

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

**SEQUÊNCIA COMPLETA DO GENOMA DE HERPESVÍRUS BOVINO 5
SUBTIPO C**

WILLIAN PINTO PAIM

Porto Alegre

2017

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

**SEQUÊNCIA COMPLETA DO GENOMA DE HERPESVÍRUS BOVINO 5
SUBTIPO C**

(Dissertação de mestrado)

Autor: Willian Pinto Paim

Dissertação apresentado como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias, área de concentração em
Medicina Veterinária Preventiva e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehle

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Paim, Willian Pinto
SEQUÊNCIA COMPLETA DO GENOMA DE HERPESVÍRUS
BOVINO 5 SUBTIPO C / Willian Pinto Paim. -- 2017.
63 f.

Orientador: Paulo Michel Roehle.

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

1. Alfaherpesvírus. 2. BoHV-5. 3. Subtipo c. 4.
Sequência genômica. 5. Meningoencefalite. I. Roehle,
Paulo Michel, orient. II. Título.

WILLIAN PINTO PAIM

**SEQUÊNCIA COMPLETA DO GENOMA DE HERPESVÍRUS BOVINO 5
SUBTIPO C**

Aprovada em 24 de março de 2017

Aprovada por:

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

Cláudio Wageck Canal
Membro da comissão

Fabiana Quoos Mayer
Membro da comissão

Gustavo Cauduro Cadore
Membro da comissão

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço minha à família pela confiança em mim depositada, além do amor e união em todos os momentos.

Aos meus pais, Tânia e Salatiel, assim como meus irmãos Luciana e Marcelo, pelo incentivo incondicional, por todos os conselhos e por tudo que me ensinaram.

Em especial ao meu avô, Pereci, por todos os conselhos e por tudo que me ensinou. Mesmo tendo nos deixado, será sempre lembrado.

Aos colegas do IPVDF e LABVIR/UFRGS pela amizade, ajuda no trabalho em vários momentos, de diferentes formas, que contribuíram para a construção desta dissertação.

Ao professor e orientador Paulo Michel Roehe, e à Professora Ana Cláudia Franco pela oportunidade e confiança, pela dedicação e pelos tantos ensinamentos que contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional.

Gostaria também de agradecer à minha segunda família, os Schiavos, pelo apoio que mesmo de longe se fizeram presentes. A minha amiga, companheira e namorada de todas as horas, Camila, sempre que possível esteve ao meu lado.

Aos amigos do Laboratório, da Faculdade, e todos os outros que tornaram meus dias mais agradáveis, com certeza também foram importantes.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária pela oportunidade de realizar mestrado em um programa de excelência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste objetivo, meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade”.

(Júlio Verne)

SEQUÊNCIA COMPLETA DO GENOMA DE HERPESVÍRUS BOVINO 5 SUBTIPO C

RESUMO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é classificado na ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. O BoHV-5 é um agente importante de encefalites ou meningoencefalites em bovinos. Até o presente três subtipos de BoHV-5 são reconhecidos (BoHV-5a, b & c), para que tais correlações possam ser investigadas com maior profundidade, a disponibilidade das sequências genômicas dos diferentes subtipos é de particular importância. Até o presente, somente uma sequência completa de BoHV-5a (SV507/99) encontra-se disponível. No presente estudo é apresentada a sequência genômica completa de uma amostra de BoHV-5 subtipo c, denominada P160/96. O genoma viral foi obtido através de sequenciamento de alto desempenho. As sequências obtidas foram analisadas com o software Geneious (versão 9.1.4). O genoma contém 137.740 pb, com 99% de similaridade em nível de nucleotídeos com a amostra SV507/99. Embora semelhante à sequência de genoma de BoHV-5 já publicada, existe um número de substituições de nucleotídeos e deleções/inserções ao longo do genoma, muitas das quais afetam as sequências de codificação. O genoma da amostra P160/96 apresenta um sítio adicional de clivagem para *BstEII*, localizado na região repetida interna (IR) da sequência, que revela o perfil de restrição enzimática característico de amostras do subtipo c. Este é o segundo genoma de BoHV-5 até o presente publicado, sendo o primeiro do subtipo c. Espera-se que esta sequência venha representar uma contribuição significativa para uma maior compreensão da biologia dos herpesvírus bovinos, especialmente na investigação de potenciais diferenças na patogenicidade de distintos subtipos de BoHV-5. Esse conhecimento poderá trazer subsídios adicionais para a definição de estratégias de controle ou erradicação mais apropriadas, contribuindo assim para a melhoria a saúde dos rebanhos bovinos.

Palavras-chave: Alphaherpesvírus; BoHV-5; subtipo c; sequência genômica; meningoencefalite.

THE COMPLETE GENOME SEQUENCE OF BOVINE HERPESVIRUS 5 SUBTYPE C

ABSTRACT

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is classified in the order Herpesvirales, family Herpesviridae, subfamily Alphaherpesvirinae, genus Varicellovirus. BoHV-5 is an important agent of encephalitis or meningoencephalitis in cattle. For such correlations to be further investigated, the availability of the genomic sequences of the different subtypes is of particular importance. To date, only one complete sequence of BoHV-5 subtype a (SV507/99) is available. In the present study the complete genomic sequence of BoHV-5 subtype c, named P160/96, is presented. The viral genome was determined by high-throughput sequencing. The obtained sequence was analyzed with the Geneious software (version 9.1.4). The P160/96 genome has 137.740 bp, with 99% similarity at the nucleotide level with SV507/99. Although similar to the published BoHV-5 genome sequence, there are a number of nucleotide substitutions and deletions/insertions throughout the genome, many of which affect the coding sequences. The P160/96 genome has the additional BstEII cleavage site located in the internal repeat region (IR), which gives rise to the reveals the characteristic enzyme restriction profile of subtype c samples. This is the second published BoHV-5 genome and the, first of subtype c. It is expected that this sequence will represent a significant contribution to a better understanding of bovine herpesvirus biology, especially in the investigation of potential differences in pathogenicity of distinct BoHV-5 subtypes. This is expected to provide additional information for the definition of appropriate control or eradication strategies, thus contributing to the improvement of cattle health.

Keywords: Alphaherpesvirus; BoHV-5; subtype c; genomic sequence; meningoencephalitis.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | | |
|----------|---|----|
| FIGURA 1 | Representação esquemática da estrutura de um vírion da família <i>Herpesviridae</i> | 21 |
| FIGURA 2 | Organização genômica de um alfaherpesvírus de ruminante..... | 22 |
| FIGURA 3 | Representação das etapas do ciclo de replicação de alfaherpesvírus..... | 25 |
| FIGURA 4 | Patogenia da infecção latente dos alfaherpesvírus..... | 29 |

CAPÍTULO 1

| | | |
|----------|--|----|
| FIGURA 1 | Alignment of the complete genome of BoHV-5c strain P160/96 with BoHV-5a strain SV507/99 (A) (GenBank accession number NC_005261.2) and BoHV-1 strain NVSL (B) (GenBank accession number JX898220.1)..... | 49 |
| FIGURA 2 | Alignment of the nucleotide sequence of the BoHV-5c IR region (P160/96) (accession number) and BoHV-5a (SV507/99) (accession number NC005261)..... | 50 |
| FIGURA 3 | Comparison, differentiation and analysis of the fragments generated by <i>in silico</i> cleavage with the <i>BstEII</i> enzyme of BoHV-5a (SV507/99) and BoHV-5c (P160/96) viral genomes..... | 51 |

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | | |
|----------|---|----|
| TABELA 1 | Classificação taxônomica de alguns membros da ordem <i>Herpesvirales</i> | 18 |
| TABELA 2 | Estudos de prevalência das infecções pelo BoHV-5 em diferentes regiões do Brasil..... | 27 |

CAPÍTULO 1

| | | |
|----------|---|----|
| TABELA 1 | Characterization of BoHV-5c strain P160/96 genes..... | 47 |
| TABELA 2 | Comparison of nucleotide and amino acid sequence identities among genes of BoHV-5c (KY559403), BoHV-5a (NC_005261.2) and BoHV-1 (JX898220.1)..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: percentagem

°C: graus Celsius

BoHV-1: herpesvírus bovino tipo 1

BoHV-5: herpesvírus bovino tipo 5

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECP: efeito citopático

ELISA: ensaio imunoenzimático (*enzyme linked immunosorbent assay*)

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

IBR: rinotraqueíte infecciosa bovina (*infectious bovine rhinotracheitis*)

IBSP: Instituto Biológico de São Paulo

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IFA: imunofluorescência

IPB: balanopostite pustular infecciosa (*infectious pustular balanoposthitis*)

IPV: vulvovaginite pustular infecciosa (*infectious pustular vulvovaginitis*)

IR: repetição interna

Kb: kilobases

LTR: transcritos de herpesvírus relacionados à latência

mRNA: RNA mensageiro

MDBK: células renais de bovino (*Madin Darby Bovine Kidney*)

NGS: sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing*)

OIE: Organização Internacional de Epizootias

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PESAGRO: Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro

REA: análise por restrição enzimática

RNA: ácido ribonucleico

RS: Estado do Rio Grande do Sul (Brasil)

SN: Soroneutralização

TR: repetição terminal

UL: segmento único longo

US: segmento único curto

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 2.1 Ordem Herpesvirales..... | 16 |
| 2.1.1 Família Herpesviridae | 16 |
| 2.1.2 Subfamília Alphaherpesvirinae | 17 |
| 2.2 Herpesvírus bovino | 19 |
| 2.2.1 Subtipos de BoHV-1 e BoHV-5..... | 19 |
| 2.2.2 Estrutura do vírion..... | 20 |
| 2.2.3 Organização genômica | 21 |
| 2.2.4 Ciclo replicativo | 23 |
| 2.2.5 Epidemiologia | 25 |
| 2.2.6 Patogenia | 28 |
| 2.2.6.1 Encefalites | 29 |
| 2.2.6.2 Aborto | 30 |
| 2.2.7 Diagnóstico virológico | 31 |
| 2.2.7.1 Diagnóstico por detecção de ácidos nucleicos | 31 |
| 2.2.7.2 Diagnóstico sorológico..... | 32 |
| 2.2.8 Controle e prevenção..... | 32 |
| 3. OBJETIVOS | 34 |
| 3.1 Objetivos Gerais..... | 34 |
| 3.1.2 Objetivos Específicos..... | 34 |
| 4. CAPITULO 1. The complete genome sequence of bovine herpesvirus 5 subtype c.. | 35 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 52 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 53 |

1. INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovinos tipos 5 (BoHV-5) e 1 (BoHV-1) são membros da ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (DAVISON et al., 2009). O BoHV-1 tem ampla distribuição mundial, sendo associado a quadros de doença respiratória, abortos e outros problemas reprodutivos (ACKERMAN & ENGELS, 2006). O BoHV-5 é o principal agente associado à meningoencefalite em bovinos. As encefalites por BoHV-5 são raras no hemisfério norte (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010). Entretanto, são bastante comuns no hemisfério sul, particularmente no Brasil e na Argentina, onde estes vírus têm sido mais estudados (CARRILLO et al., 1983; SALVADOR et al., 1998; RISSI et al., 2007; CAMPOS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Até o presente é desconhecida a prevalência de infecções por BoHV-5, o que não pode ainda ser determinada em função de dois fatores: o alto nível de semelhança genética e antigênica entre BoHV-5 e BoHV-1; e a indução de anticorpos que apresentam reatividade cruzada entre estes dois vírus. Portanto, a diferenciação entre estes dois tipos de vírus e as respostas por eles induzidas requer testes específicos, geralmente não disponíveis em laboratório de diagnóstico de rotina. A diferenciação entre ambos os vírus é importante sobre vários aspectos, como para definir as prevalências tipo-específicas, o que poderá contribuir para melhorias na definição de possibilidades de alternativas de controle e/ou erradicação dessas infecções. Como exemplo, pode-se mencionar o tema das vacinas disponíveis para BoHV-1 e BoHV-5. Mundialmente, vacinas para controle de infecções por BoHV-1 são abundantes. Por outro lado, vacinas contendo antígenos de BoHV-5 são ainda em número reduzido no mercado. No entanto, a proteção cruzada induzida por vacinas para BoHV-1 não é necessariamente suficiente para controlar as infecções pelo BoHV-5 (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2006; CAMPOS et al., 2011).

As amostras de BoHV-5 são subdivididas em três subtipos, denominados a, b & c. Até o presente não foram realizados estudos visando identificar relações entre diferentes subtipos de BoHV-5 e patogenicidade. Da mesma forma, a prevalência e distribuição de infecções por BoHV-5 e seus subtipos permanece desconhecida. Uma particularidade em relação à distribuição geográfica de amostras de BoHV-5c é que as poucas amostras desse subtipo veem de uma região geográfica limitada, correspondente à área que compreende o Sul do Estado de Minas Gerais, Nordeste do Estado de São Paulo e Sul do Estado do Rio de Janeiro (IBSP & PESAGRO, registros de laboratório). Entretanto, o número de

amostras do subtipo c identificadas é ainda bastante reduzido, o que limita a profundidade de análises epidemiológicas. Diante disso, para que associações possam ser efetuadas com maior profundidade, a disponibilidade das sequências genômicas dos distintos subtipos é imprescindível. Até o presente, somente uma sequência genômica completa de BoHV-5a (amostra SV507/99; DELHON et al., 2003) foi publicada. No presente estudo é descrita a sequência completa do genoma de uma amostra de BoHV-5c. Este trabalho faz parte de um estudo que tem o objetivo determinar as sequências genômicas completas de subtipos virais, na busca da compreensão das diferenças entre as amostras e outros aspectos relacionados a biologia destes vírus. Além do sequenciamento do genoma completo da amostra P160/96, foram efetuadas análises e estudos comparativos com outros genomas de herpesvírus bovinos disponíveis em bancos de dados genômicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ordem *Herpesvirales*

A classificação e nomenclatura (taxonomia) dos herpesvírus é atualizada constantemente pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), comitê este que regulariza e organiza a classificação taxonômica dos vírus. A organização tem desenvolvido um esquema taxonômico universal para os vírus, por meio do Código de Classificação Viral. O comitê é formado e dirigido pela Divisão de Virologia da União Internacional de Sociedades Microbiológicas (UIMS).

Desta maneira, foi sugerida uma nova ordem para a prévia família *Herpesviridae* (Tabela 1) e outras duas novas famílias virais que também foram incluídas na nova ordem *Herpesvirales* (DAVISON et al., 2009). A ordem *Herpesvirales*, é constituída por 3 famílias virais, a família *Alloherpesviridae* que abrange vírus de anfíbios e peixes, a família *Herpesviridae* que compreende vírus de mamíferos, aves e répteis e a família *Malacoherpesviridae*, que apresenta os vírus de moluscos. A família *Herpesviridae* apresenta 3 subfamílias, que compreende as subfamílias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*, além de 19 gêneros, 88 espécies e 3 gêneros com classificação ainda não atribuída (DAVISON, 2010; ICTV, 2015).

2.1.1 Família *Herpesviridae*

A família *Herpesviridae* engloba vírus que estão entre os mais complexos vírus que podem causar doenças tanto em animais, quanto em seres humanos (DAVISON, 2002). A denominação da família é proveniente da palavra grega *Herpein*, que significa rastejar. A palavra está relacionada com às lesões provocadas pelos vírus dessa família (FRANCO et al., 2012).

A Família *Herpesviridae* é constituída por três subfamílias, *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (DAVISON et al., 2009). A subdivisão está fundada nas particularidades biológicas das espécies virais da família. As espécies da subfamília *Alphaherpesvirinae* foram classificadas a partir de uma série de hospedeiros variáveis. Os membros desta subfamília apresentam um ciclo replicativo parcialmente curto, normalmente não mais do que 24 horas (FRANCO et al., 2012).

Os alfa herpesvírus, quando observados *in vitro*, demonstram uma propagação rápida em pouco espaço de tempo em cultivos celulares, verificando também modificações morfológicas decorrentes da infecção, resultando na destruição eficaz das células infectadas. Além disso, possuem a habilidade de estabelecer infecções latentes em neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos (ROIZMAN & PELLETT, 2001; FRANCO et al., 2012).

2.1.2 Subfamília *Alphaherpesvirinae*

A subfamília *Alphaherpesvirinae* é composta pelos seguintes gêneros, *Iltovirus* (GaHV-1), *Mardivirus* (GaHV-2), *Scutavirus* (CheHV-5), *Simplexvirus* (HSV-1), *Varicellovirus* (VZV), 1 gênero ainda não atribuído e 38 espécies (ICTV, 2015). Subfamília *Alphaherpesvirinae* é a maior subfamília de herpesvírus. Estes vírus incluem uma ampla gama de hospedeiros que abrangem desde animais domésticos até humanos (FRANCO et al., 2012).

O processo de recombinação genética vem colaborando para a evolução durante um longo intervalo de tempo para os alfa herpesvírus. Dessa forma, há cerca de 200 milhões de anos houve uma divisão dos outros ramos das subfamílias, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (McGEOCH et al., 1995). Assim, também foi constatado que a taxa de evolução da sequência de proteínas dos herpesvírus, analisada anteriormente, apresentava-se mais elevada do que os genes nucleares dos mamíferos. Isto demonstra que as espécies da subfamília *Alphaherpesvirinae* são capazes evoluir mais aceleradamente do que seus hospedeiros (McGEOCH et al., 2000; FRANCO et al., 2012).

A subfamília *Alphaherpesvirinae* engloba uma grande quantidade de espécies, incluindo agentes que podem infectar e causar uma variedade de doenças relevantes. Em diversas espécies, pode-se citar o herpesvírus humano tipo 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2), o vírus da varicela zoster (VZV). Em aves o vírus da doença de Marek (MDV), em suínos, o vírus da pseudorraiva (PRV), os herpesvírus de bovinos dos tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5), os herpesvírus de equinos (EHV) e seus diferentes tipos (JURAK et al., 2011; BLOOM, 2016).

Tabela 1. Classificação taxônomica de alguns membros da ordem *Herpesvirales*

| Família | Subfamília | Genêro | Espécie | Abreviação |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------|
| <i>Herpesviridae</i> | <i>Alphaherpesvirinae</i> | <i>Simplexvirus</i> | Herpesvírus atelino 1 | AtHV 1 |
| | | | Herpesvírus bovino 2 | BoHV 2 |
| | | | Herpesvírus cercopitecino 2 | CeHV 2 |
| | | | Herpesvírus humano 1 | HHV 1 |
| | | | Herpesvírus humano 2 | HHV 2 |
| | | | Herpesvírus leporídeo 4 | LHV 4 |
| | | | Herpesvírus macacino 1 | McHV 1 |
| | | | Herpesvírus macropídae 1 | MaHV 1 |
| | | | Herpesvírus macropídae 2 | MaHV 2 |
| | | | Herpesvírus panino 3 | PaHV 3 |
| | | | Herpesvírus papiño 2 | PaHV 2 |
| | | | Herpesvírus Saimiriño 1 | SaHV 1 |
| | | | Herpesvírus bovino 1 | BoHV 1 |
| | | Herpesvírus bovino 5 | BoHV 5 | |
| | | Herpesvírus bubalino 1 | BuHV 1 | |
| | | Herpesvírus canino 1 | CaHV 1 | |
| | | Herpesvírus caprino 1 | CpHV 1 | |
| | | Herpesvírus cercopitecino 9 | CeHV 9 | |
| | | Herpesvírus cervídeo 1 | CvHV 1 | |
| | | Herpesvírus cervídeo 2 | CvHV 2 | |
| | | <i>Varicellovirus</i> | Herpesvírus equino 1 | EHV 1 |
| | | | Herpesvírus equino | EHV 3 |
| | | | Herpesvírus equino | EHV 4 |
| | | | Herpesvírus equino | EHV 8 |
| | | | Herpesvírus equino | EHV 9 |
| | | | Herpesvírus felino 1 | FeHV 1 |
| | | | Herpesvírus humano 3 | HHV 3 |
| | | | Herpesvírus focídeo | PhHV 1 |
| | | | Herpesvírus suíno | SuHV 1 |
| | | | Herpesvírus alcelafino 1 | AlHV 1 |
| | | <i>Macavirus</i> | Herpesvírus bovino 6 | BoHV 6 |
| | | | Herpesvírus caprino 2 | CpHV 2 |
| | | | Herpesvírus Hippotragino 1 | HiHV 1 |
| | Herpesvírus ovino 2 | | OvHV 2 | |
| | Herpesvírus suíno 3 | | OvHV 3 | |
| | Herpesvírus suíno 4 | | OvHV 4 | |
| | Herpesvírus suíno 5 | | OvHV 5 | |
| | Herpesvírus atelino 2 | | AtHV 2 | |
| | <i>Gammaherpesvirinae</i> | Herpesvírus atelino 3 | AtHV 3 | |
| | | Herpesvírus bovino 4 | BoHV 4 | |
| Herpesvírus criceto 2 | | CrHV 2 | | |
| <i>Rhadinovirus</i> | | Herpesvírus humano 8 | HHV 8 | |
| | | Herpesvírus macacino 5 | McHV 5 | |
| | | Herpesvírus murino 4 | MuHV 4 | |
| Herpesvírus murino 7 | | MuHV7 | | |
| Herpesvírus saimiriño 2 | | SaHV 2 | | |

Fonte: Adaptado de DAVISON, 2009. Herpesvírus de ruminantes em destaque.

2.2 Herpesvírus bovino

Os herpesvírus de bovinos são membros da ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, das subfamílias *Alphaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (DAVISON et al., 2009). A espécie bovina é hospedeira natural de vários membros da família *Herpesviridae*, onde até o presente foram identificados pelo menos cinco espécies virais: o herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1), que tem sido associado com doença respiratória, genital e abortos (D'OFFAY et al., 2013); o BoHV-2, que é o agente da mamilite herpética (OBANDO et al., 2010); o BoHV-4 está relacionado a distúrbios reprodutivos (GUR & DOGAN, 2010); o BoHV-5, que é o agente da encefalite herpética (DELHON et al., 2003); o BoHV-6 conhecido como herpesvírus linfotrópico bovino, reportado em casos reprodutivos, mas não está associado à doença específica até o momento (JIA et al., 2014). BoHV-1 e BoHV-5 são agentes etiológicos primários de doenças que causam perdas econômicas significantes para a bovinocultura (FAUQUET et al., 2004; CAMPOS et al., 2009; FINO et al., 2012; DUMMER et al., 2016).

2.2.1 Subtipos de BoHV-1 e BoHV-5

O BoHV-1 é o agente etiológico de uma variedade de síndromes clínicas, como a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostites e infecção neonatal (D'OFFAY et al., 2013). Conforme os quadros clínicos foram sendo estudados e mais amostras de vírus identificadas, procurou-se estabelecer associações entre as diferentes amostras de BoHV-1 e as doenças por elas causadas. Assim, o BoHV-1 foi dividido nos subtipos 1 (BoHV-1.1) e 2 (BoHV-1.2a e BoHV-1.2b), baseado nos perfis obtidos a partir da análise com enzimas de restrição ou reações antigênicas frente a anticorpos monoclonais (RIJSEWIJK et al., 1999; D'ARCE et al., 2002; SPILKI et al., 2004; VARELA et al., 2010). O BoHV-1.1 é associado a doenças respiratórias e anomalias reprodutivas. O BoHV-1.2 foi subdividido em BoHV-1.2a e BoHV-1.2b. O subtipo 1.2a já foi descrito associado à doença do trato genital e também a abortos e infecções respiratórias, sendo o subtipo mais isolado no Brasil, e o BoHV-1.2b tem sido associado com doença respiratória leve. Em vista disso, amostras do subtipo 2b são consideradas menos patogênicas do que as amostras do subtipo 1 (MILLER, 1991; FRANCO et al., 2012).

O BoHV-1 e BoHV-5 são muito semelhantes em vários aspectos biológicos. A diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5, é possível, embora seja realizada em poucos laboratórios especializados. A diferenciação na apresentação clínica foi o que chamou a atenção do primeiro estudo que sugeriu que as encefalites eram causadas por um vírus distinto na Austrália, o que após veio a ser mais profundamente investigado com a aplicação de diversas técnicas laboratoriais (FRANCO et al., 2012). Anteriormente, amostras de vírus atualmente conhecidas como BoHV-5 eram consideradas variantes neuropatogênicas de BoHV-1 e denominadas subtipo 3, ou BoHV-1.3. Posteriormente, as amostras denominadas BoHV-1.3, foram reclassificadas no tipo 5 com base nos achados clínicos em animais infectados e nas características genômicas e antigênicas (METZLER et al., 1986; ROIZMAN et al., 1992). Dessa maneira, amostras de BoHV-5 foram subdivididas em subtipos, denominados a, b & c (este último anteriormente denominado “não a, não b”), com base em perfis de restrição enzimática (D’ARCE et al., 2002). Embora exista subdivisão das amostras de BoHV-5, como a subtipificação ainda não é realizada rotineiramente em laboratórios de diagnóstico, não há informações a respeito de possíveis associações entre distintos subtipos de BoHV-5 e diferentes manifestações clínicas. Dentre o limitado número de amostras de BoHV-5 já subtipificadas, a maioria pertence ao subtipo a (FRANCO et al., 2012).

2.2.2 Estrutura do vírion

Os herpesvírus bovinos, como outros membros da família *Herpesviridae* possuem uma partícula viral formada basicamente por quatro estruturas, núcleo, capsídeo, tegumento e envelope (Figura 1). Caracterizam-se por apresentar material genético de fita dupla linear de DNA, envolto por um capsídeo icosaédrico com aproximadamente 100 a 110 nm de diâmetro, contendo 162 capsômeros (FRANCO et al., 2012). Entre o capsídeo e o envelope viral está o tegumento, composto por um material amorfo e assimétrico. O tegumento possui pelo menos oito tipos de proteínas codificadas pelo genoma viral, envolvidas na replicação e ativação da transcrição de genes virais (KNIPE et al., 2001; METTENLEITER, 2003; METTENLEITER et al., 2009). Além disso, o nucleocapsídeo encontra-se circundado por uma camada lipídica, denominada envelope que possui cerca de 10 glicoproteínas, algumas com papel fundamental nas interações entre vírions e as células hospedeiras (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996).

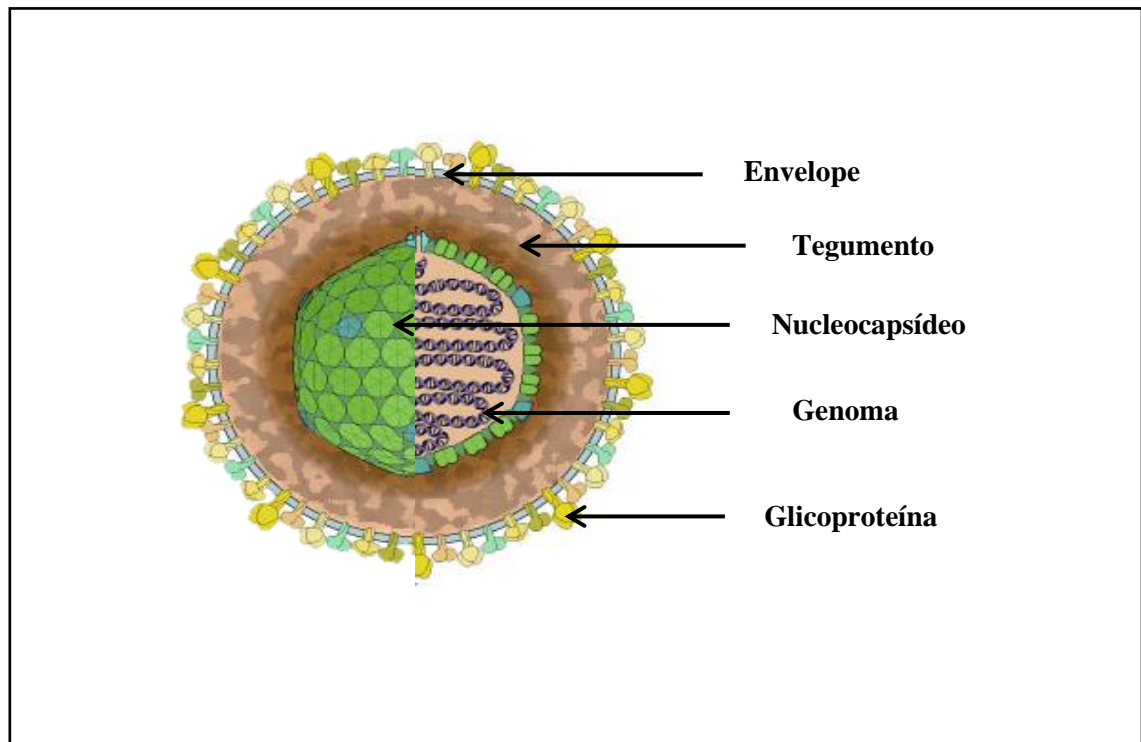


Figura 1. Representação esquemática da estrutura de um vírion da família *Herpesviridae*. As setas indicam os principais componentes do vírion: envelope, tegumento, nucleocapsídeo, genoma e glicoproteína. **Fonte:** Adaptado de ViralZone Swiss Institute of Bioinformatics, 2017.

2.2.3 Organização genômica

Os vírions da família *Herpesviridae* são constituídos por moléculas de DNA lineares de fita dupla. O genoma dos herpesvírus possui entre 120 e 250 mil pares de bases (pb), dependendo da espécie viral, podendo variar com relação à extensão, composição (conteúdo de GC-AT) e presença de sequências repetidas. A composição de bases do DNA dos herpesvírus varia de 31% a 75% de guanina e citosina (G+C) em relação ao total de nucleotídeos (ROIZMAN & PELLET, 2001).

Os genomas dos herpesvírus são classificados em seis classes (A a F) com base no arranjo do genoma (ROIZMAN & KNIPE, 2001). O BoHV-1 e BoHV-5 possuem um genoma com arranjo tipo D, que consiste de uma sequência única longa (UL) e uma sequência única curta (US). A sequência US é flanqueada por duas sequências repetidas e invertidas, sendo uma interna (IR) e outra terminal (TR), respectivamente (Figura 2) (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996).

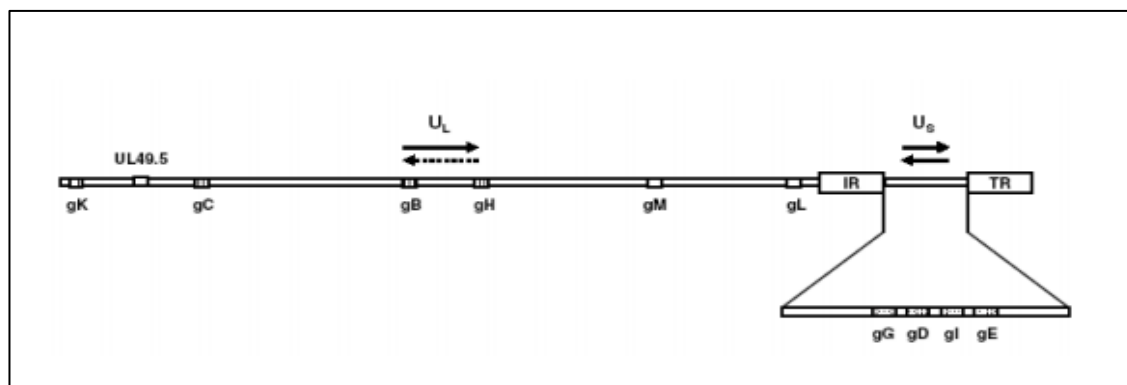


Figura 2. Organização genômica de um alfaherpesvírus de ruminante. O genoma se constitui de uma fita dupla linear de DNA, dividida em uma região longa (UL) e uma região curta (US) flanqueada por duas sequências repetidas invertidas, denominadas repetições internas (IR) e terminal (TR). O genoma inclui dez genes que codificam diferentes glicoproteínas: seis estão localizadas no segmento UL e quatro no segmento US. O segmento US pode apresentar duas possíveis orientações (demonstrado pelas flechas) e o segmento UL apresenta-se predominantemente em uma única orientação. **Fonte:** THIRY et al., 2006.

BoHV-1 e BoHV-5 compartilham uma similaridade de 77% em nível de nucleotídeo. A sequência nucleotídica do BoHV-1 contém 134.896 pb e 72,4% de conteúdo GC. Já a sequência genômica do BoHV-5 apresenta 137.821 pb de comprimento, com 74,8% de GC (DELHON et al., 2003; D'OFFAY et al., 2013). Estes vírus demonstram uma média de 82% de identidade em nível de aminoácidos (aa) entre diferentes proteínas. As proteínas mais parecidas apresentam $\geq 95\%$ de identidade de aa e desempenham funções na replicação do DNA viral e no processamento de proteínas do vírion. Com relação às sequências codificantes (CDS) menos conservadas entre BoHV-1 e 5, elas possuem $\leq 75\%$ de identidade de aa e estão relacionadas no controle do ciclo do vírus, na interação vírus-célula e na neuropatogênese viral (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010).

O genoma de BoHV-5 codifica 70 genes, dos quais todos os seus homólogos estão presentes no BoHV-1. Entretanto, o BoHV-5 não possui o homólogo de *UL0.5* presente no BoHV-1. Além disso, a glicoproteína N (gN) codificada pelo gene *UL49.5* de BoHV-1 é vista como uma proteína não verdadeira, por não ser glicosilada. A respeito disso, não existem informações relacionadas à esta glicoproteína em BoHV-5 (LIANG et al., 1996).

A região UL (104.053 pb) do BoHV-5 contém 60 genes que iniciam a partir do *Circ* e terminam em *BICP0*. A região US (9.548 pb) apresenta oito genes que vão desde o *US1.67* a *US9*. As regiões IR e TR (12.110 pb) contêm uma cópia de dois genes reguladores, denominados *BICP4* e *BICP22* (DELHON et al., 2003). O BoHV-5 contém pelo menos 10 glicoproteínas fundamentais para as interações entre vírions e as células

hospedeiras. Destas, seis estão localizadas na região UL: gK (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10) e gL (UL1). As glicoproteínas gG (US4), gD (US6), gI (US7) e gE (US8) encontram-se situadas na região US. Algumas destas glicoproteínas são essenciais à multiplicação viral (gB, gD, gH, gK, gL), enquanto que outras seriam dispensáveis (gC, gE, gG, gI, gM), apesar de exercer importantes funções de interação com a célula hospedeira. As glicoproteínas B (gB), H (gH) e L (gL) são estruturalmente conservadas entre todos os herpesvírus (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). Diferentemente, a glicoproteína C (gC), por ser menos conservada, tem sido utilizada no desenvolvimento de técnicas voltadas ao diagnóstico diferencial, assim como na análise filogenética de novos isolados de herpesvírus (RIJSEWIJK et al., 1999; SPILKI et al., 2004; SILVA et al., 2007b; ESTEVES et al., 2008; TRAESEL et al., 2015).

2.2.4 Ciclo replicativo

A entrada da partícula viral na célula ocorre em regiões de penetração do vírus no hospedeiro, principalmente em tecidos epiteliais. O ciclo replicativo começa pelo contato das partículas virais com os receptores de membrana plasmática das células hospedeiras. Os vírions podem utilizar os açúcares presentes nas proteínas glicosiladas celulares (proteoglicanos), os glicosaminoglicanos (GAGs), como o sulfato de heparan ou o sulfato de condroitina como receptor celular, presente na superfície das células alvo (FRANCO et al., 2012). A interação entre a partícula viral e a porção do receptor de superfície celular, é mediada através da glicoproteína C (gC) (CHOWDHURY, 1997; METTENLEITER, 2002; AZAB et al., 2010; FRANCO et al., 2012).

A etapa de adsorção é seguida com a ligação de outra glicoproteína (gD) a outros correceptores da membrana plasmática. Até o momento existem três receptores de superfície das células para gD, a nectina-1 (HveC), o mediador de entrada de herpesvírus (HVEM) e 3-O-sulfotransferases (GERAGHTY et al., 1998; STILES et al., 2008). Após a interação com estes receptores celulares ocorre a fusão do envelope viral com a membrana plasmática, atividade que se realiza na superfície celular (CONNOLLY et al., 2011). A fusão do envelope na membrana plasmática acontece com a participação das glicoproteínas, gD, gH-gL e gB (GERAGHTY et al., 2000; SPEAR, 2004; ATANASIU et al., 2010; FAN et al., 2015).

Posteriormente à fusão, várias proteínas do tegumento se separam do nucleocapsídeo e permanecem no citoplasma; proteína de tegumento VP22 (UL49),

proteína de tegumento VP16 (UL48), proteína de tegumento VP13/14 (UL47) e proteína do tegumento (UL11), enquanto outras proteínas são transportadas juntamente com o nucleocapsídeo ao longo dos microtúbulos até o núcleo; proteína do tegumento (UL37), proteína do tegumento (UL36) e proteína quinase (US3). No núcleo, o nucleocapsídeo liga-se no poro nuclear e libera o genoma viral no interior do núcleo celular (KELLY et al., 2009; GUO et al., 2010).

A transcrição do genoma viral se inicia logo após a sua penetração no núcleo. Os primeiros genes a serem transcritos são os genes alfa (*immediate early* ou de transcrição imediata). O produto destes genes tem como principal função, estimular a transcrição dos genes beta. Desse modo, os genes beta (*early* ou iniciais), estão envolvidos na síntese de nucleotídeos e replicação do genoma. Após a replicação do genoma, os genes gama (*late* ou tardios), codificam principalmente proteínas estruturais, que são utilizadas na construção das partículas virais (PELLETT et al., 1985; ROIZMAN & KNIPE, 2001; ROIZMAN et al., 2007). Concomitantemente à codificação das proteínas virais, ocorre a inibição da transcrição de genes, do processamento e transporte de mRNAs e síntese de proteínas da célula hospedeira. Estes acontecimentos são provocados por proteínas virais com propósito de modificar a maquinaria celular para o processamento, transporte de mRNA virais e síntese de proteínas virais (FRANCO et al., 2012).

O processo de montagem do vírus inicia no núcleo celular, onde a montagem do capsídeo é finalizada pela inclusão do DNA viral no seu interior. Após o empacotamento do genoma, os nucleocapsídeos podem realizar o brotamento através da membrana nuclear (METTENLEITER, 2016). Os nucleocapsídeos no citoplasma são diretamente encaminhados ao complexo de Golgi, onde adquirem o envelope por brotamento. As vesículas provenientes do aparelho de Golgi, contêm os vírions envelopados e os transportam até a superfície celular para que sejam liberados através da membrana plasmática celular (METTENLEITER, 2002; METTENLEITER, 2004; CAMPADELLI-FIUME, 2007; BROWN & NEWCOMB, 2011).

O ciclo replicativo dos herpesvírus em células permissivas é completado em torno de 18 a 20 horas. O ciclo replicativo dos alfa herpesvírus é demonstrado na figura 3. A célula hospedeira infectada com as partículas virais não permanece viva à infecção, devido às alterações estruturais e bioquímicas que acontecem em decorrência da replicação viral (FRANCO et al., 2012).

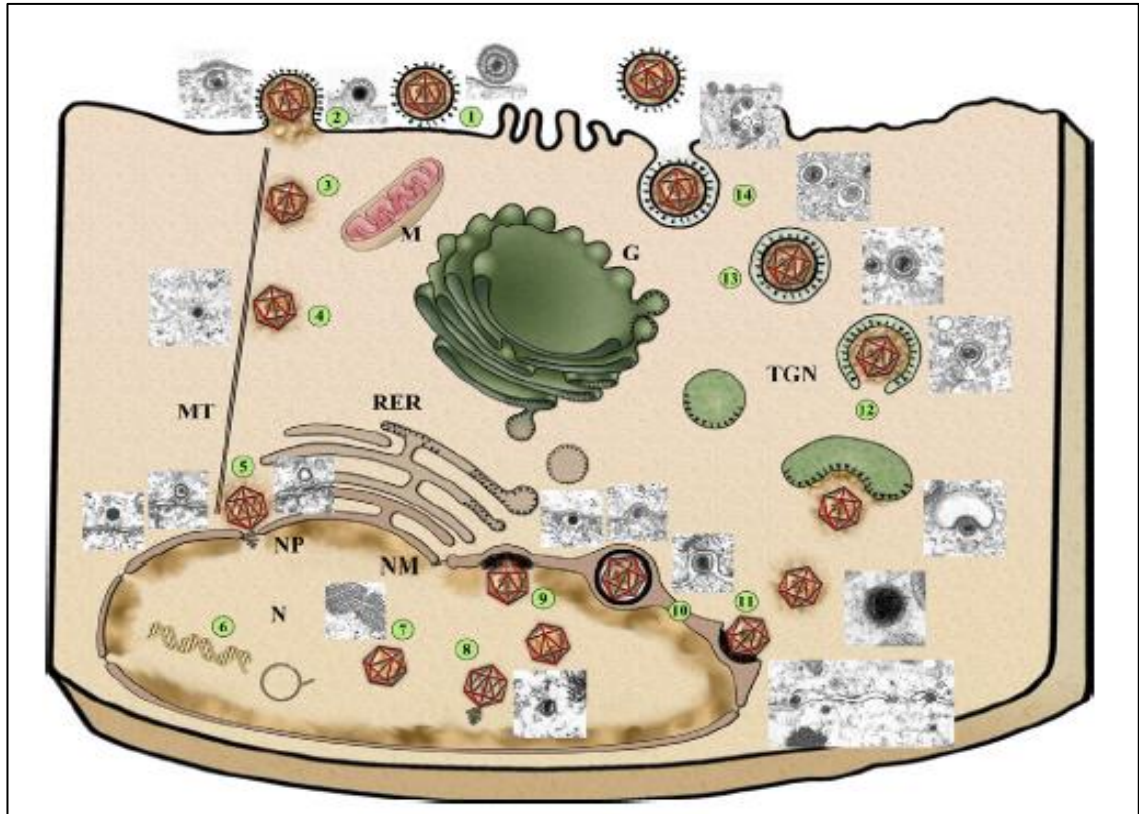


Figura 3. Representação das etapas do ciclo de replicação de alfa herpesvírus. Após a ligação (1) e a penetração (2), os capsídeos são transportados até o núcleo (N) (3) pela interação com os microtúbulos (MT) (4), ligando no poro nuclear (NP) (5) e liberando o genoma viral no interior do núcleo. Segue a transcrição dos genes virais e a replicação do genoma (6). Os genomas virais replicados concatêmicos são clivados e empacotados (8) no capsídeo pré-formado (7), deixam o núcleo por brotamento pela membrana nuclear (NM) (9) seguido pela fusão do envelope dos vírions no espaço perinuclear (10) com a membrana nuclear (11). A montagem final ocorre no citoplasma pelo envelopamento do capsídeo através de brotação em vesículas da rede trans-Golgi (TGN) (12) com as glicoproteínas virais (pontos pretos), resultando em um vírion envolto por uma vesícula celular. Após o transporte para a superfície celular (13), membranas de vesículas e plasmática se fundem, liberando um vírion, envolto da célula (14). Retículo endoplasmático rugoso (RER); mitocôndria (M); aparelho de Golgi (G). **Fonte:** Adaptado de HELLBERG et al., 2016.

2.2.5 Epidemiologia

Em razão da ampla semelhança em vários aspectos biológicos, genéticos e moleculares existentes entre o BoHV-5 e BoHV-1, a prevalência e distribuição da infecção pelo BoHV-5 é mundialmente desconhecida (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010; FRANCO et al., 2012; MARIN et al., 2016). Os surtos de doença associada ao BoHV-5 são esporádicos e restritos em sua distribuição geográfica, sendo detectados principalmente em países do Hemisfério Sul (ROEHE et al., 1997; RISSI et al., 2008; DIALLO et al., 2010; MAIDANA et al., 2011). Especialmente na Argentina e no Brasil,

onde o número de amostras isoladas tem sido significativo (PEREZ et al., 2003; CLAUS et al., 2007; MAIDANA et al., 2011; MEGID et al., 2015). Por outro lado, poucos foram os casos de meningoencefalite por BoHV-5 em países do Hemisfério Norte, Europa e Austrália (FRENCH, 1962; MORETTI et al., 1964; BARTHA et al., 1969; D'OFFAY et al., 1993). As causas para esta distribuição particular ainda são indeterminadas (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010). Isto, possivelmente pode estar relacionado aos amplos esquemas de imunização em regiões onde o BoHV-1 encontra-se endêmico, vacinação está que proporcionaria proteção cruzada contra o BoHV-5 (THIRY et al., 2006; DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2006; ANZILIERO et al., 2011).

O primeiro relato de isolamento de BoHV-5 no Brasil foi publicado em 1989, a partir de um surto de meningoencefalite no Estado do Rio Grande do Sul (RIET-CORREA et al., 1989; SALVADOR et al., 1998). A partir de então, tem se investigado a presença desse vírus no rebanho de bovinos do país, através de estudos desenvolvidos em vários estados brasileiros (Tabela 2). No Brasil, a maioria dos isolados estudados pertence ao subtipo a (D'ARCE et al., 2002; FRANCO et al., 2012). A cepa de referência A663 de BoHV-5 estudada na Argentina pertence ao subtipo b, onde foi isolada em 1982 e tem sido descrita desde então (MAIDANA et al., 2011). Contudo, os isolados examinados até o momento podem não ser representantes reais do BoHV-5 mais prevalente na Argentina, visto que a análise de isolados de BoHV-5 argentinos revelou que o subtipo "a" foi o mais prevalente nesse país (LADELFA et al., 2011).

As poucas amostras de subtipo c isoladas têm uma distribuição geográfica incomum, pois parecem estar concentradas na região Sudeste do Brasil, que compreende o Estado do Rio de Janeiro (RJ), Sul de Minas Gerais (MG), e Nordeste de São Paulo (SP). Todas as amostras até o presente obtidas desse subtipo provêm dessas regiões. Amostras do subtipo c foram também examinadas em sua reatividade frente a anticorpos monoclonais e foi observado que estas apresentam um perfil distinto das demais amostras de BoHV-5 (SOUZA et al., 2002). Apesar da divisão dos isolados de BoHV-5 em subtipos virais, até o momento poucas amostras foram subtipificadas. Em vista disso, ainda não existe informações sobre possíveis associações dos diferentes subtipos de BoHV-5 identificados com distintas manifestações clínicas dos animais.

Existem relatos da ocorrência de surtos de doença associada a infecção pelo BoHV-5 em diversos Estados do Brasil, incluindo o Rio Grande do Sul (RIET-CORRÊA et al., 1989; WEIBLEN et al., 1989; ROEHE et al., 1997; SALVADOR et al., 1998;), Mato Grosso (COLODEL et al., 2002), Mato Grosso do Sul, São Paulo (SALVADOR et

al., 1998), Paraná (CLAUS et al., 2000), Pará (RIET-CORREA et al., 2006), Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2002) e Minas Gerais (GOMES et al., 2002). As informações sobre a prevalência e distribuição das infecções pelo BoHV-5 ainda são poucas e apenas estimativas, fato este devido a extensa reatividade sorológica cruzada com o BoHV-1 e a ausência de testes sorológicos capazes de discriminar entre infecções causadas por BoHV-1 e/ou BoHV-5 (HOLZ et al., 2010; ANZILIERO et al., 2011; FRANCO et al., 2012). Dessa maneira, alguns estudos elaborados até o momento sobre este assunto foram realizados com suporte em informações obtidas através da detecção de genomas virais em amostras biológicas (CAMPOS et al., 2009; FRANCO et al., 2012). Estes estudos descritos em menores proporções, sugerem que o BoHV-5 seja amplamente disseminado nos rebanhos de bovinos do Brasil. E provavelmente, os dados epidemiológicos obtidos até o momento não refletem a real prevalência da infecção causada pelo BoHV-5 (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010; FRANCO et al., 2012). Além disso, alguns autores sugerem que o mais provável da origem desse fenômeno de prevalência seja a criação de búfalos (*Bubalus bubalis*) em proximidade aos rebanhos de bovinos (CAMPOS et al., 2017).

Tabela 2. Estudos de prevalência das infecções pelo BoHV-5 em diferentes regiões do Brasil

| Região | Estado | N ^o ^a | Método | Prevalência | Referência |
|---|---|-----------------------------|-----------------------|-------------|---------------------------|
| Nordeste | Paraíba | 139 | Histológico | 2,70% | Galiza et al., 2010 |
| | Brasília | 68 | <i>nested</i> -PCR | 30,90% | Figueiredo, 2009 |
| | Goiás | 18 | PCR | 28,00% | Silva, 2014 |
| Centro-oeste | Mato Grosso | 76 | PCR | 36,80% | Arruda, 2010 |
| | Mato Grosso do Sul | 588 | Histológico | 4,31% | Ribas et al., 2013 |
| Centro sul do Brasil, Argentina e Uruguai | Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo | 40 | <i>nested</i> -PCR | 60,00% | Silva et al., 2007 |
| Sudeste | Minas Gerais | 22 | <i>nested</i> -PCR | 22,70% | Gomes et al., 2002 |
| | | 65 | <i>multiplex</i> -PCR | 15,40% | Fonseca et al., 2011 |
| | São Paulo | 20 | PCR | 75,00% | Ferrari et al., 2007 |
| | Paraná | 400 | PCR | 9,75% | Oliveira et al., 2015 |
| Sul | Rio Grande do Sul | 147 | Histológico | 4,59% | Sanches et al., 2000 |
| | | 22 | PCR | 31,80% | Rissi et al., 2008 |
| | | 200 | <i>nested</i> -PCR | 93,10% | Campos et al., 2009 |
| | | 101 | <i>nested</i> -PCR | 21,80% | Kunert Filho et al., 2013 |

^aNúmero de amostras/casos

2.2.6 Patogenia

A maioria das infecções por BoHV-5 provavelmente ocorrem de forma subclínica ou assintomática (TEIXEIRA et al., 1998; CAMPOS et al., 2009; ISERNHAGEN et al., 2011). A infecção causada pelo BoHV-5 pode ser transmitida pelo contato direto e indireto entre animais. Este vírus penetra pelo trato respiratório superior e replica nas células epiteliais da mucosa nasal provocando a lise dessas células. Assim, surgem os primeiros sinais clínicos, como a presença de secreção nasal (VOGEL et al., 2003; DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010). Nesta fase inicial da infecção, títulos virais elevados são produzidos e eliminados nas secreções, facilitando a transmissão viral entre os animais (WYLER et al., 1989, PATEL & DIDLICK, 2008). Após a replicação primária, o vírus invade os neurônios sensoriais regionais e estabelece a infecção latente.

Na infecção latente, o genoma do vírus mantém-se inativo em células neuronais do organismo do animal, sem multiplicar-se, não resultando em progênie viral infecciosa (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) e gânglio sacrais (quando a infecção ocorre por via genital) (ROIZMAN & PELLET, 2001). O estabelecimento da infecção latente ocorre pelo transporte dos nucleocapsídeos virais aos corpos neuronais dos gânglios sensoriais e autonômicos, após a replicação primária nas mucosas do hospedeiro (FRANCO et al., 2012). No decorrer da latência, a expressão dos genes virais é quase que totalmente extinta, mantendo-se restrita somente à produção de pequenos transcritos, denominados transcritos relacionado a latência (LTR) (WORKMAN et al., 2011). Os hospedeiros latentemente infectados permanecem portadores ao longo de toda sua vida, podendo eventualmente ocorrer episódios de reativação (MUYLKENS et al., 2007; JONES & CHOWDHURY, 2008). Isto pode acontecer em resposta a estímulos naturais como o estresse, parto, desmame e transporte ou induzidos pelo tratamento com corticosteroides; basicamente fatores relacionados à imunossupressão. A reativação é um dos fatores responsáveis pela perpetuação e transmissão do vírus a hospedeiros suscetíveis (TIKOO et al., 1995; MEYER et al., 2001; CARON et al., 2002). Na fase de reativação, há uma redução da expressão de LTR e consequente aumento da expressão de outros genes virais (MUYLKENS et al., 2007; JONES & CHOWDHURY, 2008). Os vírions produzidos pela replicação produtiva nos sítios de latência: gânglio trigêmeo ou sacral, durante a reativação são transportados pelas mesmas vias de volta aos sítios de infecção primária

(via respiratória ou genital). Assim, o hospedeiro volta a disseminar e transmitir o vírus, o que pode ocasionalmente ser acompanhado de sinais clínicos e lesões nos locais de replicação (THOMISHIMA & ENQUIST, 2001). A ocorrência de sinais clínicos associada à reativação é denominada recorrência ou recrudescência, geralmente caracterizada por sinais clínicos mais brandos do que aqueles resultantes da infecção aguda (FRANCO et al., 2012).

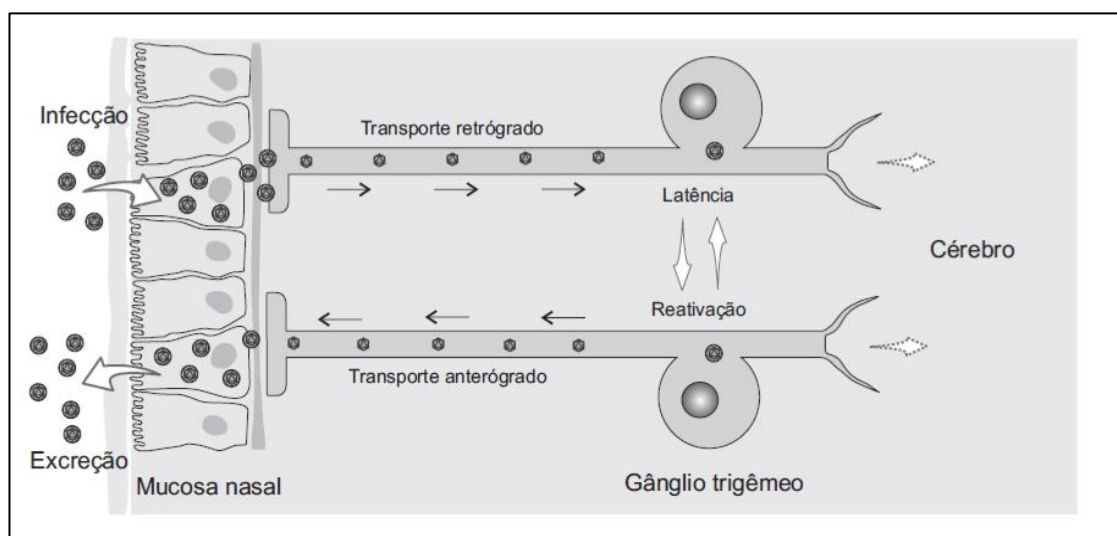


Figura 4. Patogenia da infecção latente dos alfaherpesvírus. Após a replicação primária, os nucleocapsídeos são transportados até os corpos neuronais localizados nos gânglios sensoriais e autonômicos. Nestes neurônios, o vírus replica produtivamente ou estabelece infecção latente. A infecção latente 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.

2.2.6.1 Encefalites

O BoHV-5 é considerado o principal agente associado à encefalite ou meningoencefalite herpética bovina, doença geralmente fatal que afeta principalmente animais jovens (SALVADOR et al., 1998; DELHON et al., 2003). O BoHV-5 demonstra ter um caráter de neuroinvasividade, propriedade que confere ao vírus a capacidade de penetrar, replicar e disseminar-se no SNC (CADORE et al., 2011; MACHADO et al., 2013). Além disso, o BoHV-5 também mostra ser neurovirulento, ou seja, apresenta a característica de causar lesões no SNC e com isso provocando sinais neurológicos (MAYER et al., 2006; DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010). Amostras de BoHV-5

apresentam diferentes graus de intensidade de neuroinvasividade e neurovurulência (CARON et al., 2002; CHOWDHURY et al., 2006; ISERNHAGEN et al., 2011).

No caso do BoHV-5, a reativação da infecção latente pode ser acompanhada do aparecimento de sinais neurológicos (CARON et al., 2002; FRANCO et al., 2012; SILVESTRO & BRATANICH, 2016). Para causar encefalite, o vírus precisa replicar no gânglio trigêmeo e, após, ser transportado para o encéfalo alcançando os neurônios de segunda ordem nos núcleos da ponte e do bulbo. A partir desses locais o vírus distribui-se ao cerebelo e tálamo, sendo capaz de atingir o córtex cerebral (PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003). O BoHV-5 pode disseminar-se de maneira heterogênea pelo encéfalo, provocando infecção disseminada ou local, como o bulbo, a ponte, o mesencéfalo, o córtex olfatório e frontal (VOGEL et al., 2003; DEZENGRINI et al., 2009; SILVA et al., 2010). Estudos sobre a infecção pelo BoHV-5, indicam o sistema olfatório como a principal via de acesso ao cérebro (CHOWDHURY et al., 2002; RISSI et al., 2008). No entanto, outras vias nervosas ligadas ao gânglio trigêmeo também podem ser utilizadas pelo vírus, porém de forma menos eficiente quando comparada com a via olfatória (BELTRÃO et al., 2000; DIEL et al., 2005; DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010).

O BoHV-5 pode ser reativado e re-excretado sem sinais clínicos ou pode ocorrer o desenvolvimento de manifestações clínicas de encefalite semelhantes às observadas durante a infecção aguda em bovinos (PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003; ISERNHAGEN et al., 2011). Os sinais neurológicos podem variar entre moderados a passageiros ou progressivos a fatais. Estes sinais clínicos podem variar conforme os locais do cérebro afetado. Com relação ao BoHV-5, em certas ocasiões há somente uma depressão profunda observada como manifestação clínica. Os sinais neurológicos podem ser andar cambaleante, bruxismo, protusão da língua, salivação, flexionamento do pescoço, opistótomo, cegueira, pressionamento da cabeça contra anteparos, ataxia, decúbito e convulsão (FRANCO et al., 2012; MEGID et al., 2015). Dentre os animais que apresentam sinais neurológicos a maioria progride ao óbito. A principal alteração histológica examinada é a encefalite não supurativa no córtex cerebral (PEREZ et al., 2002; RISSI et al., 2008; ISERNHAGEN et al., 2011).

2.2.6.2 Aborto

O BoHV-5 pode desempenhar importante papel em distúrbios reprodutivos e ser responsável por significativas perdas de produção (KIRKLAND et al., 2009; ASLAN et

al., 2015). Este vírus já foi isolado de várias condições clínicas, incluindo distúrbios reprodutivos, respiratórios, assim como de fetos abortados de bovinos (SCHUDEL et al., 1986; HEINLEIN et al., 1993; SALVADOR et al., 1998; ESTEVES et al., 2003; KIRKLAND et al. 2009; FAVIER et al., 2012). Os casos de aborto vêm sendo relatado em rebanhos acometidos por surtos de doença neurológica causada pela infecção de BoHV-5 (FRANCO et al., 2012). Outro estudo identificou a presença de BoHV-5 no sistema nervoso central (SNC) de fetos abortados (MARIN et al., 2013). No entanto, a detecção de BoHV-5 no SNC não comprova que ele tenha sido o responsável pelo aborto, mas sugere a sua participação neste desfecho (SHARIFZADEH et al., 2015). Além disso, o BoHV-5 também tem sido recuperado de sêmen de touros (GOMES et al., 2003; DIALLO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; SHARIFZADEH et al., 2015).

2.2.7 Diagnóstico virológico

O diagnóstico virológico da infecção pelo BoHV-5 pode ser realizado através do isolamento viral, da identificação de ácidos nucleicos virais e testes sorológicos. Para tanto, podem ser utilizadas no diagnóstico virológico amostras de cérebro, secreções nasais, sêmen e soro. O isolamento viral em cultivos celulares vem sendo o método tradicional de diagnóstico de BoHV-5 (HALFEN & VIDOR, 1998; DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010), seguido da confirmação da identidade do BoHV-5, por técnica de imunofluorescência (IFA) ou imunoperoxidase (IPX) (ROEHE et al., 1997; FRANCO et al., 2012).

2.2.7.1 Diagnóstico por detecção de ácidos nucleicos

A identificação de genomas ou fragmentos genômicos de BoHV-5 tem sido realizada através de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, por métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (ASHBAUGH et al., 1997; FLORES & CARGNELUTTI, 2012; MARIN et al., 2016). As técnicas moleculares podem ser utilizadas para detectar ácidos nucleicos virais em amostras de cérebro, secreções respiratórias e genitais. Para a identificação e diferenciação de BoHV-5 do BoHV-1, estão disponíveis várias técnicas, como a análise de enzimas de restrição (REA) (D'ARCE et al., 2002), imunoenaios utilizando anticorpos monoclonais (SOUZA et al., 2002), PCR seguida por REA (MAIDANA et al., 2013), *nested*-PCR (OLIVEIRA et al., 2011), PCR

multiplex (DIALLO et al., 2011) e método de detecção de BoHV-5 por PCR em tempo real com análise de alta resolução (MARIN et al., 2016).

A PCR seguida do sequenciamento do fragmento amplificado é fundamental para a identificação e diferenciação de BoHV-5. O sequenciamento proporciona identificar a sequência dos nucleotídeos no fragmento amplificado para subsequente comparação e análise da similaridade com outras sequências depositadas em bancos de dados (GenBank). Em função disso, o sequenciamento do amplicon é importante para identificação de BoHV-5. O primeiro método de sequenciamento de DNA foi reportado em 1977 (SANGER et al., 1977). A partir disso, novos equipamentos de sequenciamento foram desenvolvidos como o sequenciador automático de DNA e de eletroforese capilar (SMITH et al., 1986; EDWARDS et al., 1990). Posteriormente esta tecnologia foi aperfeiçoada surgindo o *Next Generation Sequencing* (NGS) (MARDIS, 2008; METZKER, 2010; VAN DIJK et al., 2014).

2.2.7.2 Diagnóstico sorológico

O diagnóstico sorológico de BoHV-5 é geralmente realizado através de testes de soroneutralização (SN) e ensaios imunoenzimáticos (*enzyme linked immunosorbent assay*) (HOLZ et al., 2010; DUMMER et al., 2016). Para isso, o material enviado para o diagnóstico sorológico são amostras pareadas de soro dos bovinos. Assim, é possível realizar a titulação de anticorpos de amostras dos bovinos, sendo que o aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos é sugestivo da infecção aguda (FRANCO et al., 2012). O teste de SN é amplamente utilizado, considerado padrão para detecção de anticorpos específicos para BoHV-5 ou BoHV-1 (TAKIUCHI et al., 2001; KRAMPS et al., 2004; HOLZ et al., 2010). O ensaio imunoenzimático do tipo ELISA é outro teste sorológico muito utilizado e considerado sensível, de relativa facilidade e rapidez de execução (DUMMER et al., 2016). No entanto, ambos os testes de SN e ELISA não conseguem diferenciar os anticorpos induzidos pelo BoHV-5 ou BoHV-1 (ROEHE et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2001; VARELA et al., 2010; FRANCO et al., 2012).

2.2.8 Controle e prevenção

As medidas de controle e prevenção são essenciais para reduzir a disseminação das infecções por herpesvírus de bovino e conseqüentemente perdas de produtividade dos

rebanhos de bovinos. Em virtude da inexistência de tratamento para o BoHV-5, o número de bovinos acometidos que se recupera de um surto é pequeno (GEORGE, 1991; RISSI et al., 2006). Além disso, o BoHV-5 e BoHV-1 são semelhantes em vários aspectos biológicos. Em função disso, as medidas preventivas adotadas para o BoHV-5 são basicamente as mesmas recomendadas para o BoHV-1. Assim, a primeira medida é analisar se a infecção está presente em rebanhos por meio de testes sorológicos periódicos. Outra medida é o teste de sêmen e reprodutores para identificar possíveis infecções (DEL FAVA et al., 2003; FRANCO et al., 2012). Com relação à vacinação, de modo geral, pode ser efetuada principalmente em rebanhos de bovinos com confirmação de infecção por herpesvírus de bovinos (FRANCO et al., 2012). Assim, a vacinação constante dos rebanhos pode diminuir a disseminação de vírus, sinais clínicos e prováveis perdas econômicas ligadas a infecção por herpesvírus de bovinos (ACKERMANN et al., 1990; OSÓRIO, 1998; DUMMER et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- Caracterizar o genoma completo de herpesvírus bovino 5 subtipo c (BoHV-5c).

3.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a sequência genômica completa de BoHV-5 subtipo c;
- Comparar o genoma recuperado de BoHV-5 subtipo c com o genoma de herpesvírus bovino 5 subtipo a (BoHV-5a) e 1 (BoHV-1) já caracterizados;
- Analisar o genoma recuperado e identificar regiões que possibilitem determinar as diferenças entre os subtipos de BoHV-5.

4. CAPÍTULO 1

The Complete Genome Sequence of bovine herpesvirus 5 subtype c

Willian Pinto Paim^{1,2}, Camila Mengue Scheffer^{1,2}, Samuel Paulo Cibulski^{1,2}, Ana Paula Mutterle Varela^{1,2}, Fabrício Souza Campos¹, Diane Alves de Lima^{1,2}, Márcia Regina Loiko^{1,2}, Fabiana Quoos Mayer², Ana Cláudia Franco¹, Phyllis Catharina Romijn³, Fernando Rosado Spilki⁴, Paulo Michel Roehé^{1,*}

¹Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas de Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

²FEPAGRO Saúde Animal, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Laboratório de Virologia, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

³Centro Estadual de Pesquisa em Saúde Animal - PESAGRO, Laboratório de Virologia, Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

⁴Instituto de Ciências da Saúde, Universidade de Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 3655.

E-mail address: proehe@gmail.com

Artigo em fase de conclusão para ser submetido na forma de artigo científico ao periódico Virus Genes

Abstract

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is a member of the subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus* in the family *Herpesviridae*. Three subtypes of BoHV-5 are recognized: BoHV-5a, b, and c. To date, only one BoHV-5a genome has been fully sequenced. Here, the complete genomic sequence of BoHV-5c strain P160/96 is reported. The virus was isolated from a bovine with encephalitis in the state of Rio de Janeiro (RJ). The complete sequence of the viral genome was recovered by high throughput sequencing. The P160/96 genome is a linear double-stranded DNA molecule, 137,740 bp in length, with a GC content of 74.7%. The genomic structure and organization corresponds to a typical herpesvirus D-type genome. It comprises a single long region (UL) of 104,012 bp and a single short segment (US) of 9,546 bp. The US segment is flanked by two inverted repeats (IR and TR) of 12,089 bp each. The full genome has a 99.3% nucleotide similarity to the BoHV-5a reference strain SV507/99, with genomic profile that characterizes subgroup c, such as the additional restriction enzyme site for *BstEII* located in the IR region.

Keywords: Alphaherpesvirus; BoHV-5; Subtype c; Meningoencephalitis; High-throughput sequencing.

1. Introduction

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is an important etiologic agent of encephalitis/meningoencephalitis in cattle. It is classified in the order *Herpesvirales*, family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus* (ICTV, 2015). Bovine herpesvirus 5 is part of a closely related set of ruminant virus, in which bovine herpesvirus 1 (BoHV-1), the long recognized agent of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) is the prototype (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010).

BoHV-5 was previously classified as BoHV-1.3, a subtype of BoHV-1 which exhibited marked neuropathogenicity (FRENCH, 1962; METZLER et al., 1986). This type has been most prevalent in countries of the Southern hemisphere (ESTEVEES et al., 2008; LADELFA et al., 2011). Type 5 is currently subdivided in three subtypes, namely BoHV-5 a, b & c, based on viral DNA restriction enzyme analyses (METZLER et al., 1986; PIDONE et al., 1999; D'ARCE et al., 2002; VARELA et al., 2010). Despite the marked neuropathogenicity of BoHV-5, the virus has also been detected in cases of respiratory and reproductive disease (BRATANICH et al., 1991; FAVIER et al., 2012; DUMMER et al., 2016). Yet there may be a geographical differentiation of particular subtypes; subtype c viruses have only been recovered from a particular region in Southeast Brazil, a distribution that is not observed with subtypes a and b. Thus, subtype differentiation may be relevant for helping to clarify details of the pathogenesis and epidemiology of BoHV-5 infections.

The sequencing and the description of the complete sequence of the genome of BoHV-5 allows further study on the biology of this important pathogen of cattle. To date, only a complete sequence of the BoHV-5 subtype a genome has been described (DELHON et al., 2003). Here a complete genomic sequence of the c subtype of BoHV-5, strain P160/96 is characterized.

2. Material and methods

2.1 Viruses and cells

The BoHV-5 strain P160/96 was originally isolated from a case of herpesvirus bovine encephalitis in the state of Rio de Janeiro (RJ). This strain had been partially characterized and typed as BoHV-5 with monoclonal antibodies (SOUZA et al., 2002). Virus multiplication was carried out on Madin Darby bovine kidney cells (MDBK) (originally ATCC CCL-22), following standard procedures (ROEHE et al., 1997). When the cytopathic effect (ECP) was apparent in 70% of the monolayer, the supernatant was removed, clarified by low speed centrifugation and frozen at -70 °C. Subsequently, the supernatant was thawed and centrifuged at 100,000 x g for 2 hours on a 25% sucrose cushion. The resulting pellet was resuspended in 100 µL of ultrapure water and treated with nucleases for elimination of non-capsid-protected nucleic acids (LIMA et al., 2015). The capsid-containing suspension was then subjected to a standard phenol/chloroform extraction (SAMBROOK, 2001). The DNA purity was checked by L-Quant and viral DNA stored at -20 °C until further processing.

2.2 High throughput sequencing and data analysis

High-throughput sequencing (HTS) was performed in the Illumina® MiSeq platform. The DNA libraries were prepared with Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina) and sequence with MiSeq Reagent Nano Kit v2 (Illumina). Raw sequence reads were imported and trimmed with the Geneious software (version 9.1.4). Geneious software was used for assembly, open reading frame (ORF) prediction and genome annotation, taking the BoHV-5a strain SV507/99 genome as reference. Comparative analyses were carried with BoHV-5 sequence strain SV507/99 (GenBank accession number NC_005261.2) and BoHV-1 strain NVSL (GenBank accession number JX898220.1).

3. Results and discussion

The sequencing generated a total of 168,648 reads, with an average length of 251 base pairs (bp). Alignment of the reads with BoHV-5a SV507/99 revealed a 132.7 fold coverage of the entire genome. The reads were used for assembly of the full P160/96 genome, which is 137,740 bp in length, slightly shorter (81 bp) than that of BoHV-5a SV507/99 (137,821 pb). The P160/96 genome has a classic type D genomic organization, with 74.7% GC content. The sequence was deposited in GenBank under accession number KY559403. The genome comprises a single long unique sequence (UL) of 104,012 bp and a single short unique sequence (US) of 9,546 bp. The US sequence is flanked by two inverted repeats of 12,089 bp each, one positioned internally (IR) and another terminally (TR) (Figure 1. A, B). The repeat sequences are arranged at the following positions along the viral genome: 104,017 to 116,105 (IR) and 125,652 to 137,740 (TR), each 12,089 bp in length, 21 bp less than the reference strain of BoHV-5a. The UL region comprises a region which has 60 putative ORFs (*Circ* to *BICP0*) and has 41 bp less length than the UL of BoHV-5a. The US region contains eight putative ORFs (*US1.67* to *US9*). The IR and TR regions include two putative regulatory ORFs (*BICP4* and *BICP22*), present in both repeated sequences but in opposite orientations.

The P160/96 genome codes for 70 putative ORFs (Table 1), all of these also reported in previously characterized strains BoHV-5a SV507/99 and BoHV-1 Cooper (DELHON et al., 2003; D'OFFAY et al., 2013). All BoHV-5c P160/96 ORFs are present in BoHV-5a SV507/99, with 99.3% nucleotide (nt) identity (Figure 1A). At the amino acid (aa) level, most BoHV-5c strain P160/96 ORFs share a 100% aa identity with BoHV-5a (Table 2). BoHV-5c *UL31*, *UL28*, *UL24*, *UL20*, *UL12*, *UL6*, *BICP22 IR/TR*, *US1.67* and *US6* are the least conserved ORFs with up to 97% aa identity to the respective homologues of BoHV-5a and are discussed below.

The coding sequences (CDS) of BoHV-5c P160/96 are parallel with their counterparts in BoHV-5a SV507/99 and are located in both directions of the viral genome. The BoHV-5c P160/96 putative gene products of the UL region which display $\leq 98.9\%$ aa identity relative to their homologues in BoHV-5a are involved in different functions that follows. These comprise a nuclear delivery protein (*UL31*), proteins involved in DNA packaging (*UL28*, *UL6*), in membrane fusion (*UL20*), in DNA processing (*UL12*) and a putative protein of unknown function (*UL24*).

The UL31 protein shows to be involved in the process of nuclear egress from the capsids into the cytoplasm of the cell (METTENLEITER et al., 2013). The *UL31* ORF of BoHV-5c P160/96 is 1,140 nt in length; it codes for a putative protein that shares 98.9% identity at aa level with SV507/99. The alignment of all predicted protein of 379 aa demonstrates four aa substitutions. Deletion of UL31 considerably impairs the nuclear egress of herpesviruses (METTENLEITER, 2002; PAßVOGE et al., 2015). In addition, alphaherpesvirus UL31 may be involved in the assembly of the capsid or even in the process of DNA cleavage and packaging. (YANG & BAINES, 2011).

The *UL28* gene codes for a putative protein of 816 aa, with 98.7% aa sequence identity in relation to BoHV-5a. Protein alignment shows a less conserved region extending from aa positions 483 to 504, with a total of 11 aa substitutions throughout the sequence. The UL28 gene codes for a putative terminase subunit in alphaherpesviruses that is part of a terminase complex, so the product of this gene is essential for cleavage and packaging of viral genomic DNA in procapsid (ADELMAN et al., 2001; YANG & BAINES, 2006).

The BoHV-5c P160/96 does contain a genomic region which putatively codes for UL24, a protein with no known function in the herpes simplex virus (HSV-1) genome. This nuclear protein seems to play an important role in neurovirulence in mice (ROCHETTE et al., 2015). The UL24 ORF contains 840 nt in length and shows an identity of 98.6% aa when aligned to its counterpart on BoHV-5a SV507/99. The aa alignment of the *UL24* gene of BoHV-5c and BoHV-5a revealed a four aa substitution.

UL20 of PRV encodes a protein that is important for assembly and exiting of of herpesvirus viral particle (DIETZ et al., 2000; METTENLEITER, 2002). BoHV-5c P160/96 *UL20* is 693 nt in length, three nucleotides larger than its homologue in BoHV-5a and has 97% aa identity. The alignment of the 230 aa protein presented six substitutions between aa positions of 26 to 35. Moreover, one aa, threonine (T) was inserted at position 34 of the UL20 protein CDS. The *UL20* homologue in alphaherpesvirus encodes a membrane protein that has the ability to function together with another protein (UL53), forming a complex, with fusion activity, entry, production and propagation of infectious virus (HAQUE et al., 2016). The HSV-1 UL20 protein plays a crucial role in the cytoplasmic enveloping of virions and egress from infected cells. In the absence of UL20 the virions fail to acquire the envelope, resulting in the accumulation of capsids in the cytoplasm of the infected cells (FUCHS et al., 1997; GUGGEMOOS et al., 2006; JAMBUNATHAN et al., 2014).

The UL12 ORF is 1,464 nt in length and encodes a putative protein of 487 aa, with 98.8% aa sequence identity to BoHV-5a 507/99. Compared to its putative counterpart in BoHV-5a, six aa substitutions were observed. The *UL12* homologue in HSV-1 encodes a protein with nuclease activity and appears to participate in both viral replication in cell culture and in neurovirulence in mice (FUJII et al., 2014). The *UL6* ORF codes for a putative capsid portal protein (2,127 nt), 42 nt shorter than the equivalent on BoHV-5a, with which it shares 97.9% aa identity. In addition, alignment of the predicted protein UL6 of BoHV-5c and BoHV-5a (723 aa) showed a 14 aa deletion between positions 54 to 67 and one substitution of aa in position 406 this CDS. The *UL6* homolog in HSV-1 encodes a capsid portal protein, forming a ring structure, which functions as a channel through which the entry of the viral genome occurs (ALBRIGHT et al., 2011).

The IR and TR regions of BoHV-5c 160/96, in analogy to other alphaherpesvirus, code for two ORFs important for the critical regulatory phase of viral gene expression (DELHON et al., 2003; SCHEFFER et al., 2017). The repeating regions (IR and TR) of BoHV-5c P160/96 code for the BICP22 gene, which is critical regulator of viral gene expression (DELHON et al., 2003). BoHV-5c P160/96 BICP22 (933 nt) is 12 nt smaller than its counterpart in BoHV-5a, with which it has 98.1% aa identity. Alignment of BoHV-5c P160/96 proteins to BICP22 IR/TR, revealed that they have a deletion of four aa and a substitution of two aa, by comparison with BoHV-5a BICP22 IR/TR regions.

The P160/96 US1.67 ORF is 744 nt in length and encodes a putative protein located between the US and IR regions, with 75 carboxy-terminal aa within the IR region. The predicted protein BoHV-5c US1.67 shares 98.8% aa identity compared to BoHV-5a US1.67. Alignment of the predicted protein of 248 aa shows three aa substitutions. The gene US1.67 is homologous to ORFs found in other alphaherpesvirus, demonstrating to be related in the determination of virulence, in the participation of viral nucleocapsid egress (OSTERRIEDER et al., 1998; DELHON et al., 2003). A spontaneous deletion of the homologous gene US1.67 of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) Cooper strain, was identified through next generation sequencing and appear not to have impaired viral multiplication in cell culture (CAMPOS et al., 2016). However, the function of the putative protein encoded by *US1.67* BoHV-5c P160/96 gene remains unknown (DELHON et al., 2003).

The US region of the P160/96 genome comprises eight putative ORFs, with four encoded glycoproteins (US4/gG, US6/gD, US7/gI and US8/gE), all homologue in BoHV-

5a (DELHO et al., 2003). Viral glycoproteins show essential function in virulence, attachment and entry of the virions into the host cell, also participating in fusion and cell to cell spread (METTENLEITER, 2002). Moreover, the glycoproteins of the herpesviruses are positioned on the surface of the viral envelope, which is why they are important targets of the host immune response (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996; SMITH et al., 2013). Of all putative glycoproteins of the US region of BoHV-5c P160/96, only gD (US6) was the least conserved ORF with 99% aa identity. The envelope glycoprotein D (gD) of alphaherpesvirus is important for in the early steps of virus infection and may influence virus tropism and neuropathogenesis (IZUMI & STEVENS, 1990; CAMPADELLI-FIUME et al., 2007; TRAESEL et al., 2014). BoHV-5c P160/96 US6 ORF is 1,341 nt in length, 87 nt longer than its homologue in BoHV-5a. The alignment of the predicted protein of 446 aa shows a substitution of four aa between positions 121,857 to 121,868.

The genomic sequences of P160/96 and BoHV-1 Cooper were also submitted to comparative analysis (Table 2). The identity between the nt sequences of the BoHV-5c and BoHV-1 genome was 76.8% (Figure 1B). BoHV-5c and BoHV-5a did not present the homologue of BoHV-1 *UL0.5* (264 nt), which encodes a predicted protein of 87 aa with unknown function to date (DELHON et al., 2003; SCHEFFER et al., 2017). The genomes of P160/96 and SV507/99 were also submitted to *in silico* enzymatic restriction analysis (REA). The IR region of P160/96 reveals an additional restriction site for *BstEII* (104,819 nt position), which does not appear in the BoHV-5a genome (SV507/99). Furthermore, sequence alignment showed a five nt deletion (CCGCC) at the *BstEII* restriction site for subtype c as compared to subtype a, responsible for variation in the REA pattern (Figure 2). *In silico* REA, reveals two fragments of 8,147 and 7,771bp on BoHV-5a, whereas three fragments of 8,456; 8,105 and 7,771 bp can be detected on the BoHV-5c genome (Figure 3).

So far, no associations have been drawn between among BoHV-5 subtypes and pathogenicity. However, this may be due to the scarcity on studies reporting BoHV-5 subtyping (LADELFA et al., 2011). Nevertheless, subtyping may be of great help in determining differences in pathogenicity, which may have go unnoticed in view of the lack of differentiation. An example of this is the peculiar geographic distribution of subtype c, which seems confined to a particular area in Southeast Brazil. Thus, subtyping may be useful in tracing the origin and evolution of isolates and, perhaps, to uncover details of viral spread and pathogenicity which may have so far been overlooked. Among

such details, age and sex of affected animals and differential clinical signs may have been disregarded, particularly because of the fear of rabies, which is endemic throughout the country and is always reminded when a neuropathological condition is observed in cattle. For that, subtyping of viruses may be significantly important for the perception of the particularities or the pathogenesis and epidemiology of BoHV-5 infections.

In conclusion, we describe the first complete sequence of a BoHV-5 strain of subtype c. This complete genomic sequence of the BoHV-5c strain P160/96 will contribute to the study of the genetic evolution of bovine herpesvirus. Only one complete genome sequence of BoHV-5 was reported and belongs to subtype a (DELHON et al., 2003).

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). PMR, FRS and ACF are CNPq research fellows. Work performed as part of the Master of Science's studies of WPP (Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS).

References

- ADELMAN, K. et al. Herpes simplex virus DNA packaging sequences adopt novel structures that are specifically recognized by a component of the cleavage and packaging machinery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 3086-3091, 2001.
- ALBRIGHT, B. S. et al. Disulfide Bond Formation in the Herpes Simplex Virus 1 UL6 Protein Is Required for Portal Ring Formation and Genome Encapsidation. **Journal of Virology**, v. 85, p. 8616-8624, 2011.
- BRATANICH, A. C. et al. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo–in vitro tests. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 38, p. 41-48, 1991.
- CAMPADELLI-FIUME, G. et al. The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, p. 313-326, 2007.
- CAMPOS F. S. et al. A Spontaneous Deletion of the *US1.67/US2* Genomic Region on the Bovine Herpesvirus 1 Strain Cooper. **Genome Announcements**, v. 4:e01665-15, 2016.
- 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, p. 315-324, 2002.
- DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, p. 10339-10347, 2003.
- DEL MÉDICO ZAJAC M. P. et al. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v. 184, p.138-145, 2010.
- DIETZ, P. et al. Pseudorabies Virus Glycoprotein K Requires the UL20 Gene Product for Processing. **Journal of Virology**, v. 74, p. 5083-5090, 2000.
- D' OFFAY, J. M.; FULTON, R. W.; EBERLE, R. Complete genome sequence of the NVSL BoHV-1.1 Cooper reference strain. **Archives of Virology**, n. 158, p. 1109-1113, 2013.
- DUMMER, L. A. et al. Development of an Indirect ELISA for Serological Diagnosis of Bovine herpesvirus 5. **Plos One**, v. 11, p. 1-10, 2016.
- ESTEVEZ, 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, p. 16-22, 2008.
- FAVIER, P. A. et al. Role of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in diseases of cattle. Recent findings on BoHV-5 association with genital disease. **Open Veterinary Journal**, v. 2, p. 46-53, 2012.

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

FUCHS, W. et al. The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress. **Journal of Virology**, v. 71, p. 5639-5646, 1997.

FUJII, H. et al. The UL12 Protein of Herpes Simplex Virus 1 Is Regulated by Tyrosine Phosphorylation. **Journal of Virology**, v. 88, p. 10624-10634, 2014.

GUGGEMOOS, S.; JUST, F. T.; NEUBAUER, A. The equine herpesvirus 1 UL20 product interacts with glycoprotein K and promotes egress of mature particles. **Journal of Virology**, v. 80, p. 95-107, 2006.

HAQUE, M.; STANFIELD, B.; KOUSOULAS, K. G. Bovine herpesvirus type-1 glycoprotein K (gK) interacts with UL20 and is required for infectious virus production. **Virology**, v. 499, p. 156-164, 2016.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy: 2015 release, Order Herpesvirales. Disponível em: <www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Acesso: 30 nov. 2016.

IZUMI, K. M.; STEVENS, J. G. Molecular and Biological Characterization of a Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Neuroinvasiveness Gene. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, p. 487-496, 1990.

JAMBUNATHAN, N. et al. Herpes simplex virus 1 protein UL37 interacts with viral glycoprotein gK and membrane protein UL20 and functions in cytoplasmic virion envelopment. **Journal of Virology**, v. 88, p. 5927-5935, 2014.

LADELFA, M. F. et al. Comparative study on the in vitro and in vivo properties of two bovine herpesvirus-5 reference strains. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, p. 37, 2011.

LIMA, F. E. S. et al. Genomic characterization of two novel polyomaviruses in Brazilian insectivorous bats. **Archives Virology**, v. 160, p. 1831-1836, 2015.

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

METTENLEITER, T. C. et al. The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. **Cellular Microbiology**, v. 15, p. 170-178, 2013.

METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGLES, M. Bovine herpesvirus 1: Molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives Virology**, v. 87, p. 205-217, 1986.

OSTERRIEDER, N. et al. The equine herpesvirus 1 IR6 protein that colocalizes with nuclear lamins is involved in nucleocapsid egress and migrates from cell to cell independently of virus infection. **Journal of Virology**, v. 72, p. 9806-9817, 1998.

PABVOGEL, L. et al. Functional Characterization of Nuclear Trafficking Signals in Pseudorabies Virus pUL31. **Journal of Virology February**, v. 89, p. 2002-2012, 2015.

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

ROCHETTE, P. A. et al. Mutation of UL24 impedes the dissemination of acute herpes simplex virus 1 infection from the cornea to neurons of trigeminal ganglia. **Journal of General Virology**, v. 96, p. 2794-2805, 2015.

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

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: A laboratory manual. Third edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, p. 2344, 2001.

SCHEFFER, C. M. et al. Genome sequence of bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) isolated in Australia in 1972. **Archives Virology**, v. 162. p. 1169-1176, 2017.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminants. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 17-29, 1996.

SMITH L. M. et al. The genome of murine cytomegalovirus is shaped by purifying selection and extensive recombination. **Virology**, v, 435, p. 258-268, 2013.

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, p. 13-18, 2002.

TRAESEL, C. K. et al. Genetic diversity of 30 region of glycoprotein D gene of bovine herpesvirus 1 and 5. **Virus Genes**, v. 48, p. 438-447, 2014.

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.

YANG, K.; BAINES J. D. The Putative Terminase Subunit of Herpes Simplex Virus 1 Encoded by UL28 Is Necessary and Sufficient to Mediate Interaction between pUL15 and pUL33. **Journal of Virology**, v. 80, p. 5733-5739, 2006.

YANG, K.; BAINES, J. D. Selection of HSV capsids for envelopment involves interaction between capsid surface components pUL31, pUL17, and pUL25. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 14276-14281, 2011.

Table 1. Characterization of BoHV-5c strain P160/96 genes

| Gene | Orientation | Position (nt) ^a | Length (nt) ^a | Length (aa) ^b | % GC | Predicted product |
|---------|-------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|------|--|
| Circ | Forward | 593-1330 | 738 | 245 | 72.8 | Myristylated tegument protein circ |
| UL54 | Reverse | 1697-2908 | 1212 | 404 | 74.1 | Multifunctional expression regulator |
| UL53 | Reverse | 3130-4125 | 996 | 332 | 76.9 | Envelope glycoprotein K |
| UL52 | Reverse | 4100-7357 | 3258 | 1086 | 76.6 | Helicase primase subunit |
| UL51 | Forward | 7356-8144 | 789 | 262 | 75.9 | Tegument protein UL51 |
| UL50 | Reverse | 8282-9247 | 966 | 322 | 72.2 | Deoxyuridine triphosphatase |
| UL49.5 | Forward | 9198-9485 | 288 | 95 | 68.8 | Envelope glycoprotein N |
| UL49 | Forward | 9619-10422 | 804 | 267 | 77.2 | Tegument protein VP22 |
| UL48 | Forward | 10615-12063 | 1449 | 482 | 72.9 | Transactivating tegument protein VP16 |
| UL47 | Forward | 12234-14459 | 2226 | 741 | 72.4 | Tegument protein VP13/14 |
| UL46 | Forward | 14592-16802 | 2211 | 736 | 74.8 | Tegument protein VP1 1/12 |
| UL44 | Reverse | 17023-18483 | 1461 | 487 | 75.4 | Envelope Glycoprotein C |
| UL43 | Reverse | 18672-19814 | 1143 | 381 | 82 | Envelope protein UL43 |
| UL42 | Reverse | 19865-21103 | 1239 | 413 | 74.5 | DNA polymerase processivity subunit |
| UL41 | Forward | 21359-22723 | 1365 | 454 | 73.5 | Tegument host shut-off protein |
| UL40 | Reverse | 22848-23795 | 948 | 316 | 62.8 | Ribonucleotide reductase subunit 2 |
| UL39 | Reverse | 23815-26217 | 2403 | 801 | 70.6 | Ribonucleotide reductase subunit 1 |
| UL38 | Reverse | 26582-28015 | 1434 | 478 | 74.4 | Capsid triplex subunit 1 |
| UL37 | Forward | 28300-31464 | 3165 | 1054 | 79.4 | Tegument protein UL37 |
| UL36 | Forward | 31564-41178 | 9615 | 3204 | 79.8 | Large tegument protein |
| UL35 | Reverse | 41405-41782 | 378 | 126 | 73.3 | Small capsid protein |
| UL34 | Reverse | 41827-42657 | 831 | 277 | 74.8 | Nuclear egress membrane protein |
| UL33 | Reverse | 42738-43070 | 333 | 111 | 71.5 | DNA packaging protein UL33 |
| UL32 | Forward | 43051-44847 | 1797 | 598 | 76.1 | DNA packaging protein UL32 |
| UL31 | Forward | 44840-45979 | 1140 | 379 | 73.6 | Nuclear egress lamina protein |
| UL30 | Reverse | 45903-49655 | 3753 | 1251 | 72.2 | DNA polymerase catalytic subunit |
| UL29 | Forward | 49926-53552 | 3627 | 1208 | 73.3 | Single-stranded DNA binding protein |
| UL28 | Forward | 53789-56239 | 2451 | 816 | 76.2 | DNA packaging terminase subunit 2 |
| UL27 | Forward | 56092-58935 | 2844 | 947 | 71.6 | Envelope glycoprotein B |
| UL 26.5 | Reverse | 59444-60391 | 948 | 316 | 79.6 | Capsid scaffold protein |
| UL26 | Reverse | 59444-61303 | 1860 | 620 | 78.5 | Capsid maturation protease |
| UL25 | Reverse | 61408-63219 | 1812 | 604 | 77.3 | DNA packaging tegument protein UL25 |
| UL24 | Reverse | 63201-64040 | 840 | 280 | 76.4 | Nuclear protein UL24 |
| UL23 | Forward | 64039-65109 | 1071 | 356 | 78.6 | Thymidine kinase |
| UL22 | Forward | 65226-67772 | 2547 | 848 | 76.2 | Envelope glycoprotein H |
| UL21 | Reverse | 67966-69777 | 1812 | 604 | 77.6 | Tegument protein UL21 |
| UL20 | Forward | 69889-70581 | 693 | 230 | 77.3 | Envelope protein UL20 |
| UL19 | Forward | 70661-74836 | 4176 | 1391 | 72.5 | Major capsid protein |
| UL18 | Forward | 74943-75893 | 951 | 316 | 75.3 | Capsid triplex subunit 2 |
| UL15 | Reverse | 76101-77285 | 1185 | 395 | 70.2 | DNA packaging terminase subunit 1 |
| UL17 | Forward | 77361-79484 | 2124 | 707 | 80.2 | DNA packaging tegument protein UL17 |
| UL16 | Forward | 79511-80542 | 1032 | 343 | 77.9 | Tegument protein UL16 |
| UL15 | Reverse | 80681-81709 | 1029 | 343 | 72.6 | DNA packaging terminase subunit 1 |
| UL14 | Forward | 81772-82446 | 675 | 224 | 75.3 | Tegument protein UL14 |
| UL13 | Forward | 82355-83842 | 1488 | 495 | 74.7 | Tegument serine threonine protein kinase |
| UL12 | Forward | 83839-85302 | 1464 | 487 | 75.3 | Deoxyribonuclease |
| UL11 | Forward | 85254-85556 | 303 | 100 | 75.2 | Myristylated tegument protein |
| UL10 | Reverse | 85699-86958 | 1260 | 420 | 76 | Envelope glycoprotein M |
| UL9 | Forward | 87079-89550 | 2472 | 823 | 74.5 | DNA replication origin-binding helicase |
| UL8 | Forward | 89648-91921 | 2274 | 757 | 76.7 | Helicase primase subunit |
| UL7 | Reverse | 91978-92883 | 906 | 302 | 72.7 | Tegument protein UL7 |
| UL6 | Reverse | 92765-94891 | 2127 | 709 | 73.8 | Capsid portal protein |
| UL5 | Forward | 94941-97457 | 2517 | 838 | 66.5 | Helicase-primase helicase subunit |
| UL4 | Forward | 97478-98044 | 567 | 188 | 74.6 | Nuclear protein UL4 |
| UL3.5 | Reverse | 98071-98517 | 447 | 149 | 80.1 | Protein V57 |
| UL3 | Reverse | 98523-99176 | 654 | 218 | 74.2 | Nuclear protein UL3 |
| UL2 | Reverse | 99223-100119 | 897 | 299 | 75.5 | Uracil DNA glycosylase |
| UL1 | Reverse | 100103-100591 | 489 | 163 | 74.4 | Envelope glycoprotein L |
| ULO.7 | Forward | 100395-101000 | 606 | 201 | 77.4 | Unknown product |
| LRORF2 | Forward | 101549-101704 | 156 | 51 | 66 | LR region |
| LRORF1 | Forward | 101943-103025 | 1083 | 360 | 77.4 | LR region |
| BICP0 | Reverse | 101636-103798 | 2163 | 721 | 76.7 | Ubiquitin E3 ligase ICP0 |
| BICP4 | Reverse | 105071-109297 | 4227 | 1409 | 82.2 | Transcriptional regulator ICP4 |
| BICP22 | Forward | 114163-115095 | 933 | 310 | 75.3 | Regulatory protein ICP22 |
| US1.67 | Reverse | 115879-116622 | 744 | 248 | 73.8 | Virion protein V67 |
| US2 | Reverse | 116680-117360 | 681 | 227 | 72.4 | Virion protein US2 |
| US3 | Forward | 117483-118817 | 1335 | 444 | 73.9 | Serine threonine protein kinase US3 |
| US4 | Forward | 118925-120247 | 1323 | 440 | 68.6 | Envelope glycoprotein G |
| US6 | Forward | 120502-121842 | 1341 | 446 | 74.3 | Envelope glycoprotein D |
| US7 | Forward | 121903-123066 | 1164 | 387 | 76.6 | Envelope glycoprotein I |
| US8 | Forward | 123355-125154 | 1800 | 599 | 76.3 | Envelope glycoprotein E |
| US9 | Forward | 125246-125650 | 405 | 134 | 76 | Membrane protein US9 |
| BICP22 | Reverse | 126662-127594 | 933 | 311 | 75.3 | Regulatory protein ICP22 |
| BICP4 | Forward | 132460-136686 | 4227 | 1408 | 82.2 | Transcriptional regulator ICP4 |

^ant, nucleotides.^baa, amino acids.

Table 2. Comparison of nucleotide and amino acid sequence identities among genes of BoHV-5c (KY559403), BoHV-5a (NC_005261.2) and BoHV-1 (JX898220.1)

| BoHV-5c Gene | BoHV-5a | | | BoHV-1 | | |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|-------------|------------------------------|------------------------------|-------------|
| | % Identity (nt) ^a | % Identity (aa) ^b | % GC | % Identity (nt) ^a | % Identity (aa) ^b | % GC |
| Circ | 99.9 | 99.6 | 72.9 | 84.5 | 83.7 | 68.6 |
| UL54 | 100 | 100 | 74.1 | 84.8 | 70.3 | 70 |
| UL53 | 100 | 100 | 76.9 | 90.9 | 82.9 | 73.6 |
| UL52 | 100 | 100 | 76.6 | 88 | 75.3 | 72.2 |
| UL51 | 99.9 | 100 | 75.8 | 81.5 | 80.2 | 71.7 |
| UL50 | 100 | 100 | 72.2 | 87 | 77.4 | 68.8 |
| UL49.5 | 100 | 100 | 68.8 | 84.2 | 81.3 | 68.4 |
| UL49 | 100 | 100 | 77.2 | 78.7 | 72.3 | 73.5 |
| UL48 | 99.9 | 100 | 73 | 98.1 | 98.3 | 72.9 |
| UL47 | 99.9 | 100 | 72.3 | 99.5 | 99.6 | 72.1 |
| UL46 | 99.7 | 99.7 | 74.7 | 85 | 81.4 | 73.3 |
| UL44 | 99.7 | 99.2 | 75.2 | 82.8 | 70.1 | 73.1 |
| UL43 | 100 | 100 | 82 | 88.7 | 77.4 | 78.6 |
| UL42 | 99.9 | 99.8 | 74.6 | 81.5 | 68 | 70.7 |
| UL41 | 100 | 100 | 73.5 | 90 | 90.7 | 69.2 |
| UL40 | 100 | 100 | 62.8 | 94.2 | 87 | 61.5 |
| UL39 | 99.9 | 99.8 | 70.6 | 94.8 | 87.1 | 68.5 |
| UL38 | 99.9 | 99.8 | 74.4 | 89.8 | 78.2 | 71.4 |
| UL37 | 99.9 | 99.9 | 79.4 | 88 | 88.1 | 75.4 |
| UL36 | 99.9 | 99.8 | 79.8 | 83.4 | 80 | 76.7 |
| UL35 | 100 | 100 | 73.3 | 90.7 | 77.8 | 70.7 |
| UL34 | 100 | 100 | 74.8 | 84.8 | 72.9 | 69.7 |
| UL33 | 100 | 100 | 71.5 | 90.4 | 82 | 67 |
| UL32 | 99.9 | 99.8 | 76 | 88.9 | 89.8 | 72.4 |
| UL31 | 99.6 | 98.9 | 73.6 | 84.6 | 84.7 | 69.1 |
| UL30 | 99.7 | 99.4 | 72.3 | 90.6 | 80.9 | 70.2 |
| UL29 | 100 | 100 | 73.3 | 94.2 | 95.6 | 71.5 |
| UL28 | 99.1 | 98.7 | 76.2 | 90.3 | 89.2 | 74.3 |
| UL27 | 100 | 100 | 71.6 | 92.1 | 92.2 | 69.9 |
| UL 26.5 | 100 | 100 | 79.6 | 79.6 | 66.4 | 75.5 |
| UL26 | 100 | 100 | 78.5 | 84.6 | 73.5 | 75.3 |
| UL25 | 99.8 | 99.8 | 77.2 | 91.4 | 82.1 | 73 |
| UL24 | 98.5 | 98.6 | 77.1 | 79.8 | 64.4 | 72 |
| UL23 | 99.9 | 100 | 78.7 | 84.4 | 82.2 | 73.4 |
| UL22 | 99.9 | 99.8 | 76.2 | 87.9 | 86.1 | 72.2 |
| UL21 | 99.9 | 100 | 77.7 | 83.4 | 70.5 | 72.5 |
| UL20 | 98.4 | 97 | 78.1 | 91.7 | 92.2 | 75.6 |
| UL19 | 99.9 | 99.9 | 72.4 | 95.9 | 97.8 | 71 |
| UL18 | 100 | 100 | 75.3 | 94.4 | 94.3 | 73.3 |
| UL15 | 99.8 | 99.7 | 70.2 | 95.1 | 88.6 | 69 |
| UL17 | 100 | 100 | 80.2 | 90.6 | 90.8 | 77.8 |
| UL16 | 99.8 | 99.7 | 77.9 | 94.1 | 94.2 | 75.4 |
| UL15 | 100 | 100 | 72.6 | 91.5 | 80.5 | 70.3 |
| UL14 | 100 | 100 | 75.3 | 98.5 | 96.9 | 75.8 |
| UL13 | 100 | 100 | 74.7 | 98.7 | 98.6 | 74.8 |
| UL12 | 98.6 | 98.8 | 75.3 | 98 | 99 | 75.3 |
| UL11 | 100 | 100 | 75.2 | 78.2 | 73 | 71.5 |
| UL10 | 99.9 | 99.8 | 75.9 | 88.3 | 78.6 | 72 |
| UL9 | 99.9 | 99.9 | 74.5 | 90.9 | 93.1 | 71.1 |
| UL8 | 100 | 100 | 76.7 | 88.6 | 89.3 | 71.7 |
| UL7 | 100 | 100 | 72.7 | 89 | 75.2 | 68.9 |
| UL6 | 98 | 97.9 | 74 | 91.1 | 81.6 | 70.7 |
| UL5 | 99.9 | 100 | 66.5 | 99.2 | 99.8 | 66.2 |
| UL4 | 100 | 100 | 74.6 | 89.8 | 86.6 | 71.7 |
| UL3.5 | 100 | 100 | 80.1 | 71.5 | 55.6 | 78.2 |
| UL3 | 99.8 | 100 | 74 | 81.1 | 67.4 | 69.1 |
| UL2 | 100 | 100 | 75.5 | 92.4 | 84.9 | 68.8 |
| UL1 | 100 | 100 | 74.4 | 82.6 | 66.3 | 69.6 |
| UL0.7 | 99.8 | 99.5 | 77.2 | 66.2 | 35.5 | 70.4 |
| BICP0 | 99.9 | 100 | 76.7 | 79.2 | 63.3 | 76.6 |
| BICP4 | 100 | 100 | 82.2 | 79.9 | 69.1 | 82.3 |
| BICP22 | 98.3 | 98.1 | 75.1 | 76.2 | 69.2 | 79 |
| US1.67 | 99.3 | 98.8 | 73.1 | 77.2 | 50.8 | 65.2 |
| US2 | 100 | 100 | 72.4 | 77.5 | 57 | 68.9 |
| US3 | 99.9 | 100 | 74 | 83 | 78.2 | 71.5 |
| US4 | 100 | 100 | 68.6 | 78.6 | 71.2 | 69.7 |
| US6 | 99.2 | 99 | 73.4 | 84.1 | 79.6 | 69.7 |
| US7 | 99.9 | 100 | 76.5 | 83.9 | 78.1 | 74 |
| US8 | 99.9 | 100 | 76.2 | 78.6 | 72.6 | 70.8 |
| US9 | 100 | 100 | 76 | 76.8 | 78.5 | 69 |
| BICP22 | 98.3 | 98.1 | 75.1 | 76.2 | 63.3 | 79 |
| BICP4 | 100 | 100 | 82.2 | 79.9 | 72.3 | 82.3 |

^ant, nucleotides.^baa, amino acids.



Figure 1. Alignment of the complete genome of BoHV-5c strain P160/96 with BoHV-5a strain SV507/99 (A) (GenBank accession number NC_005261.2) and BoHV-1 strain NVSL (B) (GenBank accession number JX898220.1). Schematic diagram showing the genomic organization of bovine herpesvirus 5c (BoHV-5c) compared to two bovine herpesvirus, recovered from GenBank. The length of the BoHV-5c sequence (137,740 nt) corresponds to the complete genome reported in the present study. Unique long region (UL) and unique short (US), in gray; Inverted repeat (IR) and terminal repeat (TR) colored in in orange. Open reading frames (ORFs) are highlighted in yellow. Identity bar color scale: green, 100% identity; green-brown, 30 less 100% identity; red, less 30% identity.



Figure 2. Alignment of the nucleotide sequence of the BoHV-5c IR region (P160/96) (accession number) and BoHV-5a (SV507/99) (accession number NC005261). Dots (.) Indicate conserved nucleotides. The dashes (-) show deleted nucleotides. The *Bst*EII restriction site is boxed.

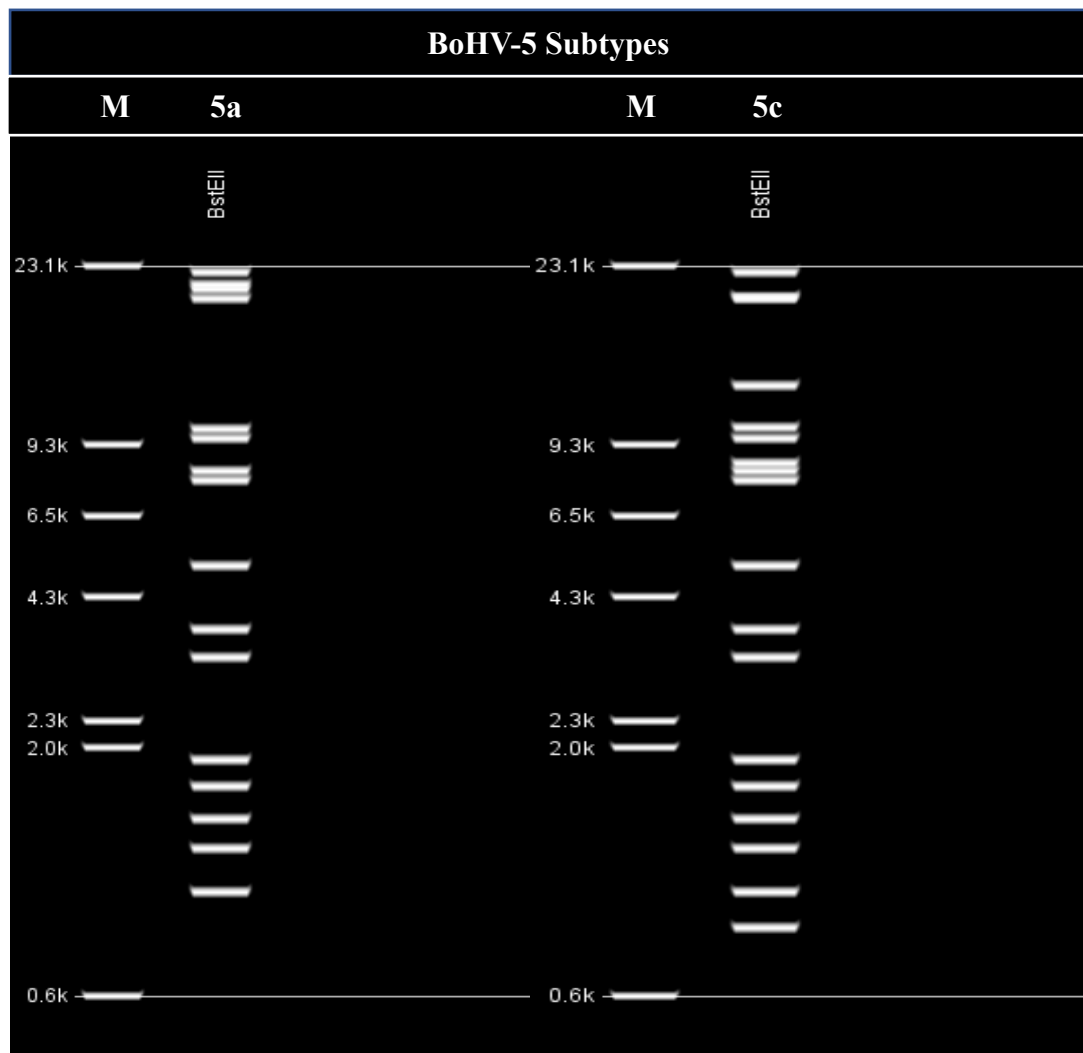


Figure 3. Comparative analysis of the fragments generated by *in silico* cleavage with the *BstEII* enzyme of BoHV-5a (SV507/99) and BoHV-5c (P160/96) viral genomes. Highlight for bands that are between 9.3 Kb and 6.5 Kb, in both cases, located within the area used for subtype classification. M: molecular weight marker.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é um alfa herpesvírus responsável pela meningoencefalite, doença que afeta principalmente animais jovens. O BoHV-5 é dividido em três subtipos a, b & c. Até o presente, somente um genoma completo de BoHV-5a SV507/99 foi descrito. Neste trabalho é apresentada a primeira sequência completa de BoHV-5c denominada P160/96. É de suma importância determinar a sequência de subtipos de BoHV-5 para que se possa estudar as possíveis diferenças de patogenia destas amostras. Por exemplo, no Estado de Minas Gerais os pesquisadores afirmam que usualmente o BoHV-5 é detectado em animais com idade mais avançada, enquanto que em outras regiões do país é comum a identificação em animais mais jovens.

Os surtos de BoHV-5 são esporádicos e parecem estar restritos em sua distribuição geográfica, sendo identificados principalmente em países da América do Sul. Somente alguns casos de meningoencefalite associada ao BoHV-5 foram identificados na Austrália, América do Norte e Europa. Assim, os surtos de BoHV-5 têm sido mais descritos no Brasil e Argentina. As razões para esta divergência geográfica do BoHV-5 ainda são desconhecidas. Uma das explicações para a baixa prevalência de BoHV-5 em países do hemisfério norte seria a vacinação contra BoHV-1, proporcionaria proteção aos animais contra o BoHV-5.

Portanto, os resultados dessa dissertação visam ampliar o conhecimento a respeito da composição genética de subtipos de herpesvírus bovino ocorrentes no Brasil. Para tanto, um isolado viral de um caso de encefalite bovina ocorrido no Estado do Rio de Janeiro, foi selecionado e submetido ao sequenciamento de alto desempenho. A análise da sequência do genoma revelou que o mesmo pertence ao subtipo c, ainda não relatado no Brasil.

Posteriormente, na continuidade desse trabalho serão realizados mais sequenciamentos de alto desempenho, de um maior número de isolados de herpesvírus bovino, provenientes de diferentes regiões do Brasil. Caso seja obtido sucesso no sequenciamento dos isolados de herpesvírus bovino, os mesmos serão caracterizados e comparados a genomas de herpesvírus bovino já caracterizados. E assim, pretende-se contribuir para o conhecimento da biologia e evolução genética dos herpesvírus de bovinos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v. 113, p. 293-302, 2006.

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

ARRUDA, L. P. et al. Molecular detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in formalin - fixed, paraffin-embedded samples from cattle with neurological disease. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 646-650, 2010.

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.

ASLAN, M. E.; AZKUR, A. K.; GAZYAGCI, S. Epidemiology and genetic characterization of BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 and Brucella spp. infections in cattle in Turkey. **Journal of Veterinary Medical Science.**, v. 77, p. 1371-1377, 2015.

ATANASIU, D. et al. Cascade of Events Governing Cell-Cell Fusion Induced by Herpes Simplex Virus Glycoproteins gD, gH/gL, and gB. **Journal of Virology**, v. 84, p. 12292-12299, 2010.

AZAB, W. et al. Glycoprotein C of equine herpesvirus 4 plays a role in viral binding to cell surface heparan sulfate. **Virus Research**, v. 151, p. 1-9, 2010.

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.

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

BLOOM, D. C. Alphaherpesvirus Latency: A Dynamic State of Transcription and Reactivation, In: KIELIAN, M., MARAMOROSCH, K., METTENLEITER, T.C. **Advances in Virus Research**, Ed. Elsevier, v. 94, p. 53-80, 2016.

BROWN, J. C.; NEWCOMB, W. W. Herpesvirus Capsid Assembly: Insights from Structural Analysis. **Current Opinion Virology**, v. 2, p. 142-149, 2011.

CADORE G. C. et al. Reactivation and distribution of bovine herpesvirus 5 DNA in the brain of latently infected lambs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 1090-1096, 2011.

CAMPADELLI-FIUME, G. The egress of alphaherpesviruses from the cell, In: ARVIN, A., CAMPADELLI-FIUME, G.; MOCARSKI, E.; MOORE., P. S.; ROIZMAN, B.; WHITLEY, R.; YAMANISHI, K. **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**, Cambridge University, cap. 12, p. 1-14, 2007.

CAMPOS, F. C. Trabalho em preparação. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAV, Universidade de Brasília - UnB. Brasília, 2017. E-mail: camposvet@gmail.com.

CAMPOS, F. S. et al. High prevalence of coinfections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 67-73, 2009.

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.

CARON, L. et al. Latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Veterinary Microbiology**, v. 84, p. 285-295, 2002.

CARRILLO, B. J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. Pathology of bovine viral necrozing encephalitis in Argentina. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 30, p. 161-168, 1983.

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

CHOWDHURY, S. I. et al. Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) Us9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. **Journal of Virology**, v. 76, p. 3839-3851, 2002.

CHOWDHURY, S.I. et al. The Us9 gene of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) effectively complements a Us9-null strain of BHV-5 for anterograde transport, neurovirulence, and neuroinvasiveness in a rabbit model. **Journal of Virology**, v. 80, p. 4396-405, 2006.

CLAUS, M. P et al. Isolation and partial characterization of bovine herpesvirus in cattle with neurological signs. **Virus Reviews & Research**, v. 5, p. 120, 2000.

CLAUS, M. P. et al. Bovine Herpesvirus 5 Detection by Virus Isolation in Cell Culture and Multiplex-Pcr In Central Nervous System from Cattle with Neurological Disease in Brazilian Herds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 485-490, 2007.

COLODEL, E. M. et al. Necrotizing meningo-encephalitis in cattle due to bovine herpesvirus in the state of Mato Grosso, Brazil. **Ciência Rural**, v. 32, p. 293-298, 2002.

CONNOLLY, S. A. et al. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 369-381, 2011.

D'ARCE, R. C. F. et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 315-324, 2002.

- DAVISON, A. J. Evolution of the herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 86, p. 69-88, 2002.
- DAVISON, A. J. et al. The order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v. 154, p. 171-177, 2009.
- DAVISON, A. J. Herpesvirus systematics. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 143, p. 52-69, 2010.
- DEL FAVA, C. et al. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 25-33, 2003.
- DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, p. 10339-10347, 2003.
- DEL MÉDICO ZAJAC, M. et al. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 327-334, 2006.
- DEL MÉDICO ZAJAC, M. et al. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 138-145, 2010.
- DEZENGRINI, R. et al. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. **Journal of Neurovirology**, v. 15, p. 153-163, 2009.
- DIALLO, I. S. et al. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, p. 93-95, 2010.
- DIALLO, I. S. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 175, p. 46-52, 2011.
- DIEL, D. G. et al. O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatórias ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via inoculação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 164-170, 2005.
- 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.; FULTON, R. W.; EBERLE, R. Complete genome sequence of the NVSL BoHV-1.1 Cooper reference strain. **Archives of Virology**, v. 158, p. 1109-1113. 2013.
- DUMMER, L. A. et al. Development of an Indirect ELISA for Serological Diagnosis of Bovine herpesvirus 5. **Plos One**, v. 11, p. 1-10, 2016.
- EDWARDS, A. et al. Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. **Genomics**, v. 6, p. 593-608. 1990.

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

ESTEVEVES, 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, p. 16-22, 2008.

FAN, Q.; LONGNECKER, R.; CONNOLLY, S. R. A. Functional Interaction between Herpes Simplex Virus 1 Glycoprotein gH/gL Domains I and II and gD Is Defined by Using Alpha herpesvirus gH and gL Chimeras. **Journal of Virology**, v. 89, p. 7159-7169, 2015.

FAUQUET, C. M. et al. **Virus Taxonomy**. The eighth report. Academic Press, San Diego, p. 1162, 2004.

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

FERRARI, H. F. et al. Detection of bovine Herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic test of bovine encephalitis. **Journal of Virological Methods**, v. 146, p. 335-340, 2007.

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

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

FLORES, E. F. & CARGNELUTTI, J. F. Diagnóstico laboratorial de infecção víricas, In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia Veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, p. 325-366, 2012.

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M.; VARELA, A. P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, p. 503-570, 2012.

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

FONSECA, J. R. et al. PCR Multiplex para detecção dos principais herpesvírus neurológicos de ruminantes. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 63, p. 1405-1413, 2011.

GALIZA, G. J. N. et al. Diseases of the nervous system of cattle in the semiarid of Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 267-276, 2010.

GEORGE, L. W. Understanding the encephalitic form of infectious bovine-rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, v. 86, p. 335-337, 1991.

GERAGHTY, R. J. et al. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. **Science**, v. 280, p. 1618-1620, 1998.

GERAGHTY, R. J. et al. Cellular Expression of Alphaherpesvirus gD Interferes with Entry of Homologous and Heterologous Alphaherpesviruses by Blocking Access to a Shared gD Receptor. **Virology**, v. 268, p. 147-158, 2000.

GOMES, L. I. et al. Detection of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in cattle in Southeast Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 217-220, 2002.

GOMES, L. I. et al. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Veterinary Research Communications**, Netherlands, v. 27, p. 495-504, 2003.

GUO, H. et al. Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. **Protein Cell**, v. 11, p. 987-998, 2010.

GUR, S.; DOGAN, N. The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 304-308, 2010.

HALFEN, D. C.; VIDOR, T. Infecção por herpesvírus bovino 1 e herpesvírus bovino 5. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. Ed. Universitária, UFPEL, Pelotas, p.82-91, 1998.

HEILEIN, A. et al. Molecular characterization of south American bovine herpesvírus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 40, p. 125-130, 1993.

HELLBERG, T. et al. Chapter Three – Nuclear Egress of Herpesviruses: The Prototypic Vesicular Nucleocytoplasmic Transport. **Advances in Virus Research**, v. 94, p. 81-140, 2016.

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

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy: 2015 release, Order *Herpesvirales*. Disponível em: <www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Acesso: 18 nov. 2015.

ISERNHAGEN, A. J. et al. Asymptomatic encephalitis in calves experimentally infected with bovine herpesvirus-5. **Canadian Veterinary Journal**, v. 52, p. 1312-1318, 2011.

JIA, J. et al. Novel gammaherpesvirus functions encoded by bovine herpesvirus 6 (bovine lymphotropic virus). **Journal of General Virology**, v. 95, p. 1790-1798, 2014.

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, p. 187-205, 2008.

JURAK, I.; GRIFFITHS, A.; COEN, D. M. Mammalian Alphaherpesvirus miRNAs. **Biochim Biophys Acta**, v. 1809, p. 641-653, 2011.

KNIPE, D.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B. **Fields virology**, USA, 4th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, v. 1, p. 2381-2510, 2001.

KELLY, B. J. et al. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. **Virus Research**, v. 145, p. 173-186, 2009.

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

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.

KUNERT FILHO, H. C. et al. Bovine Herpesviruses Do Not Play a Major Role in the Differential Diagnosis of Rabies in Cattle in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1099-1106, 2013.

LADELFA, M. F. et al. Comparative study on the in vitro and in vivo properties of two bovine herpesvirus-5 reference strains. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, p. 37-45, 2011.

LIANG, X. et al. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfidelinked complex with a second virion structural protein. **Journal of Virology**, v. 70, p. 1448-1454, 1996.

MACHADO, G. F. et al. Bovine herpesvirus-5 infection in a rabbit experimental model: Immunohistochemical study of the cellular response in the CNS. **Microbial Pathogenesis**, v. 57, p. 10-16, 2013.

MAIDANA, S. S. et al. Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. **BMC Veterinary Research**, v. 7, p. 8-16, 2011.

MAIDANA, S. S. et al. Multiplex PCR followed by restriction length polymorphism analysis for the subtyping of bovine herpesvirus 5 isolates. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 111-118, 2013.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in Genetics**, v. 24, p. 133-141, 2008.

MARIN, M. S. et al. Concomitant infection of *Neospora caninum* and Bovine Herpesvirus type 5 in spontaneous bovine abortions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1291-1295, 2013.

MARIN, M. S. et al. A new method for simultaneous detection and discrimination of Bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) using real time PCR with high resolution melting (HRM) analysis. **Journal of Virological Methods**, v. 227, p. 14-22, 2016.

MAYER, S. V. et al. Dexamethasone-induced reactivation of bovine herpesvirus type 5 latent infection in experimentally infected rabbits results in a broader distribution of latent viral DNA in the brain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 335-343, 2006.

McGEOCH, D. J. et al. Molecular Phylogeny and Evolutionary Timescale for the Family of Mammalian Herpesviruses. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, p. 443-458, 1995.

McGEOCH, D. J.; DOLAN, A.; RALPH A. C. Toward a Comprehensive Phylogeny for Mammalian and Avian Herpesviruses. **Journal of Virology**, v. 74, p. 10401-10406, 2000.

MEGID, J. et al. Outbreak Control and Clinical, Pathological, and Epidemiological Aspects and Molecular Characterization of a Bovine Herpesvirus Type 5 on a Feedlot Farm in São Paulo State. **BioMed Research International**, v. 15, p. 1-5, 2015.

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.

MORETTI, B. et al. Infectious bovine rhinotracheitis, clinical observations and isolation of virus [in Italian]. **Veterinaria Italiana**, v. 15, p. 676-702, 1964.

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus Assembly and Egress. **Journal of Virology**, v. 76, p. 1537-1547, 2002.

METTENLEITER, T. C. Pathogenesis of neurotropic herpesvirus: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Veterinary Research**, v. 92, p. 197-206, 2003.

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

METTENLEITER, T. C.; KLUPP, B. G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: an update. **Virus Research**, v. 143, p. 222-234, 2009.

METTENLEITER T. C. Vesicular Nucleo-Cytoplasmic Transport - Herpesviruses as Pioneers in Cell Biology. **Viruses**, v. 8, p. 266-272, 2016.

METZKER, M. L. Sequencing Technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 31-46, 2010.

METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v. 87, p. 205-217, 1986.

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, p. 633-652, 2001.

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

OBANDO, C. et al. Identificación molecular de una cepa de herpesvirus bovino tipo 2 en Venezuela. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. 20, p. 37-41, 2010.

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

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 Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 67, p. 1217-1225, 2015.

OSÓRIO, F. Latency of bovine herpesvirus-1. In: Simpósio Internacional Sobre Herpesvírus Bovino (Tipo 1 e 5) E Vírus Da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Santa Maria. Anais. Santa Maria: UFSM, p. 117-126, 1998.

PATEL, J. R.; DIDLICK, S. Epidemiology, disease and control of infections in ruminants by herpesviruses-an overview. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 79, p. 8-14, 2008.

PELLETT, P. E. et al. Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of a protein encoded in a small herpes simplex virus DNA fragment capable of trans-inducing a genes. **Genetics**, v. 82, p. 5870-5874, 1985.

PEREZ, S. E. et al. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 437- 444, 2002.

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

RIBAS, N. L. K. S. et al. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1183-1194, 2013.

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

RIET-CORREA, G. et al. Meningoencefalite e poliencfalomalacia causada por herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 44-46, 2006.

- RIJSEWIJK, F. A. M. et al. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus -1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1477-1483, 1999.
- 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. et al. Meningoencephalitis by bovine herpesvirus-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 251-260, 2007.
- RISSI, D. R. et al. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with bovine herpesvirus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 346-349, 2008.
- ROEHE, P. M. et al. Atualização no diagnóstico e controle de infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). **O Biológico**, v. 59, p. 27-32, 1997.
- ROIZMANN, B. et al. The family *Herpesviridae*: an update. **Archives of Virology**, v. 123, p. 425-449, 1992.
- ROIZMAN, B. & PELLETT, P. E. The family *Herpesviridae*: A brief introduction, in: Knipe, D. M.; Howley, P. M.; (Eds.), **Fields Virology**, 4th ed., p. 2381-2398, 2001.
- ROIZMAN, B. & KNIPE, D. Herpes simplex viruses and their replication. In: Knipe, D., Howley, P.M. (Eds.), **Fields Virology**. 4th ed., p. 2399-2460, 2001.
- ROIZMAN, B.; KNIPE, D.M.; WHITLEY, R.J. Herpes simplex viruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), **Fields Virology**, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 2501-2601, 2007.
- SALVADOR, S. C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, p. 75-82, 1998.
- SANCHES, A.W. D.; LANGOHR, I. M.; STIGGER, A. L.; BARROS, C. S. L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 113-118, 2000.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SCHUDEL, A. A. et al. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 33, p. 303-310, 1986.
- SCHWYZER, M. & ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminants. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 17-29, 1996.

SHARIFZADEH, A. et al. Bovine herpesvirus type 5 in semen samples from bulls in Iran. **Archives of Virology**, v. 160, p. 235-239, 2015.

SILVA, M. S. et al. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 403-408, 2007a.

SILVA, M. S. et al. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, v. 129, p. 191-199, 2007b.

SILVA, S. C. et al. A bovine herpesvirus 5 recombinant defective in the thymidine kinase (TK) gene and a double mutant lacking TK and the glycoprotein E gene are fully attenuated for rabbits. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 150-159, 2010.

SILVA, D. R. Detecção molecular de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em amostras de encéfalos bovinos incluídas em parafina. 49f. **Dissertação de mestrado em Ciência Animal**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

SILVESTRO, C.; BRATANICH, A. The latency related gene of bovine herpesvirus types 1 and 5 and its modulation of cellular processes. **Archives of Virology**, v. 161, p. 3299-3308, 2016.

SMITH, L. M. et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, v. 321, p. 674-679, 1986.

SOUZA, V. F. et al. Monoclonal antibody characterization of bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 13-18, 2002.

SPEAR, P. G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v. 6, p. 401-410, 2004.

SPIPKI, F. R. et al. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 43-49, 2004.

STILES, K. M. et al. The herpes simplex virus receptor nectin-1 is down-regulated after trans-interaction with glycoprotein D. **Virology**, v. 373, p. 98-111, 2008.

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, p. 203-209, 2001.

TEIXEIRA, M. B. et al. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, p. 61-65, 1998.

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

TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1): Biology, pathogenesis and control. **Advances in Virus Research**, v. 45, p. 191-223, 1995.

THIRY, J. et al. Ruminant alphaherpesvirus related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary Research**, v. 37, p. 169-190, 2006.

THOMISHIMA, M. J.; ENQUIST, L. W. A conserved alpha-herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane protein. **Journal of Cell Biology**, v. 154, p. 741-752, 2001.

TRAESEL, C. K. et al. Sequence analysis of the 5' third of glycoprotein C gene of South American bovine herpesviruses 1 and 5. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, p. 470-478, 2015.

VAN DIJK, E. L. et al. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in genetics**, v. 30, p. 418-426, 2014.

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.

VIRALZONE. Swiss Institute of Bioinformatics, 2017 Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/176.html> Acesso em: 16 nov. 2016.

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

WEIBLEN, R. et al. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **Veterinary Record**, v. 124, p. 666-667, 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, p. 2536-2546, 2011.

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.