração, disseminação de célula para célula, maturação e liberação do vírus. Além disso, são importantes alvos para o sistema imunitário do hospedeiro, devido a sua localização no envelope viral e na superfície das células infectadas (THIRY et al, 2007). O genoma do BoHV-1 e BoHV-5 possuem dez genes que codificam glicoproteínas do envelope (TIKOO et al., 1995).

A localização dos genes codificadores para as glicoproteínas é a mesma, tanto no BoHV-1 quanto no BoHV-5. O genoma viral compreende cerca de 70 genes, sendo que dez deles codificam glicoproteínas. O segmento UL inclui genes que codificam seis glicoproteínas, são elas a gB (UL27), gC (UL44), gH (UL22), gL (UL1), gK (UL53) e gM (UL10) e a região US possui genes que codificam quatro glicoproteínas, a gG (US4), gD (US6), gI (US6) e gE (US8) (SCHWYZER, 1996) (figura 3).



**Figura 3** – Organização genômica dos *alphaherpesvírus*, que consiste em uma fita dupla de DNA contendo um segmento longo único (UL) e um curto único (US), flanqueado por duas sequências invertidas repetidas a IR (repetição interna) e a TR (repetição terminal). Mostra a região no genoma dos dez genes que codificam as glicoproteínas, seis delas localizadas no segmento UL e quatro no US. O segmento US pode apresentar duas possíveis orientações (representado pelas setas pretas), enquanto que o segmento UL apresenta predominantemente apenas uma orientação (a seta hachurada representa a possibilidade de cerca de 5% do segmento UL variar sua orientação) (THIRY, et al., 2006).

As glicoproteínas gC, gE, gG, gI e gM são classificadas como proteínas não essenciais, pois a deleção dos genes que as codificam não reduz a capacidade de replicação viral (BARANOWSKI et al. 1996; KONIG, 2002), o mesmo já não pode ser feito com as glicoproteínas gB, gD, gH, gL ou gK que são consideradas essenciais para o processo de replicação (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996).

Apesar do alto grau de similaridade entre os genomas do BoHV-1 e BoHV-5, chegando a 95% em algumas regiões, existem regiões genômicas menos conservadas, como o gene que codifica a glicoproteína C (gC), onde compartilham cerca de 75% de similaridade (DELHON et al., 2003).

A gC é uma proteína transmembrânica que se encontra inserida no envelope viral e apesar de não ser essencial à replicação viral, é expressa em altos níveis tanto no envelope quanto na membrana plasmática das células infectadas (FITZPATRICK et al., 1989; CHOWDHURY, 1997). É composta por três regiões e todas apresentam diferenças nas sequências de aminoácidos. A baixa similaridade nessas regiões tem permitido o desenvolvimento de técnicas moleculares voltadas ao diagnóstico rápido e diferencial entre o BoHV-1 e o BoHV-5 e também para análise filogenética de novos isolados (SILVA et al., 2007; ESTEVES et al., 2008; CAMPOS et al., 2009). Além disso, a gC já vem sendo utilizada como antígeno para obtenção de anticorpos monoclonais diferenciais entre os subtipos 1 e 2 do BoHV-1 (RIJSEWIJK et al., 1999; SPILKI et al., 2004), assim como para diferenciar BoHV-1 do BoHV-5 (CHUNG, 1994).

## 2.3. Replicação Viral

O ciclo biológico dos herpesvírus pode ser dividido em três componentes principais: início da infecção viral, replicação lítica e latência. A replicação viral segue as seguintes etapas: reconhecimento e interação vírus-célula, fusão do envelope viral com a membrana plasmática, penetração do nucleocapsídeo no citoplasma da célula, transporte do nucleocapsídeo e proteínas virais para o núcleo, transcrição, replicação e síntese de DNA e proteínas virais, montagem e liberação da progênie viral (ROIZMAN & KNIPE, 2013).

### 2.3.1. Início da infecção viral

A infecção viral inicia-se através do reconhecimento de glicoproteínas virais pelos receptores de superfície celular. A adsorção dos herpesvírus na célula ocorre através de um processo complexo de ligação e fusão do envelope viral com a superfície celular. Esse processo é mediado por pelo menos 5 glicoproteínas virais (gB, gD, gH, gL e gK) que estão envolvidas na fusão e penetração do vírus na célula (METTENLEITER, 2002)

Após a fusão, ocorre a penetração do nucleocapsídeo e tegumento no citoplasma das células infectadas e, em seguida, o desligamento do envelope viral da membrana plasmática, sendo o genoma viral transportado até o núcleo através de microtúbulos celulares (ROIZMAN & KNIPE, 2013).

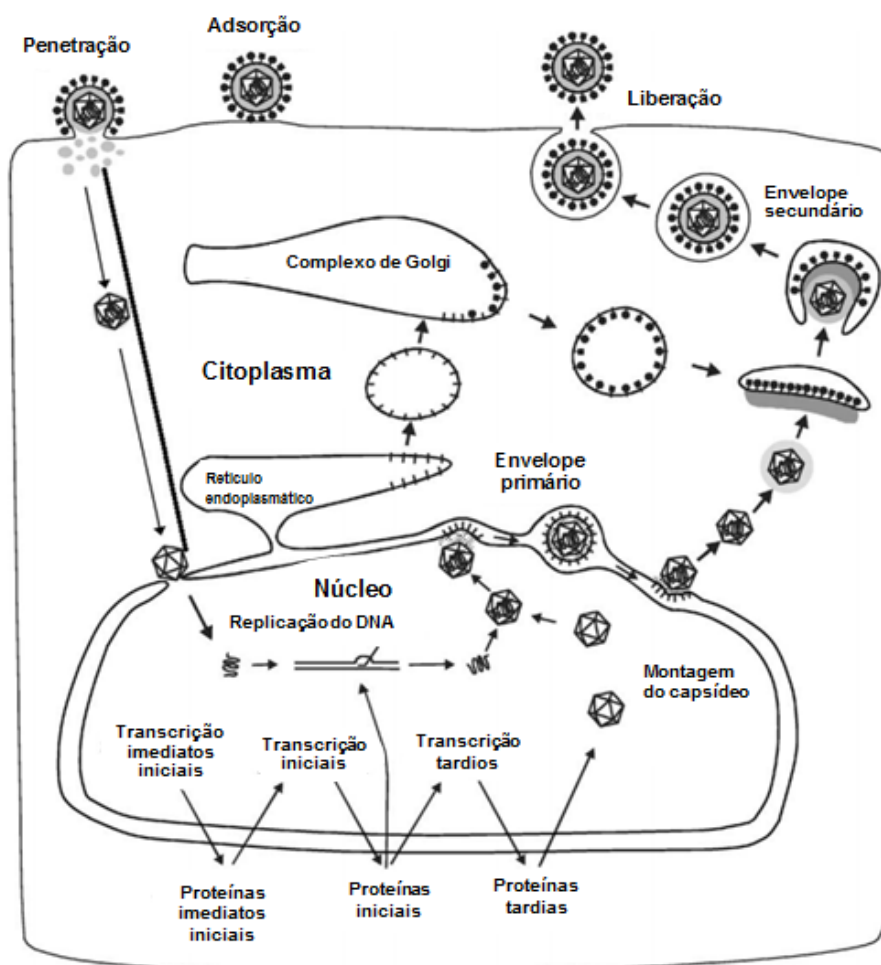
### 2.3.2. Replicação lítica

A transcrição do genoma viral se inicia logo após a sua penetração no núcleo, sendo transcrito pela RNA polimerase II celular com o auxílio de fatores celulares e virais. Os genes virais são divididos em três grupos principais de acordo com a função de seus produtos e sua cinética de expressão, sendo denominados genes alfa (*immediate early* ou de transcrição imediata inicial), beta (*early* ou inicial) e gama (*late* ou tardios) (FRANCO & ROEHE, 2007).

As proteínas dos genes alfa estão envolvidas em funções iniciais da infecção viral, como a regulação da expressão dos demais genes virais. Já as proteínas dos genes beta, dão origem a proteínas e enzimas envolvidas principalmente no metabolismo de nucleotídeos e na replicação viral. Os genes

gama só vão ser expressos após a replicação do DNA viral, eles originam as proteínas estruturais do núcleo, do capsídeo e do envelope, para a síntese de nova progênie viral (FRANCO & ROEHE, 2007).

Após a síntese das proteínas gama, tem-se o início da montagem dos nucleocapsídeos, com o empacotamento do genoma viral ocorrendo no núcleo. A formação da membrana viral ocorre por um processo duplo: primeiramente ocorre a formação de um envelope primário, adquirido por meio do brotamento do nucleocapsídeo através da membrana nuclear interna. Este envelope é perdido na fusão com a membrana nuclear externa, assim, os capsídeos se acumulam no citoplasma. Os capsídeos são envelopados novamente por membranas do complexo de Golgi e transportados em vesículas para o meio extracelular (METTENLEITER, 2002; METTENLEITER et al., 2006).



**Figura 4** - Ciclo replicativo dos herpesvírus. Representação das etapas do ciclo de replicação incluindo entrada do vírus e dissociação do tegumento, transporte do nucleocapsídeo até os poros nucleares, transcrição, replicação do DNA viral e subsequente montagem e liberação da progênie viral (Adaptado de METTENLEITER, 2004).

### 2.3.3. Latência

A latência é um mecanismo que possibilita a permanência do vírus em seus hospedeiros sem multiplicação viral, sendo uma importante propriedade dos herpesvírus (JONES, 2003).

Os mecanismos moleculares que permitem o estabelecimento da latência e da reativação do agente ainda não são completamente entendidos e podem variar entre os herpesvírus. Os *alfaherpesvírus*, por exemplo, são capazes de induzir infecções latentes em neurônios, já os *gamaherpesvírus* induzem latência em células do sistema linfóide (ROIZMAN & PELLET, 2013).

O BoHV-5 estabelece infecção latente, principalmente, nos neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos dos animais infectados (THIRY et al., 2005; FRANCO & ROEHE, 2007). Já o BoHV-1 estabelece latência, principalmente, nos gânglios trigêmeo (infecção no trato respiratório) e sacral (infecção no trato genital) (JONES, 2003).

Apesar desses locais serem os sítios mais comuns de latência, DNA viral de BoHV-1 já foi encontrado em centros germinativos das tonsilas faríngeas (WINKLER et al., 2000), linfonodos e baço (MWEENE et al., 1996). E o DNA de BoHV-5 foi detectado em várias áreas do Sistema Nervoso Central, principalmente córtex, tálamos, mesencéfalo e ponte encefálica (MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003). Além do sistema nervoso as mucosas nasal e traqueal já foram propostas como possíveis sítios de latência de BoHV-5 (MEYER et al., 2001).

Animais com infecção latente servem de reservatório natural para o vírus, que pode ser reativado naturalmente em situações de estresse ou pode ser induzido pela aplicação de corticosteroides (CARON et al., 2002; VOGEL et al., 2004). A reativação pode ser ou não acompanhada de recrudescência clínica (CARON et al., 2002; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2004).

O BoHV-1 e BoHV-5 compartilham diversas propriedades biológicas, antigênicas e moleculares e apresentam uma identidade proteica, em média, de 82%. As proteínas que possuem maior identidade com o BoHV-1 são aquelas

envolvidas na replicação e processamento do DNA viral (codificada pelos genes UL5, UL15, UL29 e UL39) e as que compõem o tegumento (codificadas pelos genes UL14, UL48) e o capsídeo (codificadas pelos genes UL19) do vírion, possuindo 95% de homologia. A diferença mais marcante entre esses vírus parece ser o potencial neuropatogênico distinto, uma característica fenotípica que reflete diferenças genéticas e moleculares ainda não esclarecidas (DELHON et al., 2003).

## **2.4. Patogenia e enfermidades relacionadas ao BoHV-1 e BoHV-5**

A severidade das infecções provocadas pelo BoHV-1 e BoHV-5, é influenciada por diversos fatores, tais como a virulência do agente, a idade e imunidade do hospedeiro, sendo que na maioria dos casos ocorrem infecções subclínicas (KAASHOEK et al., 1996).

A porta de entrada natural do BoHV-1 é a mucosa do trato genital e respiratório superior. Sua transmissão pode ocorrer de forma direta através de aerossóis e pelo contato com secreções respiratórias, oculares ou genitais contaminadas. Pode também ser transmitida de forma indireta através de fômites, água ou alimentos contaminados e por meio da inseminação artificial e transferência de embriões (WYLER et al., 1989; MUYLKENS et al., 2007) .

No sítio primário da infecção ocorre a replicação viral e posteriormente a sua disseminação, que pode ocorrer de duas formas: disseminação célula a célula, produzindo uma infecção localizada, ou os novos vírions formados podem sair para o meio extracelular, produzindo uma infecção sistêmica. A “alta taxa” de excreção das novas partículas virais é um dos fatores para uma rápida disseminação da infecção dentro de um rebanho (BARANOWSKI et al., 1996; ENGELS & ACKERMANN, 1996).

### **2.4.1. Rinotraqueíte infecciosa bovina**

Tanto o BoHV-1.1 quanto o BoHV-1.2 podem desencadear alterações associadas a problemas respiratórios (MILLER et al., 1991). A IBR pode apresentar como sinais clínicos: hipertermia (temperatura retal > 40,5° C), dispneia, tosse, descarga nasal mucopurulenta, pústulas e lesões ulcerativas na mucosa nasal e, em alguns casos, pode causar conjuntivite e ulcerações na mucosa oral (KAASHOEK et al., 1996; MEYER et al., 2001).

### **2.4.2. Vulvovaginite pustular infecciosa e balanopostite pustular infecciosa**

As infecções genitais estão associadas principalmente com o BoHV-1.2b. A Vulvovaginite pustular infecciosa manifesta-se pela presença de descarga vaginal mucopurulenta, intumescimento vulvar e formações de pequenas pústulas. Já o

balanopostite pustular infecciosa caracteriza-se pela formação de vesículas e pústulas na mucosa do pênis e do prepúcio. A instalação de infecções bacterianas secundárias, em ambos os casos, pode aumentar a gravidade das lesões, podendo ocorrer a formação de úlceras (WYLER et al., 1989; VAN OIRSCOT et al., 1995; KAHRS, 2001).

### **2.4.3. Encefalite**

Após invadir o sistema nervoso central, o BoHV-5 pode induzir uma meningoencefalite fatal em bovinos, principalmente em animais jovens. Dentre os sinais clínicos mais frequentes, destacam-se incoordenação, andar em círculos, tremor muscular, cegueira, bruxismo, convulsões e, eventualmente, a morte (WYLER et al., 1989; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002).

### **2.4.4. Diagnostico diferencial**

Diversos outros agentes podem causar alterações no SNC, apresentando sintomatologia neurológica semelhante ao da infecção pelo BoHV-5. Dessa forma, o diagnóstico diferencial torna-se essencial (CLAUS et al., 2002), especialmente devido a doenças como a raiva e a encefalopatia espongiforme bovina (EEB), que possuem grandes implicações econômicas, políticas, sanitárias e na saúde pública (BRASIL, 2008).

O diagnóstico diferencial é parte fundamental da vigilância da EEB, que se tornou uma das principais barreiras sanitárias internacionais de bovinos, criando a necessidade de implantação de um sistema de vigilância epidemiológica, que vem sendo executado no Brasil desde 2001, sendo que até o presente momento nenhum caso clássico de EEB foi notificado no país (OIE, 2016). Para monitorar a EEB os países devem estar aptos a identificar todas as doenças que possam afetar o SNC de bovinos, possuindo assim um sistema eficaz para a diferenciação das possíveis causas de encefalites.

Mesmo com a implantação do Plano de Combate à Raiva dos Herbívoros em 1966, atualmente, denominado Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e outras Encefalopatias (PNCRH), a raiva ainda ocorre de maneira endêmica no Brasil, sendo o principal agente viral relacionado com encefalites



virais (BRASIL, 2009). É transmitida para os bovinos, principalmente, pela mordedura do morcego hematófago da espécie *Desmodus rotundus*, que é o principal reservatório do vírus no país (BATISTA et al., 2007).

Além desses dois agentes, a leucose enzoótica bovina, a listeriose, a enterotoxemia, a forma cerebral da babesiose, além de doenças de etiologia múltipla como a poliencefalomalácia, também devem ser incluídas no diagnóstico diferencial de herpesvírus, sendo importante a realização de uma boa anamnese para o direcionamento do diagnóstico (CLAUS et al., 2002).

## **2.5. Métodos diagnóstico**

O diagnóstico não pode ser baseado somente nos sinais clínicos e na histopatologia, pois a maioria dos casos será inconclusivo, devido a variedade de manifestações clínicas e as suas semelhanças com sinais de outras doenças infecciosas, parasitárias e intoxicações. Assim é necessário a associação de métodos diagnósticos laboratoriais para confirmar a suspeita clínica de BoHV-1 ou BoHV-5. Dentre os métodos mais utilizados estão o isolamento viral, testes sorológicos, imunohistoquímica e o diagnóstico molecular por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (CLAUS, et al., 2002).

### **2.5.1. Isolamento Viral**

O isolamento viral em cultivo celular é a técnica padrão para o diagnóstico de BoHV-1 e do BoHV-5, podendo ser isolados sem dificuldade de secreções (conjuntival, vaginal, nasal, lavado prepucial, mucosa do trato respiratório) ou de tecidos de animais infectados (ROEHE et al., 1997b).

Uma suspensão do tecido ou da secreção, previamente filtrada, é inoculada em cultivo celular. Após um período de três a cinco dias observa-se se há presença de efeito citopático (ECP) característico para confirmação do diagnóstico (SILVA, 2011). Esta técnica não permite diferenciar entre o BoHV-1 e o BoHV-5, a identificação específica do agente viral pode ser efetuada com o emprego de outras técnicas, como imunofluorescência (IF), imunoperoxidase (IPX) e técnicas moleculares (ROEHE et al., 1997b).

### **2.5.2. Diagnóstico Sorológico**

A técnica sorológica mais utilizada para o diagnóstico de BoHV-1 e BoHV-5 é a soroneutralização (SN). A SN é considerada como técnica padrão para a detecção de anticorpos específico para BoHV (TEIXEIRA et al, 1998; OIE, 2002). Esta técnica consiste na neutralização da partícula viral pelos anticorpos presentes no soro do animal infectado, sendo utilizada em inquéritos epidemiológicos, certificação de rebanhos, triagem de reprodutores destinados à coleta e comercialização de sêmen, além de dar suporte à investigação clínica (ROCHA et al., 2001; FRANCO & ROEHE, 2007).

Apesar de ser amplamente utilizada, possui algumas desvantagens, como não possibilitar uma diferenciação clara entre o BoHV-1 e o BoHV-5 devido ao elevado percentual de reatividade cruzada, além de ser um teste laborioso e não permitir um diagnóstico rápido (TEIXEIRA et al., 1998; CAMPOS et al., 2009).

Para o diagnóstico sorológico também podem ser utilizados os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), que apresentam uma alta taxa de sensibilidade e especificidade. A grande vantagem do ELISA em comparação a SN é a possibilidade de processar um grande número de amostras, além de ser uma técnica rápida e de fácil execução (KRAMPS et al., 1994; 2004).

Entretanto o elevado custo para a aquisição dos kits pode ser um empecilho para a utilização dessa técnica, como alternativa alguns laboratórios produzem e padronizam seu próprio kit para diminuir os custos (TEIXEIRA et al., 2001; SPILKI et al., 2005; ESTEVES, 2008). Uma variedade de testes de ELISA (indireto, direto, de competição) comerciais ou *homemade* tem sido desenvolvida para a triagem das amostras de soro de bovinos, porém testes específicos para BoHV-5 são bastante raros sendo desenvolvidos principalmente para BoHV-1 (TEIXEIRA et al., 2001; NANDI et al., 2007).

### **2.5.3. Diagnóstico Molecular**

Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), para a detecção do genoma viral ou de fragmentos genômicos dos herpesvírus tem sido a metodologia diagnóstica mais explorada nos últimos anos. A PCR se baseia na amplificação de uma região alvo do DNA viral, obtendo inúmeras cópias do segmento amplificado. Devido a sua alta sensibilidade, especificidade e a rapidez de execução, esta técnica vem sendo aprimorada e amplamente utilizada na detecção e diferenciação de infecções por BoHV-1 e/ou BoHV-5 (ALEGRE et al., 2001; SILVA et al., 2007a; ESTEVES et al., 2008; CAMPOS et al., 2009)

A maior vantagem da PCR sobre outras técnicas de diagnóstico é a sua capacidade de detectar a presença do agente mesmo quando possui um número muito baixo de cópias de DNA viral, sendo utilizado para detectar o vírus em estado latente e em amostra com o vírus inativado (DEBIASI & TYLER, 2004; ESTEVES, 2008). Além da diferenciação entre os agentes, o produto obtido da

PCR pode ser sequenciado, para verificar a origem da cepa e a evolução desses vírus. Com isso possibilita a ampliação do conhecimento sobre as características das infecções nos locais em que elas ocorrem e sua distribuição epidemiológica.

## 2.6. Epidemiologia

### 2.6.1. Situação no Brasil – BoHV-1

O BoHV-1 apresenta-se distribuído mundialmente, sendo encontrado anticorpos reagentes tanto em bovinos quanto em outras espécies animais (TEIXEIRA et al. 1998, STRAUB 2001). No Brasil, foi isolado pela primeira vez em 1978 na Bahia, a partir de um caso de vulvovaginite, e no mesmo ano foi isolado em São Paulo, a partir do rim de um feto bovino oriundo de um matadouro (ALICE, 1978; MUELLER et al., 1978). Apresenta-se distribuído de forma endêmica no Brasil, sendo identificado em vários estados (Figura 5).



**Figura 5** - Cartograma mostra as unidades da federação (UF) onde já se foi identificado o BoHV-1.

No estado de Goiás, Faria et al (2003) identificaram 64,9% de positividade para BoHV-1 em touros, já Vieira et al.(2003) registraram índice de positividade de 83%, com maior prevalência em rebanhos leiteiros. Em um estudo mais abrangente, Barbosa et al. (2005) investigaram a prevalência de BoHV- 1 em 6.932, de 892 propriedades e 232 municípios do estado, encontrando 51,9% de

animais reagentes, 98,5% de propriedades com pelo menos um animal reagente e 100% dos municípios com pelo menos uma propriedade positiva.

No nordeste, Melo et al. (1999) examinou 142 bovinos na Paraíba, encontrando 62,7% animais reagentes ao BoHV-1 e todos os rebanhos investigados apresentaram pelo menos um animal reagente. Melo et al. (1997) encontraram 96,0% de bovinos reagentes dentre os 102 em Sergipe. E Silva et al (1995) encontraram 69,5% de animais reagentes para BoHV-1 em um total de 282 bovinos examinados no estado de Pernambuco.

Em Rondônia, Okuda et al. (2006) investigaram a soroprevalência do BoHV-1 em 1.988 amostras de soro de bovinos, encontrando 86,2% dos animais reagentes e com pelo menos um animal positivo em todas as propriedades.

Já na região Sul, Médici et al. (1996), através do ELISA encontraram 54% (81/150) de animais reagentes ao BoHV-1, no estado do Paraná. Medici et al. (2000b) através da técnica de SN, testou 1.235 bovinos com histórico de problemas reprodutivos, encontrando 50,8% dos bovinos de corte reagentes para BoHV-1 e 41,9% dos bovinos de leite reagentes. No Rio Grande do Sul, Lovato et al. (1995), encontraram em uma população de 7.956 animais 18,8% dos animais reagentes para BoHV-1 e 91,9% dos municípios com pelo menos um animal positivo. Holz et al. (2009) pesquisaram a prevalência média de anticorpos contra BoHV-1 e 5 examinando 2.200 bovinos provenientes de 390 propriedades e 158 municípios e encontraram 29,2% animais reagentes e 57,7% de rebanhos infectados.

Richtzenhain et al. (1999) realizaram um trabalho com amostras dos estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo, pesquisando a presença de anticorpos para BoHV-1 através da técnica de Elisa Indireto. Foram utilizadas 2447 amostras de soro sanguíneo de bovinos não vacinados encontrando uma prevalência de 68,7%, sendo 45,91% no RS; 67,42% no PR; 67,43% em MG; 68,65% em SP; 76,54% no RJ e 86,08% no MS.

Melo (1998) realizou um estudo em bovinos de corte em Minas Gerais, que através da soroneutralização, encontrou uma taxa de animais reagentes ao

BoHV-1 variando de 14,2% a 23,5% para rebanhos que realizavam cria e recria, e de 73,6% a 87,3% para rebanhos que realizavam apenas recria.

No primeiro estudo realizado no Espírito Santo, Santos et al. (2014) verificaram a frequência de anticorpos anti-BoHV-1 em rebanhos bovinos leiteiros do Estado do Espírito Santo em 1.161 animais, encontrando 66,75%, sendo todos os rebanhos considerados positivos.

Baseado nos trabalhos na literatura pode-se afirmar que este agente encontra-se distribuído na população bovina brasileira de forma endêmica e com uma prevalência alta, possivelmente os índices de prevalência sejam similares nos estados sem casos notificados. Devido a importância econômica e social da bovinocultura no Brasil e as perdas econômicas relacionadas com BoHV-1, é importante que se adotem medidas de prevenção e controle da infecção por esses agentes.

A maioria dos dados sobre a prevalência do BoHV-1 no Brasil baseia-se em inquéritos sorológicos, os quais são incapazes de distinguir respostas sorológicas induzidas por BoHV-1 e/ou BoHV-5, assim parte dos animais identificados como reagentes para o BoHV-1 podem, na realidade, ser soropositivos para BoHV-5.

### **2.6.2. Situação no Brasil – BoHV-5**

O BoHV-5 apresenta uma distribuição geográfica restrita, sendo mais frequentemente detectado no hemisfério sul do que no hemisfério norte (D'ARCE et al. 2002). Diferentemente do BoHV-1, não existem muitas vacinas desenvolvidas para o BoHV-5, e apesar de utilizarem vacinas contra BoHV-1 o nível de proteção cruzada fornecido pode não ser suficiente para induzir uma proteção satisfatória (SILVA, et al, 2006).

No Brasil, o BoHV-5 foi relatado primeiramente em 1989 a partir da ocorrência de surtos de meningoencefalite no Rio Grande do Sul (RIET-CORREA et al., 1989; SALVADOR et al., 1998). Desde então, tem se investigado a presença desses vírus na população de bovinos do país, já tendo sido isolado em vários estados brasileiros através de técnicas moleculares, já que os testes de

sorodagnóstico não diferenciam com praticidade as infecções por BoHV-5 daquelas causadas pelo BoHV-1. Na tabela 1, encontra-se vários trabalhos desenvolvidos no Brasil.

**Tabela 1:** Dados referentes à incidência de BoHV-5 e BoHV-1 no SNC nas diferentes regiões do Brasil

Região do Brasil	Estados	Nº Casos	Origem da amostra	Método diagnóstico	Prevalência (%)			Referência
					BoHV-1	BoHV-5	BoHV-1 e 5	
Sul	Rio Grande do Sul	147	Casos clínicos	Análise histopatológica	-	4,59	-	Sanches, et al., 2000
	Centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai	40	Casos clínicos	PCR "nested"	40	60	-	Silva, 2007
		22	Casos clínicos	PCR	18,2	31,8	-	Rissi, et. Al., 2008
	Rio Grande do Sul	200	Abatedouro	PCR "nested"	82,8	93,1	75,9	Campos, 2009
		101	Suspeita de raiva	PCR "nested"	25,7	21,8	29,7	Kunert Filho, 2011
	Paraná	400	Abatedouro	PCR	14,3	9,75	3,25	Oliveira et al., 2015
	Brasília	68	Casos clínicos e abatedouros	PCR "multiplex"	-	30,9	-	Figueiredo, 2009
Centro-oeste	Goiás	18			0	28	0	Silva, 2014
	Mato Grosso	76	Casos clínicos	PCR	-	36,8	-	Arruda, 2010
		1431	Casos clínicos	Análise histopatológica	-	2	-	Lemos, 2005
	Mato Grosso do Sul	588	Casos clínicos	Análise histopatológica	-	4,31	-	Ribas et al., 2013
	Minas Gerais	22	Casos Clínicos	PCR "nested"	-	22,7	-	Gomes, et al, 2002
Sudeste	São Paulo	20	Casos clínicos	PCR	-	75	-	Ferrari et al., 2007
	Minas Gerais	65	Casos clínicos	PCR "multiplex"	1,5	15,4	-	Fonseca Jr et al., 2011
Nordeste	Paraíba	139	Casos clínicos	Análise histopatológica	-	2,7%	-	Galiza et al., 2010

Como pode ser verificado na tabela 1 os trabalhos baseados apenas nos sinais clínicos e nas alterações histopatológicas dos materiais apresenta uma prevalência bem baixa se comparado as outras técnicas. Nesses casos, há uma



grande chance do número de casos diagnosticado estar subestimado, pois só é possível a identificação de animais que apresentam doença clínica, não identificando infecções latentes e a prevalência real do agente. Além disso, uma parcela muito grande dos casos não obtém um resultado conclusivo, no trabalho realizado por Ribas et al. (2013), por exemplo, 42% dos casos foram inconclusivos.

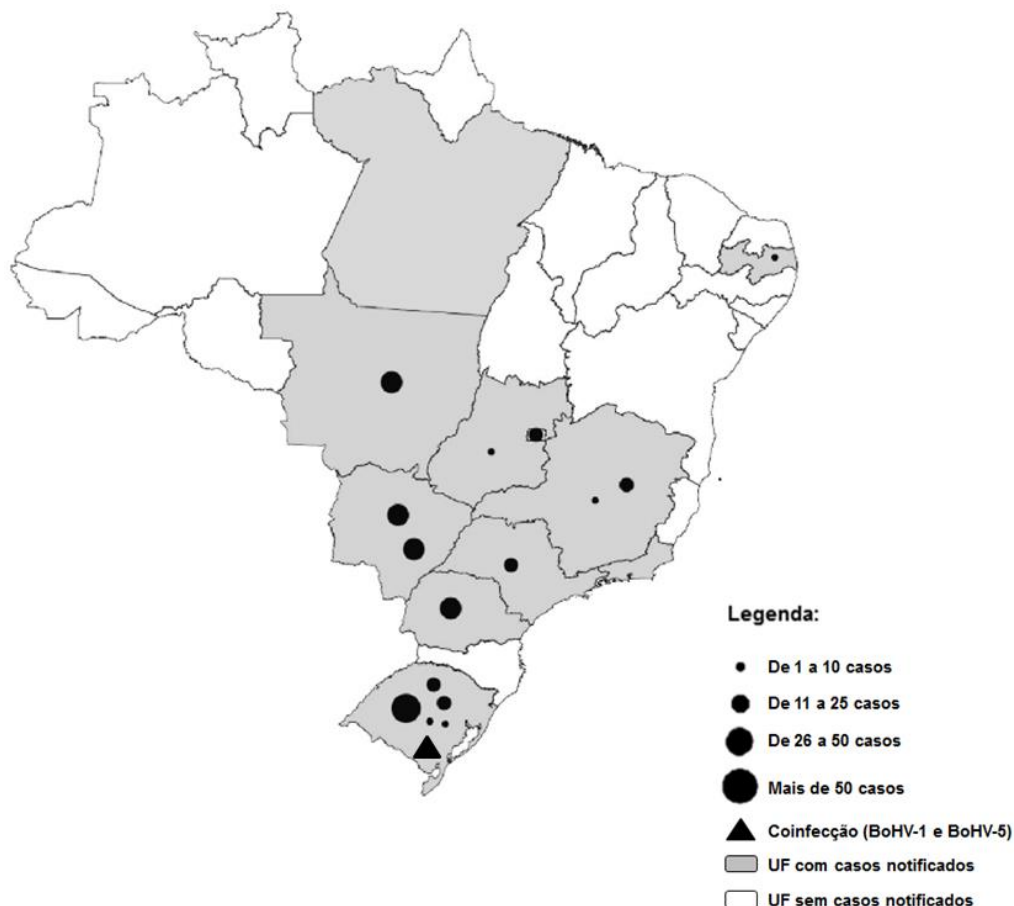
Campos (2009), encontrou uma alta prevalência de infecção latente do BoHV-1 e BoHV-5 no Rio Grande do Sul. Através de uma “nested” PCR para cada herpesvírus bovino, demonstrou que 82,8% dos bovinos apresentavam infecção latente para BoHV-1 e 93,1% para BoHV-5 e que 75,9% apresentavam infecção latente por ambos os herpesvírus.

Também no Rio Grande do Sul, Kunert Filho (2011) examinou a ocorrência de BoHV-1 e BoHV-5 em amostras de tecidos bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva detectando o BoHV-1 e o 5 tanto em amostras positivas quanto em amostras negativas para raiva. Sendo que 25,7% das amostras possuíam genoma do BoHV-1, 21,8% de BoHV-5 e 29,7% possuíam genoma de ambos.

Silva (2007) demonstrou que tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 não estão estritamente associados às suas respectivas síndromes clínicas e que podem estar frequentemente envolvidos em casos clínicos classicamente atribuídos ao outro vírus. Para tanto, realizou-se um estudo retrospectivo com 40 amostras de herpesvírus isoladas de diferentes casos clínicos na região Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai entre 1987 e 2006. Através da PCR identificou amostras de BoHV-1 isoladas em casos de doença respiratória, balanopostite e/ou vulvovaginite, do sêmen de touros saudáveis e de casos de doença neurológica. Já as amostras virais identificadas como BoHV-5 foram em sua maioria isoladas de doença neurológica, mas também sendo isolada do sêmen de touros saudáveis e do baço de um bezerro com doença sistêmica.

Além dos trabalhos descritos acima, vários estudos de menor escala têm sido realizados em regiões, sugerindo que o BoHV- 5 seja enzoótico em todo o país (Figura 6) (RIET-CORREA et al.,1989; ROEHE et al., 1997; SALVADOR et al., 1998;; COLODEL et al., 2002; GOMES et al., 2002; RIET-CORREA et al,

2006). Certamente, os dados epidemiológicos obtidos até o momento não refletem a real prevalência da infecção causada pelo BoHV-5. Dessa forma, mais estudos são necessários para alcançar tal objetivo.



**Figura 6** – Cartograma mostra a distribuição dos casos de encefalite associados ao BoHV-5 nas unidades da federação (UF). Mapa com base nos trabalhos encontrados que foram publicados nos últimos anos.

### 2.6.3. Conclusão

É de extrema importância a identificação e diferenciação desses agentes com outras enfermidades do SNC que acometem os bovinos. Os avanços das técnicas moleculares são importantes ferramentas para a obtenção de um diagnóstico etiológico rápido e preciso. Muitos estudos têm sido desenvolvidos em diversas regiões do país para verificar a incidência desses agentes, mas apesar da importância econômica do BoHV-1 e do BoHV-5 no rebanho bovino brasileiro, ainda não se sabe a real prevalência desses agentes no país. Apesar disso, com base nos estudos, acredita-se que esses agentes encontram-se distribuídos de forma endêmica no país e provavelmente apresentam uma maior prevalência do

que o relatado na literatura. Assim é necessário implementar medidas mais efetivas de prevenção e controle para o BoHV-1 e o BoHV-5, minimizando as possíveis perdas associadas a esses agentes.

## **PARTE II RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO**

### **1. INTRODUÇÃO**

O estágio supervisionado é uma disciplina obrigatória do último semestre do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. O aluno deve cumprir um total de 480 horas, que podem ser divididas em até dois locais de sua escolha. O estágio consiste na realização de atividades teórico-práticas, que permitem que o aluno entre em contato com mercado de trabalho, adquira experiência profissional e aprofunde os conhecimentos adquiridos durante a graduação.

O estágio foi realizado no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no período de 07 de março a 05 de junho de 2016, cumprindo as 480 horas exigidas. O objetivo do estágio foi aprender as técnicas desenvolvidas no laboratório, nas áreas clínica e ambiental.

### **2. LABORATÓRIO DE VIROLOGIA COMPARADA E AMBIENTAL**

O Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) realiza estudos com vírus entéricos, de origem humana e animal, com importância em Saúde Pública, sendo credenciado pelo Ministério da Saúde como referência no diagnóstico de gastroenterites virais.

Atualmente, o LVCA divide-se em dois setores: o de Virologia Ambiental e o de Virologia Clínica. O setor de virologia clínica é responsável pelo diagnóstico definitivo de amostras suspeitas de gastroenterites virais provenientes de Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN's) de diversos estados brasileiros. Essas amostras passam por uma triagem em seu estado de origem através de testes sorológicos como o ELISA e são encaminhadas ao LVCA para a realização de testes mais sensíveis para a confirmação do diagnóstico. Além de receberem amostras dos LACEN's, possuem parcerias com vários hospitais para o envio de material fecal para a realização de projetos. Já o setor de virologia ambiental, desenvolve e aplica metodologias de concentração viral e métodos moleculares para a detecção e caracterização de vírus gastroentéricos em

amostras de águas recreacionais, de esgotos e de consumo e também com a detecção de vírus em alimentos.

Por ser um laboratório de referencia regional para rotavíruses há um controle de qualidade rigoroso praticado dentro do laboratório, devendo ser respeitadas as normas de biossegurança e o fluxograma do laboratório. De acordo com o fluxograma atual, as salas são classificadas em limpas e sujas de acordo com as atividades desenvolvidas. As salas contaminadas com ácidos nucleicos, como as salas de extração, amplificação e análise de ácidos nucleicos são consideradas sujas, já as salas de processamento das amostras clínicas e ambientais e de preparo dos reagentes para reações de PCR, são consideradas limpas, pois encontram-se livres de ácidos nucleicos. Por meio desse fluxograma, há uma diminuição no risco de contaminação, já que após a entrada em uma sala suja é proibido a entrada em uma sala limpa para minimizar as chances de disseminação dos ácidos nucleicos.

As atividades foram desenvolvidas seguindo uma ordem cronológica, sendo desempenhadas todas as etapas do diagnóstico molecular do início ao fim. Na primeira semana foi realizado o treinamento inicial para o acesso ao laboratório, através de apresentação das normas de biossegurança e do fluxo de atividades, além de um treinamento para o recebimento, registro e processamento das amostras. Fiquei neste setor até dominar todos os processos envolvidos na etapa inicial. Esta etapa inicia-se com o recebimento das amostras fecais que são armazenadas em geladeira a 4°C até serem processadas. O processamento dessas amostras consiste na realização de uma suspensão fecal a 10% e no preparo de duas alíquotas com o material fecal *in natura*, nem sempre se consegue duas alíquotas por não ter material suficiente. Se sobrar material no pote original, este é armazenado, assim como as alíquotas em freezer a -20°C. A suspensão fecal é encaminhada até a sala de extração de ácidos nucleicos. Todo o material da referência é extraído utilizando um robô de extração, o QIAcube. Após a extração do material genético viral, o restante da suspensão é armazenado em freezer a -20°C. As suspensões fecais de amostras de projetos podem ser extraídas por meio do método de “Boom” (BOOM et al, 1990) ou por meio de kits de extração da Qiagen. No período do estágio não acompanhei a

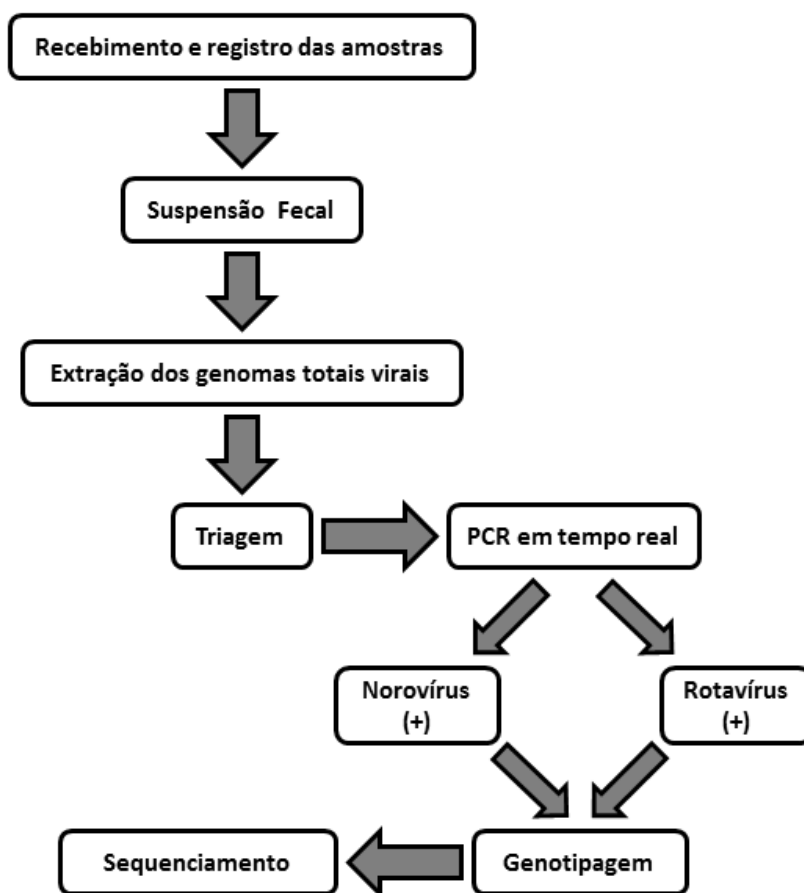
técnica de ELISA e de PAGE. O ELISA não tem mais sido utilizado rotineiramente, pois os testes moleculares são mais sensíveis e específicos, sendo utilizado em casos de surtos onde se necessita de uma rápida resposta. O PAGE não foi realizado no período do estágio devido a um problema de saúde do funcionário responsável.

Assim como ocorre com as amostras clínicas, o LVCA recebe amostras de água da região e de LACENs, para a vigilância e controle da qualidade e em casos de surto de gastroenterite com suspeita de contaminação e transmissão pela água. Durante o período do estágio o laboratório não recebeu nenhuma amostra dos LACEN's, mas no último mês de estágio, estava sendo desenvolvido um projeto de grande porte para analisar as águas de diversas regiões do Rio de Janeiro no período que precede, durante e após as Olimpíadas, que tive a oportunidade de participar. São coletados 10 litros de água que são concentradas em 10 ml, essa concentração permite a detecção de vírus presentes no ambiente. Esse processo de concentração da água é feito pela técnica da floculação com leite em pó desnatado, que consiste na adição de uma solução de leite em pó desnatado, preparada pela adição de 10g de leite em pó desnatado em 1L de água marinha, que é acidificada com HCl até o pH3.5 e mantidas por 8h sob agitação constante e 8h em descanso para a formação do sedimento pela ação da gravidade. O sobrenadante é removido cuidadosamente e o sedimento é, então, alíquotado em criotubos, que são armazenados em freezer a -20°C. Uma dessas alíquotas é encaminhada para a sala de extração de ácidos nucleicos, onde a extração é, geralmente, realizada por meio de kits da Qiagen.

Acompanhei e realizei a extração dos ácidos nucleicos por meio do kit da Qiagen, do QIAcube e do método de Boom, após a extração o material extraído é armazenado na sala de freezers a -70°C. O treinamento seguiu para a parte de amplificação dos ácidos nucleicos, na parte da referência pesquisa-se a presença do rotavírus e do norovírus, que são as principais causas de gastroenterites. Todas as amostras recebidas no LVCA passam por uma triagem através da qPCR para rotavírus e norovírus, as amostras positivas são encaminhadas para a PCR qualitativa para a caracterização viral.

A amplificação do material genético para a identificação da estirpe viral é feita pela técnica de PCR qualitativa utilizando o DNA extraído. Tanto o norovírus quanto o rotavírus são vírus de RNA, as amplificações podem ser feitas de duas formas: pode-se realizar a síntese do cDNA e depois uma PCR, ou pode-se utilizar o Kit OneStep RT-PCR.

As amostras amplificadas são analisadas através da eletroforese em gel de agarose e em reveladas através de um fotodocumentador que mediante a emissão de luz UV permite a visualização das bandas, indicando se houve ou não a amplificação de material genético. Os materiais genéticos presentes são separados de acordo com o seu tamanho molecular, que permite a genotipagem dos diferentes tipos de rotavírus, sendo sequenciado apenas quando não se consegue caracterizar qual o vírus pela PCR. A figura 7 indica o fluxograma desde o recebimento até o sequenciamento das amostras da referência.



**Figura 7** - Fluxograma das atividades desenvolvidas no setor de virologia clínica do LVCA.

### **3. CONCLUSÃO**

O estágio supervisionado foi uma oportunidade única para aprender e aprimorar habilidades, sendo fundamental para minha formação como profissional em medicina veterinária. O LVCA possui estrutura, recursos e controle de qualidade diferenciados, dando todo o suporte necessário para um aprendizado prático de excelência. Além de possibilitar uma maior familiaridade com a rotina de trabalho e experiência profissional na área de saúde pública, contribuindo bastante com a minha formação profissional e pessoal.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICE, F.J. **Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil.** Rev. Bras. Biol. 1978;38(n.4):919-920. 48.

ALMOND, J.; PATTISON, J. **Human BSE.** Nature, v. 389, p. 437-438, 1997.

ARRUDA, L.P.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; LEMOS, R.A.A.; NOGUEIRA, A.P.A.; CRUZ, R.A.S.; PESCADOR, C.A.; COLODEL, E.M. (2010) **Detecção molecular de herpesvírus bovino 1 e 5 em amostras de encéfalo conservadas em formol e emblocadas em parafina provenientes de bovinos com doença neurológica.** Pesquisa Veterinária Brasileira 30(8):646-650.

BANKS, M.; IBATA, G.; MURPHY, A. M.; FROSSARD, J. P.; CRAWSHAW, T. R.; TWOMEY, D. F. **Bovine lymphotropic herpesvirus and non-responsive post-partum metritis in dairy herds in the UK.** *Vet J* 176, 248–250, 2008.

BARANOWSKI, E.; KEIL, G.; LYAKU, J.; RIJSEWIJK, F.A.; VAN OIRSCHOT, J.T.; PASTORET, P.-P.; THIRY, E. **Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins.** *Vet. Microbiol.* 53 , 91–101, 1996.

BARBOSA, A.C.V.C.; BRITO, W.M.E.D.; ALFAIA, B.T. **Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil.** *Ciência Rural*, v.35, n.6, p.1368-1373, 2005.

BATISTA, H.B.C.R.; FRANCO, A.C.; ROEHE P.M. **Raiva: uma breve revisão.** *Acta Scient. Vet.* 35(2):125-144, 2007.

BILGE-DAGALP, S.; DEMIR A. B.; GUNGOR, E.; ALKAN F. **The seroprevalence of bovine herpesvirus type 4 (BHV4) infection in dairy herds in Turkey and possible interaction with reproductive disorders.** *Rev. Med. Vet.* 158, 201–205, 2007.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. et al. **Rapid and simple method for purification of nucleic acids.** *J Clin Microbiol*, v. 28, n. 3, p. 495-503, Mar. 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Encefalopatia espongiforme bovina – EEB : doença da vaca louca.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília, MAPA/SDA, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros : manual técnico – 2009.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009.

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HUBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A.M. **High prevalence of co-**

**infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil.** *Veterinary Microbiology*, v. 139(1-2), p. 67-73. 2009.

CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SCHERER C.F.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; ODEON, A.; SUR, J.H. **Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease.** *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 84, n. 4, p. 285-295, Feb. 2002

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; CILLI, V.; DONELLI, G.; FERRARI, M.; CHICCHINI, U.; BORDONI, E. **A study of herpes virus isolated from dairy cattle with a history of reproductive disorders.** *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1986, 9, 13-21.

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; RANUCCI, S.; ALDROVANDI, V.; CILLI, V.; RAMPICHINI, L.; GATTI, R. **Experimental infection of calves with strains of bovid herpesvirus-4.** *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1987, 10, 41-49.

CHOWDHURY, S.I. **Fine mapping of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein C neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and synthetic peptides.** *Veterinary Microbiology*, v. 58(2-4), p. 309-314. 1997.

CHUNG, C.S. **Monoclonal Antibodies That Distinguish between Encephalitogenic Bovine Herpesvirus Type 1.3 and Respiratory Bovine Herpesvirus Type 1.1.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 1(1), p. 83-88. 1994.

CLAUS, M.P. et al. **Herpesvírus Bovino Tipo 5 e Meningoencefalite Herpética Bovina.** *Semina: Ciências Agrárias*, v. 23(1), p. 131-141. 2002.

COBB, S. P.; BANKS, M.; RUSSELL, C.; THORNE, M. **Bovine lymphotropic herpesvirus in a UK dairy herd.** *Vet Rec* 158, 807-808, 2006.

COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA, R.R.P.; SOUZA, M.A.; FILHO, J.A.O.; CARON, L. **Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil.** *Ciência Rural*, v.32, n.2, p.293-298, 2002.

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(4), p. 315-324. 2002.

DAVISON, A.J. **Evolution of the herpesviruses.** *Vet. Microbiol.*, Netherlands, v.86, p.69-88, 2002.

DEBIASI R.L. & TYLER K.L. **Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis.** *Clin Microbiol Rev.* 2004 Oct;17(4):903-25

DELHON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z.; AFONSO, C.L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. **Genome of bovine herpesvirus 5**. J. Virol. 2003; 77(19):10339-1347.

ELY, R. W.; D'Offay, J.M.; Ruefer, A.H.; Cash, C.Y. **Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, Columbia, v. 8, n. 4, p. 487-492, Oct. 1996.

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

ESTEVEZ, P.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; HUBNER, S.O.; PUENTES, R.; MAISONNAVE, J.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; BATISTA, H.B.C.R.; TEIXEIRA, T.F.; DEZEN, D.; OLIVEIRA, A.P.; DAVID, C.; ARNS, C.W.; ROEHE, P.M. **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 Res. 131, 16–22, 2008.

FARIA, B.O.; FRENEAU, G.E.; BRITO, W.M.E.D.; CAMPOS JR, A.C.P.; VIEIRA, S. **Estudo de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 em municípios de entorno de Goiânia**, Go. Rev. Bras. Reprod. Anim. 2003;27(3):543-545.

FIGUEIREDO, L.A. **Presença do genoma do herpesvírus bovino 5 e do herpesvírus bovino 1 no SNC de bovinos sadios, ortadores de meningoencefalite herpética e outras encefalopatias**. Dissertação (mestrado) –Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 63p.

FRANCO, A.C. & ROEHE, P.M. *Herpesviridae*, p.433-488. In: Flores E.F. (Ed.), Virologia Veterinária. Editora UFSM, Santa Maria, 2007.

FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; RAHAL, P.; CARDOSO, T.C. **Detection of bovine Herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic test of bovine encephalitis** Journal of Virological Methods 146 (2007) 335–340

FITZPATRICK, D.R.; BABIUK, L.A.; ZAMB, T.J. **Nucleotide sequence of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gill; a structural model for gill as a new member of the immunoglobulin superfamily and implications for the homologous glycoproteins of other herpesviruses**. Virol. 173, 46-57, 1989.

FONSECA JR., A.A.; COSTA, E.A.; OLIVEIRA, T.S.; SALES, E.B.; SALES, M.L.; LEITE, R.C.; HENEIMANN, M. B.; REIS, J.K.P. **PCR Multiplex para detecção dos principais herpesvírus neurológicos de ruminantes** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.63, n.6, p.1405-1413, 2011

FURUOKA, H.; IZUMIDA, N.; HORIUCHI, M.; OSAME, S.; MATSUI, T. **Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine**. Acta Neuropathol. 90:565-571, 1995.

FRAZIER, K.; BALDWIN, C.; PENCE, M.; WEST, J.; BERNARD, J.; LIGGETT, A.; MILLER, D.; HINES, I.I.M. **Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic Bovine Herpes virus-4.** *J. Vet. Diag. Invest.*, 2002, 14, 457-462.

GAGNON, C. A.; ALLAM, O.; DROLET, R.; TREMBLAY, D. **Detection of bovine lymphotropic herpesvirus DNA in tissues of a bovine aborted fetus.** *Can Vet J* 51, 1021–1022, 2010.

GALIZA, G.J.N.; SILVA, M.L.C.R.; DANTAS, A.F.M.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. **Diseases of the nervous system of cattle in the semiarid Northeastern Brazil.** *Pesq Vet Bras* 30:267-276, 2010.

GARIGLIANY, M.-M.; BAYROU, C.; CASSART, D.; JOLLY, S.; DESMECHT, D. **Bovine lymphotropic herpesvirus detected in Belgium.** *Vet Rec* 172, 535–536, 2013.

GIBBS, E.P., RWEYEMAMU, M.M. **Bovine Herpesviruses. Part II Bovine Herpesviruses 2 and 3.** *Vet. Bull*, England, v. 47, p. 411-425, 1977.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A.; LOBATO, Z.I.P.; MENDES, L.C.N.; BORGES, A.S.; LEITE, R.C.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. **Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, n.2, p.1-5, 2002.

GUR, S.; DOGAN, N. **The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility.** *Anim. Sci. J.* 81, 304– 308, 2010.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLI E.F. **Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene.** *Vet. Res. Commun.* 27:495-504, 2003.

HAGE, J.J.; SCHUKKEN, Y.H.; BARKEMA, H.W.; BENEDICTUS, G.; RIJSEWIJK, F.A.; WENTINK, G.H. **Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd.** *Vet Microbiol.* 1996 Nov;53(1-2):169-80.

HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; BATISTA, H.B.C.R.; CAMPOS, F.S.; SILVA, J.R.; VARELA, A.P.M.; CENCI, A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. **Seroprevalência de Herpesvírus Bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.9, p.767-773, 2009.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy: 2015 Release; Order: Herpesvirales.** EC 47, London, UK, July 2015; Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>

JONES, C. **Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency.** *Clinical Microbiological Reviews*, Exeter, v. 16, n. 1, p. 79-95, Jan. 2003.

KAASHOEK, M.J.; VAN ENGELENBURG, F.A.; MOERMAN, A.; GIELKENS, A.L.; RIJSEWIJK, F.A.; VAN OIRSCHOT, J.T. **Virulence and immunogenicity in**

**calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants.** Vet. Microbiol. 48:143-53, 1996.

KAHRS, R. F. **Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis.** In: Viral disease of cattle. 2nd ed. Ames : Iowa State University Press. 2001. Cap. 18, p. 159-170.

KIRKLAND, P. D., POYNTING, A.J.; GU, X.; DAVIS, R.J. **Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5.** Veterinary Record, London, v. 165, n. 4, p. 111-113, July. 2009.

KONIG, P.; GIESOW, K.; KEIL, G.M. **Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is nonessential for in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BHV-1 infected cells.** Vet. Microbiol. 86, p. 37–49, 2002.

KRAMPS, J.A.; MAGDALENA, J.; QUAK, J.; WEERDMEESTER, K.; KAASHOEK, M.J.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; RIJSEWIJK, F.A.; KEIL, G.; VAN OIRSCHOT, J.T. **A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1.** J Clin Microbiol. 1994 Sep;32(9):2175-81.

KRAMPS, J.A.; BANKS, M.; BEER, M.; KERKHOF, P.; PERRIN, M.; WELLENBERG, G.J.; OIRSCHOT, J.T. **Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe.** Vet Microbiol. 2004 Sep 8;102(3-4):169-81.

KUNERT FILHO, H.C. **Detecção de DNA de herpesvírus bovinos em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

LEMONS, R.A.A. **Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões Centro-oeste e Sudeste do Brasil.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 155p, 2005.

LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F. L.; MORAES, M. P. **Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.** Ciência Rural, v.25, n.3, p.425-430, 1995.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola, Brasília. **Dados de rebanho bovino e bubalino do Brasil – 2015.** Disponível em: [www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Dados%20de%20rebanho%20bovino%20e%20bubalino%20do%20Brasil%202015\\_site.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Dados%20de%20rebanho%20bovino%20e%20bubalino%20do%20Brasil%202015_site.pdf)

MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A.; BEUTTEMMÜLLER, E.A.; OLIVEIRA, R.R.; DUCATTI, S.O. **Evidência sorológica da infecção de bovinos de corte pelo Herpesvírus Bovino 1, na região de Londrina, PR.** In: PANVET, 15., 1996, Campo Grande. Abstracts. Campo Grande: Panamerican Association of Veterinary Sciences, 1996, p. 261.

MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. **Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o Herpesvírus Bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos.** Ciência Rural, v.30, n.2, p.347-350, 2000b.

MEHROTRA, M.L.; SHUCLA, D.C.; SRIVASTAVA, N.C. **Isolation of a new herpesvirus from cases of reproductive disorders in cow.** Indian J Anim Sci, 56:1196-1199, 1986.

MELO, C.B.; OLIVEIRA, A.M.; FIGUEIREDO, H.C.P.; LEITE, R.C.; LOBATO, Z.I.P. **Prevalência de anticorpos contra Herpesvírus bovino-1, vírus da Diarréia Bovina a Vírus e Vírus da Leucose Enzoótica Bovina em bovinos do Estado de Sergipe, Brasil.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.21, n.2, p.160-161, 1997.

MELO, C. B. **Distribuição de anticorpos neutralizantes contra o herpes vírus bovino 1 (HVB- 1) em rebanhos bovinos de aptidão leiteira e de corte do Estado de Minas Gerais.** 1998. 82 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 1998 .

MELO, C.B.; AZEVEDO, E.O.; ALFARO, C.E.P.; LOBATO, Z.I.P.; LOBATO, F.C.F.; LEITE, R.C. **Anticorpos neutralizantes contra Herpesvírus Bovino 1 (HVB-1) em bovinos do sertão da Paraíba.** Ciência Veterinária nos Trópicos, v.2, n.1, p.43-44, 1999

METTENLEITER, T.C. **Herpesvirus assembly and egress.** Journal of Virology, v. 76, n. 4, p. 1537-1547. 2002.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. **Herpesvirus assembly: a tale of two membranes.** Curr Opin Microbiol.2006 Aug;9(4):423-9. Epub 2006 Jun 30.

METZLER, A.E.; WYLER, R. **Prevalence of Bovine herpesvirus 4 in the Swiss cattle population and possible serologic cross reaction with Bovine herpesvirus 1 (IBR/IPV virus).** Schweiz. Arch. Tierheilkd. 128, 459-467, 1986.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. **Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5.** Arch. Virol. 146 (4), 633–652, 2001.

MILLER, J.M.; WHETSTONE, C.A.; VAN DER MAATEN, M.J. **Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by endonucleases analysis of viral DNA.** Am. J. Vet. Res. 1991; 52(3):458-461.

MONGE, A.; ELVIRA, L.; GONZALEZ, J. V.; ASTIZ, S.; WELLENBERG, G. J. **Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd.** Res. Vet. Sci. 80, 120–125, 2006.

MUELLER, S.B.K.; IKUNO, A.A.; CAMPOS, M.T.G.R.; RIBEIRO, L.O.C. **Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos de um rim de feto de bovino (IPV/IBR)**. Arq. Inst. Biol. 1978;45(3)187-190.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. **Bovine herpesvirus infection and bovine herpesvirus rhinotracheitis**. Veterinary Research v.38, 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**. Japanese Journal of Veterinary Research, v. 44, p. 165–174. 1996.

NAEEM, K.; GOYAL, S. M.; WERDIN R. E. **Prevalence of bovid herpesvirus-4 and its antibody in cattle in Minnesota**. Am. J. Vet. Res. 50, 1931–1935, 1989.

NANDI, S.; PANDEY, A. B.; SHARMA, K.; AUDARYA, S. D.; CHAUHAN, R.S **Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis in cattle of an organized farm by indirect ELISA**. The Indian Cow, v. 7, p. 50–53. 2007.

OIE, World organization for animal health - **manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)**, 6<sup>th</sup> edition, 2008. Disponível em <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>

OIE, World Organization For Animal Health. **MALIGNANT CATARRHAL FEVER- Technical Disease Cards**. June, 2013. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Disease\\_cards/MALIGNANT\\_CATHARRAL\\_FEVER.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/MALIGNANT_CATHARRAL_FEVER.pdf)

OIE, World Organisation for Animal Health. **Confirmation of the negligible BSE risk status of Brazil**, 2016..Disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/bse/statement-on-brazilian-bse-situation-on-the-oie-website/>

OKUDA, L.H.; AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; STEFANO, E.; DEL FAVA, C.; PITUCO, E.M.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; GENNARI, S.M. **Inquérito soro-epidemiológico do Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) no município de Monte Negro, estado de Rondônia, Brasil**. O Biológico, São Paulo, v.68, suplemento, p.157-159, 2006.

OLIVEIRA, R. A. M.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A. A.; LISBOA, J. A. N. **Prevalência das infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos de corte no Estado do Paraná**.Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [online]. 2015, vol.67, n.5 [cited 2016-07-02], pp.1217-1225

PARK, J.B.; KENDRICK, J.W. **The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis**. Arch Gesamte Virusforsch, 41:211-215, 1973.

PENNY, C.D.; HOWIE, F.; NETTLETON, P.F.; SCHOCK, A. **Upper respiratory disease and encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine herpesvirus type 1.** Vet. Rec. 151:89- 91, 2002.

PEREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M.R.; OSORIO, E.A.; FLORES, E.F, ODEON, A.C. **Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system.** Veterinary Pathology, Middleton, v. 39, n. 4, p. 437-444, July. 2002.

PINTO, A.M.V.; ROMIJN, P.C.; SILVA, R.C.F.; SILVA, T.C.; ALFIERI, A.A.; MRATINS, L.L.; WEIBLEN, R.; ROEHE, P.M; PORTES, S.A.R.; LEITE, J.P.G. **Isolation and identification of herpesviruses in brains of calves with negative rabies diagnosis.** XI Encontro nacional de virologia, São Lourenço, MG, 25 -29. Virus Reviews and Research, 5 (suppl.1): 122, 2000.

RIBAS, N.L.K.S.; CARVALHO, R.I.; SANTOS, A.C.; VALENÇOELA, R.A.; GOUVEIA, A.F.; CASTRO, M.B.; MORI, A.E.; LEMOS, R.A.A. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos.** Pesquisa Veterinária Brasileira v.33, n.10, p.1183-1194, 2013.

RICHTZENHAIN, L.J.; BARBARINI, O.; UMEHARA, O. et al. **Rinotraqueíte infecciosa bovina: levantamento sorológico nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.66, p.83-88, 1999.

RIET-CORREA, F. et al. **Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causada por herpesvírus bovino-1.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 9, p. 13-16, 1989.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; FERNANDES, C.G. **Enfermidades do sistema nervoso dos ruminantes no sul do Rio Grande do Sul.** Ciência Rural, v. 28, p.341-348, 1998.

RIET-CORREA, G.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; CERQUEIRA, V.D.; BRITO, M.F.; RIET-CORREA F. 2006. **Meningoencefalite e polioencefalomalacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará.** Pesquisa Veterinária Brasileira 26(1):44-46.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FLORES, E.F. et al. **Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5.** Pesq. Vet. Bras., v.27, p.251-260, 2007.

RIJSEWIJK, F.A.; KAASHOEK, M.J.; LANGEVELD, J.P.; MELOEN, R.; JUDEK, J.; BIENKOWSKA- SZEWCZYK, K.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; VAN OIRSCHOT, J.T. **Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains.** J. Gen. Virol. 80 (Pt 6), 1477–1483, 1999.

ROCHA, M.A. et al. **Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais,1990-1999** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 53, n. 6. 2001.



ROEHE, P.M.; ALMEIDA, R.S.; TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A.; OLIVEIRA, E.A.S.; PETZHOLD, S.A.; SILVA, T.C. **Atualização no diagnóstico e controle de infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5)**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 59, n. 2, p. 27-32, 1997b.

ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B.; OLIVEIRA, L.G.; ROSA J.C.A. **Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais**. *Pesq. Vet. Bras.* 17:41-44, 1997.

ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C.; MEYER, G.; SCHYNTS, F.; KERKHOFS, P.; THIRY, E.; VANOPDENBOSCH, L. **Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow**. *Vet. Rec.* 146, 2000, p.586–588.

ROIZMAN, B.; PELLETT P.E. **Herpesviridae**, in: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *In Fields Virology*, 6<sup>th</sup> ed., United States: Lippincott Williams & Wilkins publishers, p. 1802 – 1822, 2013.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. **The family Herpesviridae: an update**. *Arch Virol* 123:425–449, 1992

SALVADOR, S.W.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSORIO, A.L.A.R. **Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo**. *Pesquisa Vet. Bras.* 18, 1998, p. 76–83.

SANCHES, A.W.D.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L.; BARROS, C.S.L. **Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil**. *Pesq. Vet. Bras.* 20(3):113-118, 2000.

SANTOS, Marcus Rebouças et al. **Antibodies against Bovine herpesvirus 1 in dairy herds in the state of Espírito Santo, Brasil**. *Rev. Ceres* [online]. 2014, vol.61, n.2 pp.280-283.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. **Molecular virology of ruminant herpesviruses**. *Vet. Microbiol.* 53 (1996) 17–29.

SILVA, M.S.; BRUM, M.C.S.; LORETO, E.L.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. **Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvírus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease**. *Virus Res.* 129, 2007, p.191–199.

SILVA, F. F.; CASTRO, R. S.; MELO, L. E. H.; ABREU, S. R. O.; MUNIZ, A. M.M. **Anticorpos neutralizantes contra o HVB-1 em bovinos do Estado de Pernambuco**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.47, n.4, p.597-599, 1995

SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; DEZEN, D.; OLIVEIRA, A.P.; SPILKI, F.R.; CAMPOS, F.S., FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. (2009). **Efficacy of a gE-deleted, bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) inactivated vaccine**. Pesquisa Veterinária Brasileira, 29(7), 545-551

SILVA, D. A. **Identificação de herpesvírus bovino em amostras de cérebro**. 2011. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SILVA, D.R. **Detecção molecular de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em amostras de encéfalos bovinos incluídas em parafina**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

SOUZA, R. I. C. **Estudo retrospectivo de doenças tóxicas e neurológicas em bovinos no estado de Mato Grosso do Sul**. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; LIMA, M.; FRANCO, A.C.; CHIMINAZZO, C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; DRIEMEIER, D.; ROEHE, P.M. **Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a)**. Pesq. Vet. Bras. 24 (1), 43–49, 2004.

SPILKI, F. R.; ESTEVES, P. A.; DA SILVA, A. D.; FRANCO, A. C.; RIJSEWIJK, F. A.; ROEHE, P. M. **A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2)**. Journal of Virological Methods v. 129 n. 2 p. 191-193, 2005.

STRAUB, O.C. **Advances in BHV1 (IBR) Research**. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, v.108, p.419-422, 2001.

SUAREZ-HEINLEIN, A.; METZLER, A.E.; WEIBLEN, R.; BERRIOS, P.; SCHUDEL, A.A. **Molecular characterization of south American bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE**. J. Vet. Med. 1993;40:125-130.

TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S. **Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5)**. Pesq Agrop Gaúcha, v.4, n.1, p.61-65, 1998.

TEIXEIRA, M. F. B.; ESTEVES, P. A.; SCHMIDT, C. S.; SPILKI, F. R.; SILVA, T. C.; DOTTA, M. A.; ROEHE, P. M. **ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1)**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 21 n. 1 p. 33-37., 2001.

THIRY, E. **Recombination in alphaherpesviruses**, Reviews in Medical Virology, v. 15, p.89–103. 2005.

THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY E. **Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1** Vet Res. 2006 Mar-Apr;37(2):169-90.

TIKOO, S.K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L.A. **Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control.** *Adv Virus Res.* 1995; 45:191-223.

USDA - United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**, Foreign Agricultural Service/USDA – Abril de 2016. [http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock\\_poultry.pdf](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf)

VAN DER MAATEN, M. J.; BOOTHE, A. D. **Isolation of a herpes-like virus from lymphosarcomatous cattle.** *Arch Gesamte Virusforsch* 37, 85–96, 1972.

VAN OPDENBOSCH, E.; WELLEMANS, G.; OOMS, A. A.; DEGRYSE A. Y. **BHV-4 (Bovine herpesvirus 4) related disorders in Belgian cattle: a study of two problem herds.** *Vet. Res. Commun.* 12, 347–353, 1988.

VIEIRA, S.; BRITO, W.M.E.D.; SOUZA, W.J.; ALFAIA, B.T.; LINHARES, D.C.L. **Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás.** *Ciência Animal Brasileira*, v.4, n.2, p.131-137, 2003.

VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V.; BASTOS R.G. **Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves.** *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, Oct. 2003.

VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMAN, E.R.; MORAES, M.P. BRAGANÇA, J.F.M. **Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2. (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation.** *Vet. Microbiol.* 98:185-196, 2004..

WELLS, G. A. H.; SCOTT A. C.; JOHNSON, C. T.; GUNNING, R. F.; HANCOCK, R. D.; JEFFREY, M.; DAWSON, M.; BRADLEY, R. **A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle.** *Vet. Rec.*, v. 121, p. 419-420, 1987.

WILL, R. G.; IRONSIDE, J. W.; ZEIDLER, M.; COUSENS, S. N.; ESTIBEIRO, K.; ALPEOVITCH, A.; POSER, S.; POCCHIARI, M.; HOFMAN, A.; SMITH, P. G. **A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK.** *Lancet*, v. 347, n. 921-925, 1996.

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

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. **Infectious Bovine Rhinotracheitis/Vulvovaginitis (BHV 1).** In: *Herpesvirus disease of cattle, horses and pigs*, edited by G. Wittmann, Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London, 1-72, 1989.