

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS  
BOVINO TIPOS 1 E 5**

**TESE DE DOUTORADO**

**Mariana Sá e Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2009**

# **IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1 E 5**

**por**

**Mariana Sá e Silva**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**

**Orientador: Prof. Rudi Weiblen**

Santa Maria, RS, Brasil.  
2009

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS  
BOVINO TIPOS 1 E 5**

Elaborada por  
**Mariana Sá e Silva**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Rudi Weiblen, PhD, UFSM**  
(Presidente/Orientador)

**Ana Cláudia Franco, Dr (UFRGS)**

**Eduardo Furtado Flores, PhD (UFSM)**

**Sônia de Avila Botton, Dr (UFSM)**

**Valéria Maria Lara, Dr (autônoma)**

Santa Maria, 27 de outubro de 2009.

## **RESUMO**

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

## **IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS**

### **BOVINO TIPOS 1 E 5**

AUTOR: MARIANA SÁ E SILVA

ORIENTADOR: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, 27 de outubro de 2009.

Os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1, BoHV-5) são agentes geneticamente e antigenicamente relacionados que causam grandes prejuízos econômicos à bovinocultura. O objetivo desta tese foi o de realizar a identificação e diferenciação molecular de isolados de BoHV-1 e BoHV-5. Na primeira parte, foi relatada a identificação de 40 amostras de BoHV isoladas de diferentes casos clínicos na região Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai entre 1987 e 2006. A diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 foi realizada pelo uso de um PCR para uma região de baixa homologia do gene da glicoproteína C, o que permitiu a diferenciação entre os tipos virais pelo tamanho do amplicon. As amostras identificadas como BoHV-1 (n=16) foram isoladas de doença respiratória (n=3), balanopostite e/ou vulvovaginite (n=3), do sêmen de touros saudáveis (n=5) e de casos doença neurológica (n=5). As amostras identificadas como BoHV-5 (n=24) foram, em sua maioria, isoladas de doença neurológica (n=21), mas também do sêmen de touros saudáveis (n=2) e do baço de um bezerro com doença sistêmica (n=1). Esses resultados demonstram que tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 não estão estritamente associados às suas respectivas síndromes clínicas e que podem estar envolvidos em casos clínicos classicamente atribuídos ao outro tipo viral. Esses achados também reforçam a necessidade da correta identificação dos isolados de herpesvírus para um melhor conhecimento da sua patogenia e epidemiologia. Na segunda parte do trabalho, foram caracterizados cinco isolados de BoHV-1 provenientes de casos de doença neurológica. Esses vírus foram isolados do encéfalo de bovinos que apresentavam sinais neurológicos.

Entretanto, evidências histológicas de meningoencefalite não foram observadas em três dos cinco casos. Os isolados foram identificados como BoHV-1 pela utilização de um PCR direcionado para o gene da gC. A identidade dos isolados foi confirmada pelo sequenciamento do amplicon e também por um segundo PCR para outra região do gene da gC, seguido de análise de restrição enzimática do amplicon. A caracterização antigênica com anticorpos monoclonais e testes de soroneutralização cruzada demonstraram um perfil típico de BoHV-1. Esses cinco isolados também foram inoculados em coelhos, nos quais não produziram doença neurológica. Esses resultados demonstram que o envolvimento de BoHV-1 em doença neurológica em bovinos é mais frequente do que o relatado anteriormente, evidenciando a necessidade de uma precisa diferenciação entre os tipos virais.

**Palavras-chave:** Herpesvírus, BoHV-1, BoHV-5, glicoproteína C, diferenciação viral, doença neurológica.

## **ABSTRACT**

Doctoral Thesis

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

## **MOLECULAR IDENTIFICATION OF BOVINE**

### **HERPESVIRUS TYPES 1 AND 5**

AUTHOR: MARIANA SÁ E SILVA

ADVISER: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, October 27th 2009.

Bovine herpesvirus types 1 and 5 (BoHV-1, BoHV-5) are genetically and antigenic related viruses and have been associated with important economic losses to the cattle industry. The aim of this Thesis was to perform the molecular identification of BoHV-1 and BoHV-5 isolates. The first part describes the identification of 40 herpesviruses isolated from different clinical specimens and syndromes in central-southern Brazil, Argentina and Uruguay (1987 – 2006). The differentiation between BoHV-1 and BoHV-5 was performed by examining the size of the amplification product of a glycoprotein C gene-based PCR, designed for a low homology region of the gene. BoHV-1 isolates (n=16) were identified in cases of respiratory disease (n=3), vulvovaginitis and/or balanoposthitis (n=3), in semen of healthy bulls (n=5) and in cases of neurological disease (n=5). Samples identified as BoHV-5 (n=24) were isolated predominantly from cases of neurological disease (n=21), but also from semen of healthy bulls (n=2) and from a spleen of a calf with systemic disease (n=1). These results show that both BoHV-1 and BoHV-5 are not strictly associated with their respective diseases; yet are frequently involved in clinical conditions otherwise attributed to the other virus type. These findings also reinforce the need of correctly identifying the herpesvirus isolates as to better understand their pathogenesis and epidemiology. In the second part, it is reported the characterization of five Brazilian BoHV-1 isolates associated with neurological disease, an unusual finding. All five samples were isolated from the brain of cattle presenting neurological disease, yet histological evidences of meningoencephalitis were not observed in three cases. The isolated viruses were identified as BoHV-1 by a glycoprotein C gene-based

PCR able to differentiate BoHV-1 from BoHV-5. The identity of the isolates was confirmed by nucleotide sequencing of the amplicons and by restriction analysis of PCR products from another gC region. Monoclonal antibody binding and cross-neutralization assays with BoHV-1 and BoHV-5 antisera showed a typical BoHV-1 antigenic profile. Inoculation of rabbits with these five BoHV-1 isolates did not result in neurological disease, contrasting with fatal meningoencephalitis produced by BoHV-5. Thus, the involvement of BoHV-1 in neurological disease of cattle is more frequent than previously reported, indicating the need for fast and precise means of differentiating it from BoHV-5. Likewise, the potential role of BoHV-1 in neurological disease in cattle should be further investigated.

**Keywords:** Bovine herpesvirus, BoHV-1, BoHV-5, glycoprotein C, viral differentiation, neurological disease.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Amplificação parcial do gene gC do BoHV. M: Marcador de massa molecular (p018 clivado com *Bam*HI); Linha 1: controle negativo; Linha 2: Cooper; Linha 3: SV-507/99; Linha 4: SV-265/96; Linha 4: SV-56/90; Linha 5: SV-1613/93; Linha 6: CIAG04 1428; Linha 7: SV 371/05; Linha 8:SV-136/88; Linha 9: 002/00; Linha 10: CE05 18.....36

### CAPÍTULO 2

FIGURA 1 (Figure 1) - Amplification products of the gC-based PCR designed to differentiate BoHV-1 from BoHV-5. Lane M: molecular weight marker; Lane 1: Cooper strain; Lane 2: SV-56/90; Lane 3: SV-507/99; Lane 4: EVI-340/96; Lane 5: SV-1613/93; Lane 6: SV-299/03; Lane 7: SV-609/03; Lane 8: SV-47/05; Lane 9: SV-63/06; Lane 10: no template. The arrows indicate the estimated size of the amplified product. Agarose gel (2%) stained with ethidium bromide and visualized under UV light.....59

FIGURA 2 (Figure 2) - Alignment of nucleotide sequences of a segment within the gC gene coding region of BoHV-1 and BoHV-5 standard strains and virus isolates. Shaded areas represent deletions in the respective genomes.....60

FIGURA 3 (Figure 3) - Restriction analysis of the gC-based PCR fragment. Lane 1: SV-507/99; Lane 2: EVI-340/96; Lane 3: Cooper strain; Lane 4: SV-56/90; Lane 5: SV-1613/93; Lane 6: SV-299/03; Lane 7: SV-609/03; Lane 8: SV-47/05; Lane 9: SV-63/06. The arrows show the estimated size of the amplified product of each virus. Agarose gel (2%) stained with ethidium bromide and visualized under UV light.....61

FIGURA 4 (Figure 4) - Virus neutralizing (VN) titers of specific anti-BoHV-1 (Cooper) and anti-BoHV-5 (SV-507/99) sera against the homologous viruses, strains and isolates. The columns represent the GMTs of six replicates.....62



## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO 1**

TABELA 1 (Quadro 1 ) - Origem, histórico clínico e identificação molecular de amostras de herpesvírus bovino isoladas de espécimes clínicos na região Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai, 1987-2006.....	34
---	----

### **CAPÍTULO 2**

TABELA 1 (Table 1) - Epidemiological and clinico-pathological data of the five neurological isolates identified as bovine herpesvirus 1 (BoHV-1).....	57
TABELA 2 (Table 2) - Reactivity of selected monoclonal antibodies (MAbs) with antigens of bovine herpesvirus types 1 and 5 strains or isolates.....	58

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 CAPÍTULO 1. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no centro sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987–2006).....</b>	<b>18</b>
Abstract.....	19
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	22
Resultados.....	24
Discussão.....	25
Referências.....	29
<b>3 CAPÍTULO 2. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease.....</b>	<b>37</b>
Abstract.....	38
Introduction.....	39
Material and Methods.....	41
Results.....	44
Discussion.....	47
References.....	52
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>63</b>
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1, BoHV-5) são vírus pertencentes à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*. A família *Herpesviridae* possui cerca de 200 espécies de vírus isolados de vários animais, como moluscos, peixes, anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos. A maioria desses agentes é estreitamente associada com a espécie hospedeira. Os alfa herpesvírus apresentam um ciclo de replicação rápido e lítico tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e possuem capacidade de infectar células epiteliais e nervosas, estabelecendo infecção latente em neurônios de gânglios do sistema nervoso (ROIZMAN et al., 1992).

Os herpesvírus possuem vírions pleomórficos, com 150 a 200 nm de diâmetro, genoma DNA de fita dupla linear e envelope lipoprotéico. Os vírions possuem um capsídeo icosaédrico formado por 12 capsômeros pentaméricos e 150 hexaméricos, envoltos por um material amorfo denominado tegumento (ROIZMAN et al., 1992). O envelope viral possui entre 10 e 12 glicoproteínas inseridas na camada lipídica, que possuem papel fundamental nas interações entre os vírions e as células hospedeiras (SCHWYZER; ACKERMANN, 1996). As glicoproteínas mais abundantes presentes no envelope são a gB, gC e gD (THIRY et al., 2006). A gB e a gC são as principais glicoproteínas envolvidas no processo de adsorção dos vírions à superfície das células hospedeiras (CHOWDHURY, 1995).

A gC é uma glicoproteína não-essencial, cuja sequência de aminoácidos apresenta pouca identidade entre o BoHV-1 e o BoHV-5 (DELHON et al., 2003) e aparentemente possui um importante papel na modulação da neurovirulência em coelhos (CHOWDHURY, 1995). Além da gC, a gE e a US9 também são associadas ao fenótipo neurovirulento do BoHV-5 (CHOWDHURY et al., 2000a; 2000b; 2002; AL-MUBARAK et al., 2007).

Durante a infecção lítica, as proteínas dos herpesvírus são expressas em três fases, denominadas IE (*immediate-early*), E (*early*) e L (*late*). As proteínas produzidas na fase IE estão envolvidas em funções iniciais da infecção viral, como a regulação da expressão dos demais genes virais. As principais proteínas produzidas na fase IE são as bICP (*bovine infected cell protein*) bICP0, bICP4 bICP22 e a proteína *cir* (KOPPEL et al., 1997). Dentre as proteínas IE, a melhor caracterizada é a bICP0, uma proteína com *motif* de *zinc finger* com 97kDa, cuja principal função é transativar vários genes virais, sendo essencial para a produção de progênie viral em células de cultivo (KOPPEL et al., 1997). O mecanismo de ação

detalhado das proteínas produzidas na fase IE ainda não é bem conhecido, mas sabe-se que são proteínas multifuncionais, que interagem com diversos genes e proteínas virais e celulares (SAYDAM et al., 2006).

Uma importante propriedade dos herpesvírus é a capacidade de estabelecer infecção latente (JONES, 2003). A latência é um mecanismo que possibilita a permanência do vírus em seus hospedeiros sem multiplicação viral. Nos alfa herpesvírus, o DNA viral latente permanece na forma episomal no núcleo das células infectadas e pode ser detectado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ou por hibridização *in situ*. Durante a latência, a expressão gênica é limitada e o único transcrito expresso no BoHV-1 é o transcrito associado a latência (LR, *latency related transcript*) (ROCK, 1994; JONES et al., 2006). Proteínas virais não são produzidas de forma abundante, entretanto existem evidências de produtos identificados durante a latência do BoHV-1 (HOSSAIN et al., 1995; MEYER et al., 2007).

A reativação da infecção latente, geralmente acompanhada de excreção viral, pode ocorrer naturalmente em casos de estresse, ou pode ser induzida experimentalmente pela aplicação de corticosteroides (CARON et al., 2002; VOGEL et al., 2004). Após a reativação, o vírus volta a replicar nos gânglios sensoriais e é transportado na direção anterógrada para os sítios primários de replicação, onde replica produtivamente e é excretado (ROCK, 1994). A reativação pode ocorrer acompanhada ou não de recrudescência clínica (CARON et al., 2002; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2004).

O BoHV-1 e o BoHV-5 compartilham propriedades biológicas, antigênicas e moleculares, e os seus genomas apresentam uma homologia de aproximadamente 85% de nucleotídeos (DELHON et al., 2003). Durante muitos anos, essas semelhanças representaram dificuldades para a classificação taxonômica, diagnóstico e para o estudo da epidemiologia desses agentes, pois impossibilitavam a sua diferenciação por testes virológicos e sorológicos de rotina (BRATANICH et al., 1991; KUNRATH et al., 2004; VOGEL et al., 2004). A diferença mais marcante entre esses vírus parece ser o potencial neuropatogênico do BoHV-5, uma característica fenotípica que reflete diferenças genéticas e moleculares ainda não esclarecidas (CHOWDHURY, 1995; DELHON et al., 2003).

Apesar da grande similaridade, o BoHV-1 e o BoHV-5 podem ser diferenciados por análise de restrição enzimática do genoma, pelo perfil de polipeptídeos virais produzidos em células de cultivo, pelo perfil de reatividade com alguns anticorpos monoclonais (AcMs) (METZLER et al., 1986; ROEHE et al., 1997; D'ARCE et al., 2002; SOUZA et al., 2002) e

por PCR (ASHBAUGH et al., 1997; ALEGRE et al., 2001). Por meio dessas técnicas, isolados respiratórios de herpesvírus têm sido classificados como BoHV-1.1 e isolados de doença genital como BoHV-1.2 (METZLER et al., 1986; D'ARCE et al., 2002). Os isolados de doença neurológica, anteriormente classificados como BHV-1.3, por suas diferenças moleculares e antigênicas, foram posteriormente reclassificados como BoHV-5 (ROIZMAN et al., 1992).

As amostras identificadas como BoHV-1 estão primariamente associadas com doença respiratória, genital e reprodutiva em bovinos de várias idades, e doença sistêmica em bezerros recém-nascidos (KAHRS, 2001). O BoHV-5 tem sido isolado principalmente de casos de doença neurológica em bovinos, sobretudo em animais jovens (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002). No entanto, a associação desses vírus com as respectivas manifestações clínicas parece não ser exclusiva e mutuamente excludente. O BoHV-5 já foi detectado em casos de doença respiratória natural (CARRILLO et al., 1983), no sêmen de touros saudáveis (GOMES et al., 2003), no sêmen associado com doença genital (KIRKLAND et al., 2009), em tecidos de fetos abortados (CARRILLO et al., 1983; METZLER et al., 1986) e em órgãos (baço e pulmão) em casos de infecções sistêmicas (SUAREZ-HEILEIN et al., 1993). Além disso, a inoculação experimental do BoHV-5 em bezerros pode resultar em doença respiratória (BELKNAP et al., 1994; VOGEL et al., 2003). O BoHV-1 também já foi detectado no encéfalo de bovinos com ou sem doença neurológica, sugerindo que esse vírus pode estar associado com doença neurológica, ainda que em menor frequência do que o BoHV-5 (FURUOKA et al., 1995; ELY et al., 1996; ROELS et al., 2000; PENNY et al., 2002).

A diferenciação entre o BoHV-1 e o BoHV-5 em nível laboratorial pode ser realizada pela reatividade com anticorpos monoclonais (KUNRATH et al., 2004; OLDONI et al., 2004), por PCR (ASHBAUGH et al., 1997; ALEGRE et al., 2001; CLAUS et al., 2005) e por análise de restrição genômica (D'ARCE et al., 2002). Algumas regiões da gC, que apresentam diferenças entre BoHV-1 e BoHV-5, e que permitem a diferenciação pela variação de extensão dos amplicons obtidos por PCR, podem ser utilizadas para diferenciação entre os tipos virais (ASHBAUGH et al., 1997; CLAUS et al., 2005). Outros trabalhos descrevem a utilização de um PCR baseado no gene da enzima timidina quinase (TK) isoladamente (MOORE et al., 2000), amplificação de uma região do gene da TK associada com restrição

enzimática do amplicon (D'OFFAY et al., 1995), ou ainda amplificação de uma região do gene da TK associada com uma sequência do gene da gD (ALEGRE et al., 2001).

A sequência completa do genoma do BoHV-1 foi obtida a partir da composição de cinco genomas de diferentes isolados sequenciados parcialmente (Jura, K22, Cooper, P8-2, 34). Em 2003, foi sequenciado o genoma completo do isolado SV-507/99, uma amostra de BoHV-5 proveniente de um caso de meningoencefalite no Sul do Brasil (DELHON et al., 2003).

O genoma desses vírus é composto por uma molécula de DNA fita dupla com 135.872 pb no BoHV-1, e 138.890 pb no BoHV-5, com conteúdo de GC de 75% e 72%, respectivamente (DELHON et al., 2003). Os genomas apresentam organização do tipo D, e possuem dois segmentos: uma sequência única longa (L ou U<sub>L</sub>) e uma sequência única curta denominada segmento S (S ou U<sub>s</sub>). O segmento S é flanqueado por sequências repetidas e invertidas (*repeats*) e por elementos terminais (TR, *terminal repeats*) com 12.109 pb cada (DELHON et al., 2003).

O BoHV-5 possui 72 genes, sendo 68 em cópia simples, codificados pelas regiões únicas, e dois genes na região dos *repeats*, com cópia dupla (bICP4 e bICP22) (DELHON et al., 2003). A maioria das proteínas do BoHV-5 é similar às homólogas do BoHV-1, apresentando 82% de similaridade geral. Todas as ORFs do BoHV-5 foram identificadas no BoHV-1, e apenas a UL0.5 do BoHV-1 ainda não foi identificada no BoHV-5 (DELHON et al., 2003).

Dentre os genes da região UL do BoHV-5, os UL49, UL44, UL24, UL11, UL3.5, UL3, UL0.7, LR e bICP0 são os menos conservados em relação ao BoHV-1 (DELHON et al., 2003). A UL44, que codifica o gene da gC, apresenta apenas 75% de identidade entre BoHV-1 e BoHV-5 (DELHON et al., 2003), e por essa razão essa glicoproteína tem sido utilizada para diferenciação entre os dois vírus por PCR (ASHBAUGH et al., 1997; CLAUS et al., 2005). Estudos de restrição enzimática realizados com o genoma do BoHV-1 e BoHV-5 demonstraram que as diferenças entre os genomas desses agentes são pequenas e, aparentemente, devidas à mutações pontuais (ENGELS et al., 1986).

A análise comparativa do genoma do BoHV-1 e BoHV-5 evidenciou diferenças em três proteínas regulatórias, bICP0, bICP4, bICP22, além de diferenças no gene associado à latência (LR) e na glicoproteína C (DELHON et al., 2003). Além desses genes, diferenças pontuais em alguns genes detectadas entre isolados de BoHV-1 e BoHV-5, principalmente em

glicoproteínas e proteínas do envelope, têm sido associadas com a diferença na neurovirulência entre esses dois agentes (CHOWDHURY et al., 1997; 2000a; b; 2002).

Além do envolvimento do BoHV-1 com doença respiratória e reprodutiva, existem alguns relatos de isolamento desse agente do encéfalo, associado ou não com sinais neurológicos em bovinos (D'OFFAY et al., 1993; MAGYAR et al., 1993; FURUOKA et al., 1995; ELY et al., 1996; ROELS et al., 2000; PENNY et al., 2002). No entanto, o isolamento do vírus do sistema nervoso não indica necessariamente o envolvimento do agente com doença neurológica. Estudos retrospectivos com isolados provenientes de diferentes tecidos e apresentações clínicas detectaram o BoHV-1 no encéfalo, associado ou não com quadros neurológicos (D'OFFAY et al., 1993; MAGYAR 1993; SUAREZ-HEINLEIN et al., 1993; ELY et al., 1996).

Sete dentre nove isolados de encéfalo de bovinos com faringite, traqueíte, pneumonia, diarreia e morte súbita foram identificados como BoHV-1 (D'OFFAY et al., 1993). Em nenhum desses casos os animais apresentavam sinais neurológicos, e nenhuma alteração histológica foi observada no encéfalo. Em alguns desses casos, o vírus pôde também ser recuperado de outros órgãos sugerindo que o vírus foi detectado como um achado circunstancial, sem associação direta com a doença (D'OFFAY et al., 1993). O uso de anticorpos monoclonais e a técnica de imunoperoxidase também identificaram um isolado de BoHV-1 associado com doença neurológica em bovinos, a partir de um total de oito isolados de encéfalo (SUAREZ-HEINLEIN et al., 1993). Amostras de DNA de tecidos emblocados em parafina foram utilizados para classificação do BoHV por análise de restrição, e a partir de 33 amostras oriundas de animais com diferentes apresentações clínicas, dois casos eram provenientes de doença neurológica, sendo um deles identificado como BoHV-1 (MAGYAR et al., 1993).

Um caso natural de meningoencefalite causada por BoHV-1 em um bovino adulto foi descrito (ROELS et al., 2000). Nesse caso, o vírus foi isolado do encéfalo, e identificado como BoHV-1 por análise de restrição. O uso de uma vacina viva atenuada de BoHV-1 induziu um surto de meningoencefalite em bovinos, em que 20 animais apresentaram sinais clínicos e desenvolveram alterações macroscópicas e histológicas compatíveis com as observadas para BoHV-5 (FURUOKA et al., 1995). Em outro relato, casos de encefalite associado com doença neurológica em bovinos neonatos no Reino Unido foram identificados como sendo causados pelo BoHV-1 (PENNY et al., 2002).

Os alfa herpesvírus podem infectar uma variedade de células epiteliais, que se constituem nas principais células-alvo para a replicação viral *in vivo*. Apesar de alguns desses vírus possuírem neurotropismo e neurovirulência marcantes (METTENLEITER, 2003), as bases moleculares para essas propriedades ainda não estão completamente esclarecidas. Entretanto, alguns fatores da célula hospedeira e dos genes virais estão associados ao processo de invasão e replicação no SNC e no desenvolvimento de doença neurológica (ABRIL et al., 2004; AL-MUBARAK; CHOWDHURY, 2004; CHOWDHURY, 1995; CHOWDHURY et al., 2000a; b; 2002; METTENLEITER 2003; DEL MEDICO et al., 2009).

Os genes que codificam proteínas associadas à neurovirulência em alfa herpesvírus podem ser classificados em três grupos: genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico, fatores moduladores da resposta imune e glicoproteínas virais (DEL MEDICO et al., 2009). Em HSV-1, a principal gene associado à neurovirulência é o ICP34.5, entretanto esse gene não está presente no genoma do BoHV-5 (DELHON et al., 2003). Dentre as proteínas virais mais frequentemente associadas com a neurovirulência do BoHV-5 estão a gC (CHOWDHURY, 1995) e a gE (AL-MUBARAK et al., 2004) e a proteína de tegumento US9 (CHOWDHURY et al., 2002). A deleção de gI, gE e US9 resulta em atenuação do vírus. Os animais inoculados com esse triplo mutante não desenvolvem doença neurológica após inoculação intranasal e a excreção viral é reduzida quando comparada ao vírus parental. (HUBNER et al., 2005).

A gC é uma glicoproteína transmembrana do tipo I presente no envelope viral. A gC está envolvida na penetração dos virions nas células, mediando a ligação das partículas virais com os receptores do tipo heparan sulfato presentes na membrana celular das células alvo (CHOWDHURY, 1997). A substituição da gC do BoHV-1 pela gC do BoHV-5 não afetou a capacidade de ligação do vírion ao receptor, entretanto a qualidade da ligação foi alterada, o que pode modular a capacidade do vírus se disseminar no SNC (LIMAN et al., 2000). O BoHV-5 recombinante contendo a gC do BoHV-1 replica com menor eficiência no SNC e não recupera o fenótipo neurovirulento do BoHV-5 parental. Isso indica que a gC pode regular o neurotropismo de BoHV-5 e é importante para a neurovirulência, entretanto não é essencial e determinante desse fenótipo (CHOWDHURY et al., 2000a).

Devido à sua baixa similaridade de nucleotídeos e identidade de aminoácidos, a gC e o seu gene codificante tem sido utilizados em técnicas antigênicas e moleculares para a



diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 (SRIKUMARAN et al., 1990; ASHBAUGH et al., 1997; SILVA et al., 2007a; b).

Os experimentos descritos nesta tese tiveram como objetivo realizar uma identificação molecular de isolados de BoHV-1 e BoHV-5. O Capítulo 1 descreve a identificação e diferenciação molecular de isolados de BoHV submetidos ao diagnóstico no Setor de Virologia da UFSM entre 1987 e 2006. No Capítulo 2, cinco amostras de BoHV-1 provenientes de casos de doença neurológica em bovinos foram caracterizadas em nível molecular e antigênico, comprovando a sua identidade.

## **2 CAPÍTULO 1**

### **Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987- 2006)**

Mariana Sá e Silva, Mário Celso Sperotto Brum, Rudi Weiblen e Eduardo Furtado Flores

Artigo publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira  
Pesq. Vet. Bras. 27(10):403-408, outubro 2007.

**Trabalho 1018 LD**

**Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987- 2006)<sup>1</sup>**

Mariana Sá e Silva<sup>2</sup>, Mário Celso Sperotto Brum<sup>2</sup>, Rudi Weiblen<sup>3</sup> e Eduardo Furtado Flores<sup>3\*</sup>

**ABSTRACT.-** Silva M.S., Brum M.C.S., Weiblen R. & Flores E.F. 2007. [**Identification and differentiation of herpesvirus types 1 and 5 isolated from clinical samples in central-southern Brazil, Argentina and Uruguay (1987-2006).**] 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* 27(10):403-408. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: [flores@ccr.ufsm.br](mailto:flores@ccr.ufsm.br)

Bovine herpesviruses types 1 and 5 (BoHV-1; BoHV-5) are genetically and antigenically closely related such they can not be distinguished by routine diagnostic tests. As BoHV-1 has been historically associated with respiratory and genital disease, herpesviruses isolated from these clinical syndromes have been tentatively – and sometimes definitively - diagnosed as BoHV-1. Likewise, cases of herpetic neurological infection in cattle have been generally attributed to BoHV-5. This study reports the identification of 40 herpesvirus isolates from different clinical specimens and syndromes in central-southern Brazil, Argentina and Uruguay (1987 – 2006) by the use of a PCR able to differentiate between BoHV-1 and BoHV-5. BoHV-1 isolates (n=16) were identified in cases of respiratory disease (n=3), vulvovaginitis and/or balanoposthitis (n=3), in semen of healthy bulls (n=5) and in cases of neurological

---

<sup>1</sup> Recebido em 4 de abril de 2007.

Aceito para publicação em 25 de maio de 2007

<sup>2</sup> Doutorando em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

<sup>3</sup> Depto Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

\*Autor para correspondência: [flores@ccr.ufsm.br](mailto:flores@ccr.ufsm.br)

disease (n=5). Viruses identified as BoHV-5 (n=24) were isolated predominantly from cases of neurological disease (n=21), but also from semen of healthy bulls (n=2) and from a spleen of a calf with systemic disease (n=1). These results show that both BoHV-1 and BoHV-5 are not strictly associated with their respective diseases; yet are frequently involved in clinical conditions otherwise attributed to the other virus. These findings also reinforce the need of correctly identifying the herpesvirus isolates as to better understand their pathogenesis and epidemiology.

INDEX TERMS: Bovine herpesvirus, BoHV-1, BoHV-5, differential diagnosis, epidemiology.

**RESUMO.-** Os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1; BoHV-5) são genética e antigenicamente muito semelhantes e por isso são indistinguíveis pela maioria dos testes diagnósticos. Como o BoHV-1 tem sido classicamente associado com doença respiratória e genital, os herpesvírus isolados dessas enfermidades têm sido provisoriamente – e às vezes definitivamente – identificados como BoHV-1. Da mesma forma, os casos de infecção neurológica por herpesvírus em bovinos têm sido atribuídos em sua totalidade ao BoHV-5. Este trabalho relata a identificação de 40 amostras de herpesvírus isoladas de diferentes casos clínicos na região Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai entre 1987 e 2006, pelo uso de um PCR capaz de diferenciar esses vírus. As amostras identificadas como BoHV-1 (n=16) foram isoladas de doença respiratória (n=3), balanopostite e/ou vulvovaginite (n=3), do sêmen de touros saudáveis (n=5) e de casos doença neurológica (n=5). As amostras virais identificadas como BoHV-5 (n=24) foram em sua maioria isoladas de doença neurológica (n=21), mas também do sêmen de touros saudáveis (n=2) e do baço de um bezerro com doença sistêmica (n=1). Esses resultados demonstram que tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 não estão estritamente associados às suas respectivas síndromes clínicas e que podem estar frequentemente envolvidos em casos clínicos classicamente atribuídos ao outro vírus. Esses achados também reforçam a necessidade de se identificar corretamente os isolados de herpesvírus para um melhor conhecimento da sua patogenia e epidemiologia.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Herpesvírus bovino, BoHV-1, BoHV-5, diagnóstico diferencial, epidemiologia.

## INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1; BoHV-5) pertencem à família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae, gênero *Varicellovirus* e são geneticamente e antigenicamente muito semelhantes (Roizman et al. 1992). O BoHV-1 possui distribuição mundial, enquanto casos de meningoencefalite por BoHV-5 têm sido principalmente diagnosticados no Brasil (Weiblen et al. 1989, Salvador et al. 1998, Colodel et al. 2002, Rissi et al. 2006) e Argentina (Carrilo et al. 1983, Schudel et al. 1986). O BoHV-1 é considerado um dos agentes virais mais importantes de bovinos e tem sido associado historicamente com doença respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina, IBR), genital (vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa, IPV/IBP), reprodutiva e abortos (Kahrs 2001). O BoHV-5 foi reconhecido como uma espécie viral há poucos anos – antes era considerado um subtipo do BoHV-1 – e tem sido associado com surtos de meningoencefalite em bovinos.

O BoHV-1 e o BoHV-5 compartilham diversas propriedades biológicas, antigênicas e moleculares e apresentam uma homologia de aproximadamente 85% no genoma (Delhon et al. 2003). Durante muitos anos, essas semelhanças representaram dificuldades para a classificação taxonômica, diagnóstico e epidemiologia desses agentes, pois impossibilitavam a distinção dos mesmos por testes virológicos e sorológicos de rotina (Bratanich et al. 1991, Roehe et al. 1997, Vogel et al. 2002, Kunrath et al. 2004). A diferença mais marcante entre esses vírus parece ser o potencial neuropatogênico distinto, uma característica fenotípica que reflete diferenças genéticas e moleculares ainda não esclarecidas (Chowdhury 1995, Delhon et al. 2003).

Apesar da grande similaridade, o BoHV-1 e o BoHV-5 podem ser diferenciados por análise de restrição enzimática do genoma, pelo perfil de polipeptídeos virais produzidos em células de cultivo, pela distinta reatividade com alguns anticorpos monoclonais (AcMs) e por testes de neutralização cruzada *in vitro* (Engels et al. 1986, Metzler et al. 1986, Bratanich et al. 1991, Roehe et al. 1997, D'Arce et al. 2002, Souza et al. 2002). Por meio dessas técnicas, isolados respiratórios de herpesvírus têm sido classificados como BoHV-1.1; os isolados de

doença genital, como BoHV-1.2 (Metzler et al. 1986, D'arce et al. 2002); e os isolados de doença neurológica, pelas suas diferenças moleculares e antigênicas, como BoHV-5 (Roizman et al. 1992).

As amostras identificadas como BoHV-1 estão primariamente associadas com doença respiratória, genital e reprodutiva em bovinos de várias idades e doença sistêmica em bezerros recém-nascidos (Kahrs 2001). O BoHV-5 têm sido isolado principalmente de casos de doença neurológica fatal em bovinos, sobretudo em animais jovens (Salvador et al. 1998, Colodel et al. 2002). No entanto, a associação desses vírus com as respectivas manifestações clínicas parece não ser exclusiva e mutuamente excludente. O BoHV-5 já foi detectado em casos de doença respiratória natural (Carrillo et al. 1983), no sêmen de touros saudáveis (Gomes et al. 2003), em tecidos de fetos abortados (Carrillo et al. 1983, Metzler et al. 1986) e em órgãos (baço e pulmão) em casos de infecções sistêmicas (Suarez et al. 1993). Além disso, a inoculação experimental do BoHV-5 em bezerros resulta em doença respiratória (Belknap et al. 1994, Vogel et al. 2004). O BoHV-1 também já foi detectado no encéfalo de bovinos, com ou sem doença neurológica sugerindo que o mesmo possa estar associado com doença neurológica (Furuoka et al. 1995; Ely et al. 1996, Roels et al. 2000, Penny et al. 2002).

A similaridade genotípica e fenotípica entre esses dois vírus pode acarretar em implicações epidemiológicas. Nesse sentido, a disponibilidade de técnicas para diferenciar os dois vírus, bem como uma delimitação mais precisa das manifestações clínicas associadas a cada um deles são importantes para o diagnóstico e controle dessas infecções.

O presente trabalho teve como objetivo identificar 40 amostras de herpesvírus obtidas de bovinos com diferentes afecções clínicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta amostras de herpesvírus bovino oriundas de casos clínicos em quatro estados brasileiros (MS, RJ, RS e SP), Uruguai e Argentina entre 1987-2006 foram submetidas a um PCR desenvolvido para diferenciar BoHV-1 de BoHV-5 (Ashbaugh et al.1997). A utilização de dois *primers* específicos para a região codificante do gene da glicoproteína C (gC) resulta

na amplificação de um produto de 653 pares de bases (pb) para o BoHV-1 e de 589 pb para o BoHV-5 permitindo assim a diferenciação desses.

### **Células e vírus**

As informações sobre a origem das amostras analisadas estão apresentadas no Quadro 1. Em 40 casos, os vírus foram identificados como herpesvírus pelo efeito citopático (ECP) típico produzido nos cultivos celulares, seguido de identificação com anticorpos policlonais (conjugados) ou monoclonais (AcMs) em técnicas de detecção de antígenos (imunofluorescência - IFA ou imunoperoxidase). A obtenção de DNA genômico viral para posterior amplificação e análise se deu a partir de isolados amplificados em células de linhagem de rim bovino (CRIB; Flores & Donis 1996). Cepas de referência de BoHV-1 (Cooper) e BoHV-5 (SV-507/99) foram utilizadas como controle.

### **Extração de DNA e protocolo do PCR**

Para a obtenção do DNA viral, células CRIB cultivadas em frascos de 25cm<sup>2</sup> foram inoculadas com 1 m.o.i. (multiplicidade de infecção) de cada vírus e coletadas por centrifugação quando o ECP atingia aproximadamente 80% do tapete. O DNA total foi extraído do sedimento celular utilizando-se o reagente DNazol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Cada reação de PCR utilizou aproximadamente 1,5 µl do DNA total extraído de células infectadas e 48,5µl de um mix contendo 15pmol dos *primers*; 5µl de cada dNTP a 10 mM, 10% de DMSO, 5µl de tampão de reação 10X e 1UI da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen). Os *primers* utilizados foram: *forward* 5'-GCGGGGGCTCGCCGAGGA-3' e *reverse* 5'-GGGAGCGCACGGTCAGGGGC-3'. Esse par de *primers* é complementar a seqüências localizadas na região codificante do gene da glicoproteína C (gC). A sua utilização em PCR resulta na amplificação de um segmento de 653pb para o BoHV-1 e 589pb para o BoHV-5 (Ashbaugh et al. 1997). As condições utilizadas no PCR adaptadas das descritas por Ashbaugh et al. 1997 foram: 94°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de denaturação (94°C, 50 s), anelamento (60°C, 55 s) e extensão (72° C, 1min). Os produtos da reação foram analisados sob luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. O DNA total extraído de células infectadas

com as cepas padrão Cooper e SV-507/99 foi utilizado como controle. O controle negativo se constituiu de DNA total extraído de células CRIB não infectadas. Os produtos de PCR dos isolados de BoHV-1 provenientes de doença neurológica, e do BoHV-5 isolado do baço e sêmen foram submetidos a seqüenciamento. As seqüências obtidas foram comparadas, pelo *Blast*, com seqüências do BoHV-1 e BoHV-5 depositadas no GenBank (dados não apresentados).

## RESULTADOS

A amplificação da região alvo do gene da gC a partir do DNA genômico de cada isolado resultou em amplicons de 653 ou 589 pb. O produto de 653 pb corresponde ao segmento amplificado do genoma do BoHV-1 e apresentou o mesmo padrão de migração que o produto amplificado da cepa padrão Cooper (Fig.1). O produto obtido pela amplificação do segmento genômico dos isolados de BoHV-5 possuía 589pb e apresentou migração idêntica ao produto obtido da cepa padrão SV-507/99 (Fig.1). Apenas uma banda (589 ou 653pb) foi obtida pela amplificação do DNA de cada isolado, e as bandas de cada grupo de isolados não apresentaram variação de migração entre si (dados não apresentados). Esses resultados demonstram que o protocolo utilizado permite a amplificação específica de um fragmento de DNA do genoma cuja extensão varia entre o BoHV-1 e BoHV-5, permitindo a distinção entre os dois vírus com base na extensão do produto obtido.

O Quadro 1 apresenta os resultados da identificação dos isolados com base no PCR diferencial e as informações referentes ao local de origem, material submetido para o diagnóstico e condição clínica associada com as respectivas amostras. Dentre as 40 amostras analisadas, 26 (65%) foram isoladas ou detectadas no encéfalo de bovinos que apresentaram doença neurológica na forma de surtos ou de casos isolados. Dentre as 26 amostras isoladas de doença neurológica, 21 (80,7%) foram identificadas como BoHV-5 e cinco (19,3%) como BoHV-1. Duas amostras de BoHV-5 (CE 05-18 e CE 05-63) também foram identificadas entre os vírus isolados do sêmen de touros de centrais de inseminação artificial, procedimento de rotina para o monitoramento contínuo da qualidade e inocuidade do sêmen. Um herpesvírus isolado do baço de um bezerro com histórico de crescimento retardado e susceptibilidade a infecções também foi identificado como BoHV-5.



As três amostras isoladas de doença respiratória e os três isolados de doença genital foram identificadas como BoHV-1. A identidade dos cinco isolados de BoHV-1 associados com doença neurológica (SV-1613/93, SV-299/03, SV-609/03, SV-47/05 e SV-63/06), das amostras de BoHV-5 isoladas do sêmen (CE 05-18 e CE 05-63) e do baço (002/00) foi confirmada pelo seqüenciamento dos respectivos amplicons, seguido de alinhamento com as seqüências dos respectivos vírus depositadas no GenBank (dados não apresentados).

Os resultados obtidos demonstram que tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 podem estar associados a quadros clínicos diferentes daqueles classicamente atribuídos a cada tipo viral, reforçando a necessidade de se proceder à correta identificação e diferenciação dos herpesvírus isolados de diferentes síndromes clínicas.

## DISCUSSÃO

Este artigo relata a identificação e diferenciação mais abrangente de amostras de herpesvírus bovinos realizada no Brasil até o presente, envolvendo 35 isolados brasileiros, três uruguaio e dois argentinos. Os resultados deste estudo demonstram que o tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 estão freqüentemente associados com manifestações clínicas que não aquelas classicamente atribuídas a cada uma destas espécies virais. Dentre os achados mais interessantes – e até certo ponto surpreendentes – está a associação do BoHV-1 com casos de doença neurológica (5 em 26 casos, 19,3%), historicamente atribuídos ao BoHV-5. A presença freqüente do BoHV-5 no sêmen de touros de centrais de inseminação artificial também merece destaque. Esses achados reforçam a necessidade de se identificar corretamente esses vírus após a sua detecção em amostras clínicas. A identificação e diferenciação destes vírus são de fundamental importância para o conhecimento de sua patogenia e epidemiologia.

Após aproximadamente duas décadas de confusão taxonômica e de nomenclatura, o BoHV-1 e o BoHV-5 foram classificados como duas espécies virais distintas (Roizman et al. 1992), devido a pequenas diferenças genéticas/moleculares e antigênicas (Engels et al. 1986, Metzler et al. 1986, Schudel et al. 1986). Além disso, pequenas diferenças detectadas entre amostras do BoHV-1 levaram a uma subdivisão: os isolados de doença respiratória foram classificados como BoHV-1.1 e aqueles envolvidos com doença genital foram denominados BoHV-1.2 (Miller et al. 1991, Suarez et al. 1993). Posteriormente, outras subdivisões foram

propostas (BoHV-1.2a e b) com bases em diferenças genômicas e antigênicas, porém ainda sem associação definitiva com parâmetros clínico-patológicos e/ou epidemiológicos (Engels et al. 1986, Miller et al. 1991, D'Arce et al. 2002).

A estreita associação geralmente observada entre esses agentes e as respectivas síndromes clínicas, no entanto, pode ter ocasionalmente conduzido a conclusões diagnósticas equivocadas. Essa confusão deve-se à similaridade desses vírus em aspectos biológicos (como replicação em cultivo e ECP indistinguíveis) e antigênicos (reatividade sorológica cruzada por anticorpos policlonais e pela grande maioria dos AcMs), aliada com a dificuldade de se realizar a caracterização molecular a cada novo isolamento (Bratanich et al. 1991, Ashbaugh et al. 1997, Roehe et al. 1997, Oldoni et al. 2004, Vogel et al. 2004). Assim, os herpesvírus isolados de doença respiratória e genital passaram a ser classificados provisoriamente – e às vezes definitivamente – como BoHV-1, mesmo sem confirmação molecular e/ou antigênica de sua identidade. O mesmo ocorreu com a etiologia das infecções neurológicas pelo herpesvírus bovino, que passaram a ser genericamente atribuídas ao BoHV-5. Diante dos resultados do presente trabalho, fica evidente que esses conceitos precisam ser revistos, pois tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 estão associados com condições clínicas que não aquelas tradicionalmente a eles atribuídas.

O protocolo de PCR adaptado de Ashbaugh et al. (1997) permite a detecção e a concomitante identificação do agente, sendo por isso apropriado para o diagnóstico e diferenciação dessas infecções. Durante a padronização do teste, a especificidade da amplificação diferencial BoHV-1/BoHV-5 foi comprovada pela amplificação específica de 40 isolados de BoHV-1 e BoHV-5, previamente caracterizados por outras técnicas (Ashbaugh et al. 1997). Neste trabalho, os autores utilizaram um nested-PCR, com o objetivo de aumentar a sensibilidade para detecção de DNA viral diretamente em amostras clínicas, procedimento desnecessário quando o PCR é realizado a partir do DNA extraído de células inoculadas com o agente, como no caso do presente trabalho.

A região da gC utilizada para amplificação apresenta uma série de pequenas deleções que, no total, resultam em 64 nucleotídeos a mais na seqüência de BoHV-1 em relação ao BoHV-5. Essa diferença permite uma diferenciação precisa entre os dois vírus pela diferença de tamanho dos amplicons, fato observado em todas as amostras por analisadas até o momento em nosso laboratório. A gC é uma das glicoproteínas com menor similaridade entre o BoHV-1 e BoHV-5, com apenas 75% de identidade, enquanto outras como a gB e a gD apresentam

93% e 98% de identidade, respectivamente (Delhon et al. 2003). Esta diferença torna a região um alvo adequado para diferenciação entre os isolados, seja por técnicas moleculares como PCR (Ashbaugh et al. 1997, Claus et al. 2005), ou pelo uso de AcMs específicos para esta glicoproteína (Chowdhury 1995, d'Offay et al. 1995, Oldoni et al. 2004). No presente trabalho, o seqüenciamento dos amplicons obtidos das sete amostras associadas com quadros atípicos também confirmou a especificidade da diferenciação. Da mesma forma, 15 entre as 40 amostras aqui analisadas já haviam sido caracterizadas por outros métodos, como análise de restrição e/ou reatividade com AcMs e apresentaram resultados equivalentes (Roehe et al. 1997, D'arce et al. 2002, Souza et al. 2002, Oldoni et al. 2004).

Apenas um isolado (SV-1613/93) dos 15 já anteriormente caracterizados apresentou discordância com o presente estudo. Esse isolado havia sido reconhecido por um AcM que, a princípio, reagia somente com isolados de BoHV-5 e fracamente com uma cepa de referência do BoHV-1 (Oldoni et al. 2004). Entretanto, as técnicas utilizadas no presente estudo – PCR e seqüenciamento do amplicon – identificaram esse isolado inequivocamente como BoHV-1. O AcM utilizado por Oldoni et al. (2004) possivelmente é direcionado para um epitopo da gC que é conservado entre isolados de BoHV-5 e que apresenta alguma similaridade em determinadas amostras de BoHV-1, podendo assim apresentar reatividade com esses vírus.

Além do protocolo utilizado neste trabalho, outras descrições de diferenciação de BoHV-1 e BoHV-5 por PCR baseadas em regiões com baixa similaridade entre esses vírus foram relatadas. Outra região da gC, que também apresenta deleções que permitem a diferenciação pela variação de tamanho dos amplicons, foi descrita e apresenta uma confiabilidade elevada (Claus et al. 2005). Outros trabalhos descrevem a utilização do gene da timidina kinase (TK) isoladamente (Moore et al. 2000), amplificação de uma região da TK associada com restrição enzimática do amplicon (d'Offay et al. 1995), ou ainda amplificação de região da TK associada com uma seqüência do gene da gD (Alegre et al. 2001). De qualquer forma, a diferenciação de BoHV-1 e BoHV-5 pelo uso de PCR – em protocolos padronizados para uso direto em amostras clínicas ou após o isolamento do vírus em cultivo – apresenta vantagens em relação aos métodos anteriores (análise de restrição enzimática, perfil de polipeptídeos virais). A identificação por AcMs também pode ser adequada para esse propósito desde que se disponha de anticorpos estritamente específicos para cada um destes agentes (Suarez et al. 1993, D'Arce et al. 2002, Souza et al. 2002, Oldoni et al. 2004).

Dentre as 26 amostras oriundas de doença neurológica analisadas, 21 foram identificados como BoHV-5, confirmando a estreita associação desse vírus com meningoencefalite em bovinos. No entanto, cinco isolados de doença neurológica foram identificados como BoHV-1, um achado pouco freqüente até o presente. A identidade desses vírus foi confirmada pelo seqüenciamento e restrição enzimática dos amplicons, por testes de neutralização cruzada e por análise de reatividade com AcMs (Silva et al. 2007). Ou seja, as amostras de herpesvírus isoladas de doença neurológica identificadas pelo PCR no presente estudo são inequivocamente BoHV-1. Embora o BoHV-1 já tenha sido ocasionalmente isolado do encéfalo de bovinos, associado ou não com doença neurológica (d'Offay et al. 1995, Ely et al. 1996, Roels et al. 2000, Penny et al. 2002), o presente estudo demonstra que a freqüência de envolvimento do BoHV-1 com doença neurológica é maior do que anteriormente relatado. Esses achados indicam a necessidade de se considerar sempre o BoHV-1 como suspeito em casos de doença neurológica, embora o BoHV-5 seja o mais freqüentemente envolvido.

Outros achados atípicos do presente estudo foram as amostras de BoHV-5 isoladas do sêmen de touros sadios, embora estudos anteriores já tenham relatado o isolamento do BoHV-5 do sêmen (Gomes et al. 2003). Além da presença do BoHV-5 no sêmen, a detecção desse vírus no baço de um bovino com doença sistêmica provavelmente reflete a capacidade do vírus produzir viremia, mesmo transitória e em baixos níveis. Alguns trabalhos também relataram a detecção do BoHV-5 em outros tecidos, como pulmão, baço e tecidos de fetos abortados (d'Offay et al. 1993, Suarez et al. 1993).

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que tanto o BoHV-1 como o BoHV-5 estão envolvidos com freqüência com condições clínico-patológicas classicamente atribuídas a outra espécie de BoHV. Isso reforça a necessidade de se identificar e distinguir corretamente estes vírus após a sua detecção em amostras clínicas. Nesse sentido, o PCR utilizado no presente estudo demonstrou ser adequado para a identificação e diferenciação entre o BoHV-1 e BoHV-5 e assim pode ser utilizado na rotina de diagnóstico dessas infecções.

**Agradecimentos.-** Aos Drs Paulo M. Roehle, Edwiges Maristela Pituco, Silvia de Oliveira Hübner e Anselmo Odeon pelas amostras virais caracterizadas. E.F.F. e R.W. são bolsistas de

produtividade em pesquisa do CNPq (101666/2004-0, 301339/2004-0); M.S.S. possui bolsa de doutorado da CAPES e M.C.S.B. possui bolsa de doutorado do CNPq.

## REFERÊNCIAS

- Alegre M., Nanni M. & Fondevila N. 2001. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and 5. *J. Vet. Med.* 48:613-621.
- Ashbaugh S.E., Thompson K.E., Belknap E.B., Schultheiss P.C., Chowdhury S. & Collins J.K. 1997. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:387-394.
- Belknap E.B., Collins J.K., Ayers V.K. & Schultheiss 1994. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Vet. Path.* 31:358-365.
- Bratanich A.C., Sardi, S.I., Smitsaart E.N. & Schudel A.A. 1991. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. *J. Vet. Med. B* 38:41-48.
- Carrillo B.J., Ambrogí A., Schudel A.A. Vazquez M., Dahme E. & Pospischil A. 1983. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B* 30:327-332.
- Chowdhury S. 1995. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology* 213:558-568.
- Claus M.P., Alfieri A.F., Folgueras-Flatschart A.V., Wosiacki S.R., Medici K.C. & Alfieri A.A. 2005. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J. Virol. Methods* 128:183-188.
- Colodel E.M., Nakazato L., Weiblen R., Mello R.M., Silva R.R.P., Souza M.A., Filho J.A.O. & Caron L. 2002. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 32:293-298.

- D'Arce R.C.F., Almeida R.S., Silva T.C., Franco A.C., Spilki F., Roehe P.M. & Arns C.W. 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibodies analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Vet. Microbiol.* 88:315-324.
- d'Offay J.M., Mock R.E. & Fulton R.W. 1993. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am. J. Vet. Res.* 54:534-539.
- d'Offay J.M., Ely R.W., Baldwin C.A., Whitenack D.L., Stair E.L. & Collins J.K. 1995. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:247-251.
- Delhon G., Moraes M.P., Lu Z., Afonso C.L., Flores E.F., Weiblen R., Kutish G.F. & Rock D.L. 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.* 77:10339-10347.
- Engels M., Giuliani C., Wild P., Beck T.M., Loepfe E. & Wyler R. 1986. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res.* 6:57-73.
- Ely R.W., d'Offay J.M., Ruefer A.H. & Cash C.Y. 1996. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:487-492.
- Flores E.F. & Donis R. 1995. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine virus diarrhea virus (BVDV) due to a block in viral entry. *Virology* 208:565-575.
- Furuoka H., Izumida N., Horiuchi M., Osame S., & Matsui T. 1995. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. *Acta Neuropathol.* 90:565-571.
- Gomes L.I., Rocha M.A., Souza J.G., Costa E.A. & Barbosa-Stancioli E.F. 2003. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Vet. Res. Commun.* 27:495-504.

- Kahrs R.F. 2001. Infectious bovine rhinotracheitis pustular vulvovaginitis, p.159-170. In: Idem (ed.), *Viral Disease of Cattle*. 2th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Kunrath C.F., Vogel F.S.F., Oldoni I., Flores E.F., Weiblen R., Dezingrini R., Torres F.D. & Pan K.A. 2004. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5). *Ciência Rural*, Santa Maria, 34:1877-1883.
- Metzler A.E., Schudel, A.A. & Engels M. 1986. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch. Virol.* 87:205-217.
- Miller J.M., Whetstone C.A. & Van der Maaten M.M. 1991. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.*52:458-461.
- Moore S., Gunn M. & Walls D. 2000. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Vet. Microbiol.* 75:145-153.
- Oldoni I., Weiblen R., Inkelmann M.A. & Flores E.F. 2004. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37:213-221.
- Penny C.D., Howie F., Nettleton P.F. & Schock A. 2002. Upper respiratory disease and encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine herpesvirus type 1. *Vet. Rec.* 151:89-91
- Rissi D.R., Oliveira F.N., Rech R.R., Pierezan F., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2006. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq. Vet. Bras.* 26:123-132.
- Roehe P.M., Silva T.C., Nardi N.B., Oliveira L.G. & Rosa J.C.A. 1997. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.* 17:41-44.

- Roels S., Charlier G., Letellier C., Meyer G., Schynts F., Kerkhofs P., Thiry E. & Vanopdenbosch E. 2000. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Vet. Rec.* 146:586-588.
- Roizman B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. & Studdert M.J. 1992. The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 123:425-449.
- Salvador S.W.C., Lemos R.A.A., Riet-Correa F., Roehe P.M. & Osorio A.L.A.R. 1998. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 18:76-83.
- Schudel A.A., Carrillo B.J., Wyler R. & Metzler A.E. 1986. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *J. Vet. Med. B* 33:303-310.
- Silva M.S., Brum M.C.S., Weiblen R. & Flores E.F. 2007 Biological, antigenic and molecular characterization of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) isolates associated with neurological disease in cattle. *Vet. Microbiol.* (Submetido)
- Souza V.F., Melo S.V., Esteves P.A., Schmidt C.S., Gonçalves D.A., Schaefer R., Silva T.C., Almeida R.S., Vicentini F., Franco A.C., Oliveira E.A., Spilki F.R., Weiblen R., Flores E.F., Lemos R.A., Alfieri A.A., Pituco E.M. & Roehe P.M. 2002. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.* 22:13-18.
- Suarez A.H., Metzler A.E., Weiblen R., Berrios P. & Schudel A.A. 1993. Molecular characterization of south american bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. *J. Vet. Med. B.* 40:125-130.
- Vogel F.S.F., Flores E.F., Weiblen R. & Kunrath C.F. 2002. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. *Ciência Rural* 32:881-883.
- Vogel F.S.F., Lima M., Flores E.F., Weiblen R., Winkelmann E.R., Mayer S.V., Mazzutti K.C. & Arenhart S. 2004. Replicação e excreção viral durante a infecção aguda e após a reativação da latência induzida por dexametasona em bezerros inoculados com os



herpesvírus bovinos tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). *Ciência Rural*, Santa Maria, 34:1619-1621.

Weiblen R., de Barros C.S., Canabarro T.F. & Flores E.F. 1989. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *Vet. Rec.* 124:666-667.

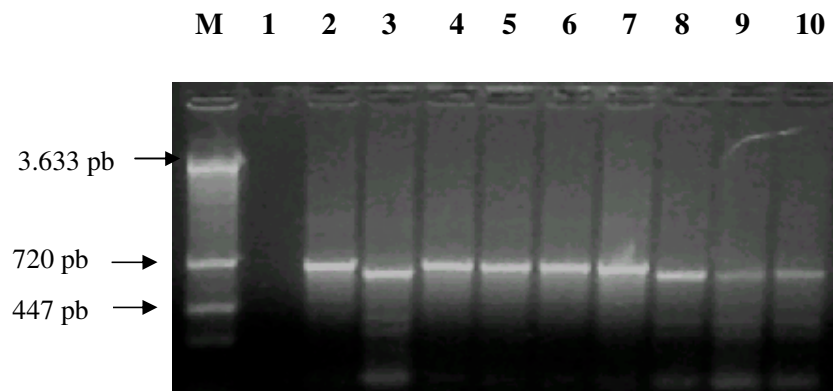
**Quadro 1. Origem, histórico clínico e identificação molecular de amostras de herpesvírus bovino isoladas de espécimes clínicos na região Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai, 1987-2006**

Identificação	Origem	Histórico	Material	PCR gC
Isolados de doença respiratória				
EVI 123/98	MS <sup>a</sup>	Doença respiratória	Suabe nasal	BoHV-1
SV-265/96	RS <sup>b</sup>	Doença respiratória	Suabe nasal	BoHV-1
SV-371/05	RS <sup>b</sup>	Doença respiratória	Suabe nasal	BoHV-1
Isolados de doença genital				
SV-56/90	RS <sup>b</sup>	Balanopostite	Lavado prepucial	BoHV-1
SV-453/93	RS <sup>b</sup>	Vulvovaginite	Suabe vaginal	BoHV-1
SV-169/06	RS <sup>d</sup>	Vulvovaginite	Suabe vaginal	BoHV-1
Isolados de sêmen e outros				
002/00	RS <sup>d</sup>	Doença sistêmica	Baço	BoHV-5
CE05 18	SP <sup>c</sup>	Monitoramento de rotina	Sêmen	BoHV-5
CIAG04 1428	SP <sup>c</sup>	Monitoramento de rotina	Sêmen	BoHV-1
CE05 63	SP <sup>c</sup>	Monitoramento de rotina	Sêmen	BoHV-5
ILAG 1354	SP <sup>c</sup>	Monitoramento de rotina	Sêmen	BoHV-1
ILAG99 1359	SP <sup>c</sup>	Monitoramento de rotina	Sêmen	BoHV-1
ILAG98 2542	SP <sup>c</sup>	Monitoramento de rotina	Sêmen	BoHV-1
ILAG01 2420	SP <sup>c</sup>	Monitoramento de rotina	Sêmen	BoHV-1
Isolados de doença neurológica				
P160/87	RJ <sup>a</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
EVI 88/95	MS	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
EVI 340/96	MS <sup>a</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
EVI 345/96	MS <sup>a</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
P 96/160	RJ <sup>a</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
Uruguai T2	Uruguai <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5

Uruguai T3	Uruguai <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
Uruguai T4	Uruguai <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
97/642	Argentina <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
A 613	Argentina <sup>d</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
ISO 97/45	MG <sup>c</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
ISO 169/96	SP <sup>c</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
SV-136/88	RS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
SV-1613/93	RS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-1
SV-106/98	RS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
SV-507/99	RS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
SV-190/00 A	MS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
SV-55/02	RS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
SV-299/03	RS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-1
SV-609/03	RS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-1
SV-437/04	RS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
SV-47/05	RS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-1
SV-198/05	RS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
SV-41/06	MS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5
SV-63/06	RS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-1
SV-344/06	MS <sup>b</sup>	Doença neurológica	Encéfalo	BoHV-5

As amostras foram isoladas ou cedidas por: <sup>a</sup> Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF-Fepagro); <sup>b</sup> Setor de Virologia, UFSM; <sup>c</sup> Instituto Biológico de São Paulo; <sup>d</sup> Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Fig.1. Amplificação parcial do gene *gC* de BoHV. M: Marcador de massa molecular (p018 clivado com *Bam*HI); Linha 1: controle negativo; Linha 2: Cooper; Linha 3: SV-507/99; Linha 4: SV-265/96; Linha 4: SV-56/90; Linha 5: SV-1613/93; Linha 6: CIAG04 1428; Linha 7: SV 371/05; Linha 8:SV-136/88; Linha 9: 002/00; Linha 10: CE05 18.



### **3 CAPÍTULO 2**

**Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease.**

Silva, M.S.; Brum, M.C.S.; Loreto, E.L.S.; Weiblen, R.; Flores, E.F.

Artigo publicado no periódico Virus Research  
v. 129, p.191–199, 2007.

1  
2 **Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus**  
3 **type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease.**

4 Silva, M.S.<sup>a</sup>; Brum, M.C.S.<sup>a</sup>; Loreto, E.L.S.<sup>b</sup>; Weiblen, R.<sup>a</sup>; Flores, E.F.<sup>a\*</sup>

5 <sup>a</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
6 Santa Maria, RS, Brazil. 97105-900. [flores@ccr.ufsm.br](mailto:flores@ccr.ufsm.br)

7 <sup>b</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil. 97105-900.

8  
9 **Abstract**

10  
11 Bovine herpesviruses type 1 and 5 (BoHV-1; BoHV-5) are closely related yet differ  
12 markedly in their neuropathogenic potential. BoHV-1 isolates have been associated with  
13 respiratory and genital disease whereas BoHV-5 has been consistently isolated from  
14 neurological infection. We report the characterization of five Brazilian BoHV-1 isolates  
15 associated with neurological disease, an unusual finding. All five viruses were isolated from  
16 the brain of cattle presenting neurological disease, yet prominent histological encephalitis was  
17 not observed in three cases. The isolated viruses were identified as BoHV-1 by a glycoprotein  
18 C gene-based PCR able to differentiate BoHV-1 from BoHV-5. The identity of the isolates  
19 was confirmed by nucleotide sequencing of the amplicons and by restriction analysis of PCR  
20 products from another gC region. Monoclonal antibody binding and cross-neutralization  
21 assays with BoHV-1 and BoHV-5 antisera showed a typical BoHV-1 antigenic profile. Lastly,  
22 inoculation of rabbits with these five BoHV-1 isolates did not result in neurological disease,  
23 contrasting with fatal meningoencephalitis produced by BoHV-5. Thus, the involvement of  
24 BoHV-1 in neurological disease of cattle is more frequent than previously reported, indicating  
25 the need for fast and precise means of differentiating it from BoHV-5. Likewise, the potential  
26 role of BoHV-1 in neurological infection in cattle should be further investigated.

1 *Keywords:* bovine herpesvirus type 1; BoHV-1; BoHV-5; meningoencephalitis; genetic  
2 analysis.

3

#### 4 **1. Introduction**

5

6 Bovine herpesvirus types 1 and 5 (BoHV-1; BoHV-5) are closely related viruses  
7 belonging to the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus*  
8 (Roizman, 1992). BoHV-1 is one of the most important pathogens of cattle and is distributed  
9 worldwide, with the exception of a few European countries which eradicated the infection.  
10 This agent has been historically associated with respiratory infection (infectious bovine  
11 rhinotracheitis, IBR), genital disease (vulvovaginitis/pustular balanoposthitis, IPV/IBP) and  
12 abortions (Kahrs, 2001). In contrast, BoHV-5 was recognized as a distinct virus species only a  
13 few years ago – it was previously considered a BoHV-1 subtype (BoHV-1.3) (Roizman,  
14 1992). This virus has been associated with outbreaks of meningoencephalitis in cattle, a  
15 disease highly prevalent in central-southern Brazil (Weiblen et al., 1989; Salvador et al.,  
16 1998) and Argentina (Carrillo et al., 1983; Schudel et al., 1986).

17 The first reports of neurological disease associated with bovine herpesvirus infection  
18 date from 1962 in Australia (Johnston et al., 1962) and the agent was considered a neurotropic  
19 strain of BoHV-1 (French, 1962). The isolate was identified as BoHV-1 based on the  
20 cytopathic effect (CPE) produced in cell cultures and in the reactivity with polyclonal antisera  
21 in a fluorescent antibody assay (French, 1962). Thereafter, several cases of neurological  
22 disease in cattle associated with herpesviruses identified as BoHV-1 were reported in  
23 European countries, Australia, North and South America (Carrillo et al., 1983; Schudel et al.,  
24 1986; Weiblen et al., 1989). These reports reinforced the association of bovine herpesvirus  
25 with neurological infection and disease, and suggested that some BoHV-1 strains would  
26 display a neuropathogenic potential (French 1962; Metzler et al., 1986). Further studies  
27 demonstrated that herpesviruses isolated from respiratory, genital and neurological disease  
28 displayed antigenic and molecular differences (Metzler et al., 1986; Engels et al., 1986/87;  
29 Suarez Heinlen et al., 1993). Subsequently, it was clearly demonstrated that respiratory and

1 neurological herpesvirus isolates could be differentiated based on genomic restriction enzyme  
2 analysis (REA), viral polypeptide profile, reactivity with specific monoclonal antibodies  
3 (MAbs) and neutralization assays (Metzler et al., 1986; Engels et al., 1986/87; Bratanich et  
4 al., 1991; Suarez Heinlen et al., 1993). Thus, based on these analyses, the respiratory and  
5 genital isolates were classified as BoHV-1.1. and BoHV-1.2., respectively; and the  
6 neurovirulent isolates were classified as BoHV-1.3. (Metzler et al., 1986; Engels et al.,  
7 1986/87; Suarez Heinlen et al., 1993). In 1992, the International Committee on Taxonomy of  
8 Viruses (ICTV) recognized the neurovirulent BoHV strains as a distinct virus species,  
9 thereafter named BoHV-5 (Roizman, 1992).

10 In spite of discrete molecular and antigenic differences, BoHV-1 and BoHV-5 are very  
11 similar in many genetic and biological aspects and display a high genomic sequence  
12 homology (Delhon et al., 2003). The main difference between these viruses appears to be the  
13 distinct neuropathogenic potential whose genetic and molecular basis remain under  
14 investigation (Chowdhury, 1995; Chowdhury et al., 1997; 2002). The neurovirulence of  
15 BoHV-5 has been confirmed by a series of experimental studies in cattle, sheep and rabbits  
16 (Belknap et al., 1994; Meyer et al., 1996; Chowdhury et al., 1997; Silva et al., 1999) and by  
17 its frequent involvement in natural cases of meningoencephalitis (Carrillo et al., 1983;  
18 Schudel et al., 1986; Weiblen et al., 1989; Salvador et al., 1998). In contrast, isolates  
19 identified as BoHV-1 have been consistently associated with respiratory and/or genital  
20 infection (Metzler et al., 1986; Suarez Heinlen et al., 1993; Magyar et al., 1993; D'Arce et al.,  
21 2002). Nevertheless, the association of these viruses with their respective clinical syndromes  
22 appears not to be definitive and mutually exclusive. Hence, BoHV-5 has already been  
23 identified among herpesviruses isolated from bovine semen (Gomes et al., 2003); in tissues of  
24 aborted fetuses (Carrillo et al., 1983; Suarez Heinlen et al., 1993) and from several organs of  
25 calves with systemic infection (Suarez Heinlen et al., 1993). Likewise, BoHV-1 has been  
26 occasionally isolated from bovine brain submissions suggesting that it may also be associated  
27 with neurological disease (Magyar et al., 1993; Furuoka et al., 1995; Ely et al., 1996; Roels et  
28 al., 2000; Penny et al., 2002).

29 The present study reports the characterization of five BoHV-1 isolates obtained from  
30 the brain of cattle with neurological disease in Southern Brazil. The isolates were first  
31 identified by a PCR able to differentiate between BoHV-1 and BoHV-5. Their molecular



1 identity was confirmed by sequencing of the amplicons and by another gC-based PCR  
2 followed by REA of the amplicons. The isolates were also characterized antigenically by  
3 MAb binding and virus neutralizing assays; and regarding to their ability to cause  
4 neurological disease in rabbits.

5

## 6 **2. Material and methods**

7

8 Twenty seven bovine herpesviruses isolated from the brain of cattle with neurological  
9 disease in Southern Brazil (1987 – 2007) were submitted to a PCR able to differentiate  
10 between BoHV-1 and BoHV-5. Five neurological isolates identified as BoHV-1 were further  
11 characterized regarding to: i. Nucleotide sequencing of the amplicons; ii. An additional gC-  
12 based PCR followed by REA of the PCR products; iii. Reactivity with selected MAbs, iv.  
13 Neutralization with BoHV-1 and BoHV-5 specific antisera; v. Ability to produce neurological  
14 disease in weanling rabbits upon intranasal inoculation.

15

### 16 *2.1. Viruses and cells*

17

18 The viruses characterized in this study were isolated from brains of cattle submitted to  
19 three veterinary virology laboratories in southern Brazil between 1987 and 2007 with a  
20 history of neurological disease (Table 1). The isolates were originally identified based on the  
21 cytopathic effect (CPE) produced in cell cultures followed by fluorescent antibody assay (FA)  
22 or peroxidase staining (IPX), using polyclonal antibody conjugates or BoHV-specific MAbs.

23 The characterization of these viruses involved an initial step of amplification of the  
24 original isolates. All procedures of virus multiplication, quantitation and virus-neutralizing  
25 assays (VN) were performed in MDBK cells. All steps of virus characterization used BoHV-1  
26 and BoHV-5 reference strains (Cooper and SV-507/99, respectively). SV-507/99 is a virus  
27 isolated from a cow with neurological disease in southern Brazil which had its genome  
28 entirely sequenced (Delhon et al., 2003). These studies also used two other well characterized

1 viruses: strain SV-56/90 (BoHV-1) was isolated from an outbreak of balanoposthitis in  
2 Southern Brazil (Weiblen et al., 1991) and EVI-340/96 (BoHV-5) was isolated from an  
3 outbreak of neurological disease in Central Brazil (D'Arce et al., 2002).

## 4 5 2.2. PCR amplification and nucleotide sequencing

6  
7 Viral DNA for PCR was obtained from MDBK cells infected with each isolate (m.o.i.  
8 of approximately 1). For this purpose, inoculated cells were harvested when the CPE reached  
9 about 80% of the monolayers. Total DNA was extracted from infected cells using DNazol  
10 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol.  
11 Approximately 1µg of total DNA was used as a template in a glycoprotein C gene-based PCR  
12 able to differentiate between BoHV-1 and BoHV-5 (Ashbaugh et al., 1997). The use of  
13 primers (forward 5'-GCGGGGGCTCGCCGAGGA-3' and reverse 5'-  
14 GGAGCGCACGGTCAGGGC-3') results in a 653bp product for BoHV-1 (genome position  
15 17.492-18.144) and a 589 amplicon for BoHV-5 (genome position 18.397-18.986). PCR  
16 conditions were as follows: 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 94°C-50 sec, 60°C-55 sec  
17 and 72°C – 1 min. PCR products were analyzed under UV light after electrophoresis in a 2%  
18 agarose gel stained with ethidium bromide.

19 PCR products were purified using the PureLink PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA,  
20 USA) according to the manufacturer's instructions and submitted to nucleotide sequencing in  
21 a MEGABACE sequencer (Amersham Biosciences). The obtained sequences were analyzed  
22 by the Staden package (Staden, 1996) and aligned using the Clone Manager Professional  
23 Suite, Align plus 5, version 5.10, software (Sci Ed. Central, Cary, NC, USA) and compared  
24 with BoHV-1 gC (accession number Z49223) and BoHV-5 (accession number Z49224)  
25 sequences deposited in GenBank. All the gC obtained sequences were deposited in Genbank  
26 (SV-56/90, accession numbers **EF613331**; EVI-340/96, **EF613332**; SV-1613/93, **EF613333**;  
27 SV-299/03, **EF613334**; SV-609/03, **EF613335**; SV-47/05, **EF613336**; and SV-63/06,  
28 **EF613337**). In all procedures, total DNA extracted from mock-infected MDBK cells and

1 from cells infected with the standard strains and isolates of BoHV-1 and BoHV-5 was used as  
2 control.

3 To further confirm their identity, the isolates were submitted to another gC gene-based  
4 PCR followed by REA of the amplicons (Esteves, 2007). Primers forward (PF 5'-  
5 CGGCCACGACGCTGACGA-3') and reverse (PR 5'-CGCCGCCGAGTACTACCC-3')  
6 were designed to target a 575/572 bp fragment on BoHV-1 and BoHV-5 genomes by  
7 annealing in the genome positions 16.793-17.337 (BoHV-1) and 17.671-18.242 (BoHV-5). In  
8 order to differentiate BoHV-1 from BoHV-5, the amplicons were digested with *Bgl* I (New  
9 England Biolabs, Ipswich, MA – USA) using a standard protocol. The products of the  
10 digestion reactions were submitted to electrophoresis in an 1% agarose gel and visualized  
11 under UV light.

12

### 13 2.3. Antigenic analysis

14

15 The five isolates were characterized antigenically by reactivity with selected BoHV-1  
16 and BoHV-5 MAbs and by virus neutralizing assays (VN). For MAb binding assays, cell  
17 cultures infected with each isolate were submitted to FA using each MAb as primary antibody  
18 and an anti-mouse FITC conjugate antibody (Sigma, Saint Louis, MO) as secondary antibody.  
19 These assays used the following MAbs: BoHV-1 specific 7F12, 11H6 (Roehe et al., 1997)  
20 and 60 (Metzler et al., 1985); BoHV-5-specific 2F9, 1F3 (Oldoni et al., 2004) and 2915  
21 (Metzler et al., 1985). Mock- infected MDBK cells and cells inoculated with Cooper, SV-  
22 56/90, SV-507/99 and EVI-340/96 were used as controls.

23 The VN assays were performed in 96-well plates testing 100TCID<sub>50</sub> of each virus  
24 against two-fold dilutions of BoHV-1 (Cooper) and BoHV-5 (SV-507/99) specific sheep  
25 antisera. After two hours of virus-serum incubation, a suspension of MDBK cells was added  
26 and the plates were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The tests were read after 72h  
27 of incubation. Each assay was performed twice and in triplicates. The VN titers were  
28 considered the reciprocal of the highest serum dilution that prevented production of CPE. The  
29 titers were converted in log<sub>2</sub> to calculate the geometric mean titers (GMT). All assays

1 included the four controls: Cooper and SV-56/90 (BoHV-1); SV-507/99 and EVI-340/96  
2 (BoHV-5).

3

#### 4 *2.4. Rabbit inoculation*

5

6 Groups of four weanling New Zealand rabbits (30-35 days old) were inoculated with  
7 each of the five isolates and with BoHV-1 (Cooper and SV-56/90) and BoHV-5 (SV-507/99  
8 and EVI-340/96). For virus inoculation, rabbits were previously anesthetized with Zoletil  
9 (Tiletamine and Zolazepan - Virbac, SP, Brazil) and inoculated intranasally through the  
10 neprine openings with 1 mL of a virus suspension containing  $10^{7.1}$ TCID<sub>50</sub> divided in the two  
11 nostrils. The animals were monitored for neurological signs on a daily basis for 20 days after  
12 inoculation. Nasal swabs collected every three days up to day 12 pi were submitted to virus  
13 isolation in MDBK cells according to standard protocols. The brains of all animals developing  
14 neurological disease were also submitted to virus isolation. All procedures of animal handling  
15 and experimentation were performed according to recommendations by the Brazilian  
16 Committee on Animal Experimentation (COBEA; law #6.638 of May 8<sup>th</sup>, 1979). The animal  
17 experiments were approved by an Institutional Ethics and Animal Welfare Committee  
18 (Comitê de Ética e Bem Estar Animal, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, approval  
19 # 09/2005; process #23081.013513/2005-72).

20

### 21 **3. Results**

22

#### 23 *3.1 Clinical cases and virus isolates*

24

25 All five viruses were isolated from the brain of cattle presenting a history of  
26 neurological disease. These cases involved single young or adult animals, or affected a  
27 variable number of young cattle (Table 1). In some cases, the veterinarians responsible for the

1 submissions requested diagnosis of rabies. In three cases (SV-609/03, SV-47/05 and SV-  
2 63/06) no gross or histological changes were observed in the examined brain sections. In two  
3 cases (SV-1613/93 and SV-299/03) the examined brains showed histological changes typical  
4 of herpesvirus-induced meningoencephalitis, notably necrotizing encephalitis associated with  
5 intranuclear eosinophilic inclusion bodies in astrocytes and neurons.

6 The viruses were isolated in tissue culture and their identity was initially determined  
7 by FA using either a FITC-conjugated polyclonal antiserum or a pool of MAbs. The use of  
8 these reagents would not allow the differentiation between BoHV-1 and BoHV-5.

9 As these viruses were isolated from the brain of animals with central nervous system  
10 (CNS) disease, they were initially assumed to be BoHV-5. The precise identification of these  
11 viruses as BoHV-1 was only achieved afterwards, by the use of a PCR able to differentiate it  
12 from BoHV-5. Other 22 isolates recovered from brain of cattle with CNS disease were  
13 identified as BoHV-5 by this PCR (not shown). Thus, five out of 27 herpesviruses isolated  
14 from the brain of cattle presenting neurological signs were identified as BoHV-1.

15

### 16 3.2. *Molecular analysis*

17

18 The PCR developed by Ashbaugh et al. (1997) allows the differentiation between  
19 BoHV-1 and BoHV-5 based on the size of the PCR products. As our isolates were amplified  
20 in tissue culture prior to PCR analysis, we skipped the second PCR reaction that was  
21 originally used to increase the sensitivity of the test with diagnostic purposes. By using only  
22 the external pair of gC-gene specific primers, PCR products of two different sizes were  
23 obtained: 653bp for BoHV-1 and 589 for BoHV-5. Among 27 isolates from neurological  
24 disease, 22 viruses yielded a 589bp band, including the well characterized BoHV-5 strains  
25 SV-507/99 and EVI-340/96 (Fig.1). In contrast, PCR amplification of DNA extracted from  
26 cells infected with five neurological isolates resulted in a 653bp amplicons (Fig.1), the same  
27 size expected for BoHV-1. Amplicons of this size were also obtained by amplification of the  
28 reference strains Cooper and SV-56/90.

1 To confirm the molecular identity of the five neurological isolates, we performed two  
2 additional analyses: i. nucleotide sequencing of the amplicons obtained by the BoHV-  
3 1/BoHV-5 differential PCR ii. restriction analysis of a DNA fragment obtained by PCR  
4 amplification of another gC region (Esteves, 2007). The nucleotide sequence of the amplicons  
5 obtained by the differential PCR (Ashbaugh et al., 1997) revealed a high homology with the  
6 sequences of BoHV-1 reference strain deposited in Genbank (Z49223), in contrast with  
7 BoHV-5 sequences (Fig.2). The correspondent region in the BoHV-5 genome contains a  
8 series of small deletions, allowing differentiating it from BoHV-1.

9 REA of the amplicons obtained by the use of another gC-based PCR (see Material and  
10 Methods for the location of the amplified region) with enzyme *Bgl* I showed a restriction  
11 pattern typical of BoHV-1 (Fig. 3). By using this method, digestion of the BoHV-5 in the *Bgl*  
12 I site yielded a 333bp and 239bp fragments. In contrast, amplicons from BoHV-1 isolates do  
13 not contain a *Bgl* I site (Fig.3).

14 Thus, the identity of the five neurological isolates was confirmed by three molecular  
15 methods: i. A gC-based PCR able to differentiate BoHV-1 from BoHV-5 based on the size of  
16 amplified products, ii. Nucleotide sequencing of the amplicons and iii. Restriction *Bgl* I  
17 analyses of products obtained by PCR amplification of a gC region containing differences  
18 between BoHV-1 and BoHV-5.

19

### 20 3.3. Antigenic analysis

21

22 To further characterize the BoHV-1 isolates recovered from the brain submissions,  
23 these viruses were submitted to antigenic analysis by MAb specific binding and VN assays  
24 using BoHV-1 and BoHV-5 specific antisera. The results of the analysis of binding by  
25 selected MAbs is shown on table 2. With the exception of one putatively BoHV-5 specific  
26 MAb (2F9) which recognized the isolate SV-63/06, the five neurological isolates showed an  
27 antigenic profile identical to BoHV-1 reference strains and differed from the BoHV-5 profile.  
28 This MAb has been also shown to bind weakly to antigens of the BoHV-1 strain Los Angeles  
29 (Oldoni et al., 2004).

1           The VN assays testing each isolate and reference strains against sheep antisera raised  
2 against Cooper strain (BoHV-1) and SV-507/99 (BoHV-5) showed a neutralization pattern  
3 clearly closer to BoHV-1 than to BoHV-5 (Fig. 3). An extensive cross-reactivity was  
4 observed among the two antisera and the different viruses tested, yet the highest VN titers  
5 were observed testing each virus against the type-specific antiserum.

6           Thus, both the MAb binding and VN analyses showed that the five neurological  
7 isolates display a typical BoHV-1 antigenic profile.

### 8

9           *3.4. Rabbit inoculation*

10

11           In order to investigate whether the BoHV-1 neurological isolates would produce  
12 neurological disease in rabbits – an ability consistently observed in BoHV-5 isolates – groups  
13 of four weanling rabbits were inoculated intranasally with each isolate plus the reference and  
14 control viruses. Rabbits inoculated with SV-507/99 (4/4) and EVI-340/96 (3/4) developed  
15 typical neurological signs of BoHV-5 meningoencephalitis, characterized by teeth grinding,  
16 opisthotonus, blindness, circling and convulsions. These animals died or were euthanized *in*  
17 *extremis* between days 6 and 10pi. The virus was isolated from the brain of all animals  
18 developing CNS disease by inoculation of brain homogenates into MDBK cells. In contrast,  
19 none of the 28 rabbits inoculated intranasally with each of five isolates (n=4 each group) plus  
20 the BoHV-1 controls (Cooper and SV-56/90) developed neurological disease. Infectious virus  
21 was recovered from nasal swabs collected from these animals demonstrating efficient virus  
22 replication. Thus, none of the five isolates from bovine neurological disease identified as  
23 BoHV-1 displayed an overt neurovirulence for rabbits, contrasting with virtually all BoHV-5  
24 isolates (over 15) tested to date (Flores, E.F. unpublished).

## 25

26           **4. Discussion**

27

1           We herein report the biological and antigenic characterization of five BoHV-1 isolates  
2 recovered from the brain of cattle with neurological disease. The isolates were identified as  
3 BoHV-1 by a PCR designed to differentiate it from BoHV-5 (Ashbaugh et al., 1997) followed  
4 by REA and nucleotide sequencing of PCR products. The characterization of these isolates by  
5 MAb binding and VN assays showed a typical BoHV-1 antigenic profile. Nonetheless,  
6 inoculation of rabbits with each of the five viruses failed to produce neurological disease, an  
7 outcome consistently observed following inoculation of rabbits with BoHV-5 (Meyer et al.,  
8 1996; Chowdhury et al., 1997; Silva et al., 1999; Flores, E.F. unpublished data). These results  
9 demonstrate that the association of BoHV-1 with neurological disease in cattle is more  
10 frequent than previously reported and indicate the need of correctly identifying BoHV field  
11 isolates to better understand their epidemiology and pathogenesis. Likewise, the potential role  
12 of BoHV-1 in neurological infection in cattle should not be neglected and deserves further  
13 investigation.

14           Since the molecular tools for differentiating BoHV-1 from BoHV-5 became available,  
15 a number of retrospective and confirmatory studies have been performed to investigate the  
16 association of these viruses with each particular clinical syndrome. Thus, isolates identified as  
17 BoHV-1 have been consistently identified among viruses isolated from respiratory, genital  
18 disease and abortions, whereas most isolates from neurological disease have been identified as  
19 BoHV-5 (Metzler et al., 1986; Suarez Heinlen et al., 1993; Magyar et al., 1993; Roehe et al.,  
20 1997; D'Arce et al., 2002).

21           In addition to the involvement with the classical IBR and IPV/IPB syndromes, BoHV-  
22 1 isolates have been occasionally detected in the brain of cattle associated or not with  
23 neurological disease (d'Offay et al, 1993; Magyar et al., 1993; Furuoka et al., 1995; Roels et  
24 al., 2000; Penny et al., 2002). The results of some of these studies, however, should be  
25 interpreted cautiously to correctly ascertain their biological significance. The detection of  
26 virus or viral products in the brain does not necessarily mean the involvement of the agent  
27 with the pathology. For example, in a retrospective study d'Offay et al. (1993) reported the  
28 isolation of BoHV-1 from the brain of seven bovine submissions, including cases of  
29 pharyngitis, tracheitis, pneumonia, rumenitis, diarrhea and sudden death. Neurological signs  
30 were not reported in any of these submissions. In most cases, the virus was also recovered  
31 from at least one organ (generally lungs) besides the CNS. Likewise, no histological evidence



1 of encephalitis was observed in the brain of these animals. These data indicate that the  
2 presence of the virus in the brain was probably circumstantial – the virus likely invaded the  
3 CNS as a consequence of primary replication in the upper respiratory tract - and not directly  
4 responsible for the disease. Indeed, experimental data demonstrated that BoHV-1 is able to  
5 reach the brain of cattle following intranasal inoculation, where it usually replicates focally  
6 without further spread (Belknap et al., 1994). This would explain the occasional isolation of  
7 BoHV-1 from the brain of cattle with respiratory infection (d’Offay et al., 1993).

8 In other cases, however, the detection of BoHV-1 in the brain was clearly correlated  
9 with clinical-pathological findings compatible with herpesvirus-induced neurological disease  
10 (d’Offay et al., 1993). In a retrospective study, Magyar et al. (1993) identified a BoHV-1 in  
11 the brain of cattle with neurological disease, but no further clinical-pathological findings were  
12 described. Roels et al. (2000) reported the isolation and molecular characterization of a  
13 BoHV-1 recovered from the brain of an adult cow showing typical signs of CNS disease.  
14 Histological examination of the brain revealed many histological changes usually observed in  
15 BoHV-5-induced meningoencephalitis, albeit neuronal necrosis and intranuclear inclusion  
16 bodies were not observed. Furuoka et al. (1995) described an outbreak of meningoencephalitis  
17 associated with the use of a live attenuated BoHV-1 vaccine in which the clinical and  
18 pathological findings were typical of neurological disease induced by BoHV-5. The virus  
19 isolated from the brain of dead animals showed a REA pattern identical to the parental BoHV-  
20 1 vaccine strain. Penny et al. (2002) described the isolation of BoHV-1 – whose identity was  
21 confirmed by REA - from neonatal beef calves with concomitant upper respiratory and  
22 neurological signs in two different farms.

23 Taken together, these data demonstrated that BoHV-1 has been detected in the brain of  
24 cattle in two main situations: i. In animals presenting clinical conditions other than CNS  
25 disease, notably respiratory signs. In most of these cases the presence of the virus in the brain  
26 seemed to be apparently circumstantial and not directly responsible for the disease; ii. In cattle  
27 affected by neurological disease. This would probably reflect the ability of the virus to  
28 produce widespread neurological infection and disease under some circumstances.  
29 Nonetheless, this distinction is not always clear and, in some cases, it may not be easy to  
30 distinguish spurious/circumstantial from an etiological association. In any case, however,

1 these findings confirmed the ability of BoHV-1 to gain access to and replicate within the brain  
2 of cattle in natural infections.

3 The results of our study reinforce that BoHV-1 may indeed be involved in the  
4 pathogenesis of clinical meningoencephalitis in cattle, otherwise attributed almost exclusively  
5 to BoHV-5. Moreover, our data show that the association of BoHV-1 with CNS disease is  
6 more frequent than previously reported. The spatial and temporal distribution of the cases  
7 reported herein - up to 14 years apart and from different geographical locations - argue against  
8 an epidemiological cluster associated with a particular virus isolate and suggests that similar  
9 cases may sporadically occur in cattle populations where BoHV-1 circulates. In all cases, the  
10 clinical presentation of the disease – as reported by the farmer or veterinarian - was supportive  
11 of neurological disease and compatible with that described in natural outbreaks by BoHV-5.  
12 In three cases (SV-609/03, SV-47/05 and SV-63/06) no significant histological changes were  
13 observed in the examined brains, in spite of the neurological signs and virus isolation. Two of  
14 these cases (SV-609/03 and SV-63/06) affected single, adult animals which presented a  
15 clinical course initially suggestive of rabies. The third case (SV-47/05) was a typical  
16 herpesvirus-induced neurological disease and affected three weanling 6-months-old calves,  
17 which died or were euthanized after a short course of neurological disease accompanied by  
18 severe rhinitis. The remaining cases were typical of herpesvirus-induced CNS disease,  
19 affecting three two-months-old calves (SV-1613/93) or 24 weaned calves (SV-299/03) in  
20 which the clinical and pathological findings were undistinguishable from cases of  
21 meningoencephalitis associated with BoHV-5 (Carrillo et al., 1983; Salvador et al., 1998).  
22 Moderate to severe respiratory disease was also observed in three outbreaks (SV-1613/93,  
23 SV-299/03 and SV-47/05).

24 Even a careful analysis of these five cases or outbreaks do not allow the establishment  
25 of a defined clinico-pathological and epidemiological pattern of disease associated with  
26 BoHV-1. In other words, the epidemiology, clinical course and pathological findings in the  
27 cases of CNS disease associated with BoHV-1 resemble those classically associated with  
28 BoHV-5 infection. As a consequence, the correct etiological diagnosis of CNS disease in  
29 cattle would not preclude the definitive identification of the virus and its differentiation from  
30 its counterpart by molecular and/or antigenic means.

1           The involvement of BoHV-1 in CNS infection and disease – as demonstrated in the  
2 present study – allows envisioning three possible scenarios. First, the association of BoHV-1  
3 with neurological disease may reflect a strain-specific neuropathogenic phenotype. Thus,  
4 some BoHV-1 isolates would present an increased ability to invade and replicate within the  
5 brain and cause neurological disease comparing with most isolates. In our study, the inability  
6 of all five isolates to produce CNS disease in rabbits argues against - yet it does not discard -  
7 this hypothesis, since even BoHV-5 strains vary markedly in their neurovirulence for rabbits  
8 and cattle (Flores, E.F. unpublished). The second possible scenario is that BoHV-1 field  
9 isolates are not inherently neurovirulent and do not vary in their neuropathogenic potential.  
10 Instead, their neuropathogenic potential would be only occasionally expressed, as a result of  
11 specific interactions with the host. Host factors such as age and immunological status, among  
12 others, might influence the outcome of the infection. This would explain why the five isolates  
13 did not produce neurological disease in the inoculated rabbits in spite of being previously  
14 associated with CNS disease in cattle. A third possible scenario accommodates both  
15 hypotheses: some BoHV-1 isolates may be potentially neurovirulent but would only express  
16 this phenotype under special circumstances.

17           It should be mentioned that BoHV-5 has been occasionally isolated from the brain of  
18 cattle suffering from other neurological conditions, such rabies (Spilki et al., 2003) and  
19 poliiencephalomalacia (David et al., 2007). In these cases, the virus was not directly  
20 responsible for the disease yet it likely replicated in the brain as a result of reactivation of  
21 latent infection triggered by the other pathology. Thus, it is possible that BoHV-1 may also be  
22 occasionally isolated from the brain of cattle suffering from neurological disease of an  
23 unrelated etiology.

24           In summary, our results showed that BoHV-1 is more frequently associated with  
25 neurological disease in cattle than previously reported, a syndrome otherwise attributed  
26 almost exclusively to BoHV-5. These findings reinforce the need of correctly identifying  
27 these viruses upon isolation or detection as to better understand their epidemiology and  
28 pathogenesis. Our findings also pave the way for further investigations on the potential role of  
29 BoHV-1 in the pathogenesis of CNS disease in cattle. Finally, these data may pose a question  
30 mark on the main biological property hitherto utilized to distinguish between BoHV-1 and  
31 BoHV-5: the ability to produce neurological disease in cattle.

1

**2 Acknowledgements:**

3

4 E.F. Flores (301666/04-0) and R. Weiblen (301339/04-0) are recipients of CNPq  
5 (Brazilian Council for Research) scholarships. M.S. Silva is recipient of a student fellowship  
6 from CAPES and M.C.S. Brum is recipient of a student fellowship from CNPq. We are  
7 grateful to the students in our lab for helping with the animal experiments. We are also  
8 grateful to Fabricio Campos, Prof. Paulo Roehe from URFGS for a gC-based PCR and RE  
9 analysis; student Paloma Menezes Rubin from UFSM for DNA sequencing. We thank Dr  
10 Norberto Fondevila (Inta, Castelar, Argentina) for providing some MABs.

11

**12 5. References**

13

- 14 Ashbaugh, S.E., Thompson, K.E., Belknap, E.B., Schultheiss, P.C., Chowdhury, S., Collins,  
15 J.K., 1997. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using  
16 a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 387-394.
- 17 Belknap, E.B., Collins, J.K., Ayers, V.K., Schultheiss, P.C., 1994. Experimental infection of  
18 neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Vet. Path.* 31, 358-365.
- 19 Bratanich, A.C., Sardi, S.I., Smitsaart E.N., Schudel, A.A., 1991. Comparative studies of  
20 BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. *J. Vet. Med. B.* 38, 41-48.
- 21 Carrillo, B.J., Pospischil, A., Dahme, E., 1983. Pathology of bovine viral necrotizing  
22 encephalitis in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B.* 30, 161-168.
- 23 Chowdhury S., 1995. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of  
24 respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology.* 213, 558-  
25 568.

- 1 Chowdhury, S.I., Lee, B.J., Ozkul, A., Weiss, M.L., 1997. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein  
2 E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the  
3 rabbit. *J. Virol.* 74, 2094-2106.
- 4 Chowdhury, S.I., Onderci, M., Bhattacharjee, P.S., Al-Mubarak, A., Weiss, M.L., Zhou, Y.,  
5 2002. Bovine herpesvirus (BHV-5) Us9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. *J.*  
6 *Virol.* 76, 3839-3851.
- 7 David, N.P., Hübner, S.O., Riet-Correa, F., Halfen, D., Lemos, R.A., 2007. Reactivation of  
8 latent bovine herpesvirus type 5 in cattle with polioencephalomalacia induced by  
9 ammonium sulfate. *Pesq. Vet. Bras.* In press.
- 10 D'Arce, R.C.F., Almeida, R.S., Silva, T.C., Franco, A.C., Spilki, F., Roehe, P.M., Arns,  
11 C.W., 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibodies analysis of Brazilian  
12 isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Vet. Microbiol.* 88, 315-324.
- 13 d'Offay, J.M., Mock, R.E., Fulton, R.W., 1993. Isolation and characterization of encephalitic  
14 bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am. J. Vet. Res.* 54, 534-  
15 539.
- 16 Delhon, G., Moraes, M.P., Lu, Z., Afonso, C.L., Flores, E.F., Weiblen, R., Kutish, G.F., Rock,  
17 D.L., 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.* 77, 10339-10347.
- 18 Ely, R.W., d'Offay, J.M., Ruefer, A.H., Cash, C.Y., 1996. Bovine herpesviral encephalitis: a  
19 retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *J. Vet.*  
20 *Diagn. Invest.* 8,487-492.
- 21 Engels, M., Giuliani, C., Wiold, P., Beck, T. M., Loepfe, E., Wyler R., 1986/87. The genome  
22 of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared  
23 to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res.* 6,  
24 57-73.
- 25 Esteves, P.A., 2007. Análise da região carboxi-terminal da glicoproteína c (gC) e sua  
26 utilização na diferenciação entre herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5).  
27 Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva/Virologia) – Programa de Pós-  
28 Graduação em Ciências Veterinárias. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande  
29 do Sul, pp.88.

- 1 French, E.L., 1962. Relationship between infectious rhinotracheitis (IBR) virus and a virus  
2 isolated from calves with encephalitis. *Aust. Vet. J.* 38, 555-556.
- 3 Furuoka, H., Izumida, N., Horiuchi, M., Osame, S., 1995. Bovine herpesvirus  
4 meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine.  
5 *Acta Neuropathol.* 90, 565-571.
- 6 Gomes, L.I., Rocha, M.A., Souza, J.G., Costa, E.A., Barbosa-Stacioli, E.F., 2003. Bovine  
7 herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: Amplification and sequence analysis of the *US4*  
8 gene. *Vet. Res. Commun.* 27, 495-504.
- 9 Johnston, L.A.Y., Simmons, G.C., McGavin, M.D., 1962. Viral meningoencephalitis in  
10 calves. *Aust. Vet. J.* April, 207-215.
- 11 Kahrs R.F., 2001. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In:  
12 Kahrs, R.F., *Viral disease of cattle*. Iowa State University Press, Ames, pp.159-170.
- 13 Magyar, G., Tanyi, J., Hornyák, Á., Bartha, A., 1993. Restriction endonuclease analysis of  
14 Hungarian and bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR, IPV and  
15 encephalitis. *Acta Vet. Hung.* 41, 159-170.
- 16 Metzler, A.E., Matile, H.; Gassmann, U. Engels, M., Wyler R., 1985. European isolates of  
17 bovine herpesvirus 1: Comparison of restriction endocuclease sites, polypeptides, and  
18 reactivity with monoconal antibodies. *Arch. Virol*, 85, 57-59.
- 19 Metzler, A. E., Schudel, A. A., Engels, M., 1986. Bovine herpesvirus 1: molecular and  
20 antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease.  
21 *Arch. Virol.* 87, 205-217.
- 22 Meyer, G., Lemaire, M., Lyaku, J., Pastoret, P.P., Thiry, E., 1996. Establishment of a rabbit  
23 model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. *Vet. Microbiol.* 51, 27-  
24 40.
- 25 Oldoni, I., Weiblen, R., Inkelmann, M.A., Flores, E.F., 2004. Production and characterization  
26 of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. *Braz. J. Med. Res.* 37,  
27 213-221.

- 1 Penny, C.D., Howie, F., Nettleton, P.F., Sargison, N.D., Schock, A., 2002. Upper respiratory  
2 disease and encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine herpesvirus type 1. *Vet.*  
3 *Rec.* 151, 89-91.
- 4 Roehe, P.M., Silva, T.C., Nardi, N.B., Oliveira, L.G., Rosa, J.C.A., 1997. Diferenciação entre  
5 o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina  
6 (BHV-5). *Pesq. Vet. Bras.* 17, 41-44.
- 7 Roizman, B., 1992. The family *Herpesviridae*: an update. *Arch. Virol.* 123, 425-449.
- 8 Roels, S., Charlier, G., Letellier, C., Meyer, G., Schynts, F., Kerkhofs, P., Thiry, E.,  
9 Vanopdenbosch, E., 2000. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an  
10 adult cow. *Vet. Rec.* 146, 586-588.
- 11 Salvador, S.C., Lemos, R.A.A., Riet-Correa, F., Roehe, P.M., Osório, A.L., 1998.  
12 Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul  
13 e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 18, 76-83.
- 14 Schudel, A.A., Carrillo, B.J., Wyler, R., Metzler, A.E., 1986. Infections of calves with  
15 antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *J. Vet. Med.*  
16 *B.* 33, 303-310.
- 17 Silva, A.M., Weiblen, R., Irigoyen, L.F., Roehe, P.M., Sur, H.J., Osório, F.A., Flores, E.F.,  
18 1999. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5): acute and  
19 latent infection. *Vet. Microbiol.* 66, 89-99.
- 20 Spilki, F.R., Franco, A.C., Teixeira, M.B., Esteves, P.A., Schaefer, R., Schidt, E., Lemos,  
21 R.A., Roehe, P.M., 2003. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. *Pesq.*  
22 *Vet. Bras.* 23, 1-4.
- 23 Staden, R., 1996. The Staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5, 223-241.
- 24 Suarez Heinlen, A., Metzler, A.E., Weiblen, R., Berrios, P., Schudel, A.A., Rodriguez, M.,  
25 1993. Molecular characterization of South American bovine herpesvirus-1 isolates with  
26 monoclonal antibodies and SDS-PAGE. *J. Vet. Med. B.* 40, 125-130.

- 1 Weiblen, R., Barros, C.S.L., Canabarro, T.F., Flores, E.F., 1989. Bovine meningoencephalitis
- 2 from IBR virus. *Vet. Rec.* 124, 666–667.
  
- 3 Weiblen, R., Kreutz, L.C., Canabarro, T.F., Flores, I.E. Balanoposthitis in bulls due to
- 4 bovine herpesvirus in south Brazil. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 24, 1-3, 1991.
  
- 5



Table 1

Epidemiological and clinico-pathological data of the five neurological isolates identified as bovine herpesvirus 1 (BoHV-1).

Isolate	History and clinical signs	Gross and histological findings
SV-1613/93	Female, two months-old, mixed breed. Three calves developed nasal and ocular discharge, opisthotonus, dehydration and dysphagia. One calf died, another was necropsied and the third recovered.	Macroscopic: none. Histology: necrotizing meningoencephalitis associated with eosinophilic intranuclear inclusion bodies in astrocytes and neurons.
SV-299/03	Female, nine months-old, mixed breed. Twenty four weaned calves developed depression, fever, blindness, teeth grinding, mucopurulent nasal discharge, circling, recumbence, trembling, paddling and nystagmus. The farm had 700 recently weaned calves (weaned at 4 – 8 months-old). Twenty four developed clinical disease; 10 animals died after a variable period of clinical course.	Macroscopic: none. Histology: necrotizing meningoencephalitis.
SV-609/03	Neurological signs, rabies suspect. Many animals were affected, some of them died. No additional data.	Macroscopic: none. Histology: unremarkable.
SV-47/05	Male, six months-old calf, mixed breed. Three animals out of 122, weaned at 75 days of age, developed nasal and ocular discharge and opisthotonus. Two died and the third was euthanized.	Macroscopic: none. Histology: unremarkable.
SV-63/06	Female, four years-old, mixed breed from a farm with 40 cattle. A few animals developed neurological signs. Clinical suspect: rabies. No additional data.	Macroscopic: none. Histology: unremarkable.

Table 2

Reactivity of selected monoclonal antibodies (MAbs) with antigens of bovine herpesvirus types 1 and 5 strains or isolates<sup>a</sup>.

Virus		MAb anti-BHV1			MAb anti-BHV5		
		60	7F12	11H6	2915	2F9	1F3
BoHV-1	Cooper	+	+	-	-	-	-
	SV-56/90	+	+	+	-	-	+
BoHV-5	SV-507/99	-	-	-	+	+	+
	EVI-340/96	-	-	-	+	+	+
Isolates	SV-1613/93	+	-	+	-	-	-
	SV-299/03	+	+	+	-	-	-
	SV-609/03	+	+	+	-	-	-
	SV-47/05	+	+	+	-	-	-
	SV-63/06	+	+	+	-	+	-

<sup>a</sup> The reactivity was assayed by submitting MDBK cells infected with each virus to a fluorescent antibody assay (IFA) using a pool or individual MAbs as primary antibody and a FITC conjugated anti-mouse IgG as the secondary antibody.

Fig.1. Amplification products of the gC-based PCR designed to differentiate BoHV-1 from BoHV-5. Lane M: molecular weight marker; Lane 1: Cooper strain; Lane 2: SV-56/90; Lane 3: SV-507/99; Lane 4: EVI-340/96; Lane 5: SV-1613/93; Lane 6: SV-299/03; Lane 7: SV-609/03; Lane 8: SV-47/05; Lane 9: SV-63/06; Lane 10: no template. The arrows indicate the estimated size of the amplified product. Agarose gel (2%) stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

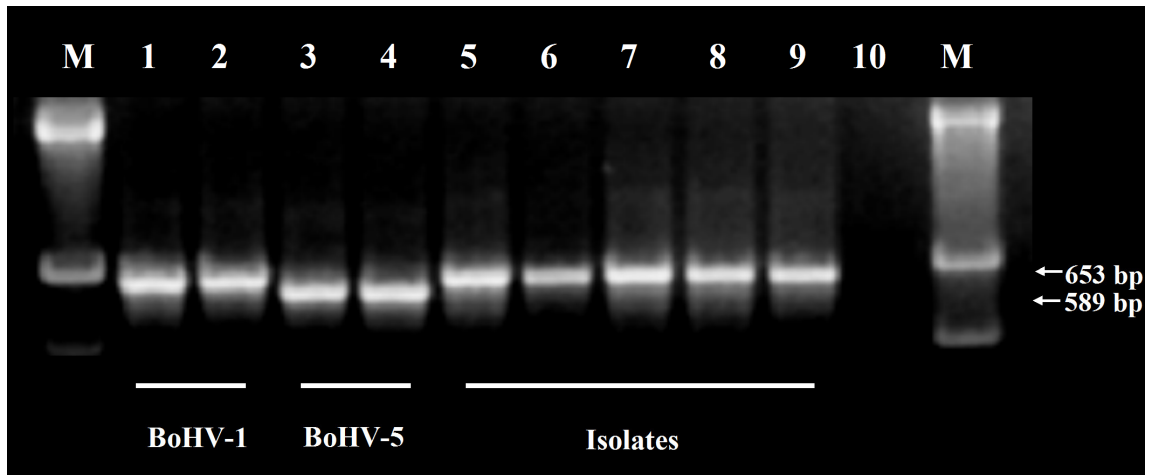


Fig.2. Alignment of nucleotide sequences of a segment within the gC gene coding region of BoHV-1 and BoHV-5 standard strains and virus isolates. Shaded areas represent deletions in the respective genomes.

```

Cooper      cgccctccccgtccccaacccgagacggaagctccgcccgggaccaccggcgcaacgccccccacgcccac
SV-56/90    cgccctccccgtccccaacccgagacggaagctccgctgggaccaccggcgcaacgccccccacgcccac
SV-507/99    tgccc-----ccgccccttgcctttgcctccccaaagccgc
EVI-340/96  tgccc-----ccgccccttgccttcgacgcccgcagcccgc
SV-1613/93  cgccctccggtacggaccgagccggaagctccgctcgaacaccggcgcaacgccccccacgcccac
SV-299/03  cgccctccccgtccccaacccgagacggaagctccgcccgggaccaccggcgcaacgccccccacgcccac
SV-609/03  cgccctccccgtcgccgacgagccggaatccgcccgggaccaccggcgcaacgccccccacgcccac
SV-47/05   cgcgctaccggtacggacgagccggaatctgggctacgaacaccggcgacgacccccggggccgca
SV-63/06   cgccctccccgtccccaacccgagacggaagctccgcccgggaccaccggcgcaacgccccccacgcccac

Cooper      cagccccgacgctacgccagaggacagcacgcccgggtgctactacgcccgggggacgcccggagccgccc
SV-56/90    cagccccgacgctacgccagaggacagcacgcccgggtgctactacgcccgtggggacgcccggagccgccc
SV-507/99    cctccccaaccccgccgagacgac-gaacgac-ggtgcgggaccctcggcgacgccc-----
EVI-340/96  cctccccaaccccgccgagacgac-gaacgac-ggtgcgggaccctcggcgacgccc-----
SV-1613/93  cagccccgacgctacgccagcagaggccgcccgtggagcaacctgccacgcccggagcgcacccaaagccca
SV-299/03  cagccccgacgctacgccagaggacagcacgcccgggtgctactacgcccgtggggacgcccggagccgccc
SV-609/03  cagccccgtcgcccgcagaggacagcacacgcccgtgaaaccagcccagggcggagcgcggaaaccgccc
SV-47/05   cagccccgacgctacgccagaggacagaaaaggggttgccacggcctcggcgtgacgcccggagccgccc
SV-63/06   cagccccgacgctacgccagaggacagcacgcccgggtgctactacgcccgggggacgcccggagccgccc

Cooper      tccgtgtccgagcagaccgcccgttaccaacagcacgcccggcggcccggcccggcctgaggacggggcag
SV-56/90    tccgtgtccgagcagaccgcccgttaccaacagcacgcccggcggcccggcccggcccggcctgaggacggggcag
SV-507/99    -----acagtcct--tcccacagcccccg-----gccacgcccgaaggacag----c
EVI-340/96  -----acacacca--acccacagcccccg-----gccacgcccgaaggacag----c
SV-1613/93  ggcgcgcaaccgacgtggcccccggttaccaacagcacgcccggcagcagcccctcggcgtacgaggcgg
SV-299/03  tccgtgtccgagcacaaccgcccgttaccaacagcacgcccggcggcccggcccggcccggcctgaggacggggcag
SV-609/03  tccgtgtccgagcagacgcccaggttaccaacagcacgcccggcgtacgcccggcctgaggacggggcag
SV-47/05   cgcgtgtccgagcggaaacctgcccgttaccaacagcacgcccggcggcccggcccggcccggcctgaggacggggcag
SV-63/06   tccgtgtccgagcagaccgcccgttaccaacagcacgcccggcggcccggcccggcccggcctgaggacggggcag

Cooper      ccggcggcgctggcaacgagccgagccgatgggcg
SV-56/90    ccggcggcgctggcaacgagccgagccgatgggcg
SV-507/99    acgacgga-----cgagacgccccttgggg
EVI-340/96  acgacgga-----cgagacgccccttggcg
SV-1613/93  ccggcggcgctggcaacgagccgagccgatgggcg
SV-299/03  ccggcggcgctggcaacgagccgagccgatgggcg
SV-609/03  ccggcggcgctggccacgcccctcgcgctgggcg
SV-47/05   ccggcagcgctggcaacgagccgagccgatgggcg
SV-63/06   ccggcggcgctggcaacgagccgagccgatgggcg

```

Fig. 3. Restriction analysis of the gC-based PCR fragment. Lane 1: SV-507/99; Lane 2: EVI-340/96; Lane 3: Cooper strain; Lane 4: SV-56/90; Lane 5: SV-1613/93; Lane 6: SV-299/03; Lane 7: SV-609/03; Lane 8: SV-47/05; Lane 9: SV-63/06. The arrows show the estimated size of the amplified product of each virus. Agarose gel (2%) stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

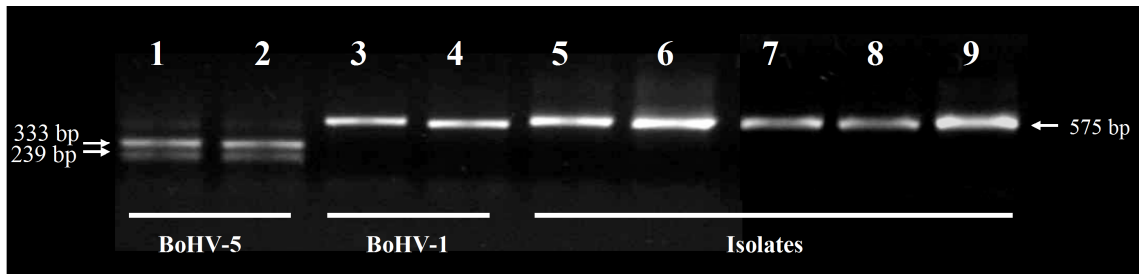
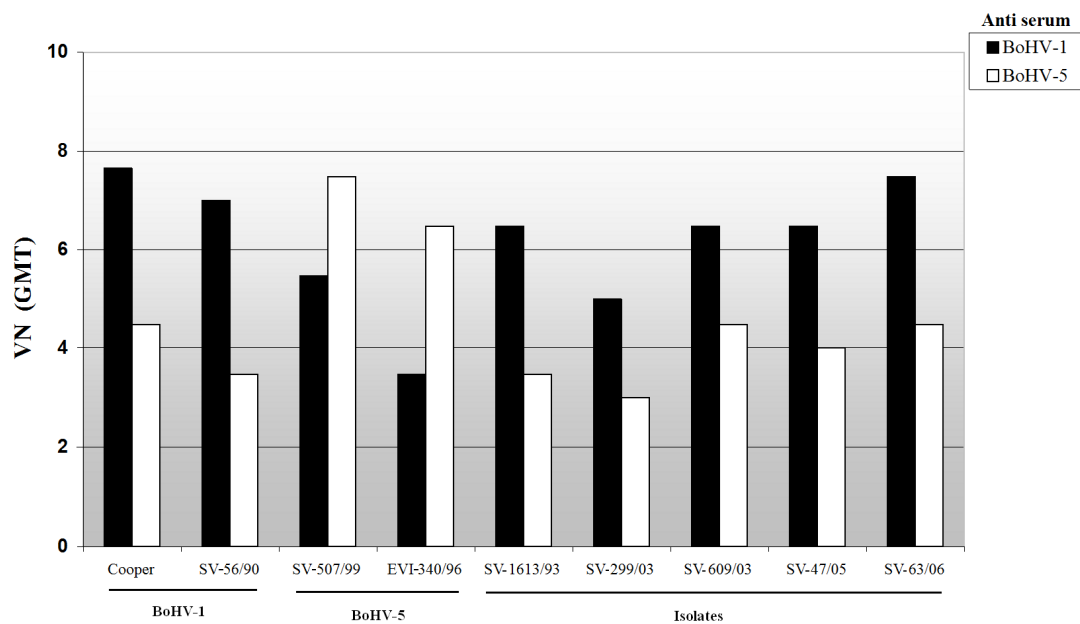


Fig.4. Virus neutralizing (VN) titers of specific anti-BoHV-1 (Cooper) and anti-BoHV-5 (SV-507/99) sera against the homologous viruses, strains and isolates. The columns represent the GMTs of six replicates.



#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os BoHV tipos 1 e 5 são importantes patógenos de bovinos e estão associados a perdas econômicas importantes na bovinocultura do Brasil e em vários outros países. A biologia desses agentes é muito semelhante, e as pequenas diferenças genéticas existentes entre eles certamente estão associadas ao distinto potencial neurovirulento.

O presente estudo teve como objetivo realizar uma identificação molecular de isolados de BoHV-1 e BoHV-5 utilizando técnicas que permitiram a diferenciação precisa entre esses dois agentes. Também foram analisados aspectos relacionados à neurovirulência diferencial entre BoHV-1 e BoHV-5, utilizando amostras de BoHV-1 isoladas do encéfalo de bovinos com doença neurológica.

A associação do BoHV-1 com doença neurológica já havia sido descrita em alguns estudos, mas o seu envolvimento é, em geral, considerado atípico e relativamente raro. Os resultados aqui apresentados demonstram que a associação do BoHV-1 com a doença neurológica é mais frequente do que anteriormente relatada. Esse fato chama a atenção para as possíveis falhas na identificação de isolados de BoHV no diagnóstico de rotina para essas enfermidades no Brasil.

O envolvimento de isolados de BoHV-1 com doença neurológica pode possuir várias explicações. É possível que esses isolados apresentam um fenótipo neurovirulento inerente, devido a diferenças genéticas em relação aos demais BoHV-1. Outra possibilidade é que esses isolados não apresentem diferenças genéticas do BoHV-1 que expliquem a sua neurovirulência, mas que por condições específicas, replicaram de forma mais eficiente e foram transportados para o SNC, onde produziram doença neurológica. Uma terceira possibilidade, é a associação de diferenças genéticas em regiões associadas a neurovirulência com fatores do hospedeiro, levando a ocorrência dessa forma neurológica.

Como conclusão geral, os resultados obtidos nesta tese demonstram que o BoHV-1 e o BoHV-5 podem estar envolvidos em apresentações clínicas diferentes das tipicamente reportadas. Pode-se concluir também que isolados de BoHV-1 podem eventualmente produzir doença neurológica.

## 5 REFERÊNCIAS

ABRIL, C. et al. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 7, p. 3644-3653, Apr. 2004.

AL-MUBARAK, A.; CHOWDHURY, S. I. In the absence of glycoprotein I (gI), gE determines bovine herpesvirus type 5 neuroinvasiveness and neurovirulence. **Journal of Neurovirology**, London, v. 10, n. 4, p. 233-243, Aug. 2004.

AL-MUBARAK, A., et al. A glycine-rich bovine herpesvirus 5 (BHV-5) gE-specific epitope within the ectodomain is important for BHV-5 neurovirulence. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 9, p. 4806-4816, May. 2004.

AL-MUBARAK, A. et al. Glycoprotein E (gE) specified by bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) enables trans-neuronal virus spread and neurovirulence without being a structural component of enveloped virions. **Virology**, New York, v. 365, n. 2, p. 398-409, Sept. 2007.

ALEGRE, M., et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, Berlin, v. 48, n. 8, p. 613-621, Oct. 2001.

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**, Columbia, v. 9, n. 4, p. 387-394, Oct. 1997.

BELKNAP, E. B., et al. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, Middleton, v. 31, n. 3, p. 358-365, May. 1994.

BRATANICH, A. C., et al. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. **Zentralblatt Veterinärmedizin Reihe B**, Berlin, v. 38, n. 1, p. 41-48, Feb. 1991.

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**, Amsterdam, v. 84, n. 4, p. 285-295, Feb. 2002.

CARRILLO, B. J., et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt Veterinärmedizin Reihe B**, Berlin, v. 30, n. 5, p. 327-332, June. 1983.



CHOWDHURY, S. I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. **Virology**, New York, v. 213, n. 2, p. 558-568, Nov. 1995.

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

CHOWDHURY, S. I., et al. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningoencephalitis in a rabbit seizure model. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 117, n. 4, p. 295-310, Nov. 1997.

\_\_\_\_\_. Neurovirulence of glycoprotein C (gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. **Journal of Neurovirology**, London, v. 6, n. 4, p. 284-295, Aug. 2000a.

\_\_\_\_\_. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, n. 5, p. 2094-2106, Mar. 2000b.

\_\_\_\_\_. Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) Us9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 8, p. 3839-3851, Apr. 2002.

CLAUS, M. P., et al. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. **Journal of Virological Methods**, London, v. 128, n. 1-2, p. 183-188, Sept. 2005.

COLODEL, E. M., et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvirus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 293-298. abr. 2002.

D'ARCE, R. C., et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 4, p. 315-324, Sept. 2002.

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

D'OFFAY, J. M., et al. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 7, n. 2, p. 247-251, Apr. 1995.

DEL MEDICO, M. P., et al. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, London, (2009). In press, doi:10.1016/j.tvjl.2009.03.035.

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

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

ENGELS, M., et al. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. **Virus Research**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 57-73, Oct. 1986.

FURUOKA, H., et al. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. **Acta Neuropathology**, Berlin, v. 90, n. 6, p. 565-571, Dez. 1995.

GOMES, L. I., et al. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht Kluwer, v. 27, n. 6, p. 495-504, Sept. 2003.

HOSSAIN, A., et al. Identification of gene products encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1. **Journal of Virology**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5345-5352, Sept. 1995.

HUBNER, S. O., et al. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, Exeter, v. 28, n. 3, p. 187-196, May. 2005.

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

JONES, C., et al. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 3-4, p. 199-210, Mar. 2006.

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

KIRKLAND, P. D., et al. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. **Veterinary Record**, London, v. 165, n. 4, p. 111-113, July. 2009.

KOPPEL, R., et al. Immediate-early protein BICP22 of bovine herpesvirus 1 trans-represses viral promoters of different kinetic classes and is itself regulated by BICP0 at transcriptional and posttranscriptional levels. **Archives of Virology**, Wien, v. 142, n. 12, p. 2447-2464, Dez. 1997.

KUNRATH, C. F., et al. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 1877-1883, dez. 2004.

LIMAN, A., et al. Glycoprotein C of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BHV-1. **Archives of Virology**, Wien, v. 145, n. 10, p. 2047-2059, Oct. 2000.

MAGYAR, G., et al. Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR, IPV and encephalitis. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 41, n. 1-2, p. 159-170, Jan. 1993.

METTENLEITER, T. C. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research**, Amsterdam, v. 92, n. 2, p. 197-206, Apr. 2003.

METZLER, A. E., et al. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, Wien, v. 87, n. 3-4, p. 205-217, May. 1986.

MEYER, F., et al. Identification of a novel protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1. **Journal of Neurovirology**, London, v. 13, n. 6, p. 569-578, Dec. 2007.

MOORE, S., et al. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 145-153, July. 2000.

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

PENNY, C. D., et al. Upper respiratory disease and encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine herpesvirus type 1. **The Veterinary Record**, London, v. 151, n. 3, p. 89-91, July. 2002.

PEREZ, S. E., et al. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, Middleton, v. 39, n. 4, p. 437-444, July. 2002.

ROCK, D. L. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. **Seminars in Virology**, San Diego, v. 5, n. 3, p. 233-240, June. 1994.

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

ROELS, S., et al. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **The Veterinary Record**, London, v. 146, n. 20, p. 586-588, May. 2000.

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

SALVADOR, S. C., et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 76-83, abr./jun. 1998.

SAYDAM, O., et al. Host cell targets of immediate-early protein BICP22 of bovine herpesvirus 1. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 3-4, p. 185-192, Mar. 2006.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 17-29, Nov. 1996.

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**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 191-199, Nov. 2007a.

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**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 403-408, out. 2007b.

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

SRIKUMARAN, S., et al. Bovine monoclonal antibodies specific for bovine herpesvirus-1 glycoprotein gIII. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 51, n. 4, p. 543-545, Apr. 1990.

SUAREZ-HEINLEIN, A., et al. Molecular characterization of South American bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. **Zentralblatt Veterinärmedizin Reihe B**, Berlin, v. 40, n. 2, p. 125-130, Mar. 1993.

THIRY, E., et al. Recombination in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 3-4, p. 171-177, Mar. 2006.

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

VOGEL, F. S., et al. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 3-4, p. 185-196, Mar. 2004.