

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

**RELAÇÕES GENÔMICAS E SOROLÓGICAS ENTRE O ALFAHERPESVÍRUS
BUBALINO TIPO 1 (BuHV1) E OS ALFAHERPESVÍRUS BOVINOS TIPO 1
(BoHV1) E 5 (BoHV5)**

Doutoranda: Camila Mengue Scheffer
Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehle

Porto Alegre

2017

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

**RELAÇÕES GENÔMICAS E SOROLÓGICAS ENTRE O ALFAHERPESVÍRUS
BUBALINO TIPO 1 (BuHV1) E OS ALFAHERPESVÍRUS BOVINOS TIPO 1
(BoHV1) E 5 (BoHV5)**

Autora: Camila Mengue Scheffer

**Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutora em
Ciências Veterinárias na área de
Microbiologia Veterinária – Virologia**

Orientador: Paulo Michel Roehle

Porto Alegre
2017

CIP - Catalogação na Publicação

Scheffer, Camila Mengue
RELAÇÕES GENÔMICAS E SOROLÓGICAS ENTRE O
ALFAHERPESVÍRUS BUBALINO TIPO 1 (BuHV1) E OS
ALFAHERPESVÍRUS BOVINOS TIPO 1 (BoHV1) E 5 (BoHV5) /
Camila Mengue Scheffer. -- 2017.
89 f.

Orientador: Paulo Michel Roehe.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2017.

1. Alfaherpesvírus. 2. Bubalinos. 3. Bovinos. 4.
Genoma completo. 5. ELISA. I. Roehe, Paulo Michel,
orient. II. Título.

CAMILA MENGUE SCHEFFER
LICENCIADA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TESE DE DOUTORADO

Submetida como requisito parcial para a obtenção do título de
DOUTORA EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA
VIROLOGIA

Aprovada em 21 de março de 2017 por:

Prof. Dr. Paulo Michel Roehle
Orientador e Presidente da comissão

Dr. Cláudio Wageck Canal
Membro da banca

Dr. Dennis Maletich Junqueira
Membro da banca

Dra. Wíllia Marta Elsner Diederichsen de Brito
Membro da banca

AGRADECIMENTOS

Em especial, agradeço aos meus amados pais José e Odete, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando minhas escolhas, acreditando na minha capacidade e incentivando meu crescimento. Serei eternamente grata!

Agradeço minha irmã Carina pelo apoio e minha sobrinha Amandinha por tornar meus dias mais alegres!

Ao meu namorado Mauro pela compreensão, carinho e sábias palavras que me mantiveram em equilíbrio nos momentos mais difíceis.

À minha grande família pela compreensão por todas as vezes que me ausentei, principalmente em momentos especiais.

A todos meus amigos e amigas que, próximos ou distantes, se fazem presentes na minha vida!

Agradeço ao meu orientador, professor Paulo Michel Roehe, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, por incentivar sempre a busca pelo melhor, pelos ensinamentos, pela paciência, dedicação e orientação nesses sete anos que permaneci no grupo LABVIR/IPVDF. Muito Obrigada!

Agradeço ao meu co-orientador, Sýlio Alfredo Petzhold, por ter abraçado este projeto com muito carinho e dedicação. Obrigada pela paciência, disponibilidade e ensinamentos. Você foi essencial no desenvolvimento deste trabalho!

Ao colega e amigo Vacaria pelas conversas, risos, mates e principalmente pela parceria, pelos aproximadamente 5000 testes de ELISA e 1000 bovinos e bubalinos coletados... sem você eu não teria conseguido! Muito Obrigada!

Aos colegas do IPVDF e LABVIR/UFRGS pela disponibilidade e ajuda nos trabalhos de campo e bancada ou que de alguma outra forma contribuíram para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial à Ana Paula, que esteve ao meu lado desde o princípio, que muito me ensinou e me ajudou em todas as fases deste trabalho. Obrigada pela amizade, parceria e pelos tantos “desestresses”. Ao Samuca pelos ensinamentos e ajuda, principalmente nos momentos de desespero em que só ele tinha uma resposta. À Márcia pela amizade, carinho e dedicação, me salvando sempre nos momentos mais difíceis. Vou levar todos comigo por onde eu for!

Aos funcionários e colaboradores do IPVDF, em especial ao Remo por manter o banco de células sempre impecável! Obrigada pelo apoio, disponibilidade e dedicação!

Aos produtores rurais pelas amostras concedidas e pela recepção em suas propriedades.

Às instituições UFRGS, IPVDF/FEPAGRO, LABOVET, CNPq, CAPES e FINEP.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

O alfaherpesvírus bubalino 1 (BuHV1) e os alfaherpesvírus bovinos 1 (BoHV1), 5 (BoHV5) e são membros da ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. O BoHV1 e o BoHV5 são subdivididos em subtipos (BoHV1.1, 1.2a, 1.2b; BoHV5a, b, c). No Brasil circulam BoHV1 e BoHV5 de todos os subtipos até o presente reconhecidos. Em vista dessa variedade de alfaherpesvírus potencialmente infecciosos para bovinos e bubalinos, o conhecimento sobre estes agentes é essencial para a implementação de medidas de controle ou erradicação. Com o objetivo de permitir algumas comparações entre estes agentes e as respostas por eles induzidas em seus hospedeiros, primeiramente foi realizado o sequenciamento do genoma completo de uma amostra de BuHV1 (b6), isolada a partir de prepúcio de búfalos (*Bubalus bubalis*) em 1972, na Austrália. O objetivo foi disponibilizar a primeira sequência completa de um alfaherpesvírus bubalino e avaliar o grau de similaridade entre o genoma desse vírus e os alfaherpesvírus de bovinos. O genoma sequenciado compreende 137.452 pares de bases (pb), com um nível de similaridade nucleotídica de 92,2% com BoHV5 (SV507/99) e 76,7% com BoHV1 (NVSL). Estes resultados permitirão estudos futuros buscando reconstruir a história evolutiva destes vírus, a importância de infecções interespecies na geração de variantes destes agentes e possíveis associações entre tais infecções e patogenicidade. Na segunda etapa dos estudos, foram realizados diversos testes sorológicos buscando definir uma metodologia de diagnóstico adequada para a identificação de anticorpos contra BuHV1 e todos os diferentes subtipos de BoHV1 e BoHV5. Inicialmente, 600 amostras de soros de bovinos de campo foram testadas através do teste de soroneutralização (SN), realizada frente aos sete alfaherpesvírus em estudo. Os resultados da SN foram influenciados pela escolha do vírus desafio utilizado no ensaio. Para obter a sensibilidade máxima do teste (259/600), foi necessário combinar resultados positivos frente a pelo menos cinco diferentes amostras virais. Em seguida, foram preparados ensaios do tipo “ELISA” para detecção de anticorpos utilizando antígenos preparados com cada um dos diferentes tipos/subtipos desses vírus (BuHV1; BoHV1.1, 1.2a, 1.2b; BoHV5a, b, c), individualmente (chamado “single ELISA” ou “sAgELISA”). Os resultados obtidos foram comparados com os resultados da soroneutralização (SN). A sensibilidade do sAgELISA variou significativamente conforme a amostra viral utilizada no preparo dos antígenos. Considerando os resultados frente a apenas um antígeno, a maior sensibilidade foi de 96,1% (249/259), obtida com apenas uma amostra de BoHV5c. Foram necessários pelo menos seis antígenos (BuHV1; BoHV1.2a, 1.2b; BoHV5a, b, c) para atingir a sensibilidade máxima do teste (263/259). Assim, foi desenvolvido um ELISA combinando vários antígenos em um mesmo teste (chamado “multiple ELISA” ou “mAgELISA”). O mAgELISA detectou 263 amostras positivas, resultando em uma concordância ótima entre sAgELISA e mAgELISA ($\kappa=0,99$). Frente a SN, o mAgELISA apresentou uma sensibilidade de 96,5% e especificidade de 96,1% ($\kappa=0,93$; VPP=95,0%; VPN=97,3%). Essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Os resultados obtidos com a SN e mAgELISA foram comparados também a um ELISA comercial para a detecção de anticorpos contra BoHV1. O ELISA comercial utilizado nas comparações não apresentou resultados significativamente diferentes dos demais testes realizados, no entanto, revelou o maior número de resultados discrepantes em relação ao SN, considerado padrão-ouro. Estes resultados revelam que o mAgELISA aqui relatado é adequado para a detecção de anticorpos para BuHV1, BoHV1 e BoHV5, com sensibilidade e especificidade significativamente comparáveis às da SN.

ABSTRACT

Bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1), Bovine alphaherpesviruses 1 (BoHV1) and 5 (BoHV5) are members of the order *Herpesvirales* family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus*. The BoHV1 and BoHV5 are divided into subtypes (BoHV1.1, 1.2a, 1.2b; BoHV5a, b, c). In Brazil, circulates BoHV 1 and BoHV 5 from all subtypes known to the present. In view of this variety of potentially infectious alphaherpesviruses for bovines and buffaloes, knowledge about these agents is essential for the implementation of control or eradication measures. In order to gain a deeper understanding about these agents and the responses induced by them in their hosts, initially, the complete genome sequence of BuHV1-b6, one of the first BuHV1 viruses isolated in Australia in 1972, is reported. The objective was to provide the first complete sequence of a buffalo alphaherpesvirus and to evaluate the degree of similarity between BuHV1 and bovine alphaherpesviruses genomes. The BuHV1-b6 genome is a linear double-stranded DNA molecule, 137,452 bp long, with overall sequence of the 92.2% similarity at the nucleotide level to the reference BoHV5 (SV507/99) strain and 76.7% with BoHV1 (NVSL) strain. These results are expected to be valuable for further studies involving evolutionary chain of these viruses, the interspecies infections importance in generation of variants and possible associations between such infections and pathogenicity. In the second stage of the study, several serological tests were performed in order to define a appropriate diagnostic methodology for the identification of antibodies against BuHV1 and all different subtypes of BoHV1 and BoHV5. Initially, 600 bovine field serum samples were screened in serum neutralization tests (SN) performed against all seven virus types/subtypes. The SN results were influenced by the choice of the challenge virus. The maximum number of positive sera (259/600) was detected by adding the positive results obtained with at least five different viruses. Seven enzyme linked immunoassays were prepared with each of the seven antigens (BuHV1; BoHV1.1, 1.2a, 1.2b; BoHV5a, b, c), individually (single antigen ELISAs; sAgELISAs). The results obtained were compared to the SN. The sensitivity of the sAgELISAs was also influenced by the choice of antigen. Considering the results against only one of them, the best sensitivity was 96.1% (249/259), obtained with BoHV5c. Maximum sAgELISA sensitivity (263/259) was achieved when positive results of at least six viruses (BuHV1; BoHV1.2a, 1.2b; BoHV5a, b, c) were combined. A multiple antigen ELISA (mAgELISA) was then prepared by combining of different viral antigens in the same test. The mAgELISA detected 263 positive samples, resulting an optimum concordance between sAgELISA and mAgELISA ($\kappa=0.99$). When compared to SN, the mAgELISA revealed 96.5% sensitivity and 96.1% specificity ($\kappa=0.93$; PPV=95.0%; NPV=97.3%). These differences were not statistically significant. The results of both SN and mAgELISA were compared to a commercially available (IBRgB) ELISA. The results of the commercial ELISA did not vary significantly in relation to others tests performed, however, revealed the highest number of discrepant results in relation to SN, taken as the gold standard. These results reveal that the mAgELISA reported here is suitable for the detection of antibodies to BuHV1, BoHV1 and BoHV5 with sensitivity and specificity significantly comparable to those of SN.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ L: microlitro
ABCB: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
ABIEC: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
A663: amostra viral de BoHV5 subtipo b
Ag: antígeno
BoHV1: alfa herpesvírus bovino 1
BoHV5: alfa herpesvírus bovino 5
BuHV1: alfa herpesvírus bubalino 1
b6: amostra viral de BuHV1
CO₂: dióxido de carbono
DNA: ácido desoxirribonucleico
DO: densidade ótica
DICC₅₀: dose infectiva para 50% dos cultivos celulares
ECP: efeito citopático
ELISA: ensaio imunoenzimático (*enzyme linked immunosorbent assay*)
ELISA IBRgB: ensaio imunoenzimático comercial
Single ELISA ou sAg ELISA: ensaio imunoenzimático realizado com diferentes antígenos virais, individualmente (ensaios separados)
Multiple ELISA ou mAg ELISA: ensaio imunoenzimático realizado com diferentes antígenos virais combinados no mesmo ensaio
EVI88/95: amostra viral de BoHV5 subtipo a
E-MEM: meio mínimo essencial de Eagle
FAO: *Food and Agriculture Organization*
GenBank: Banco de dados do NCBI (“*National Center for Biotechnology Information*”)
G-C: guanina e citosina
gB: glicoproteína B
gC: glicoproteína C
gD: glicoproteína D
gE: glicoproteína E
gG: glicoproteína G
gH: glicoproteína H
gI: glicoproteína I
gK: glicoproteína k
gL: glicoproteína L
gM: glicoproteína M
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HTS: *high-throughput sequencing*
IR: repetição interna (*internal repeat*)
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*
IBR: rinotraqueíte infecciosa bovina (*infectious bovine rhinotracheitis*)
IPV: vulvovaginite pustular infecciosa (*infectious pustular vulvovaginitis*)
IPB: balanopostite pustular infecciosa (*infectious pustular balanoposthitis*)
IFA: imunofluorescência
IPX: imunoperoxidase
ISO97/95: amostra viral de BoHV5 subtipo c
 κ : índice de concordância entre técnicas (*Kappa*)
Kb: kilobases

KCl: cloreto de potássio
KH₂PO₄: fosfato monopotássico
LA: amostra viral Los Angeles de BoHV1 subtipo 1
LTR: transcritos de herpesvírus relacionados à latência
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mRNA: RNA mensageiro
MDBK: células renais de bovino (*Madin Darby Bovine Kidney*)
MOI: multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection*)
NaH₂PO₄: fosfato monossódico
Na₂CO₃: carbonato de sódio
NaHCO₃: bicarbonato de sódio
NaCl: cloreto de sódio
NVSL: amostra viral de BoHV1
OIE: Organização Mundial da Saúde Animal (*World Organization for Animal Health*)
OGP: n-octilglucopiranosídeo
pb: pares de bases
PCR: reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
PG1779/03: amostra viral de BoHV1 subtipo 2b
PBS: tampão salina fosfato (*phosphate buffered saline*)
pH: potencial de hidrogênio iônico
RNA: ácido ribonucleico
REA: análise com enzimas de restrição (*restriction enzyme analysis*)
RS: Estado do Rio Grande do Sul (Brasil)
SN: soroneutralização
SV265/96: amostra viral de BoHV1 subtipo 2a
SV507/99: amostra viral de BoHV5
SFB: soro fetal bovino
SDS: dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)
TR: repetição terminal (*terminal repeat*)
UL: segmento único longo
US: segmento único curto
UL1: segmento da glicoproteína L
UL3: segmento da fosfoproteína
UL4: segmento da glicoproteína G
UL6: segmento da glicoproteína D
US8: segmento da glicoproteína E
US9: segmento da proteína do vírion
UL10: segmento da glicoproteína M
UL16: segmento da proteína do vírion
UL22: segmento da glicoproteína H
UL23: segmento da timidina kinase
UL27: segmento da glicoproteína B
UL44: segmento da glicoproteína C
UL53: segmento da glicoproteína K
UL54: segmento do RNA transportador
VPP: valor preditivo positivo (*positive predictive value; PPV*)
VPN: valor preditivo negativo (*negative predictive value; NPV*)

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Classificação do búfalo doméstico.....	14
Figura 2	Efetivo bubalino brasileiro entre os anos de 1961 e 2014.....	15
Figura 3	Efetivo bubalino na Região Sul do Brasil.....	16
Figura 4	Relações filogenéticas entre alguns membros da família <i>Herpesviridae</i>	18
Figura 5	Diagrama esquemático dos grupos de A - F, conforme a organização genômica dos herpesvírus.....	22
Figura 6	Ilustração simplificada de uma partícula vírica da família <i>Herpesviridae</i>	23
Figura 7	Esquema do ciclo replicativo de um alfa herpesvírus.....	25
Figura 8	Patogenia da infecção latente dos alfa herpesvírus.....	22

CAPÍTULO II

Figura 1	Overview of the features of the BuHV1-b6 genome and alignment with BoHV5 and BoHV1 strains.....	59
-----------------	---	----

CAPÍTULO III

Figura 1	Different reactivity profile of neutralizing antibody-positive field bovine sera in SN and sAgELISA with seven different alfa herpesviruses.....	84
-----------------	--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1	Characteristics of BuHV genes.....	60
Tabela 2	Comparison of GC content and nucleotide and amino acid sequence identities among genes of BuHV1-b6 (KU936049), BoHV5 (NC005261) and BoHV1 (JX898220).....	63

CAPÍTULO III

Tabela 1	Performance of different bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1) as challenge viruses or antigens in SN and sAgELISA tests.....	81
Tabela 2	Comparison between results of SN and sAgELISAs to detect antibodies induced by bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1).....	82
Tabela 3	Comparison between results of sAgELISA and mAgELISA to detect antibodies induced by bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1).....	82
Tabela 4	Comparison between results of SN and mAgELISA to detect antibodies induced by bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1).....	82
Tabela 5	Comparison between results of SN and commercial ELISA to detect antibodies induced by bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1).....	83
Tabela 6	Comparison between results of commercial ELISA and mAgELISA to detect antibodies induced by bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1).....	83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 CAPÍTULO I	14
2.1 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.1 A bubalinocultura no Brasil	14
2.1.2 Bovinos, bubalinos e a sanidade animal	16
2.1.3 Herpesvírus	17
2.1.4 Alfaherpesvírus bovinos	19
2.1.5 Alfaherpesvírus bubalino	19
2.1.6 Subtipos virais	20
2.1.7 Organização genômica	21
2.1.8 Glicoproteínas virais	22
2.1.9 Estrutura viral	23
2.1.10 Ciclo replicativo	24
2.1.11 Epidemiologia	27
2.1.12 Diagnóstico	28
2.1.12.1 Testes Sorológicos	29
2.1.12.2 Isolamento Viral	30
2.1.12.3 Testes moleculares	31
2.1.13 Controle, prevenção e erradicação	32
REFERÊNCIAS	35
3 OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo geral	51
3.2 Objetivos específicos	51
4 CAPÍTULO II	52
Genome sequence of a bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) isolated in Australia in 1972	52
REFERENCES	65
5 CAPÍTULO III	69
Indirect ELISA to detect antibodies induced by bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) and bovine alphaherpesviruses types 1 (BoHV1) and 5 (BoHV5)	69
REFERENCES	85

1 INTRODUÇÃO

Os herpesvírus e suas adaptações às espécies hospedeiras são exemplos de sucesso no processo evolutivo. Estudos genéticos sugerem que tais vírus vêm co-evoluindo com seus hospedeiros há quase um bilhão de anos. A maioria das espécies animais servem de hospedeiro natural a pelo menos um destes vírus (Roizman & Pellett, 2001). Embora estes agentes normalmente estejam intimamente associados com uma determinada espécie, alguns desses vírus são capazes de infectar outras espécies além do seu hospedeiro natural (Thiry et al., 2007).

Dentre os herpesvírus conhecidos até o momento, pelo menos quatro são de importância à bovinocultura: O alfaherpesvírus bovino 2 (BoHV2), o gamaherpesvírus bovino 4 (BoHV4), o alfaherpesvírus bovino 1 (BoHV1) e o alfaherpesvírus bovino 5 (BoHV5). Os dois últimos pertencem à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2016). O BoHV1 e o BoHV5 estão subdivididos em três subtipos virais (BoHV1.1, 1.2a, 1.2b; BoHV5a, b, c). Ambos vírus têm sido associados a vários quadros clínicos em bovinos, como rinotraqueíte, vulvovaginite, balanopostite, encefalite e problemas reprodutivos (Franco et al., 2012). Estes agentes também têm sido estudados na bubalinocultura, que vem apresentando notável crescimento no Brasil (IBGE, 2015). Apesar do BoHV1 e do BoHV5 serem responsáveis por prejuízos econômicos importantes na bovinocultura, estes não foram, até o momento, relacionados a enfermidades em bubalinos. Contudo, os búfalos podem atuar como potenciais reservatórios de alfaherpesvírus bovinos (Thiry et al., 2007). Estudos sorológicos em soros de bubalinos têm evidenciado a presença de anticorpos capazes de neutralizar BoHV1 e BoHV5 (Cortez et al., 2001; Scheffer, 2013).

Os búfalos são hospedeiros naturais do alfaherpesvírus bubalino 1 (BuHV1), vírus pertencente ao mesmo gênero do BoHV1 e do BoHV5 (ICTV, 2016). Desde seu isolamento em 1972 (St. George & Philpott, 1972), poucas pesquisas foram realizadas sobre esse agente. Consequentemente, as informações sobre esse tipo de alfaherpesvírus são limitadas. Associações entre infecções por BuHV1 e quadros patológicos em bubalinos ainda são controversas; a possibilidade do envolvimento do BuHV1 em casos de aborto e enfermidade respiratória em bubalinos na Itália foi levantada (St. George & Philpott, 1972; De Carlo et al., 2004; Petrini et al., 2012; Amoroso et al., 2013). Até o momento, não existem relatos sobre infecções de bovinos com BuHV1. Assim, esse possível intercâmbio viral entre espécies não deve ser descartado. Essa importante questão deve

ser considerada quando monitoramentos sorológicos são realizados, já que estes testes não diferenciam a resposta imune gerada pelos diferentes alfaherpesvírus (Varela et al., 2010).

A soroneutralização (SN) é o teste considerado padrão na identificação de anticorpos contra alfaherpesvírus bovinos, recomendado pela *World Organization for Animal Health* (OIE, 2010). Estudos com soros bovinos demonstram que a SN pode apresentar variáveis importantes que podem influenciar na sensibilidade do teste, como o tempo de incubação da mistura soro-vírus e a escolha da amostra de vírus de desafio (Teixeira et al., 1998; Holz et al., 2010). O mesmo acontece quando soros bubalinos são testados na SN (Scheffer, 2013). Apesar da ampla reatividade sorológica cruzada existente entre esses agentes, diferentes perfis de reatividade podem ser observados quando diferentes amostras virais são utilizadas na SN (Varela et al., 2010). No entanto, esse tipo de análise ainda não havia sido aplicada utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA) como ferramenta, considerado um teste mais sensível que a SN (Durham & Sillars, 1986; Kramps et al., 1994; 2004; Godhardt-Cooper et al., 2009). Tanto a SN quanto o ELISA representam importantes ferramentas que podem auxiliar programas de controle e erradicação das infecções por alfaherpesvírus. Geralmente, esses processos estão baseados, principalmente, na identificação e remoção de animais soropositivos (Kramps et al., 1996; Noordegraaf et al., 2000; Raaperi et al., 2014; OIE, 2016). Assim, a sensibilidade do teste sorológico utilizado para a triagem desses animais é uma questão fundamental para o sucesso de tais programas.

Face a importância dos temas acima abordados, surgiu a necessidade de estudar as relações genômicas e sorológicas entre os alfaherpesvírus bovinos e bubalinos. O primeiro capítulo desta tese apresenta uma revisão bibliográfica sobre o histórico da bubalinocultura no Brasil e os alfaherpesvírus bubalinos e bovinos. O segundo capítulo expõe os resultados obtidos frente ao sequenciamento do genoma completo de uma amostra de BuHV1 (b6) e análises comparativas com BoHV1 e BoHV5. Por fim, o terceiro capítulo apresenta os resultados obtidos frente ao desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos contra BuHV1, BoHV1 e BoHV5.

2 CAPÍTULO I

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 A bubalinocultura no Brasil

Os búfalos foram introduzidos no Brasil a partir do final do século XIX, na Ilha de Marajó, originários da Ásia e Europa, motivada pelo exotismo desses animais (Bernardes, 2007). Somente em 1962, reprodutores de raças puras foram importados visando o melhoramento genético, marcando assim, o início da exploração e expansão do rebanho bubalino no país (ABCB, 2014_a). Em 1966, o registro genealógico e o padrão das raças foram aprovados através da Portaria 505 de 26 de outubro de 1966, do Ministério da Agricultura. Atualmente, no Brasil, quatro raças são reconhecidas oficialmente pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB): as raças Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo - denominadas búfalos de rio - e a Carabao, pertencente ao grupo de búfalos de pântano, ameaçada de extinção no País (Fig.1) (Marques et al., 2003).

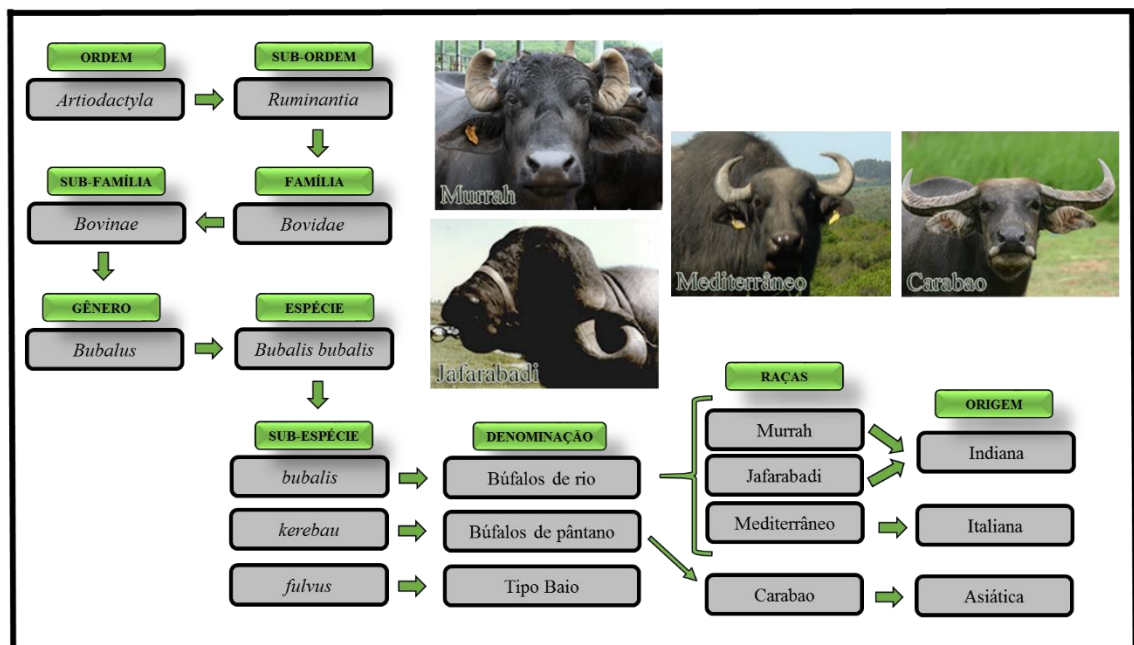


Figura 1. Classificação do búfalo doméstico e as raças bubalinas reconhecidas oficialmente no Brasil.

O desenvolvimento da exploração econômica de bubalinos no Brasil iniciou somente na década de 1980 (Fig. 2), principalmente nas regiões em que, face aos problemas da pecuária em relação à adversidade dos fatores do meio ambiente, os bovinos não produziam satisfatoriamente (ABCB, 2014_a). Conseqüentemente, o interesse de profissionais de diversas áreas envolvidas na bubalinocultura aumentou, contribuindo para a ampliação do conhecimento do potencial produtivo dos bubalinos.

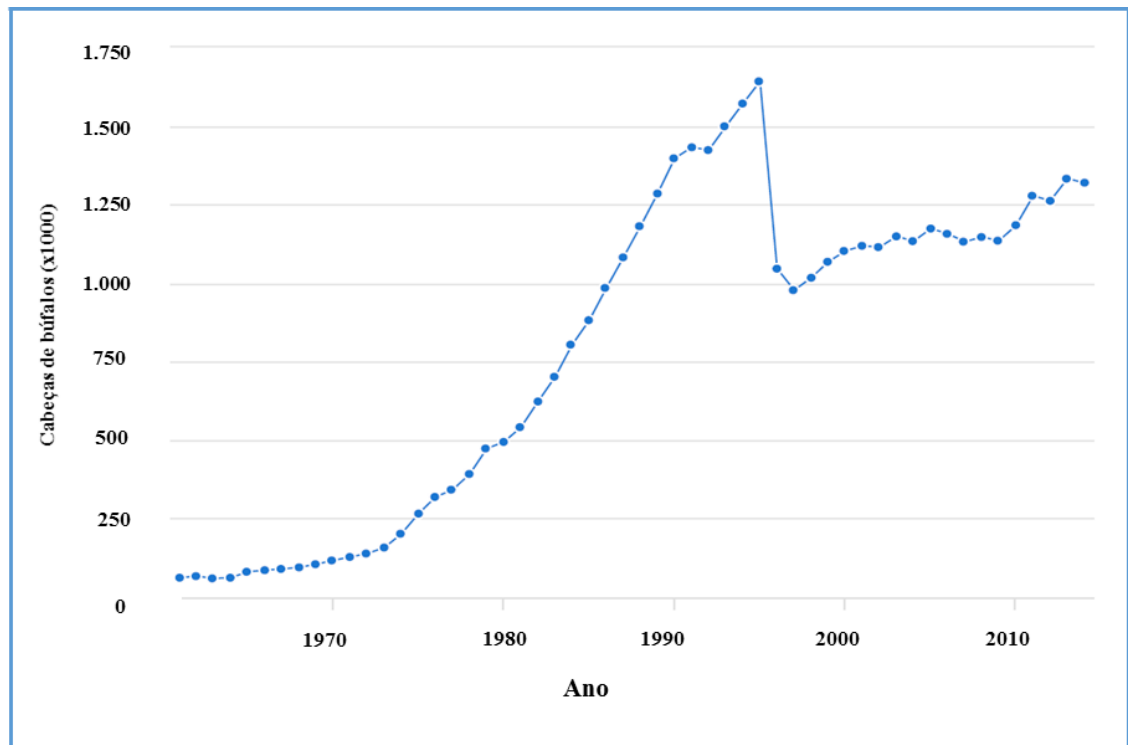


Figura 2. Efetivo bubalino brasileiro entre os anos de 1961 e 2014.

Fonte: Adaptado de FAO, 2017.

Atualmente, o rebanho bubalino brasileiro conta com 1.370 milhão de animais, sendo o maior efetivo registrado na região Norte do país, com 908.310 mil cabeças. As regiões Sudeste (169.880 mil), Nordeste (130.150 mil), Sul (102.750 mil) e Centro-Oeste (58.910 mil) contam com rebanhos menores, porém não menos importantes (IBGE, 2015). A exemplo disso, a região Sudeste detém o maior número de laticínios do país, sendo responsável por 46% do leite de búfalo produzido no Brasil (ANUALPEC, 2009). Na Região Sul, desde a década de 1970, vem ocorrendo uma evolução significativa no rebanho bubalino (Fig.3). O Rio Grande do Sul (RS) é o Estado com maior número de animais da Região Sul, com aproximadamente 74 mil cabeças (IBGE, 2015). É o Estado referência no beneficiamento e comercialização de carne bubalina tendo tornado-se modelo em toda América Latina (Ketzner, 2012).

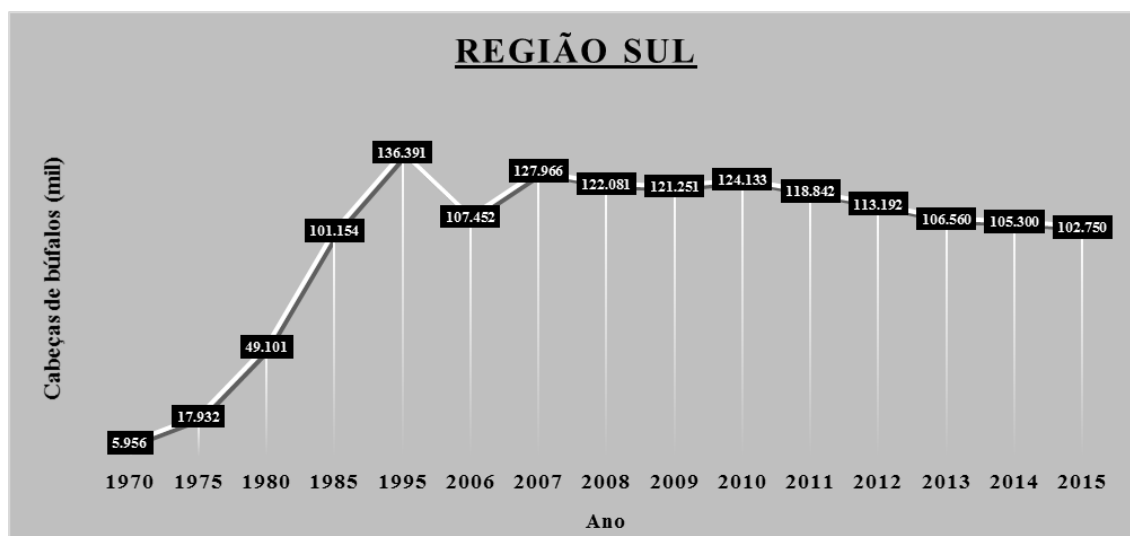


Figura 3. Efetivo bubalino da Região Sul do Brasil.

Fonte: Adaptado de IBGE, 1970-2015.

A perspectiva da bubalinocultura no País é otimista, visto que zootecnicamente a espécie possui espaço como opção pecuária relevante. Seus produtos (carne, leite e derivados) possuem qualidades nutricionais superiores as dos produtos bovinos, como menores taxas de colesterol, gordura e calorias (carne) e teores elevados de proteínas e vitaminas (leite). A grande adaptabilidade ambiental e maior rusticidade faz do búfalo uma boa alternativa e, muitas vezes, uma escolha necessária em ambientes tropicais (ABCB, 2014_{b,c}; Bernardes, 2007).

É importante salientar que o Brasil possui o maior rebanho bubalino do Ocidente. Existem no País exemplares com produtividade leiteira comparável aos melhores espécimes bovinos. No segmento de corte, a exemplo dos zebuínos, dispõe de animais com performances mais expressivas do que as existentes nos países de origem, onde a atividade é relativamente pouco explorada (Oliveira, 2005; Bernardes, 2007).

2.1.2 Bovinos, bubalinos e a sanidade animal

O Brasil tem na bovinocultura uma de suas atividades de maior importância econômica. O País possui o maior rebanho comercial do mundo, liderando as exportações para mais de 180 países (ABIEC, 2014). Atualmente, aproximadamente 215 milhões de cabeças compõe o rebanho nacional, sendo os Estados de Mato Grosso (13,6%), Minas Gerais (11,0%), Goiás (10,2%), Mato Grosso do Sul (9,9%) e Pará (9,4%) os que registraram os maiores efetivos (IBGE, 2015). Desde 2010, a Região Sul vem apresentando uma redução dos rebanhos e veio a se manter estável somente em 2015.

Embora menos expressiva, a bubalinocultura vem ampliando seu espaço e se destacando nos últimos anos (IBGE, 2005-2015). Apesar da proposta inicial ter sido a ocupação de “vazios pecuários”, ou seja, regiões em que a bovinocultura não se desenvolvia satisfatoriamente, posteriormente, acabou estendendo-se também a locais com tradição na pecuária bovina (Bernardes, 2007). A exemplo disso, no Estado do Rio Grande do Sul, alguns pecuaristas vêm crescendo às suas propriedades a criação de búfalos, onde muitos acabam optando pela substituição dos rebanhos bovinos por bubalinos.

Independentemente da região e do tipo de produção, a sanidade animal é uma questão que afeta diretamente o desempenho dos animais e, conseqüentemente, a rentabilidade da propriedade. O controle e/ou erradicação de doenças infecciosas de origem bacteriana, viral ou parasitária é essencial para que fatores como genética, nutrição animal, índices reprodutivos e qualidade de derivados acabem comprometidos. Levando em consideração a habilidade que muitos microrganismos possuem de infectar outras espécies além do seu hospedeiro natural, a proximidade entre animais de espécies diferentes pode aumentar a chance de desenvolvimento e transmissão de doenças. Apesar da rusticidade dos bubalinos, esses animais são suscetíveis a patógenos, muitos deles frequentemente associados a bovinos, como é o caso do vírus da diarreia viral bovina (BVDV), brucelose, tuberculose e raiva (Martucciello et al., 2009; Zimmer et al., 2010; Guanziroli et al., 2010; Cardoso et al., 2010; Carvalho et al., 2015). Do mesmo modo, os herpesvírus, em função do ciclo biológico que apresentam e, particularmente, os alfa herpesvírus bovinos 1 (BoHV1) e 5 (BoHV5), são fortes potenciais candidatos a causar infecções cruzadas entre bovinos e bubalinos (Thiry et al., 2007).

2.1.3 Herpesvírus

Os herpesvírus estão entre os maiores e mais complexos vírus existentes na natureza, encontrando-se amplamente distribuídos em uma variedade de espécies (Davison, 2002). São vírus muito antigos que vêm co-evoluindo com os seus hospedeiros há quase um bilhão de anos. As várias semelhanças observadas na estrutura de diferentes herpesvírus sugerem que eles tenham surgido a partir de um ancestral comum, que parece ter dado origem a duas linhagens: uma representada pelo herpesvírus alfa, beta e gama, que infectam aves e mamíferos; e a outra representada pelos herpesvírus de animais de sangue frio (Fig. 4) (Franco et al., 2012).

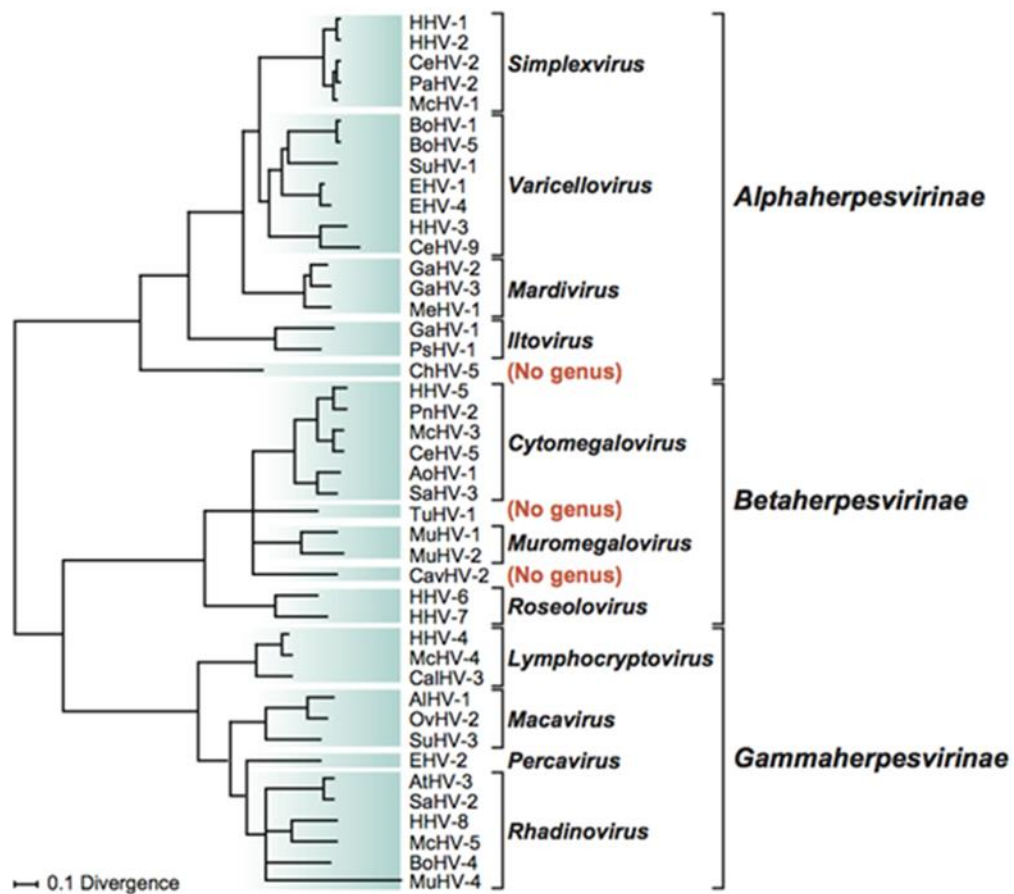


Figura 4. Relações filogenéticas entre alguns membros da família *Herpesviridae*. Árvore Bayesiana construída baseada em alinhamentos de sequências de aminoácidos para os ortólogos dos genes UL15, UL19, UL27, UL28, UL29 e UL30 de HHV-1. A escala indica o número de substituições de aminoácidos por local.

Fonte: Adaptado de McGeoch, et al., 2008, disponível em ICTV, 2011.

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* tem como características um ciclo de replicação curto e a rápida disseminação em cultivo com eficiente destruição das células infectadas. Outra característica marcante é a capacidade de estabelecer latência em gânglios nervosos sensoriais, mais especificamente nos gânglios trigêmeos (quando a infecção ocorre por via respiratória) e gânglios sacrais (quando a infecção ocorre por via genital) (Roizman & Pellet, 2001). A latência permite que o agente se mantenha por tempo indeterminado nos indivíduos infectados sem o desenvolvimento de manifestações clínicas (Stevens, 1994). Dentro desta subfamília encontra-se o gênero *Varicellovirus* (Fig.4) que abriga 17 espécies, entre elas o alfa herpesvírus bovino 1 (BoHV1), o alfa herpesvírus bovino 5 (BoHV5) e o alfa herpesvírus bubalino 1 (BuHV1) (ICTV, 2015).

2.1.4 Alfaherpesvírus bovinos

O BoHV1 e o BoHV5 são agentes etiológicos primários de doenças que causam grande detrimento econômico à bovinocultura (Kirkbride, 1985; Van Schaik et al., 1999; Biswas et al., 2013; Fino et al., 2012; Rola et al., 2015). Estes agentes têm como característica a indução de infecções em sua maioria clinicamente inaparentes. No entanto, esporadicamente, infecções com o BoHV1 podem dar origem a quadros como a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), a vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), a balanopostite pustular infecciosa (IPB) e diversas falhas reprodutivas (Kahrs, 1977; Wyler et al., 1989; Takiuchi et al., 2005; Franco et al., 2012). Essas infecções apresentam elevados níveis de morbidade, porém baixos níveis de mortalidade (Weiblen et al., 1992).

O BoHV5, por sua vez, pode causar ocasionalmente encefalites ou meningoencefalites, usualmente com elevada mortalidade (French, 1962; Studdert, 1989; Franco et al., 2012). O BoHV5 também pode induzir sinais de doença respiratória (Schudel et al., 1986, Hübner et al., 2005) e estar igualmente presente no trato genital de bovinos (Esteves et al., 2003; Kirkland et al., 2009; Oliveira et al., 2011).

Até o momento, o BoHV1 e o BoHV5 não têm sido relacionados a enfermidades em bubalinos. Todavia, estudos sorológicos envolvendo essa espécie evidenciam a presença de anticorpos capazes de neutralizar ambos agentes (Cortez et al., 2001; Scheffer, 2013). Recentemente, foi relatado o isolamento de BoHV1 de búfalos na Itália (Fusco et al., 2015).

2.1.5 Alfaherpesvírus bubalino

O BuHV1, vírus isolado de bubalinos, ainda é pouco estudado. Consequentemente, as informações sobre esse tipo de alfaherpesvírus são limitadas. Associações entre infecções por BuHV1 e quadros patológicos em bubalinos ainda são controversas; esse agente não está associado a enfermidades, já que os animais dos quais foi isolado apresentavam infecções subclínicas (St. George & Philpott, 1972; De Carlo et al., 2004). No entanto, tem sido sugerido seu envolvimento em casos de aborto e enfermidade respiratória em animais de rebanhos bubalinos na Itália (Petrini et al., 2012; Amoroso et al., 2013). Até o momento, não existem relatos sobre infecções de bovinos com BuHV1.

2.1.6 Subtipos virais

A diferenciação tipo e subtipo-específica é uma importante ferramenta que possibilita um estudo mais detalhado sobre a biologia dos herpesvírus. A subdivisão em genótipos foi proposta com base em características genômicas e antigênicas (Franco et al., 2012). A análise molecular do DNA viral com enzimas de restrição permitiu que amostras de BoHV1 isoladas de casos de encefalite fossem caracterizadas como um subtipo viral, o BoHV1.3 (Metzler et al., 1985; Shudel et al., 1986). O *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) reclassificou o BoHV1.3 como um tipo distinto, o BoHV5 (Roizman et al., 1992), devido ao potencial neuropatogênico diferenciado destas amostras. Posteriormente, através da análise do genoma de diferentes amostras de BoHV5, foi proposto sua subdivisão nos subtipos virais “a” e “b” (D’Offay et al., 1993). Mais recentemente, o subtipo “não a, não b” foi proposto por D’Arce e colaboradores (2002) que, por conveniência e simplicidade, foi substituída pela denominação de subtipo “c” (Franco et al., 2012).

Nenhuma associação clínica foi relacionada ainda entre os distintos subtipos de BoHV5. Entretanto, à medida que mais amostras forem subtipificadas, é muito provável que detalhes de sua patogenia venham a ser esclarecidos e que sejam identificadas associações entre determinados subtipos e certas patologias (P.M. Roehle, comunicação pessoal).

Em contraste com a descrição das subdivisões do BoHV5, a subtipificação do BoHV1 tem sido associada a diferentes quadros clínicos, mas igualmente obtidas com base em características genômicas e antigênicas (Franco et al., 2012). As amostras classificadas como BoHV1.1 representam as amostras clássicas do vírus associadas com doença respiratória (IBR) e, ocasionalmente, abortos (Engels et al., 1981; Metzler et al., 1985). As amostras denominadas BoHV1.2a estão associadas a uma ampla variedade de manifestações clínicas, incluindo doença do trato genital (IPV/IPB), abortos e infecções do trato respiratório (Miller et al., 1991; Van Oirschot, 1995). Já as consideradas do subtipo BoHV1.2b são frequentemente associadas com doença respiratória leve e IPV/IPB, mas não a casos de aborto (Miller, 1991; Smith et al., 1995). Devido à isso, amostras do subtipo 2b são consideradas menos patogênicas do que as amostras do subtipo 1 (Metzler et al., 1985; Edwards et al., 1990; Miller et al., 1991).

Quanto ao BuHV1, devido ao escasso número de isolamentos até o presente efetuados, somente um tipo é reconhecido. A raridade de isolamentos de amostras de

herpesvírus bubalinos provavelmente reflete a sua baixa patogenicidade, ou seu alto grau de adaptação, à espécie hospedeira natural. Além da amostra b6, isolada por St. George & Philpott em 1972, alguns outros vírus já foram isolados. Estas demonstram estreita similaridade com a amostra b6, embora com diferenças geneticamente identificáveis (De Carlo et al., 2004; Petrini et al., 2012; Amoroso et al., 2013; Maidana et al., 2014). Embora não haja até o presente dados suficientes para justificar propostas de subtipagem de BuHV1, a existência de amostras virais mais virulentas de BuHV1 foi sugerida (Amoroso et al., 2013).

2.1.7 Organização genômica

Os vírions dos herpesvírus possuem como material genético uma molécula de DNA de fita dupla linear de 120 a 250 mil pares de bases (kb). Dependendo da espécie viral, o genoma pode variar com relação à extensão, a presença de sequências repetidas e a composição de bases do DNA, que pode variar de 31 a 75% de G-C em relação ao total de nucleotídeos (Roizman & Pellet, 2001). O BoHV1 e o BoHV5 apresentam genoma com 134.896 e 138.890 pares de bases (pb), respectivamente, sendo 75% de sua composição de bases constituída por G-C (Delhon et al., 2003; D'Offay & Fulton, 2013). O BuHV1 apresenta genoma com 137.452 pb, sendo 76,8% constituído por G-C (Scheffer et al., 2017).

As diferenças de tamanho dos genomas de isolados de um mesmo vírus podem chegar a 10 Kb e, frequentemente, refletem a ocorrência de deleções ou a existência de sequências repetidas (Roizman et al., 1992). Conforme o arranjo das sequências, foram designados seis grupos de A a F, estando o BoHV1, BoHV5 e BuHV1 classificados no grupo D (McGeoch & Davison, 1999; Roizman & Knipe, 2001; Scheffer et al., 2017) (Fig. 5). Os genomas dos vírus do grupo D estão organizados em dois segmentos: um segmento único longo (UL) e um segmento único curto (US), este último flanqueado por duas sequências repetidas e invertidas, sendo uma interna (IR) e outra terminal (TR) (Fig. 5) (Schwyzer & Ackermann, 1996).

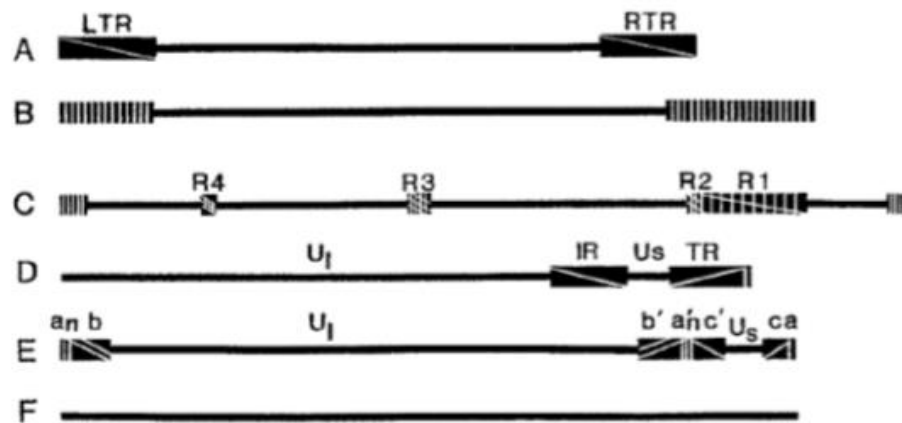


Figura 5. Diagrama esquemático dos grupos de A a F, conforme a organização genômica dos herpesvírus. As linhas horizontais representam regiões únicas ou quase únicas do genoma. Os retângulos representam as regiões repetidas, designadas terminais esquerda ou direita (LTR ou RTR) para o grupo A; repetições internas (R1 a R4) para o grupo C e repetições internas terminais (IR e TR) para o grupo D, onde o BoHV1, BoHV5 e o BuHV1 estão classificados. No grupo B, sequências são repetidas várias vezes nas duas terminações. No grupo E, as terminações consistem de dois elementos: uma terminação contendo n cópias da sequência a ao lado de uma sequência maior b ; a outra terminação tem uma cópia da repetição direita ao lado de uma sequência c . As terminações ab e ca separam as regiões única longa (UL) e única curta (US) (Adaptado de Roizman & Pellet, 2001).

Os genomas dos herpesvírus apresentam entre 70 e 200 genes, de acordo com o seu tamanho. Os genomas do BoHV1, BoHV5 e BuHV1 compreendem cerca de 70 genes, dos quais pelo menos 10 codificam glicoproteínas, algumas delas essenciais à multiplicação viral.

2.1.8 Glicoproteínas virais

As glicoproteínas virais diferenciam-se quanto as suas propriedades antigênicas e moleculares assim como em suas funções biológicas. As glicoproteínas podem ser divididas em dois grupos: as essenciais à replicação (gB, gD, gH, gK e gL) e as não essenciais à replicação (gC, gG, gM, gI e gE). Na região UL do genoma localizam-se os genes que codificam a gK (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10), gL (UL1) e na região US estão os genes que codificam a gG (UL4), gI (US9), gD (UL6) e gE (US8) (Schwyzer & Ackermann, 1996).

As glicoproteínas estão inseridas no envelope e participam de várias etapas do ciclo viral que inclui interação com membranas celulares (adsorção), penetração, maturação e saída do vírus da célula. Por essa razão elas constituem um alvo importante para a resposta imune do hospedeiro (Mettenleiter, 2004; Thiry et al., 2005). As proteínas não essenciais possuem importante papel na disseminação viral em tecidos e na proteção

contra a resposta imune do hospedeiro (Koppers-Lalic et al., 2001, Roizman & Pellet, 2001).

A gC é a glicoproteína viral mais abundante, sendo expressa em altos níveis no envelope viral e na superfície das células infectadas. Seu papel principal está relacionado a adsorção viral, ligando-se aos receptores de heparina na superfície das células-alvo (Liang et al., 1993; Okazaki et al., 1994; Babiuk et al., 1996). São estruturalmente conservadas entre todos os herpesvírus as glicoproteínas B, H, L e provavelmente desempenham papel essencial na entrada do vírus na célula (Schwyzer & Ackermann, 1996).

2.1.9 Estrutura viral

Os vírions dos herpesvírus variam de 120 a 300 nm em diâmetro. A partícula viral é formada basicamente por quatro estruturas: núcleo, capsídeo, tegumento e envelope (Fig. 6). O núcleo abriga uma molécula de DNA de fita dupla linear, protegido por um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100 nm de diâmetro, formado por 162 capsômeros (Roizman & Pellet, 2001).

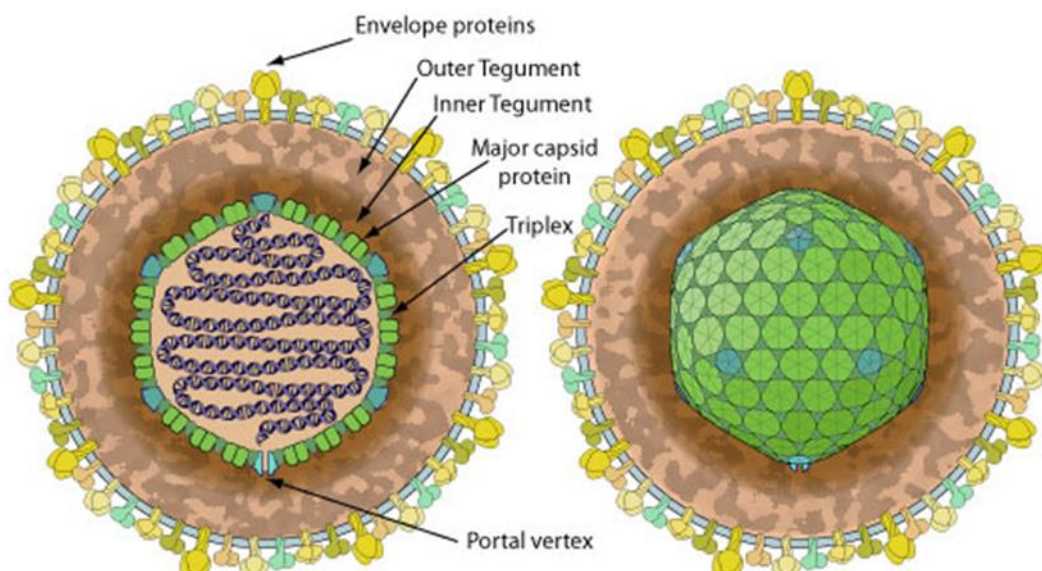


Figura 6. Ilustração simplificada de uma partícula vírica da família *Herpesviridae*. As setas indicam os principais componentes: Envelope, tegumento, capsídeo e proteínas. No centro, o núcleo contendo o material genético viral.

Fonte: Viralzone Swiss Institute of Bioinformatics, 2012.

O nucleocapsídeo encontra-se envolvido por uma camada proteica, o tegumento. Este possui espessura variável de acordo com a localização do vírion na célula, influenciando assim a morfologia e dimensões da partícula vírica (Franco et al., 2012). Este, por sua vez, é circundado por uma camada lipídica denominada envelope, onde encontram-se várias protrusões formadas por glicoproteínas que desempenham importante papel na interação entre o vírus e a célula hospedeira (MacLachlan & Dubovi, 2010).

2.1.10 Ciclo replicativo

A porta de entrada do BoHV1 e do BoHV5 no hospedeiro são as células epiteliais dos sítios primários de infecção que, dependendo da rota viral, podem ser as mucosas oronasal ou genital (Bagust & Clark, 1972). Para que ocorra a entrada do vírus na célula, é necessário a interação entre as glicoproteínas do envelope viral com receptores específicos presentes na superfície celular (Roizman & Knipe, 2001). Os receptores celulares são moléculas de membrana que desempenham funções diversas na biologia celular e que, ocasionalmente, servem para os vírus se ligarem e iniciarem a infecção (Franco et al., 2012). Essa interação inicial do BoHV1 e do BoHV5 com as células suscetíveis é mediada pela glicoproteína gC e/ou gB com o sulfato de heparina na superfície celular (Meyer et al., 1999). Esta interação permite que ocorra a penetração do vírion no citoplasma da célula (Fig. 7), onde permanecem algumas proteínas do tegumento, enquanto outras são transportadas ao núcleo celular junto com o nucleocapsídeo (Wild et al., 1998; Hushur et al., 2004). No núcleo ocorre a liberação e transcrição do genoma viral (Döhner et al., 2002). A transcrição do genoma tem sua sequência regulada sob forma de uma cascata, graças a fatores que controlam a expressão dos genes virais, determinando as fases da infecção: imediata (IE- *immediate early*), inicial (E- *early*) e tardia (L- *late*). As fases citadas envolvem três grupos de genes virais: alfa, beta e gama, respectivamente (Misra et al., 1994; Roizman & Knipe, 2001). Os genes alfa e beta são expressos abundantemente antes da replicação do genoma, enquanto os genes gama somente são expressos em quantidade significativa após a replicação do DNA viral (Fenner et al., 1993). Simultaneamente à expressão das proteínas virais, ocorre a inibição da transcrição de genes, do processamento e transporte de mRNAs e síntese de proteínas da célula hospedeira. Esses eventos são induzidos por proteínas virais e têm como objetivo subverter a maquinaria celular para o processamento e transporte de

mRNA virais e síntese de proteínas virais. Assim, o produto da expressão dos genes alfa, beta e gama, juntamente com a maquinaria da célula hospedeira atuam na replicação do genoma e construção das partículas víricas (Franco et al., 2012).

A maturação, ou seja, a aquisição da capacidade infectiva pelas partículas víricas recém-formadas, ocorre com a construção do nucleocapsídeo no núcleo celular (associação do DNA viral com o capsídeo) (Gibson, 2008) e a associação do nucleocapsídeo com o envelope viral (Mettenleiter et al., 2006). O envelopamento dos nucleocapsídeos formados ocorre por brotamento em vesículas derivadas do Complexo de Golgi, onde os vírions envelopados são transportados até a superfície e liberados da célula infectada para o meio extracelular (Mettenleiter, 2004; Mettenleiter et al., 2006).

Quando os herpesvírus se multiplicam em células completamente permissivas, o ciclo replicativo completa-se em aproximadamente 20 horas. As células infectadas não sobrevivem à infecção, devido à severas alterações estruturais e bioquímicas que ocorrem em consequência da replicação viral (Franco et al., 2012).

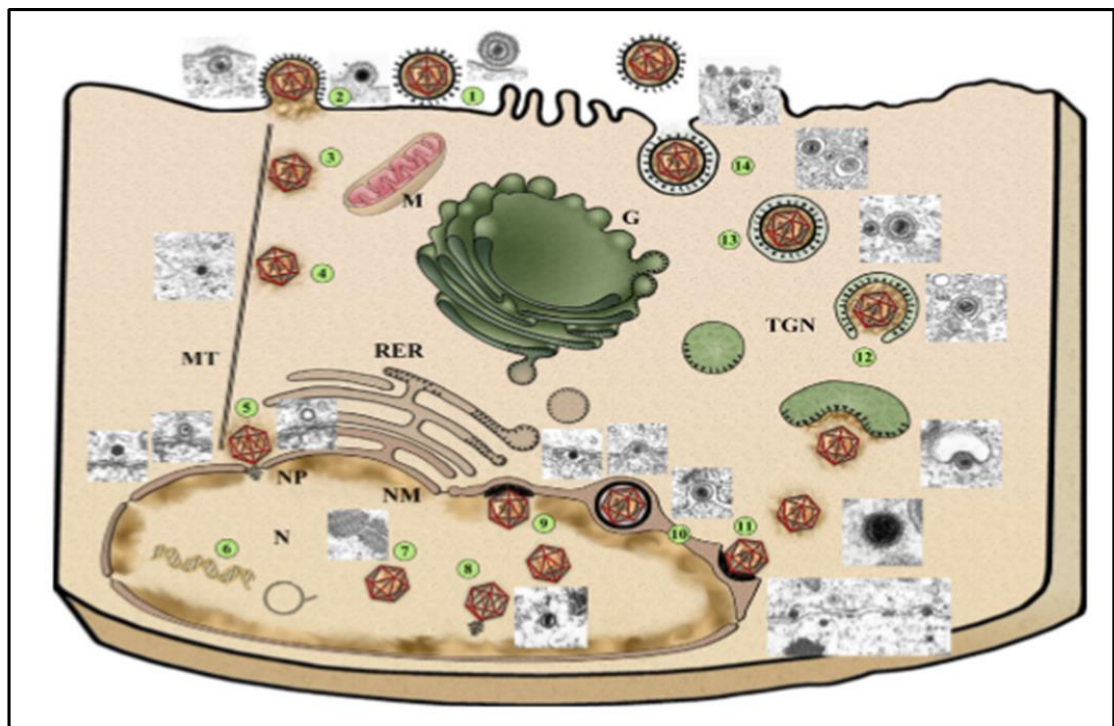


Figura 7. Esquema do ciclo replicativo produtivo de um alfa herpesvírus. Após a fixação (1) e penetração (2), os capsídeos são transportados para o núcleo (N) (3) através da interação com microtúbulos (MT) (4), encaixam no poro nuclear (NP) (5), onde o genoma viral é liberado. Neste local ocorre a transcrição de genes virais e a replicação do genoma (6). Os concatâmeros, formados na replicação do genoma, são clivados durante o processo de montagem dentro dos capsídeos pré-formados (7, 8) que, em seguida, deixarão o núcleo por brotamento do nucleocapsídeo com a membrana nuclear interna (MNI) (9), seguido pela fusão do envelope destes vírions primários localizados no espaço perinuclear (10) com a membrana exterior nuclear (11). A maturação final ocorre no citoplasma por envelopamento secundário do capsídeo via brotamento em vesículas do aparelho de Golgi (TGN) (12) contendo as glicoproteínas virais (pontos negros), resultando em um vírion envelopado dentro de uma vesícula celular que será transportado à superfície da célula (13), onde ocorre a fusão da vesícula com a membrana plasmática (14), levando a liberação de um vírion maduro. (RER) Retículo endoplasmático rugoso; (M) Mitocôndria; (G) Aparelho de Golgi.

Fonte: Mettenleiter et al., 2009.

Outro ciclo replicativo é reconhecido na biologia dos alfa herpesvírus: a infecção latente. Em contraste com a infecção produtiva, esta etapa não determina a destruição das células infectadas e não há produção de novas partículas virais (Nandi et al., 2011). Neste tipo de infecção os únicos genes expressos são os que produzem transcritos relacionados com a latência (LRT) (Workman et al., 2011). Tal expressão resulta na inibição do ciclo lítico e na indução de um estado anti-apoptótico das células infectadas (Henderson et al., 2004). A ausência de replicação viral resulta na absoluta ausência de sinais clínicos, caracterizando uma infecção totalmente subclínica e de difícil detecção (Franco et al., 2012). Os alfa herpesvírus possuem a capacidade de estabelecer latência em gânglios nervosos sensoriais, mais especificamente nos gânglios trigêmeos (quando a infecção ocorre por via respiratória) (Fig.8) e gânglios sacrais (quando a infecção ocorre por via genital) (Roizman & Pellet, 2001).

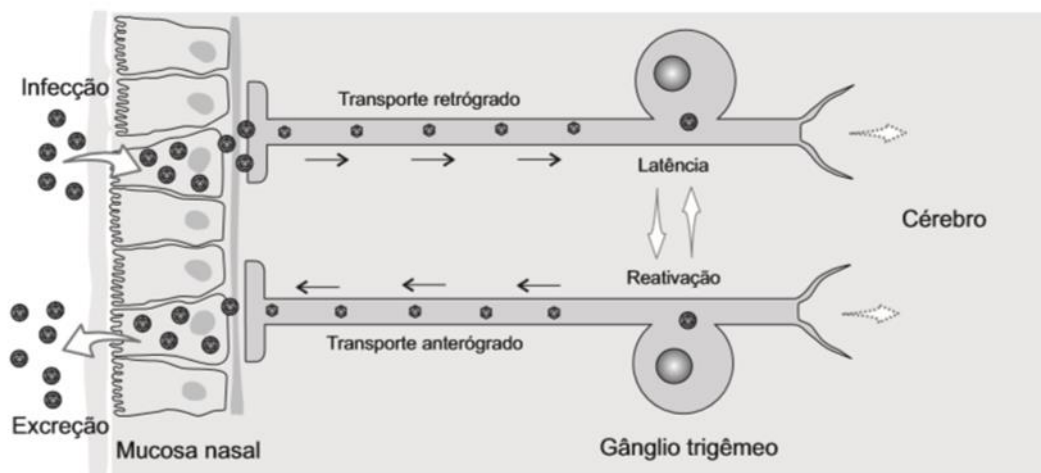


Figura 8. Patogênese da infecção latente dos alfa herpesvírus. Após a replicação primária, os nucleocapsídeos são transportados até os corpos neuronais localizados nos gânglios sensoriais e autonômicos. Nestes neurônios, o vírus replica produtivamente ou estabelece infecção latente. A infecção latente pode ser reativada e resulta em replicação produtiva. Os vírions produzidos são transportados de volta aos locais de replicação primária, onde replicam e são excretados. O acesso dos vírions ao encéfalo pode ocorrer tanto durante a infecção aguda quanto após a reativação.

Fonte: Franco et al., 2012.

Estudos apontam o estabelecimento de latência pelo BoHV1 em células sanguíneas (Mweene et al., 1996; Wang et al., 2001), baço (Mweene et al., 1996), tonsilas (Winkler et al., 2000; Pérez et al., 2005) e linfonodos (Vogel et al., 2004). Recentemente, Favier e colaboradores (2014) sugeriram que o BoHV5 também pode estabelecer latência em tonsilas e leucócitos.

A latência, uma vez estabelecida, permanece por toda vida do hospedeiro, podendo ser eventualmente intercalada por episódios de reativação (Fig.8) (Muylkens et al., 2007; Jones & Chowdhury, 2008). Isso pode acontecer em resposta a estímulos naturais (estresse, parto, desmame, transporte) ou induzidos (tratamento com corticosteróides) (Meyer et al., 2001). Quando a reativação é acompanhada de sinais clínicos, denomina-se recorrência ou recrudescência, geralmente caracterizada por sinais clínicos mais brandos do que aqueles resultantes da infecção aguda (Franco et al., 2012).

2.1.11 Epidemiologia

A maior parte dos inquéritos epidemiológicos buscando determinar a prevalência de infecções por herpesvírus bovinos estão baseados em testes sorológicos (Barbosa et al., 2005; Holz et al., 2009; Bezerra et al. 2012; Silva et al., 2015). No entanto, devido à estreita relação antigênica entre o BoHV1 e o BoHV5, consequência do alto grau de similaridade molecular entre os dois, testes sorológicos são incapazes de distinguir as respostas imunes induzidas por ambos agentes (Mahony, 2010; Franco et al., 2012). Em função disso, a prevalência tipo-específica das infecções por BoHV1 e BoHV5 permanece efetivamente desconhecida (Roehe et al., 1997; Teixeira et al., 1998). A exemplo disso, amostras que hoje são consideradas BoHV5 outrora eram consideradas um subtipo de BoHV1 (BoHV1.3), devido às extensas reações sorológicas cruzadas observadas entre ambos agentes (French, 1962; Roizman et al., 1992). A maioria dos estudos de soroprevalência de alfa herpesvírus bovinos eram - e são até hoje - executados frente a somente uma cepa de BoHV1 (Médici et al., 2000; Vieira et al., 2003; Poletto et al., 2004; Barbosa et al., 2005; Affonso et al., 2010). Entretanto, os resultados podem ser significativamente alterados pelo uso de distintas cepas virais em testes de soroneutralização (Holz et al., 2010; Varela et al., 2010). Assim, as prevalências investigadas até o momento tornam-se apenas meras estimativas que, de qualquer forma, auxiliam no conhecimento da epidemiologia desses agentes.

O BoHV1 encontra-se amplamente disseminado em todas regiões do mundo onde se pratica a bovinocultura (Nandi et al., 2009). Na América do Norte, a infecção tem caráter endêmico com prevalência elevada (Solis-Calderon et al., 2003; Cárdenas et al., 2006; Segura-Correa et al., 2016). A infecção também tem sido detectada na África, Austrália, Ásia e Europa (Achour & Moussa, 1996; Ramneek et al., 2005; Yan et al.,

2008; Shirvani et al., 2012; Ravishankar et al., 2013; Nikbakht et al., 2015; Jo Moore et al., 2015; Sayers et al., 2015).

Na América do Sul, as infecções por BoHV1 apresentam caráter endêmico na Argentina, Uruguai e Colômbia (Odeón et al., 2001; Guarino et al., 2008; Ruiz-Sáenz et al., 2010). A prevalência de BoHV1 também tem sido investigada na Venezuela, Equador e Peru (Obando et al., 1999; Stahl et al., 2002; Carbonero et al., 2011). No Brasil, inúmeros estudos têm demonstrado a alta frequência de animais/rebanhos sororreagentes (Del Fava et al., 2002; Barbosa et al., 2005; Tomich et al., 2009; Holz et al., 2009; Afonso et al., 2010; Dias et al., 2013).

A infecção pelo BoHV5 parece ser causa de morbidade e mortalidade importante somente em países do Hemisfério Sul, embora já tenha sido descrita, ainda que raramente, no Hemisfério Norte (Rissi et al., 2007). Casos isolados associados ao BoHV5 já foram documentados na América do Norte, Europa, Ásia e Austrália (French, 1962; Barenfus et al., 1963; Bartha et al., 1969; Gough & James, 1975; Ashbaugh et al., 1997; Chinchkar et al., 2002). Relatos de surtos tem sido mais frequente no Brasil e Argentina (Pérez et al., 2003; Rissi et al., 2006; Colodel et al., 2002).

Quanto a epidemiologia da infecção por alfaherpesvírus em bubalinos, inquéritos sorológicos em países da Ásia, Europa e América do Sul têm demonstrado a presença de anticorpos capazes de neutralizar BoHV1 e/ou BuHV1 (Akhtar & Asif, 1996; Cavirani et al., 1997; Cortez et al., 2001; Pharande et al., 2004; De Carlo et al., 2004; Scicluna et al., 2007). No entanto, devido a reatividade sorológica cruzada existente em testes de soroneutralização, não se pode descartar a possibilidade de infecção por BoHV5 nos animais investigados. Provavelmente, o mesmo pode ocorrer em bovinos, onde estudos envolvendo infecção por BuHV1 ainda não foram descritos.

2.1.12 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da infecção por alfaherpesvírus bovinos é baseado no histórico da propriedade, sinais clínicos e lesões observadas ao exame clínico. No entanto, a suspeita clínico-patológica deve ser confirmada por exames laboratoriais, já que essas características são apenas sugestivas, mas não patognomônicas de herpesvirose. As três principais formas de diagnóstico laboratorial são a pesquisa de antígenos e anticorpos por técnicas sorológicas, o isolamento viral em cultivos celulares e a identificação do DNA através de métodos moleculares. Podem ser utilizadas no diagnóstico laboratorial

amostras como: suabes de secreções nasais, oculares, vaginais, de prepúcio ou de áreas com lesões evidentes, assim como amostras de tecidos e soro. Durante infecções agudas ou subclínicas recentes, devem ser realizados testes para a detecção de vírus, antígenos ou DNA viral em amostras clínicas. Caso não tenha sido possível obter amostras na fase aguda, a infecção pode ser diagnosticada por meio da detecção de anticorpos (Franco et al., 2012).

2.1.12.1 Testes Sorológicos

O emprego de testes sorológicos fornece um bom histórico de exposição, mas possui significado limitado quando o objetivo é diagnosticar um evento de doença clínica (Fulton & Confer, 2012). Segundo a OIE, a técnica de soroneutralização (SN) é considerada padrão no diagnóstico sorológico de infecções por BoHV1 e BoHV5, mesmo não permitindo uma diferenciação precisa entre os animais infectados com diferentes tipos e subtipos virais (Teixeira et al., 1998; OIE, 2010). Da mesma forma, a SN não é capaz de diferenciar animais vacinados daqueles naturalmente infectados com herpesvírus (Takiuchi et al., 2001). Ainda assim, essa técnica tem sido amplamente utilizada em inquéritos epidemiológicos, certificação de rebanhos, triagem de reprodutores e no suporte de investigações clínicas, inclusive de bubalinos (Akhtar & Asif, 1996; Cavirani et al., 1997; Nandi et al., 2011; Franco et al., 2012). Em animais com infecção recente ou latentemente infectados, resultados falso-negativos podem ser obtidos devido aos baixos títulos de anticorpos presente no soro, não detectáveis por procedimentos sorológicos (Del Fava et al., 2006; Puentes et al., 2016).

Estudos demonstram que a sensibilidade (capacidade em detectar amostras positivas) do teste de SN pode ser influenciada conforme a cepa viral utilizada como desafio. Além disso, o tempo de incubação do soro-teste com o vírus de desafio antes da adição das células é outro fator importante (Vieira et al., 2003; Holz et al., 2010; Varela et al., 2010). Segundo a OIE, um período de incubação de 24 horas pode aumentar em 16 vezes a detecção de anticorpos.

Baseado na avaliação da neutralização de uma quantidade predeterminada de doses infectantes de vírus frente ao soro do animal suspeito, o teste de SN leva de 3 a 5 dias para a obtenção do resultado. Caso o soro contenha anticorpos neutralizantes, o vírus é neutralizado e impedido de infectar a monocamada de células, impedindo, conseqüentemente, o efeito citopático (ECP) característico da infecção por herpesvírus.

Fatores como tempo de execução, produção e manutenção de cultivos celulares e de estoques virais dificultam a implementação do teste em alguns laboratórios.

Outro teste sorológico bastante utilizado, mais sensível que a SN e de fácil e rápida execução, é o ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). A técnica baseia-se na imobilização da reação antígeno-anticorpo em um suporte sólido (placas de poliestireno), seguida de uma reação colorimétrica. O ELISA apresenta inúmeras variações, podendo ser classificados em diretos, indiretos e de competição (Franco et al., 2012). Todavia, assim como a SN, estes testes não diferenciam a resposta imune gerada pela infecção por BoHV1 ou BoHV5 (Teixeira et al., 2001), embora estudos deste nível já tenham sido realizados (Wellenberg et al., 2001; Spilki et al., 2005_b). Quanto a diferenciação entre animais vacinados de naturalmente infectados, o teste de ELISA é capaz de realizar esta distinção, caso vacinas diferenciais tenham sido utilizadas na imunização do rebanho (Flores et al., 1993; Van Oirschot et al., 1997; Beer et al., 2003; Oliveira et al., 2013). Essas vacinas são obtidas através de deleções em um ou mais genes que estão presentes no vírus de campo e que serão o alvo do teste sorológico (Kit & Kit, 1990; Kaashoek et al., 1996; Mars et al., 2001; Chowdhury et al., 2014).

Além dos ensaios que visam a diferenciação entre as respostas imunológicas induzidas por vacinas ou por infecção natural, outros tipos de ELISA podem ser encontrados na literatura, tanto para detecção de anticorpos quanto para a detecção de antígenos virais (Collins et al., 1985; Kramps et al., 1994; Körber et al., 1997; Van Oirschot et al., 1997; De Wit et al., 1998; Wellenberg et al., 1998; Lehmann et al., 2002; Godhardt-Cooper et al., 2009; Parreño et al., 2010; Bashir et al., 2011). A qualidade desses testes está baseada, entre outros critérios, na sensibilidade e especificidade do ensaio (Kramps et al., 1993; OIE, 2016). Como exemplo, o ELISA gE é considerado menos sensível do que o ELISA gB, possivelmente devido à baixa imunogenicidade da gE (Perrin et al., 1996; Mars et al., 2000; Kramps et al., 2004).

2.1.12.2 Isolamento Viral

O isolamento viral em cultivos celulares é um método tradicional de diagnóstico de alfa herpesvírus bovinos (Madin et al., 1956). Tanto o BoHV1 quanto o BoHV5 produzem ECP bastante evidente em vários tipos de células, incluindo cultivos primários e linhagens estabelecidas. O ECP causado pelos alfa herpesvírus é caracterizado pela desorganização nuclear, arredondamento e desprendimento celular; formação de focos infecciosos com aspecto de “cachos de uva”, corpúsculos intracelulares e lise celular

(Franco et al., 2012). A confirmação da identidade do agente pode ser realizada por imunofluorescência (IFA) ou imunoperoxidase (IPX), utilizando conjugados ou anticorpos monoclonais apropriados (Pastoret & Thiry, 1985; Weiblen et al., 1992; Roehle et al., 1997; Souza et al., 2002; Oldoni et al., 2004). Pode ser necessário mais de uma passagem do material inoculado, caso a concentração de vírus no material original seja muito baixa. Ao final da terceira passagem, caso não haja evidência de ECP, o material é considerado negativo para vírus (Maclachlan & Dubovi, 2010).

2.1.12.3 Testes moleculares

A análise de isolados virais através do uso de enzimas de restrição (REA) é uma técnica antiga, porém ainda utilizada na identificação e diferenciação entre amostras virais (Brake & Studdert, 1985; Pidone et al., 1999; D'Arce et al., 2002; Maidana et al., 2014). Muitos métodos moleculares foram desenvolvidos ao longo dos anos, facilitando a rotina nos laboratórios, substituindo ou complementando as técnicas clássicas utilizadas no diagnóstico ou na pesquisa em virologia (Fulton & Confer, 2012). Entre elas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiu a detecção e identificação de quantidades mínimas de material genético do agente suspeito, sendo capaz de detectar a presença do genoma, independente da presença de vírus infeccioso (Franco et al., 2012). Com o domínio da técnica, foi possível o desenvolvimento de variações que permitiram a detecção de vários subtipos do mesmo vírus ou vírus diferentes em uma mesma reação, utilizando oligonucleotídeos selecionados especificamente para o (s) agente (s) de interesse (*multiplex* PCR) (Alegre et al., 2001; Claus et al., 2005; Thiry et al., 2007). Outra variação da técnica, a *nested* PCR, permitiu o aumento da sensibilidade e especificidade, utilizando oligonucleotídeos iniciadores chamados “*primers* externos” e “*primers* internos” (Rocha et al., 1998; Rola et al., 2005; Oliveira et al., 2011).

A PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) foi desenvolvida para que as etapas de amplificação pudessem ser monitoradas à medida que vão ocorrendo, através da utilização de sondas marcadas com substâncias indicadoras que são liberadas a cada ciclo de amplificação (Franco et al., 2012). Além de permitir a quantificação de ácidos nucleicos presentes na amostra, a qPCR possibilita um menor tempo de reação, pois dispensa a análise por eletroforese dos produtos amplificados (Horwood & Mahony, 2011; Diallo et al., 2011; Thonur et al., 2012; Crook et al., 2012; Cardoso et al., 2013).

A técnica de PCR seguida do sequenciamento do produto amplificado permite a identificação da sequência nucleotídica das amostras. Através dessa identificação, o

amplicon pode ser comparado com outras sequências conhecidas depositadas em bancos de dados, permitindo a caracterização e diferenciação da amostra (Schynts et al., 1999; Esteves et al., 2008, Oliveira et al., 2015). O primeiro método de sequenciamento de DNA descrito foi o de Sanger, publicado em 1977. Dez anos depois foi lançado o primeiro sequenciador automático de DNA e, em seguida, o primeiro sequenciador de eletroforese capilar (Sanger, 1977; Smith et al., 1986; Edwards et al., 1990). A partir daí, essa tecnologia foi sendo aprimorada dando origem ao *Next Generation Sequencing* (NGS), atualmente denominada *High-throughput sequencing* (HTS) (Van Dijk et al., 2014; Posada-Céspedes et al., 2016).

2.1.13 Controle, prevenção e erradicação

Atualmente, 116 enfermidades estão listadas pela OIE como doenças animais de notificação obrigatória, entre elas, está a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e a vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), causadas pelo BoHV1 (OIE, 2017). Isso reflete a grande importância sanitária e econômica dessas infecções, tornando-se imprescindível seu controle e prevenção.

As medidas de controle devem ser definidas com base na situação epidemiológica do rebanho ou do país, considerando principalmente a severidade e prevalência da infecção. O diagnóstico da situação sobre a doença servirá de base para a adoção de medidas adequadas de controle. Geralmente são adotadas duas principais estratégias: controle com ou sem vacinação (Franco et al., 2012).

Diferentes tipos de vacinas estão disponíveis como vacinas com vírus vivo modificado (*modified live virus* – MLV – *vaccines*), vacinas inativadas, vacinas de subunidade, vacinas multivalente e vacinas diferenciais ou vacinas com marcadores antigênicos (Biswas et al., 2013). Essas vacinas apresentam composição, formulação e eficácia variáveis. Embora utilizadas com relativo sucesso na prevenção da enfermidade clínica e na redução da circulação de vírus na população, as vacinas contra o BoHV1 não impedem o estabelecimento de infecções com vírus de campo, assim como não evitam a indução de latência em animais vacinados (Van Oirschot et al., 1999; Muylkens, 2007). A imunogenicidade do BoHV1 da maioria das vacinas comerciais brasileira é aceitável e, provavelmente, suficiente para uma imunização adequada dos rebanhos, desde que seguidas as recomendações dos fabricantes (Anziliero et al., 2015). Para a erradicação do BoHV1, recomenda-se as vacinas diferenciais, que, associadas a um teste sorológico

adequado ao tipo de vacina utilizada, permitem a diferenciação entre animais vacinados e naturalmente infectados (Flores et al., 1993; Spilki et al., 2005_a; Oliveira et al., 2013; OIE, 2016). Este tipo de vacina ainda não está disponível comercialmente no Brasil (Franco et al., 2012), embora já tenha sido desenvolvida e avaliada (Franco et al., 2002_a; 2002_b; Spilki et al., 2005_b; Weiss, et al., 2015).

Em virtude dos significativos danos que o BoHV1 causa à bovinocultura, programas de controle e erradicação envolvendo medidas como a vacinação compulsória dos rebanhos, identificação e eliminação dos animais portadores, têm sido implementados. No Brasil, a vacinação contra BoHV1 é voluntária e, embora não seja tão utilizada como em países europeus e norte-americanos, tem aumentado nas últimas décadas (Anziliero et al., 2015). Vários países europeus possuem programas de controle nacional do BoHV1. Como exemplo, podem ser citados República Tcheca, Alemanha (todas regiões, exceto o Estado de Bavaria) e Itália (Região de *Friuli-Venezia Giulia* e Província de Trento). Já a Dinamarca, Alemanha (Estado de Bavaria), Itália (Província de Bolzano), Áustria, Finlândia, Suécia, Noruega e Suíça são considerados livres de BoHV1 (*Commission of the European Communities*, 2014). Para que um país ou região seja qualificado como livre de BoHV1, pelo menos 99,8% dos seus rebanhos devem estar livres de IBR/IPV, sendo que nenhum animal tenha sido vacinado durante pelo menos três anos. Para manter essa situação, um inquérito sorológico deve ser realizado anualmente, utilizando amostras aleatórias da população de bovinos, suficiente para fornecer um nível de confiança de 99,0% (OIE, 2016).

Além do uso de vacinas, outras medidas de controle podem ser utilizadas. Estas incluem o teste de sêmen e reprodutores, o uso de sêmen e embriões livres de BoHV1, bem como o monitoramento sorológico periódico dos rebanhos (Franco et al., 2012).

Devido às semelhanças biológicas e epidemiológicas, as medidas de controle para o BoHV5 são essencialmente as mesmas preconizadas para o BoHV1. Ainda não se encontram disponíveis vacinas comerciais específicas para BoHV5, embora já tenham sido desenvolvidas (Campos et al., 2011; Anziliero et al., 2011). O uso de vacinas contra BoHV1 pode conferir proteção cruzada contra BoHV5 (Cascio et al., 1999; Beltrão et al., 2000; Zajac et al., 2006). Isso pode explicar a baixa ocorrência da infecção pelo BoHV5 na Europa e América do Norte, onde se utiliza vacinação contra BoHV1 em larga escala (D'Offay et al., 1995). O mesmo acontece com BuHV1. Vacinas específicas ainda não foram desenvolvidas, no entanto foi possível induzir uma resposta imune protetora em

búfalos desafiados com BuHV1, utilizando uma vacina contra BoHV1 (Cavirani et al., 2007; Montagnaro et al., 2014).

REFERÊNCIAS

ANUALPEC. Anuário da pecuária brasileira. FNP Consultoria/Agros Comunicação, São Paulo, SP. 400 p. 2009.

ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br/abcb.html>>. Acesso em: 14 set. 2016a.

ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. **Componentes do leite**. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/home/?page_id=1169>. Acesso em: 16 nov. 2016b.

ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. **A carne de búfalo**. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/home/?page_id=1263>. Acesso em: 16 nov. 2016c.

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/download/exportacoes-jan-dez-2016.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2016.

Achour, H.A. & Moussa, A. Serological and virological studies on the infectious bovine rhinotracheitis in Algeria. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 43, p. 251–256. 1996.

Afonso, I. B. et al. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) nas dez regiões de planejamento do Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 892-898. 2010.

Akhtar, S. & Asif, M. Epidemiologic association between antibody titers against bovine virus diarrhoea virus, rinderpest disease virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in a buffalo herd. **Tropical Animal Health Production**, v. 28, p. 207-212. 1996.

Alegre, M. et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, p. 613-621. 2001.

Amoroso, M.G. 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.

Anziliero, D. et al. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. **Veterinary Microbiology**, v. 154, p. 14-22. 2011.

Anziliero, D. et al. Resposta sorológica aos herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 e vírus da diarréia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, v.45, n.1, p.58-63. 2015.

Ashbaugh, S.E. et al. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 387-394. 1997.

Babiuk, L.A.; Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S. & Tikoo, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 31-42. 1996.

Bagust, T.J. & Clark L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 82, p. 375-383. 1972.

Barbosa, A.C.V.C. et al. 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.

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, p. 145-151. 1969.

Bashir, S. et al. Development of a sandwich ELISA for the detection of bovine herpesvirus type 1. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 5, p. 363-366. 2011.

Beer, M. et al. Diagnostic markers in the prevention of bovine herpesvirus type 1: possibilities and limitations. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 116, n. 5-6, p. 183-191. 2003.

Beltrão, N. et al. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.4, p.144-150. 2000.

Bernardes, O. A Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298. 2007.

Bezerra D. C. et al. Prevalência e fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros no estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 158-162. 2012.

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

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.

Campos, F. S. et al. Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 148, p. 18-26. 2011.

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.

Cárdenas, A. B. et al. Comparison between three diagnostic tests to detect abortion caused by infectious bovine rhinotracheitis in dairy herds. **Veterinaria Mexico**, v. 37, n. 2, p. 151-163. 2006.

Cardoso, K. I. et al. Occurrence of rabies in bufaloes (*Buballus Bubalis*) in the city of Mazagão, state of Amapá Brasil. In: Nineth World Buffalo Congress, **Revista Veterinaria Infectious Diseases**, v. 21, p. 477-478. 2010.

Cardoso, T. C. et al. Validation of a reference control for an SYBER-Green fluorescence assay-based real-time PCR for detection of bovine herpesvirus 5 in experimentally exposed bovine embryos. **Molecular and Cellular Probes**, v. 27, p. 237-242. 2013.

Cascio, K. E. et al. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.134-139, 1999.

Cavirani, S. et al. A serological survey of different bovine herpesviruses (BHV-1, BHV-2, BHV-4) in dairy buffaloes of southern and northern Italy. In: Fifth World Buffalo Congress, Caserta, Italy, p. 626-630. 1997.

Cavirani et al. Humoral and cellular response to BoHV-1 in buffalo and cattle treated with an inactivated marker vaccine. **Italian Journal Animal Science**, v.6, n.2, 881-883. 2007.

Carvalho, O. S. et al. Occurrence of Brucella abortus, Leptospira interrogans and bovine herpesvirus type 1 in buffalo (*Bubalis bubalis*) herd under extensive breeding system. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 598-603. 2015.

Collins et al. Rapid detection of bovine herpesvirus type 1 antigens in nasal swab specimens with an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 375-380. 1985.

Colodel, E.M. et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, p. 293-298. 2002.

Commission of the European Communities: Directive 2004/558/EC (as amended). In: Official Journal of the European Union, p. 20-25. 2004. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:32004D0558>> Acesso em: 23 dez. 2014.

Cortez, A. et al. Comparação das técnicas de ELISA indireto e de soroneutralização na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em amostras de soro bubalino (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 146-148. 2001.

Chowdhury, S. I. et al. A triple gene mutant of BoHV-1 administered intranasally is significantly more efficacious than a BoHV-1 glycoprotein E-deleted virus against a virulent BoHV-1 challenge. **Vaccine**, v. 32, p. 4909-4915. 2014.

Claus, M.P. 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.

Crook, T. et al. Bovine herpesvirus 1 abortion: current prevalence in the United Kingdom and evidence of hematogenous spread within the fetus in natural cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 4, p. 662-670. 2012.

Davison, A. J. Evolution of the herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 69-88. 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, n. 4, p. 315-324. 2002.

De Carlo, E. et al. Molecular characterization of a field strain of bubaline herpesvirus isolated from buffaloes (*Bubalus bubalis*) after pharmacological reactivation. **Veterinary Record**, v. 154, p. 171-174. 2004.

De Wit, J. J. et al. A comparative study of serological tests of use in the bovine herpesvirus 1 eradication programme in The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 153-163. 1998.

Del Fava, C.; Pituco, M.E. & D'Angelino, L.J. Herpesvírus Bovino tipo 1 (HVB-1): revisão e situação atual no Brasil. **Continuous Education journal, CRMV-SP**, v. 5, p. 300-312. 2002.

Del Fava, C. et al. Reproductive Rates and performance traits in beef cattle infected by Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, n.6, p.739-746. 2006.

Delhon, G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347. 2003.

Diallo, I. S. et al. 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.

Dias, J. A. et al. Seroprevalence and risk factors of bovine herpesvirus 1 infection in cattle herds in the State of Paraná, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, n. 60, p. 30-47. 2013.

Döhner, K. Function of Dynein and Dynactin in Herpes Simplex Virus Capsid Transport. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 8, p. 2795-2809. 2002.

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, p. 534-539. 1993.

D'Offay, J.M. et al. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 7, p. 247-251. 1995.

D'Offay, J. M.; Fulton, R. W. & Eberle, R. Complete genome sequence of the NVSL BoHV-1.1 Cooper reference strain. **Archives of Virology**, v. 158, n. 5 p. 1109-1113. 2013.

Durham, P. J. & Sillars, H. M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of infectious bovine rhinotracheitis infection, with results of a preliminary survey. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 34, n. 3, p. 27-30. 1986.

Edwards, S.; White, H. & Nixon, P. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the UK. **Veterinary Microbiology**, v. 22, p. 213-223. 1990.

Edwards, A. et al. Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. **Genomics**, v. 6, n. 4, p. 593-608. 1990.

Engels, M. et al. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. **Archive of Virology**, v. 67, n. 2, p. 169-174. 1981.

Esteves, P.A. et al. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. **The Veterinary Record**, v. 152, n. 21, p. 658-59. 2003.

Esteves, P.A. 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. Food and Agriculture Organization. Faostat agriculture data (Agricultural production – live animals – livestock. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

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

Fenner, F.J. et al. Herpesviridae In: **Veterinary Virology**. San Diego: Academic Press, 2 ed., p. 337-368. 1993.

Fino, T. C. M. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n. 2, p. 122-127. 2012.

Fulton, R. W. & Confer, A. W. Laboratory test descriptions for bovine respiratory disease diagnosis and their strengths and weaknesses: gold standards for diagnosis, do they exist? **Canadian Veterinary Journal**, v. 53, p. 754-761. 2012.

Fusco et al. First report of natural BoHV-1 infection in water buffalo. **Veterinary Record**, v. 117, n. 6, p. 152. 2015.

Flores, E. F. et al. Efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinated from naturally infected animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 534-540. 1993.

Franco, A. C. et al. A Brazilian glycoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1.2a (BHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 135-140. 2002_a.

Franco, A. C. et al. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 274-278. 2002_b.

Franco, A.C.; Roehle, P.M. & Varela, A.P.M. Herpesviridae, In: Flores, E.F. (Org.), *Virologia Veterinária*, Santa Maria: UFSM, cap. 18, p. 503-570. 2012.

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

Gibson, W. Structure and formation of the cytomegalovirus virion. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.325, p. 187-204. 2008.

Guanziroli, M. C. et al. Isolation of *Mycobacterium bovis* from water buffalo (*Bubalus bubalis*, Linne 1758) of the North East of Argentine. In: Ninth World Buffalo Congress, **Revista Veterinaria Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 471-473. 2010.

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.

Godhardt-Cooper, J. A. et al. Evaluation of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 523-526. 2009.

Gough, A. & James, D. Isolation of IBR virus from a heifer with meningoencephalitis. **Veterinary Journal**, v. 16, p. 313-314. 1975.

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

Holz, C.L. et al. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29(9), p. 767-773. 2009.

Holz, C.L. et al. Serum neutralization with different types and subtypes of bovine herpesvirus 1 and 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 515-522. 2010.

Horwood, P. F. & Mahony, T. J. Multiplex real-time RT-PCR detection of three viruses associated with the bovine respiratory disease complex. **Journal Virological Methods**, v. 171, p. 360-363. 2011.

Hushur et al. Restriction of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) growth in non-permissive cells beyond the expression of immediate early genes. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 4, p. 453-455. 2004.

Hübner, S. O. et al. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n. 3, p. 187-96. 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal 2015**. Efetivo dos rebanhos de grande porte segundo as grandes regiões e as unidades da federação. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>> Acesso: 13 Jan. 2017.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Phylogenetic relationships within the order Herpesvirales. 2011. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/89/herpesvirales> Acesso: 13 Jan. 2017.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy: 2015 release, ratification 2016. Order *Herpesvirales*. Disponível em: <www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Acesso: 13 Jan. 2017.

Jo Moore, S. et al. Estimation of nasal shedding and seroprevalence of organisms known to be associated with bovine respiratory disease in Australian live export cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 1, p. 6-17. 2015.

Jones, C. & Chowdhury, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8(2), p. 187-205. 2008.

Kaashoek, M. J. et al. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase and glycoprotein E negative bovine herpesvirus 1 mutants. **Veterinary Microbiology**, v.48, p. 143-153. 1996.

Kahrs R. F. Infectious Bovine Rinotracheitis: a review and update. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 10, p. 1055-1064. 1977.

Ketzer, Júlio. 2012. Bubalinos: Criação de búfalos deve voltar a crescer no Rio Grande do Sul. **Zero Hora**, Porto Alegre, 29 jun. 2012. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticia/pecuaria/criacao-bufalos-deve-voltar-crescer-rio-grande-do-sul-preve-entidade-37375>> Acesso em: 27 set. 2014.

Kirkland, P. D. et al. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. **The Veterinary Record**, v. 165, p. 111-113. 2009.

Kirkbride, C.A. Managin and outbreak of livestock abortion 2: diagnosis and control of bovine abortion. **Veterinary Medicine**, v. 80, n.5, p.70-79, 1985.

Kit, S.; Otsuka, H. & Kit, M. Gene-deleted IBRV marker vaccine. **The Veterinary Record**, v. 127, n. 14, p. 363-364. 1990.

Körber, R et al. Experience with the gE serodiagnostics. In: Franken, P. (Ed.), IBR control programmes, qualification and monitoring of the IBR-free status, Maastricht, The Netherlands, p. 3-4. 1997.

Koppers-Lalic, D. The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2071-2081. 2001.

Kramps, J. A. et al. Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 35, p. 11-21. 1993.

Kramps, J. A. et al. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2175-2181. 1994.

Kramps, J. A. et al. A European inter-laboratory trial to evaluate the reliability of serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 153-161. 1996.

Kramps J.A. et al. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 102, p. 169-181. 2004.

Lehmann, D. et al. Improvement of serological discrimination between herpesvirus-infected animals and animals vaccinated with marker vaccines. **Veterinary Microbiology**, n. 86, p. 59-68. 2002.

Liang, X. et al. Mapping of heparin binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. **Virology**, v. 194, p. 233-243. 1993.

Maclachlan, N.J. & Dubovi, E.J. Fenner's Veterinary Virology, 4th ed. Academic Press, Saint Louis, MO, USA. 2010.

Madin, S. H.; York, R. J. & McKercher, D. G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science**, v. 124, n. 3225, p. 721-722, 1956.

Mahony, T. J. Bovine herpesvirus: What is missing from our understanding of the relationship between BoHV-1 and BoHV-5? **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 124-125. 2010.

Maidana 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.

Martucciello, A. et al. Detection of Bovine viral diarrhoea virus from three water buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 137-140. 2009.

Mars, M. H. et al. Presence of bovine herpesvirus 1 gB-seropositive but gE-seronegative dutch cattle with no apparent virus exposure. **The Veterinary Record**, v. 147, n. 12, p. 328-331. 2000.

Mars, M. H. et al. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. **Vaccine**, v. 19, p. 1924-1930. 2001.

Marques, J. R. F. et al. Conservation of genetic resources of the small populations of domestic animal of the Amazon Region in Brazil. **Animal Genetic Resources Conservation**, v. 33, p. 31-40. 2003.

Médici, K.C.; Alfieri, A.A. & Alfieri, A.F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrentes de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347-350. 2000.

Metzler, A.E. et al. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v. 85, p. 57-69. 1985.

Mettenleiter, T.C. Budding events in herpesvirus morphogenesis. **Virus Research**, v. 106, p. 167-180. 2004.

Mettenleiter T.C. & Minson T. Egress of alphaherpesviruses. **Journal of Virology**, v. 80, n. 3, p. 1610- 1611. 2006.

Mettenleiter T.C.; Klupp, B.G. & Granzow, H. Herpesvirus assembly: An update. **Virus Research**, v. 143, p. 222-234. 2009.

Meyer, G.; Bare O. & Thiry, E. Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2849-2859. 1999.

Meyer, G. et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v. 146, n. 4, p. 633-652. 2001.

Miller, J.M. et al. Abortifacient property of BHV-1 isolates that represent three subtypes of determined by RE analysis of viral DNA. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 458-461. 1991.

Misra V., et al. Protein and DNA elements involved in transactivation of the promoter of the bovine herpesvirus (BHV) 1 IE-1 transcription unit by the BHV alpha gene transinducing factor. **Journal of Virology**, v. 68, p. 4898– 4909. 1994.

Montagnaro, S. et al. Bovine herpesvirus type 1 marker vaccine induces cross-protection against bubaline herpesvirus type 1 in water buffalo. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 116, p. 56-62. 2014.

McGeoch, D. J. & Davison, A. J. The molecular evolutionary history of herpesvirus. In: Domingo, E; Webster, R.; Holland, J. (Eds.) *Origin and evolution of the herpesviruses*. Academic Press, London, p. 441-465. 1999.

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.

Muylkens, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, p. 181-209. 2007.

Nandi, S. et al. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 85-98. 2009.

Nandi, S. et al. Serological evidences of bovine herpesvirus-1 infection in bovines of organized farms in India. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 2, p. 105-109. 2011.

Noordegraaf, A. V. et al. Evaluating control strategies for outbreaks in BHV1-free areas using stochastic and spatial simulation. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 44, n. 1-2, p. 21-42. 2000.

Nikbakhta, G. et al. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus 1 and bovine leukaemia virus in Iranian cattle and associations among studied agents, **Journal of Applied Animal Research**, v. 43, n.1, p. 22-25. 2015.

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, n. 4, p. 271–278. 1999.

Odeón, A.C. et al. Seroprevalencia de la diarrea viral bovina, herpesvirus bovino y virus sincicial respiratorio en Argentina. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 82, n. 4, p. 216-220.

OIE. World organization for animal health. International Animal Health Code. Manual of Standards. 2010. Disponível em: <<http://oie.int/norms/mmanual>>. Acesso em: 02 dez. 2014.

OIE. World organization for animal health. Validation guideline 3. 6. 2. 2014. Development and optimization of antibody detection assays. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.2_A_NTIGEN_DETECT.pdf> Acesso em: 02 dez. 2014.

OIE. World organization for animal health. Terrestrial animal health code. Recommendations applicable to OIE listed diseases and other diseases of importance to international trade. Volume II, section 11, chapter 11.10. 2016. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_ibr_ip_v.pdf> Acesso em: 21 Jan 2017.

OIE. World organization for animal health. OIE-listed diseases, infections and infestations in force in 2017. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>> Acesso em: 21 Jan. 2017.

Oldoni, I. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 2, p. 213-221. 2004.

Oliveira, A.L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n. 2, p.122-134. 2005.

Oliveira, M.T. et al. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 1139-1145. 2011.

Oliveira, S. A. M. et al. Prokaryotic expression of a truncated form of bovine herpesvirus 1 glycoprotein E (gE) and its use in an ELISA for gE antibodies. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 41-46. 2013.

Oliveira, R. A. M. et al. Prevalência das infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos de corte no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, V. 67, n. 5, p. 1217-1225. 2015.

Okazaki K.; Honda E. & Kono Y. Heparin binding domain of bovid herpesvirus 1 glycoprotein gIII. **Archives of Virology**, v. 134, p. 413–419. 1994.

Parreño, V. et al., Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum sample using ISO/IEC17025 standards. **Journal of Virological Methods**, v. 169, p. 143-153. 2010.

Pastoret, P.P. & Thiry, E. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v. 89, n. 1, p. 35-42. 1985.

Perrin, B. et al. Selection of European Union standard reference sera for use in the serological diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. **Revue Scientifique et Technique** (International Office of Epizootics), v. 13, n. 3, p. 947-960. 1996.

Pérez, S.E. et al. Retrospective analysis of cases with a diagnosis of cerebrocortical necrosis and its relation with type 5 bovine herpesvirus. **Revista Argentina Microbiología**, v. 35, n. 2, p. 69-73. 2003.

Pérez, 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.

Petrini, S. et al. Rilievo del Bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) in un allevamento di bufali nel centro Italia. **Large Animal Review**, v. 18, p. 113-116. 2012.

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

Poletto, R. et al. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 595-598. 2004.

Posada-Céspedes, S.; Seifert, D. & Beerenwinkel. Recent advances in inferring viral diversity from high-throughput sequencing data. **Virus Research**, DOI: 10.1016/j.virusres.2016.09.016. 2016.

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. 2016.

Pharande, R.R.; Deshmukh, V. V. & M. B. Gujar. Seroprevalence and characterization studies of infectious bovine rhinotracheitis virus. In: 11th International Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine and 16th Veterinary Association Malaysia Congress, 23-27., 2004. Sunway Pyramid Convention Centre, Petaling Jaya, 2004. P. 300-301.

Raaperi, K.; Orro, T. & Viltrop, A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. **Veterinary Journal**, v. 201, n. 3, p. 249-256. 2014.

Ramneek, D.D.; Maiti, N.K. & Oberoi, M.S. Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. **Revue Scientifique et Technique** (International Office of Epizootics), v. 24, n. 3, p. 1085-1094. 2005.

Ravishankar, C. et al. Concurrent testing of breeding bulls for bovine herpes virus 1 infection (BHV-1) in India. **Veterinaria Italiana**, v. 49, n. 2, p. 145-150. 2013.

Rissi, D.R. et al. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 123-132. 2006.

Rissi, D. R. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 251-260. 2007.

Rocha, M.A. et al. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, v. 63, p. 1-11. 1998.

Roehle, P.M. Comunicação pessoal. Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, E-mail proehle@gmail.com.

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

Roizmann, B. et al. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v. 123, p. 425-449. 1992.

Roizman, B. & Knipe, D. Herpes simplex viruses and their replication. In: Knipe, D., Howley, P.M. (Eds.), **Fields Virology**, fourth ed. pp. 2399–2460. 2001.

Roizman, B. & Pellett, P.E. The family Herpesviridae: A brief introduction. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.) **Fields Virology**, 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins publishers, Philadelphia, p. 2381–2398. 2001.

Rola, J.; Larska, M. & Polak, M. P. Detection of bovine herpesvirus 1 from an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 49, p. 267-271. 2005.

Rola, J. G.; Larska, M.; Grzeszuk, M. & Rola, J. Association between antibody status to bovine herpesvirus 1 and quality of milk in dairy herds in Poland. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 781-789. 2015.

Ruiz-Sáenz et al. Prevalencia serológica y aislamiento del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) en hatos ganaderos de Antioquia y del Valle del Cauca. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 23, n.3. 2010.

Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n.12, p. 5463-5467. 1977.

Sayers, R. G. Prevalence of exposure to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) in Irish dairy herds. **Research in Veterinary Science**, n. 100, p. 21-30. 2015

Segura-Correa, J. C. Seroprevalence and risk factors associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in North-Eastern Mexico. **Open Veterinary Journal**, v. 6, n. 2, p. 143-149. 2016.

Silva, F. S. et al. Análise soropidemiológica da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos no Estado de Pernambuco. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, n. 1324. 2015.

Solis-Calderon, J.J. et al. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, n. 4, p. 199-208. 2003.

Souza, V.F. et al. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p.13-18, 2002.

Scheffer, C. M. Herpesvírus e pestivírus em rebanhos bubalinos do Rio Grande do Sul. 98f. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

Scheffer, C. M. Genome sequence of bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) isolated in Australia in 1972. **Archives of Virology**, v. 161, p. 1-8. 2017.

- Schudel, A.A. et al. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and neurological disease. **Journal of Veterinary Medicine B.**, v. 33, p. 303-310. 1986.
- Schynts, F. et al. A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. **Veterinary Microbiology**, v. 66, p. 187-195. 1999.
- Schwyzler, M. & Ackermann, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 17-29. 1996.
- Scicluna, M.T. Epidemiological situation of Herpesvirus infections in buffalo herds: Bubaline Herpesvirus1 or Bovine Herpesvirus1? **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 845-849. 2007.
- Shirvani, E. et al. Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses (BRSV, BoHV-1, PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province). **Tropical Animal Health Production**, v. 44, n. 1, p. 191-195. 2012.
- Smith, L. M. et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, v.321, n. 6071, p. 674-679. 1986.
- Smith, G.A. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. **Archives of Virology**, v. 140(3), p. 599-603. 1995.
- Spilki, F.R. et al. Field evaluation of safety during gestation and horizontal Field evaluation of safety during gestation and horizontal spread of a recombinant differential bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) vaccine (BoHV-1) vaccine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 54-58. 2005_a.
- Spilki, F.R. et al. 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_b.
- St. George, T.D. & Philpott, M. Isolation of IBR virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 126. 1972.
- Stahl, K. et al. Bulk milk testing for antibody seroprevalence to BVDV and BHV-1 in a rural region of Perú. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 56, n. 3, p. 193-202. 2002.
- Stevens, J. G. Overview of herpesvirus latency. **Seminars in Virology**, v. 5, n. 3, p. 191-196. 1994.
- Studdert, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. **The Veterinary Record**, v. 124, n. 25, p. 584. 1989.
- Takiuchi, E.; Alfieri, A. F. & Alfieri, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 203-209. 2001.

Takiuchi, E. et al. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 85-88. 2005.

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.

Teixeira, M. F. B. et al. Elisa de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n. 1, p. 33-37. 2001.

Tomich, R.G.P. et al. Sorodiagnóstico de doenças da reprodução em rebanhos de bovinos leiteiros de assentamentos rurais de Corumbá, MS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.4, p. 986-991. 2009.

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

Thiry, J. et al. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. **Veterinary Research**, v. 3, p. 26. 2007.

Thonur, L. et al. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. **Veterinary Research**, p. 8-37. 2012.

Van Schaik, G. et al. Modeling the effect of an outbreak of bovine herpesvirus type 1 on herd-level milk production of dutch dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 944-952. 1999.

Van Oirschot, J.T. Bovine herpesvirus in semen of bulls and the risk of transmission: a brief overview. **Veterinary Quarterly**, v. 17, p. 29–33. 1995.

Van Oirschot, J.T. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. **Journal of Virological Methods**, v. 67, p. 23-34. 1997.

Van Oirschot, J. T. et al. Strains of bovine herpesvirus 1 that do not express an epitope on glycoprotein E in cell culture still induce antibodies that can be detected in a gE-blocking ELISA. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 103-113, mar. 1999.

Varela, A.P.M. et al. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 254-260. 2010.

Vieira, S. et al. 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.

Viralzone. Swiss Institute of Bioinformatics, 2012 Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/176.html> Acesso em: 25 fev. 2015.

Vogel, F. S. et al. 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. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 3-4, p. 185-196. 2004.

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.

Weiblen, R. et al. Isolation of bovine herpesvirus 1 from perputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. **Journal of veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 341-343. 1992.

Weiss, M. et al., A glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus 1 as a candidate vaccine strain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 843-851. 2015.

Wild, P. et al. Novel Entry Pathway of Bovine Herpesvirus 1 and 5. **Journal of Virology**, v. 72, n. 12, p. 9561-9566. 1998.

Wyler R., Engels M. & Schwyzer M. Infectious Bovine Rhinotracheitis/ Vulvovaginitis (BHV-1). In: Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs. Developments in Veterinary Virology, v. 9, p. 1-72, 1989.

Workman, A. et al. A Protein (ORF2) Encoded by the Latency-Related Gene of Bovine Herpesvirus 1 Interacts with Notch1 and Notch3. **Journal of Virology**, v. 85, n. 6, p. 2536-2546. 2011.

Wellenberg, G. J. et al. ELISA detection of antibodies to glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 in bulk milk samples. **Veterinary Record**, v. 142, p. 219-220. 1998.

Wellenberg, G.J.; Marsb, M.H. & Van Oirschot, J.T. Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 79-84. 2001.

Winkler, M. T. C.; Doster, A. & Jones, C. 2000. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsil of latently infected calves. **Journal of Virology**, v. 74, n. 11, p. 5337-5346. 2000.

Yan, B.F. Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in China. **Veterinary Microbiology**, v. 127, p. 136-141. 2008.

Zajac M. P. D. M. et al. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, n. 81, p. 327-334. 2006.

Zimmer, P. A. et al. Brucellosis in buffalos in Formosa, Argentina. In: Nineth World Buffalo Congress, **Veterinary Journal, Infectious Diseases**, v. 21, p. 445-47. 2010.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Contribuir para o conhecimento das relações genômicas e sorológicas entre os alfaherpesvírus bubalinos e bovinos.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Sequenciar o genoma completo da amostra b6 de alfaherpesvírus bubalino 1 (BuHV1);
- ✓ Comparar o genoma sequenciado de BuHV1-b6 com os alfaherpesvírus bovinos 1 (BoHV1) e 5 (BoHV5);
- ✓ Desenvolver um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos induzidos pelo BuHV1, BoHV1 e BoHV5;
- ✓ Padronizar o ELISA baseado no teste padrão ouro (SN) para detecção de anticorpos contra alfaherpesvírus bovinos.

4 CAPÍTULO II

Genome sequence of a bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) isolated in Australia in 1972

Camila Mengue Scheffer^{1,2}, Ana Paula Muterle Varela^{1,2}, Samuel Paulo Cibulski^{1,2}, Candice Schmidt^{1,2}, Fabrício Souza Campos², Willian Pinto Paim^{1,2}, Raíssa Nunes dos Santos², Thais Fumaco Teixeira², Márcia Regina Loiko^{1,2}, Caroline Tochetto^{1,2}, Helton Fernandes dos Santos², Diane Alves de Lima^{1,2}, Cristine Cerva^{1,2}, Fabiana Quoos Mayer¹, Sylio Alfredo Petzhold¹, Ana Cláudia Franco², Toby St George³, Fernando Rosado Spilki⁴, Paulo Michel Roehle^{1,2}

¹ Institute of Veterinary Research “Desidério Finamor” (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul CEP 92990-000, Brazil

² Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul CEP 90050-170, Brazil

³ Unit 44, 260 Cliveden Avenue, Corinda, Queensland, Australia, 4075 (formerly with CSIRO Australia)

⁴ Institute of Health Sciences, Feevale University, Rodovia RS-239, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul CEP 93525075, Brazil

Camila Mengue Scheffer (corresponding author)

Email scheffer.cm@gmail.com

Tel: + 55 51 3308 3655

Archives of Virology

Original Article

Received: 10 October 2016

Accepted: 20 December 2016

Published online : 06 January 2017

DOI 10.1007/s00705-016-3218-8

Abstract

Bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) is a member of the family *Herpesviridae* subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus*. To date, no full genome sequence of BuHV has been published. Here, we report the complete genome sequence of bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) strain b6 (BuHV1-b6), isolated from a water buffalo (*Bubalus bubalis*) in 1972 in Australia. The virus was multiplied in MDBK cells, the DNA extracted and subjected to high-throughput sequencing. The reads were aligned and combined into a single genome, with bovine alphaherpesvirus 5 (BoHV5) strain SV507/99 (accession number NC005261) as reference. The BuHV1-b6 genome is a linear double-stranded DNA molecule, 137,452 bp long, with a GC content of 76.8%. The genome consists of two unique sequences: a long, or UL, sequence (103,818 bp) and a short, or US, sequence (9,586 bp), with the latter being flanked by inverted IR and TR elements of 12,024 bp each. The arrangement is typical of herpesvirus genomes of the D-type. The overall sequence has a 92.2% similarity at the nucleotide level to the reference BoHV5 strain. Our report provides a significant landmark in the history of herpesviruses, represented by the genome sequence of this 44 year-old virus isolate.

Keywords: *Bubalus bubalis*, strain b6, bubaline alphaherpesvirus 1, bovine herpesvirus

Introduction

Bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) is often associated to subclinical infections in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) [7]. Subsequent studies have suggested its involvement in cases of abortion and respiratory disease in buffalo herds [1, 34]. The first report on isolation of BuHV1 (strain b6) dates to 1972, in Australia, where the virus was recovered from the prepuce of a water buffalo with no signs of disease [41]. Thirty-two years later, in southern Italy, BuHV1 was recovered from a water buffalo after corticosteroid-induced reactivation [7]. More recently, BuHV1 was also recovered after corticosteroid administration from apparently healthy water buffaloes in northeast Argentina [24].

BuHV1 is a member of the order *Herpesvirales*, family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus* [17]. The genus also includes other relevant alphaherpesviruses of ruminants, including bovine alphaherpesvirus 1 and 5 (BoHV1 and BoHV5), whose primary hosts are cattle. Previous studies have shown that BuHV1 is antigenically and genetically related to BoHV1 and BoHV5 [5, 12, 38, 43]. However, phylogenetic analyses of partial gene sequences from different regions along the genome revealed that BuHV1 seems to be more closely related to BoHV5 than to BoHV1 [12, 38].

In order to gain a deeper understanding of the evolutionary relationships among these viruses, the availability of complete genomes sequences is of utmost importance. To date, only about 5% of the BuHV1 genome has been sequenced. Here, the complete genome sequence of BuHV1-b6, one of the first BuHV1 viruses isolated in Australia in 1972 [41] is reported.

Materials and Methods

Sample and DNA isolation

Strain BuHV1-b6 was originally isolated from the prepuce of a water buffalo with subclinical infection in Australia [41]. It was one of three isolates that were recovered at that time. The virus was cultivated in Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells (originally ATCC CCL-22), following standard procedures [16]. The previous passage history of the virus is unclear, as it was received from a collaborator (F.A.M. Reijsewijk, in memoriam) from the Central Veterinary Institute, Wageningen, (formerly ID-Lelystad). In our laboratory, BuHV1-b6 was subjected to six passages in MDBK cells

and two passages in a bovine viral diarrhea (BVDV)-resistant MDBK clone, named CRIB [15]. When a cytopathic effect was evident in approximately 70% of the cells, the supernatant was harvested, clarified by low-speed centrifugation and pelleted by ultracentrifugation (100,000 x g) on a 25% sucrose cushion. The viral pellet was then resuspended in 100 μ L of ultrapure water and treated with nucleases to eliminate non-capsid-protected nucleic acid [22]. DNA from capsids was extracted with phenol-chloroform following standard procedures [39]. DNA quality and quantity were checked by spectrophotometry and fluorimetry.

High-throughput sequencing and sequence analysis

High-throughput sequencing (HTS) was performed in an Illumina MiSeq® apparatus (Illumina) following the manufacturer's protocol for DNA library construction. Raw sequence reads were trimmed with the aid of Geneious software (version 9.0.5). Assembly and annotation of the viral genome were done using template-assisted assembly, in which trimmed sequences were mapped to the BoHV5 SV507/99 reference genome (accession number NC005261) using Geneious software. Open reading frame (ORF) predictions were performed with the GeneMarkS software [4]. Comparative analysis of the genome BuHV1-b6 described here (KU936049) and other relevant alphaherpesviruses, BoHV5 strain SV507/99 (accession number NC005261) and BoHV1 strain NVSL (accession number JX898220), was also performed.

Results and Discussion

The HTS coverage of the whole genome was 919.3 times. A total of 1,217,514 reads were generated, of which 1,098,925 (90.3%) were used to construct the full BuHV1-b6 genome sequence. The linear double-stranded DNA genome was 137,452 bp long, with GC content of 76.8%. The sequence was deposited in GenBank under accession number KU936049. The genome consists of two unique sequences: long, or UL (103,818 bp), and short, or US (9,586 bp), with the latter being flanked by inverted IR and TR elements of 12,024 bp each. This arrangement corresponds to the D-type herpesviral genome (Fig. 1A, B). TR and IR each contain a copy of two regulatory genes, BICP4 and BICP22. The UL region codes for 60 putative genes. The US region comprises eight putative genes. The ORFs are distributed on both the negative (32 ORFs) and positive (38 ORFs) strands, following a pattern already reported for BoHV5 [8]. The putative gene description is shown in Table 1. All BuHV1-b6 ORFs are present in BoHV5, with 92%

overall nucleotide (nt) sequence identity (Fig. 1A). The BuHV1-b6 genes showed considerable conservation in relation to BoHV5, suggesting that their biological functions are the same in both viruses. Comparative genomic analysis of BuHV1-b6 and BoHV5 shows that most of their genes share $\geq 90\%$ deduced amino acid (aa) sequence identity (Table 2). The genes that code for predicted protein with less than 90% aa sequence identity to their counterparts in BoHV5 are UL48, UL14, UL13, UL11, UL0.7, BICP0, BICP4, BICP22 and US4, which are discussed below.

The BuHV1-b6 UL region contains six genes that are least conserved ($< 90\%$ aa sequence identity) relative to BoHV5. Four of these (UL48, UL14, UL13 and UL11) code for some of the tegument proteins [8, 23, 25, 42]. The tegument of herpesviruses is composed of more than twenty viral-encoded proteins. Tegument proteins play different roles during the viral life cycle, serving as structural components of the virion as well as modulators of cellular and viral functions in infected cells. Yet, many of its functions remain unknown [10, 26, 36, 37]. Although the protein content of the tegument varies considerably among the different herpesvirus subfamilies, several tegument proteins are conserved, indicating that they might play key roles in virion assembly [26, 27]. Protein UL48 is apparently restricted to alphaherpesviruses and appears to be important for secondary envelopment [25]. The BuHV1-b6 UL48 gene is 133 nt longer than that of BoHV5 and shares 82.8% identity with it at the predicted aa level. Protein alignment of the whole predicted protein (531 aa) shows at least 80 aa substitutions. Deletion of UL48 from the genome of herpes simplex virus 1 (HSV1), pseudorabies virus (PrV) and equine herpesvirus 1 (EHV1) strongly impairs secondary envelopment. Furthermore, the UL48 proteins of several alphaherpesviruses function as potent activators of immediate-early gene expression [11, 13, 18, 31].

The UL14 gene codes for a putative protein of 334 aa (Table 1), with 80.4% aa sequence identity in relation to BoHV5. This gene codes for a conserved peptide in alphaherpesviruses that has been identified as a minor component of the virion tegument; however, its functions remain largely unknown [6, 9]. The deduced protein encoded by the BuHV1-b6 gene UL13 shares 86.0% aa sequence identity with its equivalent in BoHV5 (Table 2). It is a serine/threonine protein kinase that is conserved in all members of the family *Herpesviridae* [20, 28, 35]. This protein is believed to play a role in maintenance of virion structure and, possibly, in the phosphorylation of other viral proteins [30].

UL11 encodes a protein that is conserved in all herpesviruses and is important for viral budding from infected cells [25]. The predicted BuHV1-b6 UL11 protein shares 82% aa sequence identity with BoHV5 UL11. Protein alignment (109 aa) shows a less-conserved region extending from amino acid positions 43 to 75. All UL11-deleted herpesviruses show defects during virion envelopment. As result, capsids accumulate within the cytoplasm of infected cells and fewer virions are released into the extracellular space [2, 3, 14, 21].

UL0.7 (558 nt) is the least conserved region in the BuHV1-b6 genome (Table 2). It is present in the genomes of BoHV5 and BoHV1, with which the BuHV1-b6 counterpart shares 56.8% and 43.4% aa sequence identity, respectively. However, it is not found in other herpesviruses. The function(s) of the putative protein encoded by this gene remains unknown [8].

The BuHV1-b6 BICP0 gene, located at the end of the UL region, extends from nucleotide positions 103,604 to 101,769 and encoded a critical regulator of viral gene expression [8]. The BuHV1-b6 BICP0 gene (1836 nt) is 328 nucleotides smaller than BoHV5 BICP0 gene, and the encoded proteins share 87.5% sequence identity at the aa level. However, comparison between BoHV5 and BoHV1 BICP0 showed less sequence conservation (70% aa sequence identity). It has been proposed that this region might be responsible for differences in virulence between these viruses, whose neuropathogenic potential is quite distinct [19]. However, its role in BuHV1 and its possible association with pathogenicity remain to be investigated.

The repeat regions (IR and TR) of BuHV1-b6 contain two genes, BICP4 and BICP22, as well as BICP0, that are critical regulators of viral gene expression [8]. BuHV1-b6 BICP4 is 26 nt smaller than BoHV5 BICP4 and shares 85.3% identity with it at the predicted aa level. BuHV1-b6 BICP22, on its turn, shares 79.3% aa sequence identity with BoHV5 BICP22.

The US region of the BuHV1-b6 genome contains eight putative genes, of which four encode glycoproteins, all with counterparts in BoHV5 [8]: gG (US4), gD (US6), gI (US6) and gE (US8). Viral glycoproteins play important roles in virulence, mediating attachment and entry of the virions into the host cell, as well as participating in fusion and cell-to-cell spread [25]. In addition, because of their location in the virion envelope and on the surface of infected cells, glycoproteins are important targets for the host immune responses [40]. The putative BuHV1-b6 glycoproteins share considerable homology with BoHV5 glycoproteins; of the four glycoproteins encoded in the US region of both

genomes, only gG (US4) shares less than 90% predicted aa sequence identity. Glycoprotein gG is believed to be involved in cell-to-cell virus transmission *in vitro* and in prevention of apoptosis in certain cell lines [32, 33].

Comparative analysis of the genomes of BuHV1-b6 and BoHV1 isolate NVSL (accession number JX898220) was also performed. The overall genome nt sequence identity between BuHV1-b6 and BoHV1 is 76.7% (Fig. 1B). In relation to BoHV1, BuHV1-b6 lacks a UL0.5 region, which in BoHV1 encodes an 87-aa protein of unknown function; interestingly, this is also absent from the BoHV5 genome [8].

In conclusion, we report here the full genome sequence of one of the first BuHV1 isolates ever reported [41]. The other two isolates that were recovered at that time were probably lost (St. George, personal communication). This sequence, from a virus isolated back in 1972, is expected to be valuable for further studies involving different aspects of the comparative biology of herpesviruses, providing a dated record of the occurrence of this virus, thus representing an important landmark for evolutionary studies. It must be borne in mind, however, that the passage history of BuHV1-b6 could not be fully determined, due to the lack of precise laboratory records. Nevertheless, as the evolutionary rates of herpesviruses are relatively low [29], the sequence reported here is expected to represent with reasonable accuracy the actual BuHV1-b6 genome sequence.

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, project number 475802/2013-6), and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, contract 01.10.0783.00). PMR, FRS and ACF are CNPq research fellows. This work was performed as part of the doctoral studies of CMS (Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS).

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

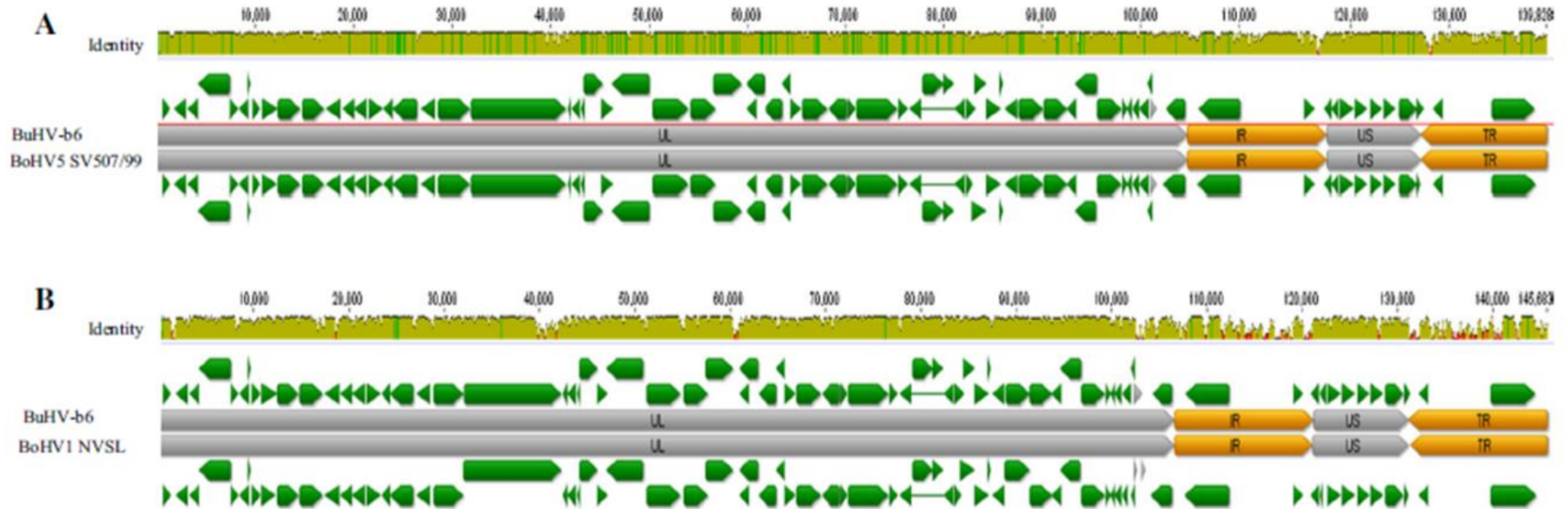


Fig 1 Overview of the features of the BuHV1-b6 (KU936049) genome and alignment with BoHV5 (A) strain SV507/99 (NC005261) and BoHV1 (B) strain NVSL (JX898220). The map shows the major regions of the genome: unique long (UL) and unique short (US), annotated in grey and inverted repeats (IR and TR; orange). Open reading frames (pointed rectangles) are highlighted in green. The consensus identity plots are colored as follows: green, 100 % identity; green-brown, 30 to < 100 % identity; red, < 30 % identity

Table 1 Characteristics of BuHV genes

Gene	Predicted product	Orientation	Position (nt)^a	Length (nt)^a	Length (aa)^b	% GC
circ	Myristylated tegument protein circ	Forward	599-1336	738	245	74.0
UL54	Multifunctional expression regulator	Reverse	1717-2943	1227	408	75.5
UL53	Envelope glycoprotein K	Reverse	3164-4159	996	331	77.0
UL52	Helicase primase subunit	Reverse	4134-7400	3267	1088	78.4
UL51	Tegument protein UL51	Forward	7399-8187	789	262	77.7
UL50	Deoxyuridine triphosphatase	Reverse	8319-9284	966	321	76.6
UL49.5	Envelope glycoprotein N	Forward	9283-9522	240	79	70.0
UL49	Tegument protein VP22	Forward	9655-10464	810	269	80.9
UL48	Alpha trans-inducing factor	Forward	10654-12222	1569	522	79.2
UL47	Tegument protein VP13/14	Forward	12261-14495	2235	744	77.0
UL46	Tegument protein VP11/12	Forward	14624-16891	2268	755	76.5
UL44	Envelope glycoprotein C	Reverse	17112-18557	1446	481	77.7
UL43	Envelope protein UL43	Reverse	18745-19887	1143	380	83.5
UL42	DNA polymerase processivity subunit	Reverse	19939-21174	1236	411	76.6
UL41	UL41 virion host shutoff factor	Forward	21430-22797	1368	455	74.8
UL40	Ribonucleotide reductase subunit 2	Reverse	22920-23867	948	315	64.1
UL39	Ribonucleotide reductase subunit 1	Reverse	23887-26274	2388	795	71.7
UL38	Capsid triplex subunit 1	Reverse	26616-28052	1437	478	75.8
UL37	Tegument protein UL37	Forward	28341-31496	3156	1051	81.0
UL36	Large tegument protein	Forward	31596-41108	9513	3170	81.1
UL35	Small capsid protein	Reverse	41308-41685	378	125	74.9
UL34	Nuclear egress membrane protein	Reverse	41730-42557	828	275	75.6
UL33	DNA packaging protein UL33	Reverse	42642-42974	333	110	72.7
UL32	DNA packaging protein UL32	Forward	42955-44763	1809	602	77.1
UL31	Nuclear egress lamina protein	Forward	44756-45868	1113	370	74.3
UL30	DNA polymerase catalytic subunit	Reverse	45792-49562	3771	1256	73.7

Table 1 continued

Gene	Predicted product	Orientation	Position (nt) ^a	Length (nt) ^a	Length (aa) ^b	% GC
UL29	Single-stranded DNA binding protein	Forward	49851-53486	3636	1211	74.2
UL28	DNA packaging terminase subunit 2	Forward	53729-56179	2451	816	77.3
UL27	Envelope glycoprotein B	Forward	56032-58866	2835	944	72.5
UL 26.5	Capsid maturation protease	Reverse	60326-59376	951	317	80.9
UL26	Capsid maturation protease	Reverse	59376-61244	1869	622	79.4
UL25	DNA packaging tegument protein UL25	Reverse	61347-63155	1809	602	77.9
UL24	Nuclear protein UL24	Reverse	63137-63973	837	278	78.3
UL23	Thymidine kinase	Forward	63972-65042	1071	356	79.6
UL22	Envelope glycoprotein H	Forward	65159-67669	2511	836	77.5
UL21	Tegument protein UL21	Reverse	67843-69636	1794	597	78.5
UL20	Envelope protein UL20	Forward	69748-70449	702	233	79.2
UL19	Major capsid protein	Forward	70529-74710	4182	1393	73.6
UL18	Capsid triplex subunit 2	Forward	74807-75757	951	316	75.8
UL15	DNA packaging terminase subunit 1	Reverse	75959-77143	1185	395	72.8
UL17	DNA packaging tegument protein UL17	Forward	77219-79324	2106	701	81.1
UL16	Tegument protein UL16	Forward	79359-80390	1032	343	78.6
UL15	DNA packaging terminase subunit 1	Reverse	80525-81553	1029	343	72.8
UL14	Tegument protein UL14	Forward	81623-82627	1005	334	83.4
UL13	Tegument serine threonine protein kinase	Forward	82531-83691	1161	386	78.6
UL12	Deoxyribonuclease	Forward	83682-85157	1476	491	79.7
UL11	Myristylated tegument protein	Forward	85109-85384	276	91	75.4
UL10	Envelope glycoprotein M	Reverse	85528-86784	1257	418	77.1
UL9	DNA replication origin-binding helicase	Forward	86906-89383	2478	825	75.5
UL8	Helicase primase subunit	Forward	89461-91752	2292	763	77.2
UL7	Tegument protein UL7	Reverse	91799-92704	906	301	74.0
UL6	UL6 virion protein	Reverse	92586-94751	2166	721	75.8
UL5	Component of DNA helicase primase complex	Forward	94750-97269	2520	839	70.8

Table 1 continued

Gene	Predicted product	Orientation	Position (nt) ^a	Length (nt) ^a	Length (aa) ^b	% GC
UL4	Nuclear protein UL4	Forward	97290-97856	567	188	75.7
UL3.5	Protein V57	Reverse	97883-98323	441	146	82.5
UL3	Nuclear protein UL3	Reverse	98329-98979	651	216	75.4
UL2	Uracil DNA glycosylase	Reverse	99026-99916	891	296	75.3
UL1	Envelope glycoprotein L	Reverse	99900-100376	477	158	74.6
UL0.7	Unknown product	Forward	100192-100749	558	186	77.2
BICP0	Ubiquitin E3 ligase ICP0	Reverse	101769-103604	1836	611	78.7
BICP4	Transcriptional regulator ICP4	Reverse	104884-109068	4185	1394	83.6
BICP22	Regulatory protein ICP22	Forward	113907-114854	948	315	80.4
US1.67	Virion protein V67	Reverse	115623-116351	729	242	75.3
US2	Virion protein US2	Reverse	116409-117089	681	226	78.0
US3	Serine threonine protein kinase US3	Forward	117212-118582	1371	456	77.4
US4	Envelope glycoprotein G	Forward	118695-120014	1320	439	72.7
US6	Envelope glycoprotein D	Forward	120265-121518	1254	417	74.9
US7	Envelope glycoprotein I	Forward	121673-122836	1164	387	78.3
US8	Envelope glycoprotein E	Forward	123123-124922	1800	599	77.3
US9	Membrane protein US9	Forward	125014-125649	636	211	80.2
BICP22	Regulatory protein ICP22	Reverse	126421-127368	948	315	80.4
BICP4	Transcriptional regulator ICP4	Forward	132193-136389	4197	1398	83.7

^a nt, nucleotides^b aa, amino acid

Table 2 Comparison of GC content and nucleotide and amino acid sequence identities among genes of BuHV1-b6 (KU936049), BoHV5 (NC005261) and BoHV1 (JX898220).

Gene	% GC			BoHV5		BoHV1		Identity (%)
	BuHV1	BoHV5	BoHV1	% ID	% ID	% ID	% ID	
				(nt) ^a	(aa) ^b	(nt) ^a	(aa) ^b	
Circ	74.0	72.0	68.7	96.5	97.6	84.6	84.1	100
UL54	75.5	73.8	70.2	96.6	93.6	85.9	83.6	90
UL53	77.0	75.6	73.3	98.1	98.2	90.7	88.2	80
UL52	78.4	76.2	72.1	96.4	96.1	89.0	87.7	70
UL51	77.7	75.0	71.7	95.6	95.5	82.1	80.9	60
UL50	76.6	72.0	68.8	90.9	90.0	81.7	78.0	50
UL49.5	70.0	74.2	68.4	95.4	96.2	87.9	87.3	40
UL49	80.9	76.0	73.5	93.8	93.7	80.3	74.9	
UL48	79.2	73.1	72.8	88.5	82.8	87.8	81.3	
UL47	77.0	73.3	71.8	92.5	92.2	92.3	92.2	
UL46	76.5	74.3	73.3	91.7	91.6	84.9	80.5	
UL44	77.7	73.9	73.1	93.3	91.6	82.7	77.7	
UL43	83.5	82.0	78.6	96.3	96.6	90.1	88.2	
UL42	76.6	74.6	70.7	96.1	96.9	83.1	80.3	
UL41	74.8	73.4	69.1	98.2	97.8	90.4	91.6	
UL40	64.1	63.0	61.6	98.6	98.7	95.3	95.9	
UL39	71.7	68.5	68.4	97.7	97.7	95.3	96.7	
UL38	75.8	74.0	71.4	96.5	96.0	90.7	91.2	
UL37	81.0	79.6	75.4	79.9	97.4	88.9	88.9	
UL36	81.1	79.7	76.7	94.6	93.0	84.2	80.3	
UL35	74.9	72.2	70.7	97.9	98.4	90.5	95.2	
UL34	75.6	74.3	69.7	96.3	94.9	85.5	83.3	
UL33	72.7	74.3	67.0	98.8	98.2	90.7	88.2	
UL32	77.1	75.2	72.4	97.3	98.0	89.3	89.6	
UL31	74.3	73.7	69.0	94.6	92.9	87.0	85.9	
UL30	73.7	72.2	70.2	96.6	95.5	91.0	90.7	
UL29	74.2	73.3	71.5	98.5	98.8	94.6	95.4	
UL28	77.3	73.6	74.3	97.3	96.2	91.4	90.7	
UL27	72.5	71.6	70.0	98.2	98.8	92.7	92.4	
UL 26.5	80.9	78.5	75.5	94.3	93.1	81.6	77.1	
UL26	79.4	78.0	75.5	96.2	95.8	85.7	83.3	
UL25	77.9	77.7	73.0	98.6	95.8	92.3	94.9	
UL24	78.3	77.7	72.0	96.2	98.7	81.3	74.5	
UL23	79.6	76.8	73.4	96.2	95.0	85.3	82.6	
UL22	77.5	76.1	72.2	96.1	94.1	88.9	87.6	
UL21	78.5	75.6	72.3	95.3	96.0	83.9	81.1	
UL20	79.2	73.8	75.6	97.0	94.4	93.9	95.3	
UL19	73.6	73.1	70.9	97.2	96.6	95.0	96.6	
UL18	75.8	74.8	73.5	98.2	98.2	94.5	95.6	
UL15	72.8	71.3	69.7	97.7	98.1	94.3	96.3	
UL17	81.1	79.4	77.7	97.2	97.7	91.5	91.5	
UL16	78.6	77.5	75.5	98.8	99.1	94.8	94.8	
UL15	72.8	71.3	69.7	97.7	98.4	94.3	96.3	
UL14	83.4	75.3	75.8	88.8	80.4	89.2	83.8	
UL13	78.6	75.1	74.8	89.8	86.0	89.9	86.3	
UL12	79.7	75.3	75.3	91.7	90.6	91.7	91.0	
UL11	75.4	74.5	71.5	87.1	82.0	84.1	81.3	
UL10	77.1	75.3	72.2	96.8	97.6	88.9	87.8	
UL9	75.5	74.5	71.0	97.8	98.7	91.9	93.0	
UL8	77.2	76.1	71.7	95.2	94.1	80.2	73.8	
UL7	74.0	70.5	68.9	97.1	97.3	90.2	89.7	
UL6	75.8	72.8	70.1	93.6	94.2	90.0	92.1	
UL5	70.8	68.1	66.2	93.8	95.5	93.5	95.5	
UL4	75.7	74.0	71.5	97.7	96.3	90.6	88.2	
UL3.5	82.5	80.1	78.2	93.2	91.3	70.9	60.3	

Table 2 continued

Gene	% GC			BoHV5		BoHV1	
	BuHV1	BoHV5	BoHV1	% ID (nt) ^a	% ID (aa) ^b	% ID (nt) ^a	% ID (aa) ^b
UL3	75.4	76.6	68.9	94.7	92.2	83.1	76.9
UL2	75.3	76.4	70.4	95.8	94.0	90.2	89.2
UL1	74.6	76.2	69.6	93.3	92.0	84.9	81.0
UL0.7	77.2	77.2	70.4	84.5	56.8	69.1	43.4
BICP0	78.7	76.0	76.6	91.9	87.5	79.2	72.8
BICP4	83.6	82.0	82.3	90.0	85.9	82.7	75.5
BICP22	80.4	74.7	79.1	85.0	79.3	80.6	72.4
US1.67	75.3	73.5	65.2	92.2	93.1	81.6	82.3
US2	78.0	72.4	68.9	91.6	92.0	82.0	79.8
US3	77.4	71.0	71.5	91.7	90.1	86.8	82.4
US4	72.7	68.7	69.7	91.5	86.6	81.7	73.8
US6	74.9	75.4	69.7	96.7	95.9	85.8	81.2
US7	78.3	76.5	74.0	96.4	94.6	84.2	77.4
US8	77.3	77.2	70.8	95.9	95.2	80.2	73.8
US9	80.2	78.7	69.0	94.4	94.4	78.8	80.0
BICP22	80.4	74.7	79.1	85.0	79.3	80.6	72.4
BICP4	83.7	82.0	82.3	89.9	85.3	82.5	74.8

^a nt, nucleotides^b aa, amino acids

REFERENCES

1. Amoroso MG, Corrado F, De Carlo E, Lucibelli MG, Martucciello A, Guarino A, Galiero G (2013) Bubaline herpesvirus 1 associated with abortion in a Mediterranean water buffalo. *Res Vet Sci* 94:813-816
2. Baines JD, Roizman B (1991) The open reading frames UL3, UL4, UL10, and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *J Virol* 65:938-944
3. Baird LN, Starkey JL, Hughes DJ, Wills JW (2010) Myristylation and palmitoylation of HSV-1 UL11 are not essential for its function. *Virology* 397:80-88
4. Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M (2001) GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Res* 29:2607-2618
5. Bulach DM, Studdert MJ (1990) Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. *Arch Virol* 113:17-34
6. Cunningham C, Davison AJ, Maclean AR, Taus NS, Baines JD (2000) Herpes Simplex Virus Type 1 Gene UL14: Phenotype of a Null Mutant and Identification of the Encoded Protein. *J Virol* 74:33-41
7. De Carlo E, Re GN, Letteriello R, Del Vecchio V, Giordanelli MP, Magnino S, Fabbi M, Bazzocchi C, Bandi C, Galiero G (2004) Molecular characterization of a field strain of bubaline herpesvirus isolated from buffaloes (*Bubalus bubalis*) after pharmacological reactivation. *Vet Rec* 154:171-174
8. Delhon G, Moraes MP, Lu Z, Afonso CL, Flores EF, Weiblen R, Kutish GF, Rock DL (2003) Genome of bovine herpesvirus 5. *J Virol* 77:10339-10347
9. Dolan A, Jamieson FE, Cunningham C, Barnett BC, McGeoch DJ (1998) The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *J Virol* 72:2010-2021
10. Eaton HE, Saffran HA, Wu FW, Quach K, Smiley JR (2014) Herpes simplex virus protein kinases US3 and UL13 modulate VP11/12 phosphorylation, virion packaging and phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling activity. *J Virol* 88:7379-7388
11. Einem JV, Schumacher D, O'Callaghan DJ, Osterrieder N (2006) The α -TIF (VP16) homologue (ETIF) of equine herpesvirus 1 is essential for secondary envelopment and virus egress. *J Virol* 80:2609-2620
12. Esteves PA, Dellagostin OA, Pinto LS, Silva AD, Spilki FR, CiacciZanella JR, Hübner SO, Puentes R, Maisonnave j, Franco AC, Rijsewijk FA Batista HB,

- Teixeira, TF, Dezen D Oliveira AP, David C, Arns CW, Roehe PM (2008) 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
13. Fuchs W, Granzow H, Klupp BG, Kopp M, Mettenleiter TC (2002) The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *J Virol* 76:6729-6742
 14. Fulmer PA, Melancon JM, Baines JD, Kousoulas KG (2007) UL20 protein functions precede and are required for the UL11 functions of herpes simplex virus type 1 cytoplasmic virion envelopment. *J Virol* 81:3097-3108
 15. Flores EF, Donis RO (1995) Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. *Virology* 208:565-575
 16. Freshney RI (2016) *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. Hoboken, New Jersey
 17. ICTV (2015) International Committee on Taxonomy of Viruses. Order Herpesvirales. <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>. Accessed 31 July 2016
 18. Johnson DC, Baines JD (2011) Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol* 9:382-394
 19. Jones C, Chowdhury S (2007) A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Anim Health Res Rev* 8:187-205
 20. Kawaguchi Y, Kato K (2003). Protein kinases conserved in herpesviruses potentially share a function mimicking the cellular protein kinase cdc2. *Rev Med Virol* 13:331-340
 21. Kopp M, Granzow H, Fuchs W, Klupp B, Mettenleiter TC (2004) Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment. *J Virol* 78:3024-3034
 22. Lima FES, Cibulski SP, Witt AA, Franco AC, Roehe PM (2015) Genomic characterization of two novel polyomaviruses in Brazilian insectivorous bats. *Arch Virol* 160:1831-1836
 23. Loomis JS, Courtney RJ, Wills JW (2006) Packaging determinants in the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 80:10534-10541
 24. Maidana SS, Konrad JL, Craig MI, Zabal O, Mauroy A, Thiry E, Crudeli G, Romera SA (2014) First report of isolation and molecular characterization of

- bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) from Argentinean water buffaloes. *Arch Virol* 159:2917-2923
25. Mettenleiter TC (2002) Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* 76:1537-1547
 26. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H (2009) Herpesvirus assembly: An update. *Virus Res* 143:222-234
 27. McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor P (1988) The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 69:1531-1574
 28. McGeoch DJ (1989) The genomes of the human herpesviruses: contents, relationships and evolution. *Annu Rev Microbiol* 43:235-265
 29. McGeoch DJ, Cook S, Dolan A, Jamieson FE, Telford EAR (1995) Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J. Mol. Biol.* 247:443-458
 30. Morrison EE, Wang YF, Meredith DM (1998) Phosphorylation of structural components promotes dissociation of the herpes simplex virus type 1 tegument. *J Virol* 72:7108-7114
 31. Mossman KL, Sherburne R, Lavery C, Duncan J, Smiley JR (2000) Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol* 74:6287-6299
 32. Nakamichi K, Kuroki D, Matsumoto Y, Otsuka H (2001). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for prevention of apoptosis and efficient viral growth in rabbit kidney cells. *Virology* 279:488-498
 33. Nakamichi, K., Y. Matsumoto, and H. Otsuka. 2002. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary to maintain cell-to-cell junctional adherence among infected cells. *Virology* 294:22–30
 34. Petrini S, Amoroso MG, Perugini G, Gianfelici P, Corrado F, Bazzucchi M, Paniccia M, Casciari C, Fortunati M, Giammarioli M, Fisichella S, De Mia GM, Galiero G, Cenci T (2012) Rilievo del bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) in un allevamento di bufali nel centro Italia. *Large Anim Rev* 18:113-116
 35. Purves FC, Roizman B (1992) The UL13 gene of herpes simplex virus 1 encodes the functions for posttranslational processing associated with phosphorylation of the regulatory protein alpha 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7310-7314
 36. Roizman B, Pellett PE (2001) The family Herpesviridae: A brief introduction. In: Knipe DM, Howley PM (ed) *Fields Virology*, 4th edn. Lippincott Williams and Wilkins publishers, Philadelphia, pp 1929-1939

37. Roizman B, Sears AE (1996). Herpes simplex viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (ed) *Fields Virology*, 4th edn. Lippincott Williams and Wilkins publishers, Philadelphia, pp 1940-1989
38. Ros C, Belák S (2002) Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes* 24:99-105
39. Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York , Cold Spring Harbor Laboratory Press
40. Schwyzer M, Ackermann M (1996) Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol* 53:17-29
41. St George TD, Philpott M (1972) Isolation of IBR virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. *Aust Vet J* 48:126
42. Svobodova S, Bell S, Crump CM (2011) Analysis of the Interaction between the essential herpes simplex virus 1 tegument proteins VP16 and VP1/2. *J Virol* 86:473-483
43. Thiry J, Widén F, Grégoire F, Linden A, Belák S, Thiry E (2007) Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. *Vet Res* 3:26

5 CAPÍTULO III

Indirect ELISA to detect antibodies induced by bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) and bovine alphaherpesviruses types 1 (BoHV1) and 5 (BoHV5)

Camila Mengue Scheffer^{1,2}, Sylio Alfredo Petzhold¹, Ana Paula Mutterle Varela^{1,2}, Willian Pinto Paim^{1,2}, Phelipe Magalhães Duarte¹, Márcia Regina Loiko^{1,2}, Cristine Cerva^{1,2}, Candice Schmidt^{1,2}, Adrieli Wendlant^{1,2}, Samuel Paulo Cibulski^{1,2}, Diane Alves de Lima^{1,2}, Caroline Tochetto^{1,2}, Anne Caroline Ramos dos Santos^{1,2}, Juliana Inês Herpich^{1,2}, Thais Fumaco Teixeira², Helton Fernandes dos Santos², Paulo Michel Roehle^{1,2}

¹ Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul CEP 92990-000, Brasil

² Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul CEP 90050-170, Brasil

Camila Mengue Scheffer (corresponding author)

Email scheffer.cm@gmail.com

Tel: + 55 51 3308 3655

Artigo em fase de conclusão

Abstract

Bovine alphaherpesviruses 1 (BoHV1) and 5 (BoHV5) with its subtypes (BoHV1.1, 1.2a, 1.2b; BoHV5a, b, c) are major pathogens of cattle, associated to a number of clinical conditions including respiratory disease, fatal encephalitis and reproductive failure. Bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) is becoming of greater importance in view of the rapid expansion of bubaline farming worldwide and the possibility of cross-species transmission and induction of cross-reactive antibodies to herpesviruses. In the present study, an indirect ELISA was developed to detect antibodies induced by all subtypes of BoHV1, BoHV5 and BuHV1. Initially, 600 bovine field serum samples were screened in serum neutralization tests (SN) performed against all seven virus types/subtypes. The SN results were influenced by the choice of challenge virus; the maximum number of positive sera was detected by adding the positive results obtained with seven different viruses. Seven enzyme linked immunoassays were prepared with each of the antigens (single antigen ELISAs; sAgELISAs) and compared to the SN. The sensitivity of the sAgELISAs was also influenced by the choice of antigen; when compared to SN, all different sAgELISAs revealed significantly lower sensitivities ($p < 0.05$) than combined SN results. Maximum sAgELISA sensitivity was achieved when positive results of at least six viruses were combined, revealing four additional positive sera beyond the SN-positive sera (263/259; 101.5%). However, such differences were not statistically significant. A multiple antigen ELISA (mAgELISA) was then prepared by combining five viral antigens, expected to reach the peak sensitivity of the combined results of the sAgELISAs. When compared to SN, the mAgELISA revealed 96.5% sensitivity and 96.1% specificity ($\kappa = 0.93$; PPV=95.0%; NPV=97.3%). The results of both SN and mAgELISA were compared to a commercially available (IBRgB) ELISA. In relation to SN, the commercial ELISA showed 94.9% sensitivity and 93.8% specificity ($\kappa = 0.88$; PPV=92.0%; NPV=96.1%). In relation to the mAgELISA, the commercial ELISA showed 95.1% sensitivity and 97.3% specificity ($\kappa = 0.92$; PPV=96.5%; NPV=96.0%). The results of the mAgELISA and the commercial ELISA did not vary significantly. A low degree of discrepant results were detected in all assays evaluated; the commercial ELISA revealed the highest number of discrepant results in relation to SN, taken as the gold standard. These results reveal that the mAg ELISA reported here is suitable for the detection of antibodies to BoHV1, BoHV5 and BuHV1, with sensitivity and specificity significantly comparable to those of SN.

Keywords: serological test, viral subtypes, reactivity profile, multiple antigen ELISA

Introduction

Bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV1), Bovine alphaherpesvirus 5 (BoHV5) and Bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) are members of the order *Herpesvirales*, family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus* (ICTV, 2016). The two bovine alphaherpesvirus have been subdivided into subtypes (BoHV1.1, 1.2a, 1.2b; BoHV5a, b, c). These are major pathogens of cattle, associated to a number of clinical conditions including respiratory disease, fatal encephalitis and reproductive failure (Esteves et al., 2003; Hübner et al., 2005; Oliveira et al., 2010; Franco et al., 2012). The BuHV1, on its turn, is becoming of greater importance in view of the rapid expansion of water buffalo farming worldwide and the potential for cross-species transmission and induction of cross-reactive antibodies to herpesviruses (FAO, 2017; Thiry et al., 2007; Nogarol et al., 2014). These may hamper differential diagnosis of such infections. Bubaline alphaherpesvirus has not been so deeply investigated; the only full BuHV1 sequence has just recently been published (Scheffer et al., 2017). The virus probably induces mostly inapparent infections in water buffaloes (*Bubalus bubalis*), although it was incriminated in occasional reproductive and respiratory diseases (St. George & Philpott, 1972; Petrini et al., 2012; Amoroso et al., 2013). Serological studies have identified neutralizing antibodies to BoHV1 and BoHV5 in buffaloes (Cortez et al., 2001; Roncoroni et al., 2007; Scheffer et al., 2013). However, BuHV1 may induce significantly cross-reactive antibodies, it is not possible to discriminate between the antibody responses induced by any of these three virus types or subtypes.

In nature, herpesviruses are usually hosted by a single host species. However, ruminant alphaherpesviruses as well as a number of other herpesviruses of other species may eventually cross the species barrier (Reid et al., 1986; Nettleton et al., 1988; Tolari et al., 1991; Engels et al., 1992; Six et al., 2001; Han et al., 2016). In water buffaloes, infections with BoHV1 have been suggested in view of the results of serological testing and virus isolation (Scheffer, 2013; Scicluna et al., 2007; Fusco et al., 2012). In cattle, infections with BuHV1 have not to date been demonstrated. However, in routine diagnosis, BuHV1 in cattle would most likely be identified as BoHV1 or BoHV5, so cross-infections would require deeper investigation. Nonetheless, water buffalo and cattle are closely related members of the *Bovidae* family. Thus, the growing number of farms where buffaloes and cattle are raised together or in proximity increase the chances for inter-species transmission of infectious agents.

The detection of antibodies was one of the first methods used for the specific diagnosis of viral infections and remains an important tool in diagnostic virology (Storch, 2001). Serological assays such as neutralization tests and enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) have been used in support to control/eradication programs in a number of occasions, often as the mainstay for identification and removal of infected animals (Kramps et al., 1996; Noordegraaf et al., 2000; Raaperi et al., 2014). Therefore, the sensitivity of the serological test used in the screening of these animals is a fundamental issue for the success of such programs.

The gold standard for the detection of antibodies against bovine herpesvirus is SN, a test recommended by the World Organization for Animal Health (OIE, 2010). However, even this test has important variables that can influence the sensitivity of the test, such as incubation time of serum-virus mix and the choice of the virus used for challenge virus (Teixeira et al., 1998; Holz et al., 2010; Varela et al., 2010; Scheffer, 2013). This makes SN a somewhat cumbersome test to use in support of control or eradication schemes, where assays such as ELISAs, more easily adaptable to testing of large numbers of samples, would be more convenient.

Generally, ELISAs are regarded as slightly more sensitive than SN (Cho and Bohac, 1985; Godhardt-Cooper et al., 2009). However, most of ELISAs for antibodies detection to BoHV available to date have been prepared with antigens from single, “classical” BoHV1 strains. Moreover, these are usually validated against sera which were also tested by SN to one or a few “classical” BoHV1 strains (Ferreira et al., 2005; Bauermann et al., 2010; Parreño et al., 2010; Casarin et al., 2016). A commercially available ELISA, based on the detection of antibodies to glycoprotein B (HerdChek* IBRgB, IDEXX) is perhaps the most sensitive among commercially available assays to detect antibodies to BoHV1. However, to date, no ELISA has been fully validated to detect antibodies to all known types and subtypes of BoHV1 and BoHV5. The same applies for BuHV1, where serological testing is still in its early days (Caruso et al., 2016).

The main aim of this study was to develop an assay that would be useful as a screening test to detect antibodies induced by all types and subtypes of bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV1), bovine alphaherpesvirus 5 (BoHV5) and bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1). Antigens from representatives of each of the seven different virus types/subtypes (BoHV1.1, 1.2a, 1.2b; BoHV5a, b, c; BuHV1) were prepared and assays performed in comparison with SN.

Materials and Methods

Collection of samples

The study involved direct manipulation of cattle in the collection of blood samples. The permission for this work was granted by the Ethics Committee on the Use of Animals (ECUA) of the Veterinary Research Institute Desidério Finamor-FEPAGRO/RS, under registry n° 20/2014.

The bovine serum samples used in the study were collected in farms from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. A total of 600 samples collected in ten herds were assayed. The herds were formed of animals naturally infected, vaccinated or with no history of vaccination and/or infection. Sera were separated from blood collected in sterile tubes without additives and kept in insulated boxes until reaching the laboratory. Each serum sample was divided in several aliquots, to avoid repeated freezing/thawing. Sera were heat inactivated at 56°C for 30 min and stored at – 20°C until testing.

Sera that reacted positively or negatively to all seven virus types/subtypes in SN tests as well as in a commercially available ELISA (see below) were pooled. These were pooled and used as positive and negative standards throughout.

Cells

Madin Darby bovine kidney cells (MDBK; originally ATCC CCL-22), were multiplied in Eagle's minimal essential medium (E-MEM; Gibco) supplemented with 8% fetal bovine serum (FBS; Gibco) and gentamicin (50 ug/ml; Sigma). Cells were subcultured every 3-4 days following standard procedures (Freshney, 2016). All cells, sera and media were tested free of pestiviruses, bovine herpesviruses or antibodies to such viruses, following standard procedures (Roehe et al., 1997).

Viruses

One sample of each viral subtype of bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV1), bovine alphaherpesvirus 5 (BoHV5), and bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1), were used as challenge virus in serum neutralization assays (SN), and for the preparation of the ELISA antigen. Viral strains used were: BoHV1.1 strain Los Angeles (LA; Madin et al., 1956), BoHV1.2a strain SV265/96 (Franco et al., 2002), BoHV1.2b strain PG1779/03 (Batista et al., 2010), BoHV5a strain EVI88/95 (Souza et al., 2002), BoHV5b strain A663 (Carrillo et al., 1983), BoHV5c strain ISO97/95 (Souza et al., 2002) and BuHV1 strain

b6 (St George and Philpott, 1972). The viruses were multiply and titrated according to usual methods (Roehle et al., 1997).

Serum neutralization tests (SN)

The SN tests were performed separately against all six viruses representative of all known BoHV1 and BoHV5 subtypes as previously described (Varela et al. 2010). In addition, sera were also tested against the BuHV1 strain b6 (St. George & Philpott, 1972). Briefly, serum samples were diluted twofold (1:2 and 1:4) and mixed with 50 μ l of each of the challenge virus, containing 100 tissue culture infectious doses (TCID₅₀). The serum-virus mixtures were incubated at 37°C for 24 h before the addition of 3–5 x 10⁴ MDBK cells/well. Plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for up to 96 h until the final readings, which were performed with basis on the presence or absence of the typical cytopathic effect (CPE). In each battery of tests, appropriate negative and positive controls were added. The samples were considered positive when the antibodies present in the serum were able to neutralize the viral CPE.

Commercial ELISA

The Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus (BHV1) gB Antibody Test Kit HerdChek* IBRgB (IDEXX) was used for the detection of antibodies to bovine alphaherpesvirus. The assays were performed independently by a private laboratory. The test was performed according to the manufacturer's recommendations.

Antigen preparation

Antigens were prepared in roller tissue culture bottles (850 cm²). Each of the seven viruses was inoculated in nearly confluent monolayers of MDBK cells at a multiplicity of infection equal to 0.01. When cytopathic effect was evident in about 80% of the monolayers, the cells were scraped of the flasks, mixed with the supernatant and centrifuged at 5000 x g for 15 min. The medium was removed and cells overlaid with 2 mL 0.2% OGP (n-octylglucopiranoside; Sigma-08001) in PBS (phosphate buffered saline; 0.02% KH₂PO₄; 0.09% NaH₂PO₄; 0.8% NaCl; 0.02% KCl) and incubated on a rocker platform for 2 h at 4°C. Next, the suspension obtained was centrifuged at 5000 x g for 5 min to remove cell debris. The antigen obtained was aliquoted and stored at -70°C until use. Uninfected cell cultures were similarly prepared and used as control antigen.

Optimization of the assays

The conditions of the ELISA test were optimized in checkerboard titrations. Serial dilutions of each antigen (1:50 to 1:6400) were prepared in carbonate/bicarbonate buffer (0.3% Na₂CO₃ and 0.6% NaHCO₃, pH 9.6). Each antigen was tested in individual plates (Polystyrene ELISA microplates-Greiner). The positive and negative control pools were diluted (1:2 to 1:4096) in diluting buffer (0.1% Tween 20; 4.0% NaCl; 6.0% bovine serum albumin; 0.8% phenol red) and incubated with each antigen preparation, individually. The peroxidase conjugate (peroxidase/anti-bovine IgG conjugate, Sigma-A5295) also were prepared. The assays were optimized with basis on the conditions that would provide the most distinctive differences between positive and negative control sera. Tests were considered valid when the difference in optical density (OD) readings between positive and negative controls was at least 0.70 OD units. A negative control antigen MDBK cells were added in ELISA run.

Single antigen (sAg) ELISA procedure

In the sAgELISA, sera were tested separately against antigens prepared with each of the seven different virus strains. Polystyrene ELISA microplates (Greiner) were coated overnight at 4°C with 50 µL of the previously titrated (1:200) antigens, in carbonate/bicarbonate sodium buffer (0.3% Na₂CO₃; 0.6% NaHCO₃, pH 9.6). After the adsorption of the antigens, plates were washed three times with 100 µL of PBST-20 (0.05% Tween 20/ 0.02% KH₂PO₄; 0.09% NaH₂PO₄; 0.8% NaCl; 0.02% KCl, pH 7.3). Plates were then blocked with 70 µL of 2% milk powder (Molico®, Nestlé) for 1 h at 37 °C and then washed as above. The test sera were then diluted (1:2), added to duplicate wells (50 µL/well) and incubated for 1 h at 37°C. Plates were washed again and incubated for 1 h at 37°C with an appropriate dilution (1:1500 in diluting buffer) of rabbit anti-bovine peroxidase/IgG conjugate (Sigma-A5295). After another round of washings, 50 µL of the substrate ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid; Sigma-A1888) with 0.3% H₂O₂ were added to plates. After 30 min of incubation at room temperature, the optical density (OD) was measured at 405 nm and the average OD of each serum was calculated. In each batch of tests, appropriate controls were added.

Multiple antigen (mAg) ELISA procedure

The selection of antigens to be included in the mAgELISA was based on the results obtained at sAgELISAs. Among the antigens with higher sensitivity, those which

gave higher optical density readings were selected. In addition, the reactivity profiles of each serum sample against each antigen were analyzed. Five antigens (BoHV1.2a, 1.2b and BoHV5a, b, c) were selected to prepare the mAgELISA. Antigens were adjusted to a final dilution of 1:200 (in carbonate/bicarbonate sodium buffer), distributed in 50 μ L volumes per well and incubated overnight at 4°C. Other procedures were performed as described for the sAgELISA above.

Determination of the cut-off points of sAgELISA and mAgELISA

For determination of the cut-off of the assays, 100 serum samples were used, comprising 80 sera which resulted positive in SN tests performed against all seven virus types/subtypes. Samples with different levels of reactivity at ELISA (high, medium and weak ELISA- reactive sera), as well as 20 sera which resulted negative in all assays were also included. The cut-off point of the ELISAs was established for each individual plate by comparing the optical density (OD) of negative controls and strong positive controls.

Sensitivity and statistical analyses

The sensitivity of the SN and the seven sAgELISAs were defined as the capacity to detect antibody-positive sera in relation to the maximum number of positive sera detected. Comparative sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, McNemar's and the Kappa (κ) correlation coefficient were calculated using the Dag Stat program (Mackinnon, 2000).

Results

Optimization of the ELISAs

The optimum dilutions for the viral antigens to be used in the sAg and mAgELISAs were established at 1:200 for all antigens. Positive and negative test sera and controls were diluted 1:2. The anti-bovine IgG/peroxidase conjugate was used at in 1:1500. The readings obtained with the control antigen prepared with uninfected cells and "blank controls" (no antigen) were consistently irrelevant.

The cut-off point of the ELISAs was established for each individual plate at $\geq 45\%$ the optical density (OD) of the negative control, when the difference between negative and strong positive controls were ≥ 0.7 OD units. Plates where controls were not within these limits were repeated. All sera were tested at least once with the seven sAgELISAs.

All sera which gave rise to OD readings close to the cut-off point were repeated until consistent results were obtained.

Comparisons between SN, sAgELISA, mAg ELISA and commercial ELISA

The results obtained at SN and with the seven sAgELISAs are shown in Table 1. Out of the 600 selected sera, 259 (43.2%) were positive for neutralizing antibodies to at least one of the seven SN challenge viruses, whereas 341 (56.8%) sera were negative for antibodies to all viruses assayed. Out of the total number of neutralizing antibody-positive sera, 213/259 (82.2%) reacted with all seven viruses tested. However, 46/259 (17.8%) sera reacted displaying different profiles depending on the viral type/subtype used at challenge (Fig.1).

In the sAgELISAs, a total of 263/600 (43.8%) serum samples were positive to at least one of the seven antigens prepared. Of these, 219/263 (83.3%) were positive for the seven viruses simultaneously. Thus, 44/263 (16.7%) sera presented different profiles of reactivity, which varied depending on the antigen used at sAgELISA. Yet, 337/600 (56.2%) serum samples were completely negative with all seven sAgELISA. Figure 1 allows a more discriminative visualization of the reactivity profile of those positive sera, which revealed discrepancies in the results of the assays. The highest sensitivity of sAgELISA was achieved with BoHV5c antigen, which detected 249/259 (96.1%) of the SN-positive sera. The sensitivity of the sAgELISAs prepared with other antigens varied between 229/259 (88.4%) to 247/259 (95.4%) (Tab. 1). When positive results were added the sAgELISA sensitivity increased significantly (Tab. 2). These results were used to design the mAgELISA, whose combination of antigens should provide an assay that would be able to detect as many positive sera as those detected by the sum of positive sera with the seven sAgELISAs (Tab. 3). The antigen for the mAgELISA was then prepared by mixing five antigens (BoHV1.2a, 1.2b and BoHV5a, b, c). With the mAgELISA, 263/259 (101.5%) serum samples were considered positive. In relation to SN, over the 600 sera, the mAgELISA revealed 96.5% sensitivity and 96.1% specificity ($\kappa=0.93$; PPV=95.0%; NPV=97.3%). Twenty-two sera showed discrepant results between mAgELISA and SN (Tab. 4).

A commercial ELISA was included in the comparisons. In relation to SN, the commercial ELISA revealed the highest number of discrepant results (267/259; $\kappa=0.88$; PPV=92.0%; NPV=96.1%). Thus, 21 sera were detected as positive at the commercial ELISA that were neutralizing antibody-negative (Tab. 5).

The results obtained with the commercial ELISA were compared to those of the mAgELISA. The results of the mAgELISA and commercial ELISA did not vary significantly (Tab. 6), showing 95.1% sensitivity and 97.3% specificity ($\kappa=0.92$; PPV=96.5%; NPV=96.0%). Between these, 12 sera were also mAgELISAs-negative.

Discussion

A number of different ELISAs for detecting antibodies to bovine alphaherpesviruses in cattle have been developed; yet most of those were constructed with basis on a single BoHV1 strain as source of antigen (Ackermann et al., 1990; Perrin et al., 1996; Van Oirschot et al., 1997; De Wit et al., 1998; Teixeira et al., 2001; Godhardt-Cooper et al., 2009; Parreño et al., 2010; Casarin et al., 2016). In Brazil, BoHVs of all types/subtypes known to date are circulating (D'Arce et al., 2002; Franco et al., 2002_b; Souza et al., 2002; Esteves et al., 2008; Batista et al., 2010). In addition, BuHV1, although not to date isolated in the country, is probably circulating in bubaline herds. The importance of BuHV1 is increasing in view of the rapid expansion of bubaline farming worldwide and, particularly, the possibility of cross-species transmission of herpesviruses (FAO, 2017; Thiry et al., 2007). In serological diagnosis, the induction of cross-reactive antibodies to bovine herpesviruses, already documented in a number of occasions (Nagarol et al., 2014; Scicluna et al., 2007; Caruso et al., 2016) is an additional concern. Therefore, serological tests aimed to reveal exposure of animals to these viruses should be able to detect antibodies induced by all types and subtypes of such viruses (Varela et al., 2010). With that aim in mind, this study was carried out to develop an ELISA capable of detecting antibodies to all different circulating viruses, yet with sensitivity, specificity and predictive values comparable to those of the “gold standard” SN - when performed against all targeted herpesviruses types/subtypes. Although some assays for antibody detection against BoHV1 and BoHV5 have been previously developed (Teixeira et al., 2001; Ferreira et al., 2005; Bauermann et al., 2010), those did not focus on the possibility of infections with multiple alphaherpesvirus types and subtypes.

Serum neutralization is often used as the gold standard for validation of antibody assays (Kramps et al., 2004; Jordan et al., 2012). Despite that, SN does bear significant variables, such as the choice of virus used at challenge and the length of the incubation of the serum/virus mixtures (Bitsch, 1978; Vieira et al., 2003; Holz et al., 2010; Varela et al., 2010). Moreover, it is well known that the sensitivity of the assays may vary at different ages, stages of infection or different immune status of the hosts (Kramps et al.,

2004). Animals whose antibody levels might be below the trough level of the serological assays will be reported as seronegative. Yet specifically in the case of bovine herpesviruses, it has been demonstrated that a significant proportion of BoHV1 latently infected animals may be SN-negative, with levels of discrepancy that may reach 28.6% (Puentes et al., 2016).

In order to decrease the possibility of error that might be introduced due to the usage of a single virus at challenge in SN, the ELISAs here developed were compared with SN using seven different challenge viruses. The serum-virus mixtures were incubated for 24 h before the addition of cells, thus making the assay more sensitive (Vieira et al., 2003). The mAgELISA was constructed with basis on the combination of the results of multiple sAgELISAs, resulting in optimal agreement between both tests ($\kappa=0.99$), what brought the validation parameters of the assay quite close to the gold standard SN ($\kappa=0.93$; PPV=95.0%; NPV=97.3%).

These findings reveal the importance of using more than one virus as antigen source for the ELISA, as demonstrated for SN here and elsewhere (Holz et al., 2010; Varela et al., 2010) when using more than one challenge virus. In fact, here the best combination was achieved by using five different antigens in the mAgELISA. It can be argued that antigen preparation may be complicated by the use of different viruses. However, most laboratories dedicated to herpesvirus work would be able to process five distinct viruses with little difficulty. Yet the actual antigen preparation procedure is quite simple and consists of no more than a detergent treatment of a crude infected cell preparation. The use of different viruses as antigens source for the ELISA will increase considerably the sensitivity of the assay, as demonstrated here. Unfortunately, although predictively, with basis on SN (Varela et al., 2010), the ELISA here presented does not allow for distinguishing the virus inducer of the antibody response detected by the assay.

The performance of a commercial ELISA was compared with that of the mAgELISA. The commercially available assay is aimed to detect antibodies to BoHV1 glycoprotein B (gB) BoHV1-gB. As this protein has 93.0% amino acid identity with its counterpart on BoHV5 (Delhon et al., 2003) and 92.4% amino acid identity with its equivalent on BuHV1 (Scheffer et al., 2017), good sensitivity was expected from the commercial ELISA in its capacity to detect BoHV1, BoHV5 and BuHV1 anti-gB antibodies. In fact, the commercial ELISA detected more positive sera than SN against seven viruses, what raises the question as to whether these were false positives or true antibody-positive sera. Such question will remain unanswered. However, to minimize

such trouble, the mAgELISA was adjusted in its sensitivity to provide results as close as possible to SN.

In conclusion, the mAgELISA offers an excellent alternative to SN, which ideally should be performed against seven viruses if antibodies to all BoHV1 and BoHV5 subtypes, plus BuHV1, are to be detected. Such assay would be highly suited for screening of large number of cattle sera. These results reveal that the mAg ELISA reported here is suitable for the detection of antibodies to BoHV1, BoHV5 and BuHV1, with sensitivity and specificity significantly comparable to those of SN.

Table 1. Performance (individualized and cumulative) of different bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1) as challenge viruses or antigens in SN and sAgELISA tests with field bovine sera which resulted positive to at least one of the viruses tested.

Viral samples	SN		sAgELISA		McNemar's ^b
	Number of positive sera	Sensitivity ^a	Number of positive sera	Sensitivity ^a	
BoHV1.1 LA	236	91,1	237	91,5	p<0,05
BoHV1.2a SV265/96	244	94,2	247	95,4	p<0,05
BoHV1.2b PGI779/03	241	93,1	241	93,1	p<0,05
BoHV5a EVI88/95	239	92,3	233	90,0	p<0,05
BoHV5b A663	235	90,7	232	89,6	p<0,05
BoHV5c ISO97/95	242	93,4	249	96,1	p<0,05
BuHV1 B6	237	91,5	229	88,4	p<0,05
LA+SV265/96	248	95,8	251	96,9	p<0,05
LA+PGI779/03	249	96,1	246	95,0	p<0,05
LA+EVI88/95	251	96,9	240	92,7	p<0,05
LA+A663	249	96,1	239	92,3	p<0,05
LA+ISO97/95	250	96,5	251	96,9	p>0,05
LA+B6	249	96,1	240	92,7	p<0,05
SV265/96+PGI779/03	250	96,5	254	98,1	p>0,05
SV265/96+EVI88/95	249	96,1	251	96,9	p<0,05
SV265/96+A663	249	96,1	251	96,9	p<0,05
SV265/96+ISO97/95	249	96,1	257	99,2	p>0,05
SV265/96+B6	250	96,5	252	97,3	p>0,05
PGI779/03+EVI88/95	250	96,5	243	93,8	p<0,05
PGI779/03+A663	247	95,4	243	93,8	p<0,05
PGI779/03+ISO97/95	251	96,9	255	98,5	p>0,05
PGI779/03+B6	249	96,1	246	95,0	p<0,05
EVI88/95+A663	246	95,0	237	91,5	p<0,05
EVI88/95+ISO97/95	249	96,1	252	97,3	p>0,05
EVI88/95+B6	247	95,4	239	92,3	p<0,05
A663+ISO97/95	249	96,1	251	96,9	p>0,05
A663+B6	247	95,4	238	91,9	p<0,05
ISO97/95+B6	249	96,1	252	97,3	p>0,05
LA+SV265/96+PGI779/03	253	97,7	255	98,5	p>0,05
LA+SV265/96+EVI88/95	252	97,3	253	97,7	p>0,05
LA+SV265/96+A663	252	97,3	252	97,3	p>0,05
LA+SV265/96+ISO97/95	252	97,3	257	99,2	p>0,05
LA+SV265/96+B6	253	97,7	253	97,7	p>0,05
LA+PGI779/03+EVI88/95	255	98,5	247	95,4	p<0,05
LA+PGI779/03+A663	253	97,7	247	95,4	p<0,05
LA+PGI779/03+ISO97/95	255	98,5	256	98,8	p>0,05
LA+PGI779/03+B6	253	97,7	249	96,1	p<0,05
LA+EVI88/95+A663	254	98,1	242	93,4	p<0,05
LA+EVI88/95+ISO97/95	254	98,1	253	97,7	p>0,05
LA+EVI88/95+B6	254	98,1	243	93,8	p<0,05
LA+A663+ISO97/95	255	98,5	252	97,3	p>0,05
LA+A663+B6	255	98,5	242	93,4	p<0,05
LA+ISO97/95+B6	254	98,1	253	97,7	p>0,05
LA+SV265/96+PGI779/03+EVI88/95	255	98,5	256	98,8	p>0,05
LA+SV265/96+PGI779/03+A663	254	98,1	256	98,8	p>0,05
LA+SV265/96+PGI779/03+ISO97/95	255	98,5	260	100,4	p>0,05
LA+SV265/96+PGI779/03+B6	255	98,5	257	99,2	p>0,05
LA+PGI779/03+EVI88/95+A663	255	98,5	248	95,8	p<0,05
LA+PGI779/03+EVI88/95+ISO97/95	257	99,2	256	98,8	p>0,05
LA+PGI779/03+EVI88/95+B6	257	99,2	250	96,5	p>0,05
LA+EVI88/95+A663+ISO97/95	257	99,2	254	98,1	p>0,05
LA+EVI88/95+A663+B6	257	99,2	245	94,6	p<0,05
LA+A663+ISO97/95+B6	258	99,6	254	98,1	p>0,05
SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+A663	252	97,3	256	98,8	p>0,05
SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+ISO97/95	254	98,1	260	100,4	p>0,05
SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+B6	254	98,1	258	99,6	p>0,05
SV265/96+EVI88/95+A663+ISO97/95	254	98,1	259	100,0	p>0,05
SV265/96+EVI88/95+A663+B6	254	98,1	256	98,8	p>0,05
SV265/96+A663+ISO97/95+B6	255	98,5	260	100,4	p>0,05
PGI779/03+EVI88/95+A663+ISO97/95	254	98,1	256	98,8	p>0,05
PGI779/03+EVI88/95+A663+B6	254	98,1	249	96,1	p<0,05
PGI779/03+A663+ISO97/95+B6	255	98,5	258	99,6	p>0,05
EVI88/95+A663+ISO97/95+B6	255	98,5	255	98,5	p>0,05
LA+SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+A663	255	98,5	257	99,2	p>0,05
LA+SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+ISO97/95	257	99,2	260	100,4	p>0,05
LA+SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+B6	257	99,2	258	99,6	p>0,05
LA+PGI779/03+EVI88/95+A663+ISO97/95	257	99,2	257	99,2	p>0,05
LA+PGI779/03+EVI88/95+A663+B6	257	99,2	251	96,9	p>0,05
LA+EVI88/95+A663+ISO97/95+B6	259	100,0	256	98,8	p>0,05
SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+A663+ISO97/95	254	98,1	261	100,8	p>0,05
SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+A663+B6	254	98,1	259	100,0	p>0,05
PGI779/03+EVI88/95+A663+ISO97/95+B6	256	98,8	258	99,6	p>0,05
LA+SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+A663+ISO97/95	257	99,2	261	100,8	p>0,05
LA+SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+A663+B6	257	99,2	259	100,0	p>0,05
SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+A663+ISO97/95+B6	256	98,8	263	101,5	p>0,05
LA+SV265/96+PGI779/03+EVI88/95+A663+ISO97/95+B6	259	100,0	263	101,5	-

^aSensitivity calculated over the highest number of SN-positive sera (SN=259); ^bValues <0.05 (in bold type) are significant.

Table 2. Comparison between results of SN and sAgELISAs to detect antibodies induced by bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1) with field bovine sera, which resulted positive to at least one of the viruses tested in both tests.

SN	sAgELISA		TOTAL
	POSITIVE	NEGATIVE	
POSITIVE	250	9	259
NEGATIVE	13	328	341
TOTAL	263	337	600

Sensitivity 96.5%; specificity 96.1%; positive predictive value 95.0%; negative predictive value 97.3%; Kappa 0.93; McNemar's $p > 0.05$

Table 3. Comparison between results of sAgELISA and mAgELISA to detect antibodies induced by bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1) with field bovine sera, which resulted positive to at least one of the viruses tested in sAgELISA.

sAgELISA	mAgELISA		TOTAL
	POSITIVE	NEGATIVE	
POSITIVE	262	1	263
NEGATIVE	1	336	337
TOTAL	263	337	600

Sensitivity 99.6%; specificity 99.7%; positive predictive value 99.6%; negative predictive value 99.7%; Kappa 0.99; McNemar's $p > 0.05$

Table 4. Comparison between results of SN and mAgELISA to detect antibodies induced by bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1) with field bovine sera, which resulted positive to at least one of the viruses tested in SN.

SN	mAgELISA		TOTAL
	POSITIVE	NEGATIVE	
POSITIVE	250	9	259
NEGATIVE	13	328	341
TOTAL	263	337	600

Sensitivity 96.5%; specificity 96.1%; positive predictive value 95.0%; negative predictive value 97.3%; Kappa 0.93; McNemar's $p > 0.05$

Table 5 Comparison between results of SN and commercial ELISA to detect antibodies induced by bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1) with field bovine sera, which resulted positive to at least one of the viruses tested in SN.

SN	commercial ELISA		TOTAL
	POSITIVE	NEGATIVE	
POSITIVE	246	13	259
NEGATIVE	21	320	341
TOTAL	267	333	600

Sensitivity 94.9%; specificity 93.8%; positive predictive value 92.0%; negative predictive value 96.1%; Kappa 0.88; McNemar's $p > 0.05$

Table 6. Comparison between results of commercial ELISA and mAgELISA to detect antibodies induced by bovine alphaherpesviruses (BoHV1 and BoHV5 and its subtypes) and bubaline alphaherpesvirus (BuHV1) with field bovine sera.

commercial ELISA	mAgELISA		TOTAL
	POSITIVE	NEGATIVE	
POSITIVE	254	13	267
NEGATIVE	9	324	333
TOTAL	263	337	600

Sensitivity 95.1%; specificity 97.3%; positive predictive value 96.5%; negative predictive value 96.0%; Kappa 0.92; McNemar's $p > 0.05$

Viral samples	Bovine serum samples																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
LA	Diagonal	Diagonal	Diagonal						Diagonal	Diagonal									Diagonal	Diagonal		Vertical	Vertical
SV265/96				Diagonal						Vertical	Vertical								Diagonal			Vertical	
PG1779/03									Diagonal				White						Diagonal			Vertical	Vertical
EVI88/95					Diagonal					Diagonal											Diagonal	Vertical	Vertical
A663						Vertical	Vertical					Diagonal	Diagonal		Diagonal	Diagonal	Vertical			Diagonal	Vertical	Vertical	Vertical
ISO97/95							Vertical	Vertical				Diagonal	Diagonal		Diagonal	Diagonal	Vertical		Diagonal		Vertical	Vertical	Vertical
b6							Vertical	Vertical	Vertical	Vertical			Diagonal	Diagonal	Vertical	Vertical	Vertical			Diagonal	Vertical	Vertical	Vertical
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
LA					Vertical	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical				Diagonal					Diagonal	Vertical		Diagonal	
SV265/96				Vertical		Vertical													Diagonal			Vertical	Diagonal
PG1779/03	Diagonal	Diagonal	Diagonal			Vertical	Vertical	Vertical	Vertical			Vertical	Vertical	Diagonal	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical	Diagonal	Diagonal	Diagonal	Vertical	Vertical
EVI88/95	Diagonal	Diagonal	Diagonal	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical		Vertical	Diagonal	Vertical	Vertical		Vertical	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical
A663	Diagonal	Diagonal	Diagonal	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical			Diagonal	Diagonal		Vertical	Diagonal		Vertical		Vertical	Vertical	Vertical		Vertical	Vertical
ISO97/95	Diagonal				Vertical	Vertical	Vertical			Diagonal	Diagonal		Diagonal	Diagonal		Vertical		Vertical	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical	Vertical
b6	Diagonal				Vertical	Vertical	Vertical	Vertical				Vertical	Diagonal				Vertical		Vertical		Vertical	Vertical	Vertical
	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67		
LA		Vertical	Vertical	Vertical															Diagonal				
SV265/96					Diagonal	Diagonal	Diagonal																
PG1779/03									Diagonal			Diagonal	Diagonal										
EVI88/95	Diagonal								Vertical	Vertical	Vertical												
A663										Vertical	Vertical					Diagonal							
ISO97/95	Diagonal				Vertical	Vertical	Vertical								Diagonal		Diagonal	Diagonal	Vertical		Diagonal		
b6																			Vertical	Vertical	Diagonal	Vertical	Vertical

Figure 1. Different reactivity profile of neutralizing antibody-positive field bovine sera in SN and sAgELISA with seven different alphaherpesviruses (BoHV1: LA, SV265/96, PG1779/03; BoHV5: EVI88/95, A663, ISO97/95; BuHV1: b6) as challenge viruses or antigens. Black squares: positive reaction to a particular strain in both tests; White squares: negative reaction to a particular strain in both tests; Vertical stripes: positive reaction to a particular strain only in SN; Diagonal stripes: positive reaction to a particular strain only in sAgELISA.

REFERENCES

- Amoroso, M.G. 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.
- Ackermann, M.; Belak, S. & Bitsch, V. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 361-363. 1990.
- Batista, H. B. C. R. et al. Herpesvírus bovinos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1023- 1028. 2010.
- Bauermann, F. V. et al. Teste imunoenzimático com base em anticorpo monoclonal para a detecção de anticorpos contra os herpesvírus bovino tipos 1 e 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 411-417. 2010.
- Bitsch, V. The P 37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.19, p. 497–505. 1978.
- Carrillo, B.J. et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt für Veterinärmedizin B. Journal of veterinary medicine. Series B**, v. 30, n. 5, p. 327-332. 1983.
- Casarin, E et al. A new ELISA using the ANANAS technology showing high sensitivity to diagnose the bovine rhinotracheitis from individual sera to pooled milk. **Plos One**, v. 11, n. 1. 2016.
- Cortez, A. et al. Comparação das técnicas de ELISA indireto e de soroneutralização na detecção de anticorpos contra o BHV-1 em amostras de soro bubalino (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and animal Science**, v. 38, n. 3, p. 146-148. 2001.
- Caruso, C. et al. Prevalence of antibodies against Bubaline herpesvirus (BuHV-1) among Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*) with implications in buffalo trade. **Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 4, p. 184-188. 2016.
- Cho, H. J. & Bohac, J. G. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bovine rhinotracheitis viral antibody in cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 49, n. 2, p. 189-194. 1985.
- 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.
- Delhon, G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347. 2003.

De Wit, J. J. et al. A comparative study of serological tests of use in the bovine herpesvirus 1 eradication programmes in the Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 153-163. 1998.

Engels, M. et al. Interactions of bovine and caprine herpesviruses with the natural and foreign hosts. **Veterinary Microbiology**, v. 33, p. 69-78. 1992.

Esteves, P. A. et al. Bovine herpesvirus (BoHV-5) in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. **Veterinary Record**, v. 152, p. 658-659. 2003.

FAO. Food and Agriculture Organization. Faostat agriculture data (Agricultural production – live animals – livestock. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

Ferreira, M. C. et al. Desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico sorológico da infecção pelo herpesvírus bovino 1. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 3, p. 363-372. 2005.

Fusco et al. First report of natural BoHV-1 infection in water buffalo. **Veterinary Record**, v. 117, n. 6, p. 152. 2015.

Franco, A.C. et al. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 274-278. 2002.

Franco, A.C.; Roehle, P.M. & Varela, A.P.M. *Herpesviridae*. In: Flores, E.F., Virologia Veterinária, Santa Maria, RS, Ed. UFSM, cap. 18, p. 503-570. 2012.

Freshney, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. Seventh Edition. Hoboken, New Jersey. 2016.

Godhardt-Cooper, J. A. et al. Evaluation of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 523-526. 2009.

Han, Z. et al. Prevalence of circulating antibodies to bovine herpesvirus 1 in yaks (*Bos grunniens*) on the Qinghai-Tibetan Plateau, China. **Journal of wildlife diseases**, v. 52, n. 1, p. 164-167. 2016.

Holz, C.L. et al. Serum neutralization with different types and subtypes of bovine herpesvirus 1 and 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 515-522. 2010.

Hübner, S. O. et al. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, p. 187-196. 2005.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy: 2015 release, ratification 2016, Order *Herpesvirales*. Disponível em: <www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Acesso: 09 jan. 2017.

Jordan, D. et al. Describing the within laboratory and between laboratory agreement of a serum ELISA in a national laboratory network. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 104, p. 240-248. 2012.

Kramps, J. A. et al. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2175-2181. 1994.

Kramps, J. A. et al. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 102, p. 169-181. 2004.

Madin, S. H.; York, R. J. & McKercher, D. G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science**, v. 124, n. 3225, p. 721-722, 1956.

Mackinnon, A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. **Computers in Biology and Medicine**, v. 30, p. 127-134. 2000.

Nettleton, P. F. et al. Herpesvirus infections in Cervidae. **Revue scientifique et technique Office International of Epizootics**, v. 7, p. 977-988. 1988.

Noordegraaf, A. V. et al. Evaluating control strategies for outbreaks in BHV1-free areas using stochastic and spatial simulation. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 44, p. 21-42. 2000.

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.

OIE. World organization for animal health. International Animal Health Code. Manual of Standards. 2010. Disponível em: <<http://oie.int/norms/mmanual>>. Acesso em: 02 dez. 2014.

Oliveira, M. T. et al. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 1139-1145. 2010.

Parreño, V. et al. Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum sample using ISO/IEC17025 standards. **Journal of Virological Methods**, v. 169, p. 143-153. 2010.

Perrin, B. et al. Selection of European Union standard reference sera for use in the serological diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. **Revue scientifique et technique Office International of Epizootics**, v. 13, n. 3, p. 947-960. 1996.

Petrini, S. et al. Rilievo del Bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) in un allevamento di bufali nel centro Italia. **Large Animal Review**, v. 18, p. 113-116. 2012.

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. 2016.

Raaperi, K. et al. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. **The Veterinary Journal**, v. 201, p. 249-256. 2014.

Reid, H. W. et al. Experimental infection of red deer (*Cervus elaphus*) and cattle with a herpesvirus isolated from red deer. **Veterinary Record**, v. 118, p. 156-158. 1986.

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

Roncoroni, C. Serological survey and reproductive performances in buffaloes under fixed time artificial insemination. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 828-831. 2007.

Six, A. et al. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. **Archives of Virology**, v. 146, p. 1325-1335. 2001.

Souza, V.F. et al. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p.13-18, 2002.

Scheffer, C. M. Herpesvírus e pestivírus em rebanhos bubalinos do Rio Grande do Sul. 98f. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

Scheffer, C. M. Genome sequence of bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) isolated in Australia in 1972. **Archives of Virology**, v. 161, p. 1-8. 2017.

Scicluna, M.T. Epidemiological situation of Herpesvirus infections in buffalo herds: Bubaline Herpesvirus1 or Bovine Herpesvirus1? **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 845-849. 2007.

St. George, T.D. & Philpott, M. Isolation of IBR virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 126. 1972.

Storch, G. A. Diagnostic Virology. In: Knipe, D., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Chapter 18. fourth ed. pp. 410-442. 2001.

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.

Teixeira, M. F. B. et al. 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, J. et al. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. **Veterinary Research**, v. 3, p. 26. 2007.

Tolari, F. et al. Isolation and reactivation of bovid herpesvirus 1 in goats. **Microbiologica**, v. 13, p. 67-71. 1991

Van Oirschot, J. T. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. **Journal of Virological Methods**, v. 67, p. 23-34. 1997.

Varela, A.P.M. et al. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 254-260. 2010.

Vieira, S. et al. 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.