

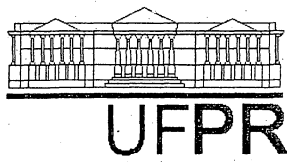
ERNESTO RENATO KRÜGER

**HERPESVÍRUS BOVINO 4 (BoHV-4):
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO; DESENVOLVIMENTO
DE ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO**

Tese apresentada no Programa de Doutorado em
Processos Biotecnológicos da Universidade
Federal do Paraná – UFPR, sob a orientação da
Profª Drª Vanete Thomaz Soccol.

CURITIBA

2012



RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

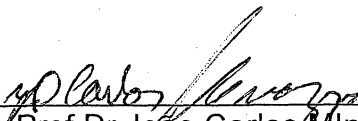
Aos dezesseis dias do mês de janeiro de 2012, na sala de aulas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Usinas Piloto B, do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Vanete Thomaz Soccol, Professora e Membro do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Septuagésima Terceira Defesa de Tese de Doutorado, Área de Concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da professora, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores João Carlos Minozzo (CPPI), Luiz Felipe Caron (UFPR), Magda Ribeiro (UFPR), Walfrido Svoboda (PUC-PR) e Profª Drª Vanete Thomaz Soccol (UFPR-UP-orientadora da tese).

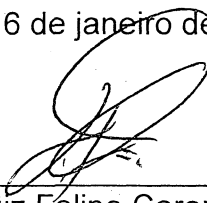
Às 9h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **Ernesto Renato Krüeger** a fazer a apresentação da Tese intitulada: **“Herpes Vírus Bovino 4 (BoHV-4): Isolamento e Caracterização; Desenvolvimento de Elisa Indireto para Diagnóstico”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de argüição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a argüição, a banca composta pelos professores João Carlos Minozzo, Luiz Felipe Caron, Magda Ribeiro, Walfrido Svoboda e Profª Drª Vanete Thomaz Soccol declarou o candidato APROVADO (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

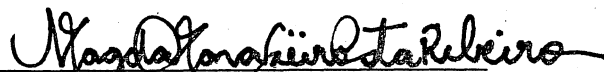
Curitiba, 16 de janeiro de 2012



Prof Dr João Carlos Minozzo



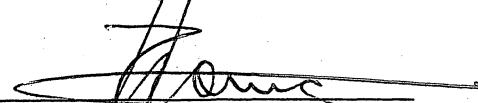
Prof Dr Luiz Felipe Caron



Profª Drª Magda Ribeiro



Prof Dr Walfrido Svoboda



Profª Drª Vanete Thomaz Soccol

Universidade Federal do Paraná
Setor de Tecnologia
Curso de Doutorado em Processos
Biotecnológicos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a consciência de que Deus existe. Agradeço a Ele por ter me feito nascer da honra e da humildade do seu Osmar e da dona Ieda e por ter me permitido frequentar as Escolas que frequentei e conhecer os mestres-referência que conheci. Escolho a pessoa e profissional Vanete Thomaz Soccol, para em seu nome, agradecer a todos. Sou um produto da Escola Pública é meu dever reconhecer e agradecer a este espaço de civilidade.

Agradeço as instituições Secretaria de Estado da Agricultura, Instituto de Tecnologia do Paraná – Tecpar e à Universidade Federal do Paraná e seus funcionários, meus colegas de trabalho, por ter tido a oportunidade de dar esta contribuição ao melhor entendimento da Saúde Animal.

“A ciência é a busca da verdade, não um jogo no qual uma pessoa tenta bater seus oponentes, prejudicando outras pessoas”.

(Linus Carl Pauling, 1901-1994)

RESUMO

Introdução: BoHV-4 é membro da sub-família *Gammaherpesvirinae*, gênero *Rhadinovirus* e está associado a diversas manifestações clínicas, em que estudos demonstram uma forte correlação entre infecção por este vírus com metrite pós-parto e aborto em bovinos. **Objetivos:** este trabalho teve por propósito caracterizar uma amostra viral isolada a partir de secreção uterina de fêmea de bovino e desenvolver técnica de ensaio imunoenzimático - ELISA indireto - para detecção de anticorpos específicos ao BoHV-4 em soros procedentes de treze diferentes estados brasileiros. **Material e Métodos:** a partir de *swabs* colhidos de secreção uterina a amostra de vírus isolada foi caracterizada pela citopatologia, morfologia e biologia molecular. Um teste ELISA indireto foi desenvolvido, avaliado e utilizado para pesquisa de anticorpos. **Resultados:** houve presença de efeito citopático em que a emissão de longos filamentos com pequenos balões ao longo destes foi característica distintiva. Na microscopia eletrônica, a existência de partículas virais com capsídeos com simetria icosaédrica e envelope mostraram-se típicas de Herpesvírus. Na identificação por PCR o produto obtido apresentou 2571 pb, cuja digestão com Hind III gerou fragmentos com 403, 420, 535 e 1125 bp. Do corte do genoma com enzimas de restrição, Hind III e Bam HI, obteve-se as chamadas bandas diagnósticas e a presença de banda hipermolar com 2350 pb, demonstrando ser Herpesvírus bovino-4, pertencente ao grupo DN-599. A padronização da técnica ELISA apresentou resultados diferenciando entre positivo e negativo com os seguintes parâmetros: concentração de antígeno de 5 µg por poço; diluição de soro 1:25 e diluição do conjugado 1:1600 ou 1:3200. Com a sorologia realizada em bovinos, evidenciou-se a presença de anticorpos em soros procedentes de todos os estados examinados. **Conclusão:** como já descrito em outros países, em nosso meio o BoHV-4 também está associado a metrite pós-parto, que infecta rebanhos em todos os estados examinados. Em alguns a situação é enzoótica. Metrite pós-parto afeta aproximadamente 40% dos bovinos e a participação deste agente viral como causa de aborto ainda não está incluída nas rotinas de diagnóstico no Brasil. Espera-se com este trabalho despertar a consciência profissional para a participação viral nas enfermidades uterinas de bovinos.

Palavras-chave: Herpesvírus bovino 4; BoHV-4; ELISA indireto; PCR; DNA fingerprinting.

ABSTRACT

Introduction: BoHV-4 is a member of *Gammaherpesvirinae* sub-family and belongs to genus *Rhadinovirus*. This virus has been associated to different clinical manifestations and a research activity has put forward an strong correlation among virus infection, postpartum metritis and abortion. **Objectives:** these works had as major goals to characterize a virus strain isolate from a cow's uterine outflow and the development of an immunoenzymatic assay, indirect ELISA, in order to detect specific antibodies to BoHV-4, in sera harvested from 13 different brazilian states. **Material and Methods:** from swabs drawn of an uterine secretion a virus strain was isolated and characterized by its cytopathology, morphology and molecular biology aspects. An indirect ELISA was developed, evaluated and utilized to search for BoHV-4 antibodies. **Results:** there was CPE development, characterized mainly by long strands with several small balloons along them, radiated from infected cells. Electron microscopy analysis revealed virus particles which had icosahedral capsid symmetry surrounded by a loose envelope, typical of a Herpesvirus. A 2571 bp PCR product, which after Hind III digestion generated four fragments, whose base pair composition were 403,420,535 and 1125 bp. Restriction enzymes Hind III and Bam HI generated the expected diagnostic bands, as well as, a 2350 bp hypermolar fragment, as result of Bam HI treatment, to demonstrate that agent was a bovine Herpesvirus 4, appertaining to DN-599 group. Works done in order to have ELISA methodology under control, such as antigen concentration at $\pm 5 \mu\text{g}/\text{well}$, conjugate dilution 1:1600 or 1:3200 and sera dilution at 1:25, allowed sera categorization as positive, negative or gray zone. Antibodies to BoHV-4 were found in sera from all states screened. **Conclusion:** as has been described in several countries, in Brazil, also, BoHV-4 is associated to postpartum metritis in cows, and the virus infects herds distributed throughout the states that were under evaluation. Postpartum metritis affects approximately 40% of bovine population, and this viral agent as abortion cause still is not included in Brazil's diagnostic routine. We hope to highlight the participation of viral infections in bovine uterus diseases, in order to get a better professional consciousness.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 ORIGEM DOS VÍRUS DNA.....	13
2.2 EVOLUÇÃO DO BoHV-4.....	14
2.3 GENOMA DO BoHV-4	17
2.4 PROTEÍNAS do BoHV-4	18
2.5 RESPOSTA IMUNE AO BoHV-4.....	21
2.6 ESPÉCIES HOSPEDEIRAS.....	22
2.7 SAÚDE PÚBLICA.....	22
2.8 CICLO BIOLÓGICO	25
2.9 LATÊNCIA	29
2.10 PATOGÊNESE	30
2.11 SINTOMATOLOGIA.....	35
2.11.1 Doenças Reprodutivas	35
2.11.1.1 <i>Metrite Pós-parto</i>	35
2.11.1.2 <i>Infecção Fetal e Aborto</i>	37
2.11.1.3 <i>Orquite – Epididimite – Vaginite</i>	38
2.11.1.4 <i>Mastite</i>	39
2.11.1.5 <i>Infertilidade</i>	40
2.11.2 Doenças do Aparelho Digestório	41
2.11.3 Doenças do Aparelho Respiratório e Afecções Oculares	42
2.11.4 Afecções Cutâneas	42
2.11.5 Neoplasias	42
2.11.6 Astenia	42
2.11.7 Associação com Febre Catarral Maligna (FCM)	43
2.11.8 Associado a Estomatite Vesicular	43
2.12 DIAGNÓSTICO DO BoHV-4.....	43
2.12.1 Avaliação da Imunidade Humoral	43
2.12.2 Avaliação da Imunidade Celular	43

2.12.3	Isolamento Viral	44
2.12.4	Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	44
2.12.5	Hibridização Southern	45
2.12.6	Enzimas de Restrição	45
2.13	EPIDEMIOLOGIA	46
3	JUSTIFICATIVA	48
4	OBJETIVOS	50
4.1	OBJETIVO GERAL.....	50
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
5	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	51
5.1	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO HERPESVÍRUS BOVINA 4, (BOHV-4) NO ESTADO DO PARANÁ-BRASIL	51
5.2	DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM ELISA INDIRETO E PESQUI- SA SOROLÓGICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA BoHV-4, NO BRASIL.....	61
6	DISCUSSÃO GERAL	71
7	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A+T	adenina + timina
ADCC	<i>antibody dependent cell cytotoxicity</i>
Atg	<i>autophagy related proteins</i>
CD4 ⁺	<i>cluster determinant 4 positive (helper T cell)</i>
CD8 ⁺	<i>cluster determinant 8 positive (cytotoxic T cell)</i>
BoHV-1	<i>Bovine herpesvirus 1</i>
BoHV-4	<i>Bovine herpesvirus 4</i>
BoHV-4/SU	<i>Bovine herpesvirus 4, strain SU (uterine secretion)</i>
BORF1	<i>bovine open reading frame 1</i>
BORF3/4	<i>bovine open reading frame 3 and 4</i>
C+G	citocina + guanina
CO ₂	dióxido de carbono
COX	ciclooxygenase
COX ₂	ciclooxygenase 2
DED	<i>death effector domain</i>
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i>
DRiP	<i>defective ribosomal proteins</i>
EBNA	<i>Epstein Barr nuclear antigen</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
Fas	<i>apoptose stimulating fragment</i>
Fc	<i>fragment cristalizable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
fg	fentograma
FISH	<i>fluorescent in-situ hybridization</i>
GAG	glicosaminoglicanas
GAG ⁻	negativo para glicosaminoglicanas
GAG ⁺	positivo para glicosaminoglicanas
GMP	<i>genome maintenance proteins</i>

gp	glicoproteína
HeLa	<i>Henrieta Lacks – human cell lineage</i>
IL2	<i>interleukin 2</i>
Kb	kilo base
KDa	Kilo Dalton
LANA	<i>latent nuclear antigen</i>
LAMP 2	<i>latent membrane protein 2</i>
LASER	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LC3	<i>mammalian homologue of Atg 8</i>
LUR	<i>long and unique region</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MM	meio de manutenção
Mta	<i>metastasis tumor antigen – protein family</i>
MuHV-4	<i>Murine herpesvirus 4</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
ORF 73	<i>open reading frame 73</i>
O _v HV-2	<i>Ovine herpesvirus 2</i>
PI3	<i>phosphatidil inositol 3</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGG ₂	prostaglandina G ₂
PGH ₂	prostaglandina H ₂
prDNA	<i>polyrepetitive desoxyribonucleic acid</i>
RNA	ácido ribonucléico
Rta/IE-2	<i>replication and transcription activator / immediate early 2 gene</i>
TCID ₅₀	<i>tissue culture infectious dose</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
th1	<i>T cell helper 1</i>
th2	<i>T cell helper 2</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR1	<i>tumor necrosis factor receptor 1</i>
TPB	<i>tryptose broth phosphate</i>
vBcl ₂	<i>viral B cell lymphoma 2</i>

vFGAM *viral phosphoribosylglycinamide synthase*
vFLIP *viral FLICE inhibitory protein*
vβGnT *viral β-1,6-N-acetylglucosaminyl transferase*

1 INTRODUÇÃO

Habitualmente aprende-se sobre interação hospedeiro-patógeno quando se tem por responsabilidade assegurar a integridade da matéria nos seres vivos. A interação destes macro e microuniversos, uma vez que os microorganismos entendidos como “Metade Escondida”, se constituem em 50% da biosfera. Um sistema imune a identificar o próprio e o não próprio, a diferenciar o perigoso do inócuo. Há um aprendizado evolucionário sobre a coexistência de diferentes graus de organização da matéria. O parasita tende a tornar-se simbiote, o custo energético torna-se favorável a ambos. Os vírus têm apresentado um processo de coevolução com seus hospedeiros e têm desenvolvido estratégias para sobrevivência, estabelecendo um estado de equilíbrio com a população ou hospedeiro. Os vírus buscaram no próprio hospedeiro moléculas e mecanismos que lhes permitem resistir ao escrutínio do sistema imune dos padrões moleculares do patógeno.

Face ao conhecimento atual, os vírus fazem parte do material pré-biótico (SHACKELTON; HOLMES, 2004), ou seja, das primeiras moléculas que se organizaram para que forma e função tivessem um significado, o surgimento de seres vivos no planeta, a matéria organizada, reprodutiva e no cume da hierarquia pensante.

O material genético de vírus inserido no material genético do hospedeiro, genes virais que codificam proteínas fusógenas, com funções fisiológicas, criam sincícios nos trofoblastos, os retrovírus se revelam parte integrante dos mamíferos. Mais recentemente, os Herpesvírus, que até então eram entendidos como plasmídios após a infecção, criaram mecanismos para inserção do seu genoma no genoma hospedeiro, em uma região associada à morte ou a multiplicação desordenada das células, os telômeros (MORISSETTE; FLAMAND, 2010). Os Herpesvírus desenvolveram uma estratégia de persistência, de modo a controlar a divisão celular, não mais serem estranhos ao sistema imune, pois passam a ser reconhecidos como próprios. Então, o diagnóstico fica comprometido. Genes e respectivas proteínas do hospedeiro são incorporados ao material genético do vírus situação do νBCI_2 e νFLIP , este último originalmente descoberto nos vírus e

posteriormente o celular homólogo. O BoHV-4 busca para seu genoma a estratégica enzima $C_2\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyl transferase, enzima capaz de modificar a glicosilação de proteínas virais e celulares, criando mecanismos para não serem reconhecidos por anticorpos neutralizantes, desenvolvendo tropismo para diferentes tecidos, buscando novos hospedeiros (MARKINE-GORIAYNOFF et al., 2003). Normalmente os Gamaherpesvírus são altamente espécie-específicos. O BoHV-4 é exceção à regra pois possui enorme diversidade de hospedeiros. A patogênese tende a ser consequência da coexistência a longo prazo - latência - tendo em vista que genes virais codificam proteínas quando a destruição lítica não interessa à perpetuação do patógeno. A morte celular por apoptose também é impedida pela mesma razão e a resposta imune deve ser evitada. Mas, é preciso experimentar as modificações no hospedeiro para lidar com o invasor. O ácido nucléico e proteínas dos parasitos intracelulares são detectados por sensores e enzimas proteolíticas ou nucleases, que preparam os substratos da nova síntese. No que se refere a Gamaherpesvírus, tanto saúde quanto doença, é resultante do experimento evolucionário mais bem sucedido, do macro para a primeira situação e do micro na segunda.

No que se descreve nas páginas seguintes tem-se oportunidade de avaliar o significado de polímeros ramificados, nesta sub-especialidade Glicovirologia, especialmente na questão ligante-receptor. Analisar-se-á a origem e evolução de um vírus, isolado inicialmente na Hungria, que infecta búfalos (*Syncerus caffer*), apatogênico e que lhes confere imunidade a outro patógeno letal existente em seu *habitat*, o Alcelaphine *herpesvirus* 1, do Gnu (*Connochaetes taurinus*), simbiote desta espécie para a qual o BoHV-4 é letal.

Discutir-se-á a passagem do BoHV-4 ao *Bos primigenius*, ancestral dos bovinos domésticos atuais e a manifestação nestes, em doenças reprodutivas, digestivas e neoplásicas.

Finalmente, serão apresentados dois trabalhos experimentais (Itens 5a e 5b) onde se discute o isolamento e caracterização de uma amostra de BoHV-4 isolada de *swabs* colhidos de uma vaca com metrite pós-parto, de um rebanho no município de Tibagi, no estado do Paraná, no ano de 1999. O uso desta para produção de reagentes, desenvolvimento e aplicação de um teste de ensaio imunoenzimático, ELISA indireto, como recurso para o diagnóstico sorológico deste agente patogênico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORIGEM DOS VÍRUS DNA

Este item é uma transliteração do texto original de Shackelton e Holmes (2004). Numerosas teorias existem para explicar a origem dos vírus DNA. Algumas propõem que o ancestral dos vírus modernos apareceu antes das células. Tem sido sugerido, por exemplo, que as micelas, as quais têm tendência de aprisionar e proteger os ácidos nucleicos, formavam o material Pré-Biótico. Com aumento do número de sequências retiradas e com o desenvolvimento da atividade Ribozima, as micelas se tornaram protovírus, desenvolveram proteínas, se fundindo frequentemente, dividindo informação. Eventualmente, algumas evoluíram para **protocélulas**. Tem sido também proposto que os vírus foram os primeiros a usar DNA para proteger seu material genético da degradação por enzimas codificadas por RNA de células com RNA. Outra teoria é de que os vírus surgiram através de uma evolução redutiva de microorganismos patogênicos ou células primitivas que viveram antes do LUCA (*Last and Unique Common Ancestor*), último e único ancestral comum. As células teriam reduzido o tamanho dos seus genomas de forma acentuada, mantendo somente os genes necessários à persistência do parasitismo, um processo em parte recapitulado pelas bactérias endossimbióticas.

Uma teoria alternativa para a origem dos vírus DNA é de que eles são fragmentos do DNA celular que escapou do controle celular. Este DNA, que provavelmente codificava a maquinaria de replicação, ganhou genes regulatórios e de localização no capsídeo, permitindo o movimento entre células. Uma proteína celular pode ter evoluído para formar o capsídeo icosaédrico. Os genes do capsídeo podem então ser replicados pela célula hospedeira e acumular genes adicionais benéficos. Como contrapartida, esta flexibilidade genômica dos vírus e sua estabilidade em transferir genes entre células deveria ter permitido as células primitivas de dividir experimentos evolucionários exitosos.

A ausência de registros de fósseis virais torna difícil a experimentação de teorias. Então, inferências são feitas com frequência de fontes indiretas. Algumas indicações vêm das similaridades entre vírus que infectam organismos de diferentes

formas de vida. Esta diversidade de hospedeiros pode significar que os vírus divergiram antes do LUCA, evoluindo em paralelo com as células. As similaridades na estrutura do capsídeo, mecanismos de replicação e ou organização de genoma entre alguns vírus DNA de células eucarióticas e fagos, e alguns vírus DNA de células eucariontes e vírus DNA da linhagem de *archaeobacterias* têm sido tomadas como evidência de sua antiguidade.

Informações mais definitivas no que concerne à evolução de vírus DNA vêm, mais recentemente, da comparação de filogenias de vírus DNA com aquelas das espécies hospedeiras. Uma significativa coincidência entre filogenias de hospedeiros e vírus é indicativa de coespeciação que, quando observada, pode significar evolução viral na escala de tempo, mostrando que ela deve ter ocorrido durante o mesmo período da evolução de seus hospedeiros. Esta técnica foi utilizada para inferir de forma aproximada tempos de divergência para hospedeiros de mamíferos durante os últimos 200 milhões de anos. Entretanto, mesmo que estes estudos revelem de forma conclusiva a idade relativa de alguns vírus DNA, não se sabe se coespeciação pode ser estendida para o começo da história precoce de eucariontes e procariontes, a qual pode ser esperada se os vírus DNA são produtos das primeiras formas de vida.

2.2 EVOLUÇÃO DO BoHV-4

Por análise filogenética verificou-se que o gene Bo17, que codifica a enzima (2- β -GnT), foi adquirido do búfalo africano (*Syncerus caffer*) há 1,5 milhões de anos, muitos anos após a separação das linhagens *Bos* e *Syncerus*. A análise da sequência de bases do gene Bo17, de amostras bovinas, sugere a transmissão do BoHV-4 ao *Bos primigenius*, ancestral dos bovinos modernos, em tempo remoto. Cabe salientar que o *B. primigenius* viveu na Eurásia e África do Norte, enquanto o *S. caffer* viveu em regiões abaixo do deserto do Saara. O Bo17 é significativamente mais próximo do celular homólogo do búfalo do que do bovino. Estima-se que a última amostra ancestral comum do gênero *Bos* e *Syncerus* existiu há 730.000 anos e a separação das amostras específicas de cada gênero tenha ocorrido há 700.000 anos. Quanto à divergência das amostras prevalentes no gênero *Bos*, acredita-se

que a divergência ocorreu na época em que houve a separação das espécies *B. taurus* e *B. indicus*, entre 0,2 e 0,3 milhões de anos (para o BoHV-4 275.000 anos). Importante observar que a amostra M40, única do *B. indicus* que teve cinco de seus genes avaliados filogeneticamente, divergiu do ancestral a 850.000 anos, o que evidencia que ela não coevoluiu com a espécie e a transmissão indireta é incontestável. Outra observação inquisitiva trata-se do elevado grau de divergência existente entre amostras americanas e europeias no gênero *B. taurus*. Amostras isoladas do bisão (*Bison bison*) no continente norte americano, gerou padrões de migração de fragmentos de DNA, tratados por enzimas de restrição, que as caracterizam como semelhantes ao DN599, amostra prototípica nos EUA. Os bisões chegaram a Beríngia vindos da Ásia, lugar comum ao *B. primigenius* na metade do Pleistoceno (300.000 a 130.000 anos). Possivelmente se constituem no reservatório para o vírus BoHV-4. Da análise filogenética de cinco genes, ORF16 (codifica ν Bcl2), Bo10 (glicoproteína específica do BoHV-4), ORF71 (ν FLIP), ORF73 (LANA homólogo) e ORF71 mais região intermediária e ORF73 de 09 amostras virais, procedentes dos gêneros *Syncerus* e *Bos*, que foram incluídas em duas clades distintas de acordo com o gênero de origem, e classificadas pelo perfil eletroforético do DNA digerido com enzimas de restrição, constata-se que nenhum gene teve a mesma árvore evolucionária e deve-se à existência de seis eventos de recombinações entre amostras divergentes. Ficou patente também que houveram três transmissões através de espécies, o que gerou amostras de *B. indicus* e *B. taurus* europeias e americanas (DEWALS et al., 2006) (Tabela 1).

TABELA 1 – EVOLUÇÃO DO BoHV-4: EVENTOS E ESCALA DO TEMPO

EVENTO	ESCALA DO TEMPO/ANOS
Big Bang	11,3 bilhões
Vida na Terra	3,5 bilhões
Precursor da célula eucariótica	1,5 bilhão
Emergência dos vertebrados no Cambriano	505-570 milhões
Herpesvírus Ancestral	
• Herpesvírus de ostra	1,0 bilhão
• Herpesvírus de peixes e sapos	450 milhões
• Herpesvírus, divergência mamíferos e aves	310 milhões
Origem da subfamília <i>Gammaherpesvirinae</i>	400 milhões
Aquisição pelo BoHV-4 do gene Bo17 (2- β -1,6-GnT) do ancestral do búfalo <i>Sincerus caffer</i>	1,5 milhões
Último ancestral BoHV-4 comum aos taurinos e bubalinos	730 mil
Transmissão do BoHV-4 do búfalo ao <i>Bos primigenius</i>	700 mil
Separação das linhagens <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i>	200 - 300 mil
Último ancestral comum das amostras de búfalos	280 mil
Linhagem das amostras de BoHV-4 em <i>B. taurus</i> e <i>B. indicus</i>	275 mil
Divergência das amostras de BoHV-4 taurinos em europeias e americanas	260 mil
Domesticação dos bovinos	10 mil
Chegada de bovinos europeus a América do Norte	500

2.3 GENOMA DO BoHV-4

O BoHV-4 possui DNA cadeia dupla linear, com estrutura tipo B (Figura 1), Roizman e Pellet (2001), o que o diferencia de outros Gamaherpesvírus. Pertence ao gênero *Rhadinovirus* (*rhadino* é uma palavra do grego antigo que significa **frágil**). Os *Rhadinovirus* possuem genoma do tipo M, com densidade intermediária em gradientes de cloreto de cério (M-DNA). O tamanho do genoma é de 144 ± 6 kb, cujo o peso molecular é de $95.8 \pm 4 \times 10^6$ (60 genomas = 10fg de DNA). Esta molécula de ácido nucleico é constituída de uma sequência central denominada LUR (*Long and Unique Region*) com aproximadamente 108 kbp, contendo em geral 41% de bases G+C. Em ambos os lados, de região central, existem em número variável do chamado DNA polirepeditivo (prDNA), unidades monoméricas com 1950 bp (classe I), 2350 bp (classe II) e 2750 bp (classe III) que, ao todo, somam 15 segmentos. Cada unidade do prDNA contém em média uma proporção de (C+G):(A+T) de 4:1, o que faz com que a composição de C+G chegue a 71,1%. A região prDNA é entendida como não codificadora (EHLERS et al., 1985; BROLL et al., 1999).

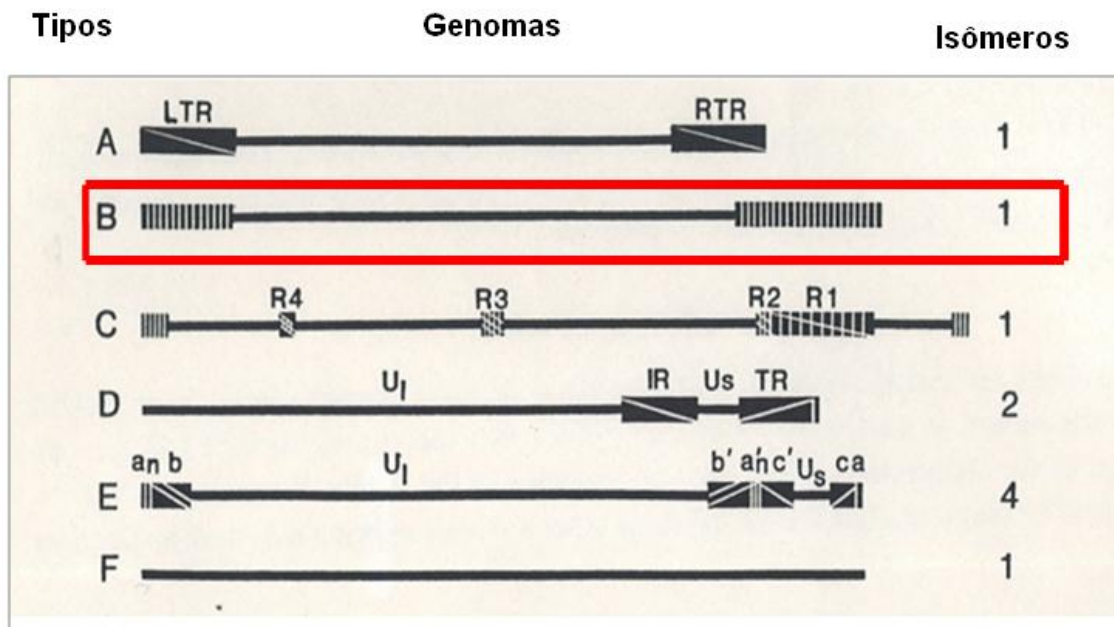
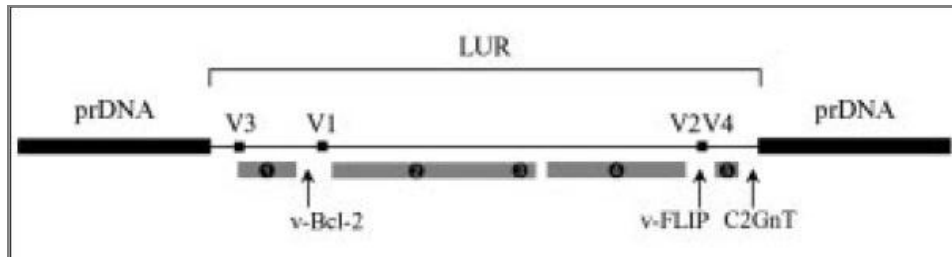


Figura 1 – Estruturas de DNA de Herpesvírus.

Uma propriedade característica do genoma dos Herpesvírus consiste no agrupamento em cinco blocos de genes, 58% do total do genoma, de genes

conservados, cuja orientação e localização são próprias do “gênero” e subfamília. No bloco 1, 2 e 4 estão presentes genes conservados nas três subfamílias e nos blocos 3 e 5 genes específicos dos Gamaherpesvírus. Entre os blocos situam-se genes que são únicos de um vírus em particular ou de espécies filogeneticamente relacionadas, sendo frequente a presença de genes de origem celular nessas regiões (Figura 2).



Legenda:

- 1, 2 e 4 – genes comuns a todos os membros da família *Herpesviridae*.
- 3 e 5 – genes específicos da subfamília *Gamaherpesvirinae*.
- V₁, V₂, V₃ e V₄ – genes específicos do BoHV-4.
- vBcl₂, vFLIP e C₂GnT – genes adquiridos do hospedeiro natural.

Figura 2 – Bloco de Genes do Herpesvírus bovino-4.

O genoma contém aproximadamente 79 ORF (*Open Reading Frames*), 17 dos quais únicos do BoHV-4. A origem da replicação situa-se entre os ORF 69 e 71 e um mínimo de 1,69 Kbp constitui-se um sinal para uma ação cis de replicação (ZIMMERMANN et al., 2001).

2.4 PROTEÍNAS do BoHV-4

Fazem parte do virion 29 proteínas estruturais diferentes. Do total, 10 polipeptídeos são glicosilados, glicoconjugados, glicoproteínas. Estas, nos sistemas biológicos, merecem especial atenção, pois são a maior fonte de diversidade estruturais. Nos chamados polímeros biológicos, os carboidratos são os únicos a permitirem ramificações. Os aminoácidos e nucleotídeos estão ligados de forma linear por ligações peptídicas ou fosfodiéster. Oligômeros de qualquer classe de molécula biológica podem estabelecer um sistema de codificação, para armazenar informação. A significância dos resíduos glicosil é conferir às proteínas uma função de reconhecimento discreta. Para se ter uma ideia da amplitude do chamado código

do açúcar, para armazenar informação, vale citar: 20 monossacárides diferentes podem gerar 9×10^6 diferentes trissacárides, enquanto que 20 aminoácidos diferentes podem gerar 8×10^3 tripeptídeos (REUTER; GABIUS, 1999).

Glicoconjugados são expressos preferencialmente na superfície de células epiteliais, que residem em áreas do organismo expostas ao meio externo, densamente colonizadas por micro-organismos, tais como os aparelhos respiratório e digestório, o que sugere uma função de receptor. Estes receptores normalmente são codificados por genes (porção proteica), com elevado grau de polimorfismo, o que sugere uma estratégia das espécies de vertebrados de tornarem alguns membros susceptíveis e outros resistentes a certos patógenos (KARLSSON, 1998).

No que se refere especificamente a vírus que possuem envelope lipoproteico com suas respectivas glicoproteínas, a interação patógeno-hospedeiro inicial (porta de entrada), ou etapa da adsorção se dá pela interação de dois glicoconjugados: o receptor celular, uma glicoproteína, e o antireceptor viral, também uma glicoproteína, gerando subsequentes eventos de endocitose ou fusão de membranas. Nos processamentos de maturação, egresso de partículas virais da célula infectada e a propagação de vírus de uma célula a outra via desmossomos, também há participação de glicoproteínas. As glicoproteínas virais, no processo de brotamento, são inseridas na membrana celular e se constituem no alvo das respostas imunes humoral (ADCC – *antibody dependent cell mediated cytotoxicity* e lise por complemento) e celular através da expressão de antígenos virais em conjunto com complexo maior de histocompatibilidade, classe I, alvo da lise celular pelos linfócitos T citotóxicos, CD_8^+ . De outra parte algumas glicoproteínas não essenciais à multiplicação viral, podem ter seus genes deletados, gerando mutantes, que se constituem em marcadores sorológicos, criando a possibilidade de distinguir se a resposta humoral é devida à infecção natural ou decorrente de vacina.

O BoHV-4 possui em seu genoma um gene de origem celular, o Bo17, que codifica a enzima 2- β -1,6-N-acetylglucosaminyl transferase, tipo mucina (VANDERPLASSCHEN et al., 2000 e CHOI et al., 2004), que reúne em uma só proteína três atividades enzimáticas descritas para uma família de genes. Esta enzima viral pode alterar a glicosilação tanto das proteínas virais como da célula infectada, alterando a sensibilidade da célula infectada à lise por anticorpos e complemento ou pelas perforinas/granzime na resposta celular.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS ESTRUTURAS DO HERPESVÍRUS BOVINO-4

PROTEÍNA	MASSA MOLECULAR	FRAÇÃO NUCLEOCAPSÍDEO	FRAÇÃO ENVELOPE	GLICOSILAÇÃO	PRECIPITADO POR SORO
VP1	>300KDa		+		
VP2	250 KDa				
GPV3	210 KDa		+	+	+
VP4	190 KDa				
VP5	175 KDa		+		
GPV 6	150 KDa		+	+	+
VP7	140 KDa	+			+
GPV 8	135 KDa		+	+	+
VP9	122 KDa	+			
GPV 10	120 KDa		+	+	+
GPV 11	120 KDa		+	+	+
VP12	110 KDa	+			
VP13	95 KDa	+			
VP14	78 KDa	+			
VP15	68 KDa	+			
GPV 16	56 KDa		+	+	
GPV 17	51 KDa		+	+	+
GPV 18	47 KDa		+	+	
VP19	33 KDa	+	+		
VP20	31 KDa	+			
GPV 21	27 A 30 KDa		+	+	
VP22	27 KDa	+			
VP23	17 KDa	+			
VP24	16.5 KDa	+	+		
VP25	16 KDa	+			
VP26	14.5 KDa	+	+		
VP27	13 KDa		+		
VP28	11.5 KDa		+		
GPV 29	11 KDa		+	+	

Legenda:

- (+) – Fração nucleocapsídeo: proteínas isoladas com o nucleocapsídeo.
- (+) – Fração envelope viral: proteínas isoladas com envelope.
- (+) – Glicosilação: glicoproteínas.
- (+) – Precipitado por soro: proteínas reconhecidas por anticorpos do soro sanguíneo.

Das glicoproteínas codificadas pelo BoHV-4, merecem ser melhor conhecidos os complexos gp6/gp10/gp17, que possuem três regiões com epítomos envolvidos em neutralização. O segundo grupo se compõe pela gp11/24, que possui duas regiões, e a terceira proteína importante na adsorção é a gp8, pela interação com o sulfato de heparan, que existe no receptor celular (DUBUISSON et al., 1989).

2.5 RESPOSTA IMUNE AO BoHV-4

Bovinos infectados, natural ou experimentalmente, desenvolvem resposta imune humoral que se caracteriza por não haver produção de anticorpos neutralizantes, ou, quando são produzidos, há títulos efêmeros. Estes anticorpos são detectáveis entre 22 e 34 dias após a infecção (CASTRUCCI et al., 1987). É importante mencionar que coelhos, que não são hospedeiros naturais, quando imunizados com BoHV-4, com antígenos concentrados e com adição de adjuvante completo de Freund, desenvolvem anticorpos neutralizantes com títulos bastante baixos. A adição de complemento tem sido considerada uma alternativa para a detecção precoce de títulos mais elevados de anticorpos neutralizantes (DUBUISSON et al., 1987). Esta afirmação não tem se repetido em alguns trabalhos experimentais (ESSMAIL et al., 1999). Frazier et al. (2001), utilizando uma amostra endometriotrópica isolada a partir de casos clínicos enviados à necropsia, relata que, de 480 amostras de soro analisadas por soroneutralização, 404 foram negativas e 76 positivas, com títulos que variavam de 1:8 a 1:32. Usando a mesma metodologia para soros procedentes de um rebanho leiteiro enzooticamente infectado, detectaram-se 107 (26%) animais positivos de um total de 296, com títulos de 1:8 a 1:64.

Anticorpos dirigidos a antígenos não críticos podem ser detectados pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) e imunoperoxidase, ocorrendo a soro conversão entre 14 e 20 dias após a infecção primária (OSÓRIO; REED, 1983; EDWARD; NEWMAN, 1985; DUBUISSON et al. 1987; WELLEMANS; Van OPDENBOSCH, 1999; MONGE et al., 2006). Quando acontece a reativação viral, que induz resposta imune secundária, estas metodologias podem detectar aumentos de títulos de quatro ordens de magnitude. Para avaliar a resposta imune celular ao BoHV-4, utilizou-se o teste de

hipersensibilidade tardia, gerando resultados negativos em animais previamente imunizados, no primeiro caso, ou poucos animais responderam, no experimento do segundo grupo e os autores não recomendam como uma possibilidade de diagnóstico (CASTRUCCI et al., 1988 e Van OPDENBOSCH et al., 1988). Na avaliação da imunidade celular através da detecção de interferon gama, houve resposta mensurável em 75 animais (44,4%) de um total de 168 animais, quando 76,3% eram sorologicamente positivos ao BoHV-4, avaliados em teste de ELISA indireto. Quando estes resultados foram avaliados em paralelo, resposta celular positiva e animais soro positivos, o teste de detecção de interferon gama associado ao ELISA indireto gerou 81,5% de animais positivos, o que foi considerado pelos autores como “complementariedade dos testes” (GODFROID et al., 1996).

2.6 ESPÉCIES HOSPEDEIRAS

A replicação da maioria dos Gamaherpesvírus é restrita a espécies que são naturalmente hospedeiras. O BoHV-4 é uma das poucas exceções à regra. Ao contrário dos demais, o BoHV-4 tem se mostrado capaz de se multiplicar em ampla diversidade de espécies tanto *in vivo* como *in vitro*. Além de bovinos europeus, o BoHV-4 tem sido isolado de espécies de ruminantes, tais como zebu (*Bos indicus*), bisão americano (*Bison bison*), búfalo africano (*Sincerus caffer*) e ovinos. Isolamentos esporádicos foram relatados em leões, gatos, macacos (*Aotus trivirgatus*). Experimentalmente, foi comprovado que BoHV-4 pode infectar cabras, porcos da Índia e coelhos. Quando *in vitro*, o BoHV-4 é capaz de se replicar em células de cultivo primário ou de linhagens de diferentes espécies de animais, tais como: bovinos, ovinos, cabras, suínos, gatos, cães, coelhos, *minks*, cavalos, perus, galinhas, *hamsters*, ratos, camundongos, coelhos e furões (GILLET et al., 2004).

2.7 SAÚDE PÚBLICA

A amostra de referência Movar 33/63 foi inoculada em 14 linhagens de células humanas diferentes e em cinco cultivos primários de diversos tecidos humanos.

Houve replicação do BoHV-4 em células de duas linhagens de pulmão, MRC-5 e Wistar 38 e na linhagem de células de glioblastoma (EGYED, 1998).

Para avaliar o risco associado à transmissão de amostras de um vírus é preciso considerar dois fatores principais: o risco de transmissão e as consequências para o hospedeiro em caso de haver transmissão. O risco de transmissão depende:

- a) prevalência do vírus no ambiente;
- b) existência de eventos permitindo a transmissão do vírus; e
- c) capacidade do vírus de infectar hospedeiros não naturais.

Em relação a esses fatores, várias observações suportam a existência de um risco do BoHV-4 ser transmitido a seres humanos.

A primeira é que o BoHV-4 é altamente prevalente na população bovina e não há programa de controle e ou erradicação para este vírus.

Em segundo lugar, muitos fatos tornam possível a transmissão do vírus de bovinos aos humanos:

- a) os animais infectados excretam o BoHV-4 nas descargas nasais e vaginais, tanto após infecção primária como na reativação, tornando possível a contaminação de humanos que tenham contato com bovinos infectados;
- b) o BoHV-4 tem sido encontrado no leite de vacas com mastite, bem como de vacas aparentemente saudáveis, sugerindo possível contaminação de humanos por via oral; e
- c) o BoHV-4 é frequentemente isolado de soro bovino, o qual é usado em abundância em preparações farmacológicas e alimentícias, tornando a contaminação humana, pelo BoHV-4 possível pelas vias entéricas e parenteral.

A terceira observação é que alguns estudos têm revelado a capacidade de algumas linhagens de células humanas permitirem replicação do BoHV-4 (EGYED, 1998).

O segundo fator a ser observado quando da avaliação do risco associado à transmissão entre espécies de um vírus está sendo considerada, são as consequências para o hospedeiro infectado. Se as células do hospedeiro não natural

infectado são permissíveis à infecção, lesões podem ser produzidas pela replicação do vírus. Alternativamente, uma infecção não permissiva, resultante de infecção latente ou de infecção de células que são sensíveis, mas não permissíveis, pode levar a dramáticos efeitos, tais como a oncogênese de desregulação do sistema imune. A transmissão entre espécies de alguns Gamaherpesvírus, tem mostrado tal fenômeno. Por exemplo, o *Alcelaphine herpesvirus 1* induz uma doença proliferativa letal quando infecta ruminantes outros que não o Gnu (*Connochaetes taurinus*). A patogênese de tal doença depende da expressão de um número restrito de genes virais capazes de imortalizar, transformar ou conferir resistência a apoptose na célula hospedeira. Em comparação a outros Gamaherpesvírus, BoHV-4 codifica pequeno número de genes susceptíveis de afetar a biologia da célula infectada. Entretanto, o BoHV-4 possui dois genes que podem proteger a célula infectada contra apoptose: ORF 16 e ORF 71, que codificam vBcl2 (Viral B cel lymphoma) e vFLIP (*Viral Flice Inhibiting Protease*), respectivamente. O ORF 71 codifica proteína que inibe apoptose induzida por Fas e TNF (*Tumor Necrosis Factor*), quando expressa nas células HeLa. Usando linhagem de células HeLa como modelos de células humanas sensíveis, mas não permissíveis a infecção pelo BoHV-4, foi investigada a resistência de células infectadas a apoptose e a persistência da infecção através de divisões celulares (GILLET et al., 2004). Os resultados são sumarizados como segue:

- a) células HeLa sofrem infecção não permissiva pelo BoHV-4 que as protege da apoptose induzida pelo TNF;
- b) a infecção de células HeLa pelo BoHV-4 persiste em cultivo celular, entretanto, a percentagem de células infectadas decresce com o tempo devido a transmissão errônea do genoma viral através das divisões celulares;
- c) a infecção pelo BoHV-4 não tem efeito sobre a taxa de divisão da célula HeLa.

Estes dados tomados em conjunto sugerem que o BoHV-4 pode infectar humanos (GILLET et al., 2004).

BoHV-4 induz apoptose, *in vitro* e *in vivo*, de células de alguns carcinomas humanos, A-549 é uma linhagem obtida de carcinoma pulmonar e OVCAR derivada de adenocarcinoma de ovário. Xenotransplantes destas células em camundongos e

infecção destes com BoHV-4 induz apoptose das células tumorais, fenômeno conhecido como vírus oncoapoptose, atualmente muito explorado como alternativa de tratamento para alguns tipos de câncer. Estas células são sensíveis, elas são infectadas e também são permissíveis, ocorre o ciclo lítico de replicação viral, codificação de proteínas virais que induzem a apoptose (GILLET et al., 2005).

Em outro trabalho experimental em que o propósito foi avaliar a sensibilidade e permissividade de 21 células humanas a infecção com o BoHV-4, constatou-se que células de origem linfóide e mielóide são resistentes, enquanto que células epiteliais, as de carcinoma e adenocarcinoma são sensíveis e moderadamente permissíveis (GILLET et al., 2004).

2.8 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico do BoHV-4 depende, assim como de todos os Herpesvírus, da existência de dois tipos de infecção: **lítica** ou **replicativa e latente**. Na primeira, há produção de partículas virais intactas e lise celular. Na segunda, o genoma viral permanece circularizado em forma **epissomal**, onde um pequeno número de genes é expresso e que pode afetar a célula infectada.

No processo de entrada dos Gamaherpesvírus na célula há necessidade de interação entre glicoproteínas virais (**ligante**) e celulares (**receptores**) – 10^4 a 10^5 para cada vírus em particular. Estes receptores são de dois tipos: de **adsorção** e de **entrada**. Ambos são glicosaminoglicanas, normalmente sulfato de heparan, e proteoglicanas na superfície da célula. O sulfato de heparan aumenta a concentração de vírus na superfície da célula, o que cria condições para que o ligante viral para entrada encontre o respectivo receptor. A interação entre ligante de adsorção e receptor é de baixa afinidade, reversível, enquanto que entre ligante de entrada e receptor é de elevada afinidade e irreversível. Com os vírus que possuem envelope o processo ou interação receptor – antirreceptor deve desencadear a fusão entre as membranas lipoproteicas virais e celular. Isso pode acontecer de duas maneiras por **endocitose**, menos comum nos Herpesvirus, com formação de **endossomas**, mecanismo mediado pelas proteínas **clatrins**. Com a acidificação no interior dos endossomas, que ocorre após fusão com os lisossomas, esta diminuição

de pH é dependente de energia e se dá pelo transporte de hidrogênio através de H^+ ATPase constitutiva da membrana. Há alterações conformacionais nas glicoproteínas e exposição de sítios reativos que promovem a fusão das membranas virais e do endossoma e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma.

O segundo mecanismo se dá pela **fusão de membranas** onde há participação de múltiplas glicoproteínas (gp) virais e parece que as gp B, H e L são conservadas nos Herpesvírus, o que não exclui a possibilidade de outras gps estarem envolvidas.

Como as glicoproteínas para a entrada dos virions são dispostas é importante porque são os alvos primários aos anticorpos neutralizantes. Um entendimento da forma física deve mostrar como melhor se conseguir a neutralização de **epítomos** críticos sensíveis e que são protegidos pela associação de glicoproteínas do virion, sendo somente revelados após a ligação a célula. Além do acima exposto, o entendimento destas interações se faz necessário para explicar o tropismo celular, a latência e, conseqüentemente, a patogênese.

O BoHV-4 possui em seu genoma o gene Bo10, de classe cinética tardia, que codifica uma glicoproteína com peso molecular de 180 KDa. Mutantes com o Bo10 deletado são menos eficientes na infecção de células GAG⁺ (que possuem glicosaminoglicanas) e infectam normalmente células GAG⁻. A Gp 180 regula a adsorção do vírus a célula, encobrendo um epítomo GAG independente até que seja exposto pela interação com o GAG celular. Acredita-se que a ligação da gp 180 ao sulfato de heparan ou outro receptor celular estabeleça algum tipo de sinalização à célula e ocorra um recrutamento de outros receptores. A racionalidade seria de que a gp 180 protegeria o outro receptor dos anticorpos neutralizantes (MACHIELS et al., 2011).

Os Herpesvírus são transmissíveis de hospedeiros imunes como partículas virais livres e precisam evitar a neutralização pelos anticorpos do hospedeiro. A gp 180 faz com que epítomos importantes sejam expostos somente na superfície da célula, ou após endocitose, restringindo a oportunidade de neutralização. Especula-se que a ligação da gp180 ao GAG seja de baixa afinidade, o que evitaria a exposição do antígeno encoberto, quando da ligação com o GAG solúvel e parece ser o caso, já que a gp 180 não se liga ao GAG⁺ celular expresso com a proteína de

fusão Fc. Uma ligação de alta afinidade limitaria o deslocamento da gp 180 após a adsorção (MACHIELS et al., 2011).

Uma questão importante a ser respondida é de se a gp 180 precisaria ser deslocada do sítio de inibição para expor o epítopo de entrada GAG independente e como infectaria células que são naturalmente GAG⁻, como a infecção de monócitos no sangue que são livres de sulfato de heparan. A especulação é de o BoHV-4 seria transmitido da superfície de células GAG⁺ para GAG⁻. Cabe aqui evidenciar o modelo de outro Gamaherpesvírus, que é humano, o Epstein Barr, em que virions produzidos em fibroblastos infectam de forma mais eficiente os linfócitos B do que os próprios fibroblastos, produzindo ligantes adequados ao linfócito B (MACHIELS et al., 2011).

Os genes posicionais homólogos da gp 180 de outros Gamaherpesvírus são bastante diferentes, mas todas são proteínas transmembranares do tipo I, com elevado grau de O-glicosilação, e todas são relacionadas em função, que parece ser uma proteção glicosídica independente da adsorção da célula.

Após a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma com algumas proteínas do tegumento envolvidas em transativação, este se liga aos microtúbulos e é movido em direção a extremidade negativa, cujo motor é a proteína Dynein, por movimento centrípeto da periferia do citoplasma ao poro nuclear. No interior do núcleo, o DNA sofre processo de circularização com participação de proteínas celulares e virais. A expressão dos genes obedece a uma cronologia e gera proteínas de três classes cinéticas, classificadas pela utilização de drogas inibidoras ou pela mensuração da expressão de genes virais. As proteínas são designadas como IE (*Immediate-Early*) precoces imediatas, que são predominantemente fatores de transcrição envolvidos na transativação e que são codificadas pelos genes **alfa**. O segundo grupo de proteínas ditas E (*Early*) precoces, são enzimas envolvidas na replicação do DNA e os genes que codificam são ditos **beta**. O último bloco de proteínas chamadas L (late) tardias, são estruturais, componentes das partículas virais, codificadas pelos genes **gama**.

A replicação do DNA viral obedece ao processo designado círculos rolantes (*rolling circle model*). O DNA viral para se replicar precisa de um molde (*template*), o *primer* e dNTP. Neste processo, o DNA viral circularizado sofre a ação de uma

endonuclease celular em uma das cadeias e a extremidade 3' livre serve como *primer* à cadeia intacta que funciona como *molde*.

Reprimir a expressão de genes celulares (*host shutoff*) é um fenômeno comum na infecção por Herpesvírus (GRECO et al., 2000). O BoHV-4 não afeta a síntese de proteínas celulares em seu ciclo biológico (AUGSBURGER; METZLER, 1989).

No processo de maturação, quando há formação do capsídeo e incorporação do DNA viral, etapa na qual os intermediários de replicação, **concatameros** são clivados para gerar as unidades genômicas, o sinal para clivagem encontra-se nas regiões do DNA polirrepetitivo (efeito tampão, limita o tamanho do DNA) e as enzimas responsáveis são codificadas pelos ORFs 29, 32 e 43, para a amostra de BoHV-4 V. test, vírus isolado na Bélgica de um touro com orquite.

O conjunto ácido nucleico, capsídeo e tegumento recebem o envelope primário da lamela interna do nucleolema, do espaço perinuclear as partículas virais por brotamento, migram para o retículo endoplásmico. A passagem dos virions do interior do retículo endoplasmático à superfície celular, não está clara e dois modelos tentam explicar. No primeiro, o envelope viral funde-se com a membrana do RE e os capsídeos são liberados no citoplasma, que ganham acesso a vesículas do aparelho de Golgi, onde adquire o envelope definitivo. No segundo modelo, os virions do interior do RE são incorporados em vesículas e transportados aos compartimentos do aparelho de Golgi. Neste modelo as glicoproteínas são modificadas na superfície dos virions. As partículas virais deixariam as células por exocitose.

Na infecção lítica, três proteínas estão envolvidas na transativação. Estas são transcritas de genes **alfa** que codificam proteínas imediatamente precoces e iniciam o ciclo de replicação lítica, que tem importância menor na patogênese dos Gamaherpesvírus. Duas destas proteínas são codificadas por sequências (ORF) conservadas (ORF50 ou Rta/IE2, ORF57 ou Mta/IE-1), a terceira é por um gene não conservado, que no BoHV-4 chama-se Bo4/5. Ativação do promotor por estas proteínas tem efeito decisivo na síntese de DNA a partir da origem lítica (*ori lyt*) da replicação, como resultado virions são produzidos e liberados da célula infectada (ACKERMAN, 2006).

2.9 LATÊNCIA

Latência e reativação são consideradas estratégias críticas dos Herpesvírus para sobrevivência na natureza e são chamadas **persistência epissomal**. O DNA viral persiste como epissomas estáveis, não integrado e em número elevado de cópias no núcleo celular. Os Gamaherpesvírus tendem a favorecer o estabelecimento de latência a partir da infecção primária, com pouca lise celular, situação inversa ocorre com os alfa e beta-herpesvírus.

Não existe um padrão comum de expressão de genes para o estabelecimento da latência. Alguns Herpesvírus sintetizam várias proteínas durante a latência enquanto outros absolutamente nada.

A maioria dos genes dos Herpesvírus são ancestralmente relacionados e tem pequena ou nenhuma similaridade de sequência com os genes dos hospedeiros. Os Gamaherpesvírus – rhadinovirus codificam um número adicional de genes que têm uma similaridade extensiva aos genes dos hospedeiros, que podem ter sido capturados recentemente de células infectadas na evolução da adaptação aos organismos hospedeiros específicos. Supõe-se que estes genes se expressem durante a latência e podem estar envolvidos no redirecionamento da resposta imune e na sobrevivência da célula infectada durante a latência. No caso específico do BoHV-4 o genoma contém os ORF16, ORF 71, BORFA 1 e BORF 3-4, que codificam as proteínas ν Bcl2, ν FLIP, ν FGAM e ν β GnT, respectivamente. A latência desses vírus é caracterizada por uma combinação de sequências virais que são requeridas para a manutenção do genoma e genes que intermediam a sobrevivência celular, por afetarem as rotas de sinalização e também o desvio da resposta imune (ACKERMAN, 2006). O que torna claro que as doenças produzidas por *Rhadinovirus* estão associadas à latência e uma reação inapropriada do sistema imune.

BoHV-4, como os demais Gamaherpesvírus, preferencialmente estabelece latência e não o ciclo lítico. A presença do DNA viral tem sido encontrada em diferentes tecidos de animais natural ou experimentalmente infectados, mas a tendência face ao conhecimento acumulado, é de que as células alvo sejam da linhagem monócito/macrófago, o que faz com que se torne difícil a comprovação de outros sítios (tecidos) de latência.

Em células de rhabdomyosarcoma humano e macrófagos bovinos há persistência do genoma do BoHV-4, que após sucessivas passagens mantiveram o ácido nucleico viral, comprovado por análise em eletroforese com lise *in situ*, que permite distinguir o DNA genômico, o DNA viral na forma epissomal, circularizado por ligação covalente e o DNA viral linear. A persistência do material genético foi também comprovada por PCR (DONOFRIO, 2000b).

Utilizando as mesmas células antes mencionadas, o mesmo autor, utilizando diferente metodologia (FISH, hibridização *in situ* com fluorescência), demonstrou a presença de DNA viral não somente na forma epissomal, mas também integrado no genoma celular de células em metafase, onde ambas as cromátides, foram marcadas no mesmo *locus*, no mesmo cromossoma. No momento não existe explicação por qual mecanismo se dá a integração e se somente ocorre *in vitro* ou se repete *in vivo* (DONOFRIO, 2010).

2.10 PATOGÊNESE

As células dos mamíferos utilizam primariamente dois sistemas proteolíticos para estabilizar material intra e extracelular usados para produzir energia e geração dos blocos macromoleculares para a construção da matéria. Os proteossomas degradam proteínas solúveis que foram processadas pelo sistema ubiquitina e os lisossomas destroem proteínas-ubiquitina em agregados e organelas celulares. Estes mesmos mecanismos são utilizados para eliminar patógenos e processar fragmentos para apresentação ao sistema imune, via exógena para apresentação junto ao complexo maior de histocompatibilidade Classe II e via endógena junto ao Classe I (TAYLOR et al., 2010).

A autofagia funciona para levar constituintes citoplasmáticos aos lisossomas. Três vias autofágicas são descritas: **microautofagia**: processo no qual os substratos brotam dentro dos lisossomas para degradação, não tem sido documentada em eucariontes mais evoluídos; **autofagia mediada por caperones**: as proteínas devem conter a sequência de reconhecimento KFERQ para serem transportadas através da membrana lisossomal até o lúmen. Este transporte é mediado por caperones do citoplasma e lisossomais, bem como pela LAMP 2a. **macroautofagia**: utiliza 34 proteínas chamadas proteínas relacionadas a autofagia (Atg). A infecção

por Herpesvírus e o controle imune destas são reguladas por macroautofagia. A degradação de patógenos por esta via chama-se **xenofagia**. Os Gamaherpesvírus codificam vFLIP, homóloga cFLICE-proteína inibitória (cFLIP) que bloqueiam a macroautofagia para promover a latência. A macroautofagia tem papel importante na apresentação de antígenos pelas células dendríticas (DC) aos linfócitos T CD4⁺ e na resposta imune adaptativa como um todo. Os Herpesvírus são considerados exemplos em matéria evolutiva, e mecanismos diversos foram desenvolvidos para subverter a imunidade e a macroautofagia foi um dos alvos. Mutações nos resíduos laterais a epítomos imunodominantes ou nestes próprios e não há processamento nos proteossomas ou a mutação impede a ligação do pepídeo ao TCR ou ao MHC Classe I (TAYLOR et al., 2010).

A importação de ácidos nucleicos virais para endolisossomas os expõe a “sensores imunes”, o que torna a macroautofagia um mecanismo importante no controle de patógenos intracelulares crônicos. Todos os membros da subfamília *Gamaherpesvirinae* expressam o gene ortólogo do cBcl-2 – protótipo inibidor da apoptose celular. Apoptose e macroautofagia estão intimamente interconectadas e com regulação coordenada. O Bcl₂ liga-se ao Atg6 – Beclin 1 e impede a ligação destes a kinase PI₃, processo inicial da macroautofagia. O ortólogo do cFLIP, vFLIP pode ligar-se ao Atg3 e impedir a ligação deste ao LC₃ envolvida na formação do autofagossoma e incorporação de substratos.

Os animais mais evoluídos desenvolveram dois mecanismos para o controle das infecções virais, ambos dependem da eliminação da célula infectada por **apoptose**. O primeiro baseia-se na resposta imune, polipeptídeos virais associados aos antígenos de Classe I do complexo maior de histocompatibilidade são apresentados na superfície da célula onde são reconhecidos pelo linfócitos T citotóxicos, CD₈⁺. A lise celular se dá por sinapses, nas **perforinas/granzima** sintetizadas pelos LT ou pela estimulação do receptor do Fas (*Apoptosis Stimulating Fragment*) com estimulação da **caspase 8** e, finalmente, ocorre a morte celular (O'BRIEN, 1998). O segundo mecanismo é autônomo, a célula infectada percebe o estímulo das proteínas virais que induzem de forma não programada o ciclo celular. Uma possível explicação para como a célula percebe é que quando o ciclo celular é induzido por fator de crescimento, a mensagem (comunicação intracelular) se divide em duas vias, uma para induzir a divisão celular e a outra para suprimir

componentes que levam à apoptose, no viral somente a primeira via acontece (O'BRIEN, 1998).

Inibir a apoptose é uma estratégia dos vírus para assegurar a persistência e promover um prolongamento na sobrevivência das células para a máxima produção viral. A patogênese dos Gamaherpesvírus, é consequência de dois experimentos evolucionários, infectar a célula, torná-la imortal e permanecer não detectável pelo sistema imune.

O genoma do BoHV-4 contém a sequência BORFE2 (*Bovine Open Reading Frame E2*) que codifica uma proteína citoplasmática de 22 KDa, que inibe a apoptose induzida pelo Fas e TNFR1, e contém a sequência de aminoácidos efetora na morte celular, DED (*Death Effector Domain*). Duas proteínas celulares, FADD (*Fas Associating Protein With Death Domain*) e a pró caspase 8 são componentes essenciais na via de sinalização do Fas e TNFR1 na indução da apoptose.

A proteína FADD liga-se ao DED do Fas e do TNF, o DED do FADD liga-se ao DED da pró caspase 8 (pró enzima de uma protease cujo alvo são sequências ricas em cisteína). O Fas conjuntamente com as perforinas são importantes na lise celular por linfócitos T citotóxicos e o TNF ele próprio com a participação do interferon destrói células infectadas. No ciclo de replicação viral as proteínas imediatamente precoces, não estruturais, são as primeiras a serem processadas pelos linfócitos T que liberam mediadores, tais como interferon gama e TNF, que inibem a expressão de genes por uma via não tóxica.

Prostaglandinas E₂ (PGE₂) são normalmente produzidas pelos organismos como parte da resposta inflamatória às infecções por Herpesvírus. A reação inicial na produção de prostaglandinas consiste na liberação do **ácido aracdônico**, um ácido graxo essencial de 20 carbonos, da membrana celular, pela ação da **fosfolipase A2**. As ciclooxygenases (COX) são enzimas que catalisam a oxidação do ácido aracdônico na exata medida, para produzir endoperóxido hidroperoxi ou prostaglandina G₂ (PGG₂). Esta é subsequentemente reduzida a endoperóxido hidroxil ou prostaglandina H₂ (PGH₂), que por ação da enzima prostaglandina sintase produz os componentes prostanoídes, incluindo prostaglandina, prostaciclina e tromboxane. A prostaglandina E sintetase catalisa a conversão de PGH₂ para PDE₂ (REYNOLDS; ENQUIST, 2006).

O BoHV-4, ORF 50, codifica a proteína IE 2-Rta (*Replication and Transcription Activator*), ativador da replicação e transcrição. O Rta tem função central no início da replicação do ciclo lítico viral, não somente quando da reativação da latência, mas também na infecção e produção, de novo, de virions. O Rta é uma proteína imediatamente precoce.

O BoHV-4 possui tropismo por células epiteliais e do estroma uterino. A eficiência na replicação viral nestas células deve-se às proteínas IE que são potentes transativadores (Rta), havendo aumento na produção das enzimas COX 2 e PGE. Esta última possivelmente reativa o BoHV-4 latente em macrófagos, que serve como repositório do vírus. As prostaglandinas são reconhecidas pelo seu efeito antagonista do NFkB, que por sua vez desbloqueia a expressão do gene que codifica a Rta. Os ORFs 16 e 71 codificam BCl₂ e $\sqrt{\text{FLIP}}$ inibidores da apoptose. A infecção das células do endométrio não conduz à morte destas por apoptose, mas deve-se ao ciclo lítico viral, de novo síntese de virions, o que pode se constituir em um dos fatores que leva à metrite (DONOFRIO et al., 2007). A morte celular por apoptose nas infecções virais, entendida como resposta altruísta, não é compatível com a perpetuação do patógeno, que precisa gerar partículas completas (ALLSOPP; FAZAKERLEY, 2000).

Prostaglandinas são importantes mediadores em muitos mecanismos fisiológicos e inflamatórios, que podem modular a resposta imune. Elas podem suprimir a produção de óxido nítrico na resposta inata e produção de citocinas pelas células Th1 na resposta induzida. A PGE₂ inibe a produção de interferon pelos linfócitos T ativados e IL12, como também promove o redirecionamento da resposta imune baseada em Th1 (imunidade celular) para Th2 (imunidade Humoral). Sintetase de óxido nítrico (NOS) é uma enzima que propicia a produção de interferon e é induzida na resposta inata. A forma induzida da NOS (iNOS) produz ácido nítrico, molécula citotóxica, que reage com o H₂O₂ e gera ONOO⁻ (peroxinitrito), altamente tóxico. Como a indução da COX gera PG e da iNOS gera NO, PG e NO são antagonistas. NO sabe se inibir a multiplicação de vírus DNA. A indução da COX nas infecções virais leva à produção de PGE e em consequência ativação da transcrição via promotor viral.

As GMPs são proteínas de ligação do DNA, que agem de duas maneiras para a efetiva manutenção do genoma: (i) atuam como pontes para ligar o genoma viral

ao cromossoma da célula hospedeira; (ii) estão envolvidas na replicação do genoma. É uma forma de assegurar que durante a mitose o genoma viral episomal será dividido para as duas células. As GMPs diferem entre os Gamaherpesvírus, mas dentro de cada gênero há um elevado grau de similaridade. Na região central das GMPs existe uma sequência de aminoácidos repetidos, glicina e alanina (GAR). As GMPs são codificadas pelo ORF 73 nos Gamaherpesvírus, que são homólogos em posição e sequência (BLAKE, 2010).

A principal fonte de antígenos para apresentação em conjunto com o MHC Classe I, tem sido historicamente entendida como a degradação de proteínas virais estáveis. Atualmente, existem fortes evidências de que a principal fonte são as “Proteínas Ribossomais Defectivas” (DRiPs. – *Defective Ribossomal Proteins*) (BLAKE, 2010).

Na latência a supressão de genes é o fenômeno central na evasão da resposta imune. Devido a ação estratégicas das GMPs na latência a longo prazo, todo mecanismo de evasão necessariamente deve envolver as GMPs. O EBNA homólogo é estratégico para a manutenção da latência e o reconhecimento desta proteína pelos linfócitos CD8⁺ citotóxicos tem sido investigado com muito interesse. Experimentos *in vitro* e *in vivo* tem revelado que o EBNA é capaz de ligar-se ao MHC Classe I, mas que de alguma forma é protegido para que o reconhecimento pelas células CD8⁺ não ocorra e o que se postula é que a sequência de GAR de alguma forma inibe a geração de peptídeos antigênicos e na realidade a sequência GAR age em cis para prevenir a apresentação de peptídeos antigênicos via MHC de Classe I aos linfócitos T citotóxicos CD8⁺. Esta sequencia GAR impede a degradação das proteínas pelos proteossomas. O sistema imune, por sua vez, desenvolve a sua estratégia para lutar contra o invasor e como fonte de peptídeos imunogênicos surgiram os DRiPs, capazes de induzir imunidade celular, ou seja, na divisão celular, quando há animação da latência, DRiPs são produzidos e apresentados ao sistema imune. Os recursos pela evasão dos CD8⁺ não se esgotam e a sequência GAR agem em cis para promover uma redução na tradução do RNA mensageiro que irá sintetizar os DRiPs. Durante a latência o LANA autorregula a própria síntese e atua pós ou co-transcricionalmente para impedir o processamento de RNA mensageiros primários. GMPs tem sido identificadas em todos os membros da subfamília gamaherpesvirinae que tiveram seu genoma sequenciado. O BoHv-4 como MuHV-4

não apresentam os GAR no ORF 73, mas uma sequência efetora está localizada em uma pequena região que não apresenta, no momento, nenhuma característica distintiva (BLAKE, 2010).

2.11 SINTOMATOLOGIA

2.11.1 Doenças Reprodutivas

2.11.1.1 *Metrite Pós-parto*

De um rebanho na Califórnia, EUA que tem aproximadamente 1800 animais que, durante um ano vinham apresentando metrite pós-parto e problemas de infecção uterina, com incidência considerada anormal, uma vaca com parto normal, gerou um bezerro viável, mas que adoeceu em seguida. Esta vaca apresentou metrite 12 dias após o parto, com conteúdo uterino purulento e fétido. A primeira amostra de BoHV-4 foi isolada deste material e estabelece uma associação entre este vírus e infecção uterina (PARKS; KENDRICK, 1973).

Na Bélgica, foram encontradas dez propriedades com histórico de metrite crônica sendo retiradas amostras de secreção uterina de animais afetados que foram utilizadas para isolamento viral. Foram isoladas 16 amostras virais de BoHV-4. Também houve dois isolamentos de vírus a partir de ascite, decorrente de metrite associada a peritonite e um do próprio útero. De 46 amostras de soros de animais com metrite clínica, os títulos de anticorpos por ELISA e imunofluorescência indireta foram bastante elevados (WELLEMANS et al., 1984).

Na região de Perugia, Itália, um rebanho leiteiro com aproximadamente 250 vacas que por dois anos apresentavam problemas de metrite pós-parto, vulvovaginite pustular, abortos, natimortos e infertilidade, três amostras de BoHV-4 foram isoladas de *swabs* de secreção uterina. De 30 amostras de soros desta propriedade 15 foram positivas em soro neutralização com títulos de 1:4 a 1:8. Há que se considerar que este vírus não induz ou induz títulos baixos e transitórios (CASTRUCCI et al., 1986).

Na Bélgica, duas fazendas (A com 34 animais e B com 24), por um período de 10 anos apresentaram problemas de metrite pós-parto e infertilidade, sendo acompanhadas entre dez./85 e maio/86. Houve registro de metrite em 59% e 24% nas propriedades A e B, respectivamente. No ano anterior os percentuais foram de 77% e 72%. BoHV-4 foi isolado em 11 amostras da A e em 4 da B. A análise revelou significativa correlação entre metrite, isolamento viral e soro conversão (Van OPDENBOSCH et al., 1988).

Seis amostras de Herpesvírus foram isolados de rebanhos com história de abortos, na Índia. *Swabs* vaginais foram colhidos de seis vacas com aborto e só de fêmeas com metrite que tiveram retenção de placenta. Os autores não fizeram caracterização molecular das amostras isoladas, mas pelas propriedades biológicas e pelo fato de não serem neutralizadas por soro hiperimune para o BoHV-1, concluíram tratar-se de amostras semelhantes ao BoHV-4 (MEHROTRA et al., 1986).

Endometrite ulcerativa e supurativa associada à infecção por BoHV-4 foi identificada em cinco propriedades com gado de leite, na Georgia, EUA. Quinze animais foram enviados à necropsia, amostras de útero foram utilizadas para isolamento viral, das quais nove resultaram positivas. O diagnóstico definitivo de BoHV-4 foi obtido pela realização de PCR (FRAZIER et al., 2001).

O trabalho mencionado no item anterior foi ampliado para um total de 68 casos de metrite pós-parto associados ao BoHV-4 confirmados por isolamento viral, PCR e lesões histopatológicas características (FRAZIER et al., 2001-2002).

Em mais de 10 rebanhos leiteiros na Espanha metrite pós-parto associada ao BoHV-4, foi confirmada por isolamento viral, PCR e sorologia. A presença do vírus foi confirmada em 83% dos casos com sinais clínicos. Aumento no título de anticorpos para o BoHV-4 foi evidenciado em todos os casos de metrite pós-parto e, muito interessante, em 30 animais considerados clinicamente normais houve aumento no título de anticorpos e na sequência desenvolveram sinais clínicos da doença (MONGE et al., 2006).

Dois fazendas na região de Belgrado, na Sérvia, experimentaram sérios problemas de metrite pós-parto. A soroprevalência média para o BoHV-4, determinado por ELISA, foi de 84,37%. Isolamentos virais foram realizados a partir de *swabs* vaginais. PCR e enzimas de restrição foram utilizadas para melhor caracterizar as amostras, onde duas mostraram similaridade ao MOVAR 33/63 e

uma com padrão de bandas diferente. Em nove de dez vacas com metrite houve aumento considerável no título de anticorpos (NIKOLIN et al., 2007).

2.11.1.2 *Infecção Fetal e Aborto*

A amostra de vírus designada de BH1247 foi isolada de pulmão de feto bovino abortado no sétimo mês de gestação. Este vírus analisado por soroneutralização não mostrou relacionamento antigênico com o DN599 e MOVAR 33/63 e outros Herpesvírus comuns aos bovinos. No que diz respeito a efeito citopatogênico, à formação de sincício e o tempo decorrido, seis dias, são comuns BoHV-4 (CRANDELL et al., 1976).

Soros pareados foram colhidos com intervalo de quinze dias, de 205 vacas que abortaram, em 29 houve soro conversão de forma inequívoca para o BoHV-4, soros avaliados por ELISA. Também, de aproximadamente 100 fetos abortados, foram colhidos líquido do abomaso, fragmentos do pulmão, baço e rim. Foram isoladas 3 amostras de vírus do abomaso e 2 de placenta. Das cinco vacas que tiveram estes abortos, três possuíam títulos elevados de anticorpos para o BoHV-4 e duas apresentaram soro conversão acentuada. Em outros três casos houve presença de células fluorescentes nos órgãos mencionados e as vacas apresentavam títulos elevados de anticorpos (VELLEMANS; Van OPDENBOSCH, 1989).

Amostras de soro de 221 vacas que abortaram na província de Liège, Bélgica, entre novembro de 1994 e abril de 1995, foram colhidas nas vinte e quatro horas seguintes aos abortos. Vinte e seis amostras de animais normais foram usadas como controle. No primeiro grupo, 38 animais (17%) foram positivos para o BoHV-4 e no segundo grupo 10% (soros avaliados por ELISA). A soro prevalência foi significativamente maior em animais que abortaram do que nos do grupo de controle. Os abortos ocorreram entre o quinto e o nono mês e os títulos de anticorpos eram elevados. Sugerem os autores que estas duas condições são evidências da participação do vírus em abortos (CZAPLICK; THIRY, 1998).

A presença do BoHV-4 foi investigada por vários métodos em 24 fetos bovinos abortados procedentes de vinte e dois estabelecimentos de produção de leite na Hungria. Por PCR e hibridização *in situ* a presença do vírus foi confirmada em 7

(29%) dos fetos. O genoma viral foi detectado nos linfócitos esplênicos, monócitos e, ocasionalmente, nas células epiteliais dos túbulos renais e células de Kupffer (DEIM, Z. et al., 2007).

Em estudo realizado na Hungria, para identificar a transmissão intrauterina do BoHV-4, amostras de sangue foram colhidas de trinta e uma fêmeas e seus respectivos bezerros, no dia do parto e antes da ingestão do colostro. Avaliadas por ELISA, gerou os seguintes resultados: 100% das fêmeas foram positivas e 100% dos bezerros negativos. Sangue total com e sem anticoagulantes foram utilizados para extração de DNA para estudo por PCR e evidenciou de que das trinta e uma fêmeas 100% foram positivas e dos bezerros, dezessete dos trinta e um, estavam infectados. No mesmo estudo, sêmen de 57 touros (espermatozoide, células epiteliais e granulócitos) foram avaliados por PCR. Deste total, onze amostras continham BoHV-4. Nas células do baço de sete natimortos, também estudadas pela mesma metodologia, constatou-se o genoma viral em quatro bezerros. Os autores concluem que a transmissão intrauterina é real, mas os fetos não produzem anticorpos (EGYED, et al., 2011).

2.11.1.3 Orquite – Epididimite - Vaginite

Doze amostras de vírus isoladas de bovinos que apresentaram sintomas de epididimite e vaginite foram identificadas como sendo Herpesvírus em virtude de suas características biológicas, físico-químicas e morfológicas. Nenhuma destas amostras apresentou relacionamento sorológico ao BoHV-1. Por suas características, lentidão na produção de efeito citopático e inabilidade em produzir anticorpos neutralizantes, o autor sugere que há uma proximidade ao DN 599. Estes trabalhos foram realizados na África do Sul (TEODORIDIS, 1978, 1985).

Casos repetidos de infertilidade em touros usados para reprodução, com clínica semelhante, apareceram na Bélgica, no ano de 1980. Orquite edematosa e azoospermia eram as principais características e em um destes animais foi realizada, ablação cirúrgica dos testículos. Células dos testículos foram co-cultivadas com células de linhagem para isolamento viral. Deste trabalho resultou isolamento de partículas virais com propriedades biológicas e morfológicas características de Herpesvírus. Este vírus não apresentou relacionamento sorológico com o BoHV-1,

mas os autores entenderam que pelo efeito citopático e morfologia, eram indistinguíveis do MOVAR 33/63 (THIRY et al., 1981).

Em rebanho leiteiro com aproximadamente 400 animais que apresentou epizootia de estomatite vesicular, de um total de 94 animais examinados, 19 (20%) apresentaram lesões vaginais. *Swabs* destas lesões foram utilizadas para isolamento viral e resultou na obtenção de Herpesvírus com propriedades consistentes com o BoHV-4. Este trabalho foi realizado no estado de Washington, EUA, no período de 1979-1984. Lá, 34% das amostras do BoHV-4 isoladas tinham origem no aparelho reprodutivo (EVERMANN et al., 1985).

Em rebanho leiteiro na região da Perugia, Itália, de animais com lesões de vulvovaginite, swabs vaginais foram colhidos e usados para isolamento viral, que resultou em três amostras de Herpesvírus. Estas amostras apresentaram propriedades biológicas, físicas e químicas comuns ao DN 599 (CASTRUCCI et al., 1986, 1988).

2.11.1.4 Mastite

Estudo realizado na Holanda em dez estabelecimentos de gado de leite, em que foram colhidos 58 amostras de leite de vacas com mastite e, também, soro sanguíneo, no dia zero (fase aguda) e dia 21 (convalescença). As amostras de leite foram utilizadas para isolamento viral e pesquisa do genoma por PCR. Os soros foram avaliados para presença de anticorpos para o BoHV-4 em ELISA. Amostras de soro e leite foram colhidas em mesmo número e das mesmas propriedades de animais sadios.

Três amostras do BoHV-4 foram isoladas em três propriedades diferentes. Análise estatística revelou que isolamento de BoHV-4 é mais frequente em vacas com mastite do que nas controles ($P = 0,125$). Em um dos rebanhos avaliados, com maior número de casos de mastite clínica, os animais apresentaram soro conversão durante o tempo em que a mastite ocorreu. Os autores concluem, ainda, que pelo uso do teste de Fisher, existiu uma significativa associação positiva entre isolamento de BoHV-4 e de *Streptococcus uberis* (WELLENBERG et al., 2000).

Para conhecer a participação do BoHV-4 na mastite bovina, experimentos com PCR foram realizados em rebanho da Hungria com 2000 vacas. De 30 a 41% dos úberes de 101 vaca com mastite clínica de natureza bacteriana geraram resultados positivos enquanto que menos de 6% das amostras de leite de 118 vacas normais foram reagentes ao BoHV-4. Estes animais controles foram acompanhados até o final do período de lactação, quando aproximadamente 90% dos animais continham BoHV-4 no leite, independente da presença ou não de bactérias. Não houve correlação entre excreção viral, contagem de células somáticas ou presença de bactérias. Os autores concluem que o BoHV-4 não participa da iniciação do processo, mas a reativação viral nos monócitos/macrófagos seria consequência da infecção bacteriana, e que a participação viral seria responsável pela severidade e duração da doença (KÁLMÁN et al., 2004).

Estudando uma situação de mastite contagiosa em que vários animais adoeceram ao mesmo tempo em Fukushima, Japão, pesquisadores isolaram BoHV-4 do tecido mamário infectado, crostas e conteúdo de abscesso. As amostras virais foram analisadas por PCR e enzimas de restrição e demonstraram tratar-se de vírus relacionado ao MOVAR 33/63. Soros colhidos quatro meses após o começo da doença conjuntamente com soros que haviam sido colhidos anteriormente foram avaliados por ELISA e, de oito animais com mastite, quatro foram positivos ao BoHV-4. Os autores concluem que uma relação existe entre o BoHV-4 e a mastite, mas que a patogenicidade do vírus para o tecido mamário não é propriedade comum. No entanto, deve se considerar que o BoHV-4 tem tropismo pelo tecido mamário, que o DNA viral já foi detectado nas células epiteliais dos ductos do úbere em vacas com mastite clínica e que o vírus tem sido detectado no leite em condições de produzir infecção (viável) (IZUMI et al., 2005).

2.11.1.5 *Infertilidade*

Para avaliar a participação do BoHV-4 na infertilidade de bovinos, pesquisadores, na Turquia, avaliaram 273 amostras de soro sanguíneo por ELISA, dos quais 84 eram procedentes de animais com histórico de repetição de serviço. Também destas mesmas fazendas, mesmo número de animais (84) com performance reprodutiva normal foi examinado, gerando resultados para o primeiro

grupo de 69% (58/84) de positivos e no segundo 44% (37/84). Para o restante das amostras com funções reprodutivas normais (105) houve 24,7% de positivos. Os autores concluem que há uma correlação positiva, com análise estatística entre infertilidade e infecção por BoHV-4 (GÜR; DOGEN, 2010).

2.11.2 Doenças do Aparelho Digestório

Trabalhos realizados por pesquisadores na Tanzânia resultaram no isolamento de quatro amostras de Herpesvírus de animais com síndromes clínicas distintas:

- a) Amostra T/877/70: isolado da mucosa faríngea de uma novilha em um rebanho que apresentava diarreia, principalmente em bezerros, anemia, febre, estomatite discreta, linfadenite moderada, morte súbita e casos de abortos;
- b) Amostra T/1452/70: isolada de epitélio lingual de animal com suspeita de Febre Aftosa;
- c) Amostra T/1563/70: isolada de leucócitos de animais que apresentaram icterícia, decúbito e morte.

Em testes de soroneutralização estes vírus não foram neutralizados por anticorpos para os Herpesvírus bovinos convencionais. Entretanto, a citopatologia apresentava semelhança intensa com a do MOVAR 33/63 (RWEYEMAMU; LORETU, 1973).

Trabalho realizado pelo laboratório de diagnóstico de doenças de animais no estado de Washington, EUA, no período compreendido entre 1979 e 1984, onze amostras (29%) de BoHV-4, foram isoladas de animais que apresentaram diarreias (EVERMANN et al., 1985). Nos Estados Unidos, o BoHV-4 foi isolado a partir de fezes diarreicas de bovinos (EUGSTER, 1978, 1979). Outros isolamentos são provenientes de animais com glossite ulcerosa e lesões linguais (REWEYEMAMU; LORETU, 1973; LUINI et al., 1985; CAVIRANI et al., 1990).

2.11.3 Doenças do Aparelho Respiratório e Afecções Oculares

Amostras de BoHV-4 têm sido isoladas associadas as seguintes enfermidades: ceratoconjuntivite aguda, que resultou na amostra de referência européia, Movar 33/63 (BARTHA et al., 1966); doenças respiratórias caracterizadas por secreção nasal, tosse, hiperpneia e dispneia (MOHANTY et al., 1971) que caracterizou DN-599, referência na América do Norte. Há também relatos de isolamentos publicados por SMITH et al. (1972) e EVERMANN et al. (1985).

2.11.4 Afecções Cutâneas

BoHV-4 tem sido isolado de biopsias de dermatite aguda contagiosa mamária, úlceras mamárias e dermatite interdigital (REED et al., 1977; LUINI; FIONI, 1986; CAVIRANI et al., 1998; DONOFRIO et al., 2000a).

Isolamentos em casos de dermatite nodular (ALEXANDER et al., 1957; RWEYEMAMU; LORETU, 1973; HOUSE et al., 1990).

2.11.5 Neoplasias

Amostras de BoHV-4 têm sido isoladas de diferentes tipos de tumores que ocorrem em bovinos. Linfossarcoma (POTGIETER; MARÈ, 1974; VAN DER MAATEN; BOOTHE, 1972); carcinoma escamoso ocular (ANSON et al., 1982); linfoma de células T (TOHO et al., 1985), tumor de rúmen e bexiga (KAMINJOLO et al., 1982), Tumor de etmoide (MORENO-LOPEZ et al., 1989).

2.11.6 Astenia

A amostra B11-41 do BoHV-4, pertencente ao grupo DN-599, foi isolada da medula espinhal de vaca com astenia no Japão (NAKANE et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2000).

2.11.7 Associação com Febre Catarral Maligna (FCM)

Todos os isolamentos do BoHV-4 têm sido registrado em animais acometidos pela forma europeia de FCM, causada pelo Ovine herpesvirus 2 (OvHV-2) (LIEBERMANN et al, 1967; STORTZ, 1968; TODD; STORZ, 1983).

2.11.8 Associado a Estomatite Vesicular

Grande número de isolamentos de BoHV-4 ocorreu em epizootia de VSV, onde 20% dos animais apresentavam vaginite (EVERMANN; HENRY,1989).

2.12 DIAGNÓSTICO DO BoHV-4

2.12.1 Avaliação da Imunidade Humoral

Várias são as técnicas sorológicas usadas para diagnosticar BoHV-4. Todas apresentam vantagens e desvantagens. Dentre elas as mais utilizadas são:

- Imunofluorescência indireta: Augsburg e Metzler (1989); Dewals et al. (2005).
- ELISA Indireto: Edwards e Newman (1985); Asano et al. (2003).
- Imunoperoxidase: Wellenberg et al. (1999); Monge et al. (2006).
- Soroneutralização: Frazier et al. (2002).
- Dot Immunobinding: Naeem e Goyal (1990); Essmail et al. (1999).

2.12.2 Avaliação da Imunidade Celular

A resposta imune conferida pelos linfócitos T, conseqüente à infecção pelo BoHV-4, não tem sido investigada de forma satisfatória e as opções apresentadas têm sido usadas em paralelo com a sorologia.

- Hipersensibilidade tardia: Castrucci et al. (1988); Van Opdenbosch et al. (1988).

- Interferon Gama: Godfroid et al. (1996).

A tecnologia para a citometria de fluxo, associada aos avanços na produção de raios LASER com diferentes comprimentos de onda e o desenvolvimento de novos fluorocromos tem permitido estudos da proliferação de linfócitos em resposta a estimulação antigênica, gerando informações sobre fenótipo, frequência de precursores, e estágio de ativação de células em divisão. Não há citação na literatura atual do emprego desta metodologia para avaliação na imunidade celular para o BoHV-4, como correntemente está em uso para o BoHV-1 (LITTEL-VAN DEN HURK, 2007), o que na certa ocorrerá como decorrência de experimentos para o desenvolvimento de modernas vacinas.

2.12.3 Isolamento Viral

Utiliza-se como substrato para multiplicação viral cultivos primários ou células de linhagens e como fonte de vírus a ser isolado, *swabs* de secreções uterinas, oculares e nasais. Fragmentos de órgãos e crostas da epiderme. Bastante eficiente, o co-cultivo com células mononucleares ou explantes de tecidos. Em um caso de orquite, o isolamento somente foi possível através do cultivo de células do testículo com células de linhagem. Para linhagens de células e amostras clínicas vide itens 2.6 Espécies Hospedeiras e 2.11 Sintomatologia.

2.12.4 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Oligonucleotídeos:

- Genes que codificam a glicoproteína B, região altamente conservada Amplicon com 179 bp (BOERNER et al.; 1999; WELLEMBERG et al., 2001; FRAZIER et al.; 2002; MONGE et al., 2006).
- Genes que codificam a timidina quinase: amplicon com 2538 bp (EGYED; BARTHA, 1998).
- Genes que codificam a MDBP (proteína maior que se liga ao DNA, amplicon com 2.538 bp) (NIKOLIN et al., 2007).

- Genes incluídos nos ORF 1, extremidade 3', ORF 2, ORF 3 e ORF 4, extremidade 5', amplicon com 2,571 bp (DONOFRIO et al., 2000a).
- *Nested* PCR: utiliza gene que codifica timidina quinase, amplicons com 260 e 567 bp (GYED et al., 1996; YAMAMOTO et al., 2000; ASANO et al., 2003; IZUMI et al., 2005).

2.12.5 Hibridização *Southern*

Representa um método altamente sensível para detecção de DNA de BoHV-4, permitindo inclusive estimar o número de cópias presente nos tecidos (NAEEM et al., 1991; GALIK et al., 1993; BOERNER et al., 1999; DONOFRIO et al., 2000a).

2.12.6 Enzimas de Restrição

Metodologia bastante utilizada para discriminar amostras virais de um mesmo tipo, com discretas variações no material genético, o que tem permitido agrupar diferentes isolamentos de BoHV-4 em torno das amostras de referência ou identificá-los como possuindo perfil eletroforético com características distintivas (EHLERS et al., 1985; OSÓRIO et al., 1985; DUBUISSON et al., 1987; BUBLOT et al., 1990; DONOFRIO et al., 2000a; YAMAMOTO et al., 2000; IZUMI et al., 2005; NIKOLIN et al., 2007).

2.13 EPIDEMIOLOGIA

Existem trabalhos publicados sobre a ocorrência de BoHV-4 em diferentes países e em quase todos continentes. Percebeu-se que este vírus tem sido isolado ou a presença de anticorpos específicos tem sido detectada em quase todos os países. Europa e Estados Unidos lideram os estudos, na sequência vêm África e Ásia, como é descrito a seguir:

- Bélgica: 28,7% das propriedades da região da Wallonie e 15% na de Flandres são positivas (Van MALDEREM et al., 1987).
- Holanda: 4% da amostras de leite procedentes de 54 vacas com mastite possuíam anticorpos ao BoHV-4 (WELLENBERG et al., 2000).
- Alemanha: 18,4% dos animais da região Oeste foram positivos e de 0 a 69% dos soros de touros de centrais de inseminação revelaram-se positivos (TRUMAN et al., 1986).
- Itália: na região norte 50% dos rebanhos estão infectados (LUINI; FIONI, 1986).
- Suíça: 4,2% dos animais de exploração estão infectados (METZLER et al., 1990).
- Kenia, Tanzania e África do Sul: BoHV-4 tem sido isolado de lesões cutâneas e epivag (KAMINJOLO et al., 1972; RWEYEMAMU; LORETU, 1973; THEODORIDIS, 1978).
- Zaire: em estudo sorológico, 70% dos animais foram positivos (EYANGA et al., 1989).
- Etiópia e Gana: 22,3 e 14% de soro prevalência são relatados (MARCHOT et al., 1991 e WOLDEMESKEL et al., 2000).
- Leste da África: 93,6% dos búfalos são soropositivos (ROSSITER et al. 1989). Este resultado merece reflexão, pois se trata de animais em liberdade e em vasta região, rara doença atinge percentual tão elevado.
- Estados Unidos:
 - Oklahoma: 2% dos bovinos possuíam anticorpos (POTGIETER; MARÉ, 1974)
 - Idaho, Oregon e Washington: amostragem de bovinos de corte e leiteiro, revelou a presença de anticorpos em 86% dos animais (GUO et al., 1988).
 - Minnesota: evidenciou a presença de anticorpos em 17% dos animais sem problema e de 36 a 88% em bovinos com problemas reprodutivos (NAEEM et al., 1989).
 - Kansas: 12,4% dos bovinos de corte e 24,2% dos bovinos de leite apresentavam anticorpos ao BoHV-4 (PHILLIPS et al., 1983; PHILLIPS; NASSAR, 1989).

- Michigan: 44% das fêmeas e 73% dos machos, da população de gatos possuíam anticorpos BoHV-4 (KRÜGER et al., 2000).
- Minnesota: soro prevalência em gatos foi 30% (KRÜGER et al., 1991).
- Taiwan: 23,3% de bovinos positivos (KWANG, 1999).
- Japão: em estudo epidemiológico, 8,9% dos bovinos são positivos (ASANO et al., 2003).
- Egito: BoHV-4 conjuntamente com vírus de *Lumpy Skin disease* foram isolados de animais com nódulos cutâneos em fazenda governamental em Suez (HOUSE et al., 1990).
- Turquia: para avaliar associação entre infertilidade e BoHV-4, pesquisadores revelaram presença de anticorpos em 69% de animais problemas e 44% em animais sadios (GÜR; DOGAN, 2010).
- Servia: soro prevalência de 84,37%, em duas fazendas com histórico de metrite (NIKOLIN et al., 2007).
- Espanha: BoHV-4 foi detectado em 83% de amostras clínicas de animais com metrite (MONGE et al., 2006).
- Sudão: soros de bovinos, total de 688 amostras, procedentes de Cartum e região central do Sudão, avaliados por ELISA indireto, revelou taxas de infecção de 25.0% e 19.3%, respectivamente (EIHASSAN et al. 2011).
- Brasil: foram analisados por PCR *nested* 14 fragmentos de sistema nervoso central, de bovinos que morreram com sintomatologia nervosa. A presença de material do genético de BoHV-4 foi encontrada em todos materiais (COSTA et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

O ambiente uterino dos bovinos mantém-se estéril por um conjunto de mecanismos de defesa. Células epiteliais e do estroma do endométrio tem responsabilidade imunológica, uma vez que expressam receptores de reconhecimento – PRR (*Pathogen Recognition Receptor*), de regiões antigênicas comuns a um grupo de patógenos, os chamados PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) e produzem uma resposta inflamatória clássica aos microrganismos (AZAWI, 2008).

A contaminação do útero por microrganismos, do meio externo, comumente habitantes da parte posterior do aparelho digestivo, produz efeitos adversos para a saúde e produtividade dos rebanhos. Tipicamente, 25 a 40% dos bovinos tem metrite clínica nas duas primeiras semanas subsequentes ao parto e a doença pode persistir em 20% dos animais como metrite crônica. A infecção subclínica do útero é assunto emergente e, até 50% das fêmeas, 40 a 60 dias pós-parto apresentam inflamação do endométrio, que reduzem as taxas de concepção (SHELDON et al., 2008).

Pouco explorada é a participação viral nas doenças uterinas, embora o BoHV-4 tem sido isolado em vários casos de metrite. *In vitro* BoHV-4 apresenta tropismo por células endometriais e infecta de forma, particularmente, eficiente células epiteliais e estromais causando intenso efeito citopático (DONOFRIO et al., 2007).

As perdas financeiras associadas à infecção uterina dependem do custo do tratamento, redução na produção do leite ou carne e infertilidade. Na Inglaterra, os custos diretos de tratamento e redução na produção de leite, de uma vaca com doença uterina é de 91 euros, e a doença uterina faz com que o animal deixe de produzir 300 litros de leite. Os custos indiretos devido ao aumento no intervalo entrapartos, eliminação de animais, inseminações extras e baixa expressão de cios é de 101 euros, perfazendo um total de custos por animal de 192 euros. Os custos diretos de uma doença uterina, somente, foram estimados ser de 1.059 euros para cada 100 vacas, informações obtidas de 21 rebanhos, entre 1989 a 1999. No

mesmo período existiam nos 15 membros da União Europeia 19.5×10^6 vacas de leite e as projeções de custos nas doenças uterinas, tendo com base o trabalho dos ingleses, poderia representar mais de 206 milhões de euros (SHELDON et al., 2008).

Dentre os patógenos virais bovinos conhecidos, BoHV-4 é o único agente com participação documentada experimentalmente em metrite pós-parto da espécie. Os mecanismos moleculares envolvidos na gênese da doença são intensamente pesquisados e meios e métodos de diagnóstico são desenvolvidos e/ou aperfeiçoados para lidar com este patógeno de características emergentes. Este projeto pretende oferecer alternativas para vencer limitações de natureza técnica e acadêmica, ora existentes, tais como:

- a) inexistência em nosso país de protocolos avaliados e padronizados para diagnóstico virológico e sorológico de BoHV-4;
- b) falta de isolamentos virais e estudos moleculares destes;
- c) ausência de estudos epidemiológicos da doença em bases regionais ou de âmbito mais abrangente; e
- d) inexistência de um kit nacional de ELISA indireto, para diagnóstico sorológico, com custo por unidade analisada que estimule a avaliação de rebanhos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar patógenos virais com participação nas doenças uterinas dos bovinos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Tendo sido isolado um agente viral a partir de amostras clínicas procedentes de animal com doença cujos sintomas permitam a elaboração do diagnóstico presuntivo, ou de uma síndrome, necessário se faz a análise deste agente em seus componentes estruturais, tais como: natureza do ácido nucléico e proteínas, determinantes antigênicos e características de crescimento, tais como: lesões celulares *in vitro* e tempo decorrido para que se tornem evidentes. Finalmente, detectar e avaliar a existência de anticorpos no soro sanguíneo dos animais doentes ou/e em contato.

Em síntese, os objetivos específicos do estudo foram:

- Caracterizar as propriedades biológicas:
 - Efeito citopático
 - Sorologia
- Caracterizar a morfologia:
 - Microscopia eletrônica
- Caracterizar os aspectos moleculares:
 - PCR
 - Enzimas de restrição
- Desenvolver ELISA indireto.

5 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

Descreve-se a seguir a abordagem experimental e metodológica concebidas com o propósito de estabelecer uma conexão entre os achados objetivos com elementos subjetivos, da pertinência relacional entre manifestação clínica e agente causal. A homeostasia do hospedeiro rompida por elementos da natureza, parasitos, que sua lógica a ciência tenta desvendar e harmonizar fato e razão.

Os artigos obedecem a uma redação padrão, que poderá ser modificada por exigência dos periódicos onde serão publicados.

5.1 ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BOVINE HERPESVIRUS 4, (BOHV-4) IN PARANA STATE-BRAZIL

Ernesto Renato Krüger¹, Tania Regina Penha², Daura Regina Eira Stoffelo³, Magda Costa Ribeiro⁴, Vanete Thomaz Soccol⁴

^{1,4}Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti – Rua Jaime Balão, 575, Hugo Lange, 80.040-340 – Curitiba – PR – Brazil

^{2,4}Instituto de Tecnologia do Paraná, Rua João Américo de Oliveira,330, Juvevê,80035-060 – Curitiba – PR – Brazil

³Universidade Federal do Paraná –Centro de Microscopia Eletrônica-Rua F.H. dos Santos,100,81531-990- Curitiba – Paraná – Brazil

⁴Universidade Federal do Paraná – Programa de Doutorado em Processos Biotecnológicos-Rua F.H. dos Santos,100,81531-990-Curitiba – PR – Brazil

Bovine herpesvirus-4 has been described in literature as closely associated to postpartum metritis in cows. We describe in this paper the characterization of a virus through biological, morphological and molecular methodologies that was isolated from uterine exudates drawn from a cow suffering from postpartum metritis, submitted to the Centro de Diagnostico Marcos Enrietti, a state diagnostic laboratory. Considering the cytopathic effect characteristics, morphology revealed by electron microscopy, and molecular data generated by polymerase chain reaction (PCR) and analysis by restriction enzymes we concluded to be BoHV-4 grouped together with DN-599 strain.

Keywords: BoHV-4, polymerase chain reaction, restriction enzymes, virus isolation.

INTRODUCTION

Bovine herpesvirus – 4 (BoHV4) was first isolated by Bartha in Hungary, from calves suffering from respiratory and ocular diseases (Bartha et al., 1966). The second major achievement that established a close association between this virus and bovine population was the recovery of a herpesvirus by Mohanty, in the United States, from a 1 and 1/2 – year – old steer with clinical signs of respiratory illness. (Mohanty et al., 1971). Merit in mentioning the works done by (Theodoridis et al., 1973), in Africa, with several strains of herpesvirus isolates from animals showing a genital syndrome known as “epivag”, first described in 1938, but the serological relationship with that is now accepted as reference strains, that were not pursued. The successive isolations of viruses, in several countries, which share genomic and antigenic properties to BoHV4, offers the ground for a non reasonless understanding that this pathogen has world wide distribution.

Parks and Kendrick (1973), are considered the first researchers to isolate BoHV4 from a cow with metritis, establishing a link between virus infection and uterus pathology. Since then Castrucci et al. (1986) in Italy, Mehrotra et al. (1986) in India, Czaplick and Thiry (1988) in Belgium, Frazier et al. (2001) in the USA, Monge et al. (2006) in Spain and Nikolin et al. (2007) in Serbia have BoHV4 from samples obtained of cattle with signs of reproductive disorders. Most recently Donofrio et al. (2007) shed more light on the etiological role of BoHV4 and indicates in his paper the likelihood of this virus being responsible for uterine pathology considering its tropism for stromal and epithelial cells and consequent cytopathology.

Molecular and genome sequencing data has allowed the classification of BoHV4 as a gammaherpesvirus, genus Rhadinovirus (Zimmerman et al., 2001). Its genome is constituted of linear double stranded DNA of 144 +/- 6 Kbp which consists of a long unique region (LUR) of +/- 108 Kbp that has at both ends approximately 15 tandem repeats of 200 bp, totalizing +/- 2.2 Kbp, a non coding region named polyrepetitive DNA (prDNA).

Through restriction enzymes analysis, strains of BoHV4 have been grouped into three categories: i) DN599 like, similar to the strain DN599, reference in United States, ii) Movar like, to those strains close to Movar 33/63, and iii) strains non classified, which have its own profile particularities (Markine-Goriaynoff et al., 2003).

In this paper we describe the isolation and characterization by biological, morphological and molecular methodologies of a herpesvirus, from a cow suffering from postpartum metritis. This strain is part of a herpesvirus collection isolated from the brain, organs and blood lymphocytes, as part of diagnostic activities from one of the authors (Kruger E. R.) at the virology laboratory of the Centro de Diagnóstico Marcos Henrietti – Paraná State, Brazil.

RESULTS

Virus isolation: characterized from the beginning by the rounding and detachment of cells dispersed over the monolayer. Approximately 48 hours after infection, cells were showing a kind of shrinkage and emission of long cytoplasmic strands. The CPE culminated by enlarged refringent cells and lytic degeneration. The enlarged cells also had long filaments with several balloons along them (Figure 01).

Electron microscopy: the ultra structure data of the isolated virus, such as regular arrangement of capsomers in icosahedral nucleocapsid and existence of a well defined membrane envelope, were easily detected by transmission electron microscopy (Figure 02).

Polymerase chain reaction: the amplified fragment had a molecular weight compatible with the predicted amplicon, assumed to be 2.571kb, taking into account the band positioning between molecular weight marker bands 2kb and 3kb. This fragment generated four bands, after Hind III digestion, whose base pair content were considered to have 1125 bp, 535 bp, 420 bp and 403 bp. Based on the molecular weight bands and being the bands migration pattern similar to those results published by previous work (Donofrio et al., 2000) (Figure 03).

Restriction endonuclease analysis: as shown in figure (Figure 04) the utilized restriction enzymes generated cleavage products that are in agreement with profiles assigned to BoHV-4, strain DN 599, what means a high molecular fragment which had a size of 2350 bp, indicating a monomeric repeat unit of class II and the total number of fragments summed 15 (L to M) as a result of Bam HI treatment, while Hind III has generated fragments which number, size and relative distance migration are typical of the above mentioned strain.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture: from a primary cell culture of tracheal epithelium of a bovine fetus a cell lineage was derived and named TraFB. These cells were grown in F10-199 (1:1) medium, supplemented with 10% tryptose broth phosphate (TPB) and 5% of fetal calf serum (FCS). Antimicrobials were penicillin at 100 UI mL⁻¹, streptomycin at 100 µg mL⁻¹ and amphotericin B at 2.5 µg mL⁻¹.

Virus isolation: swabs containing uterine secretion drawn from a cow with post parturient metritis were shaken in a 15 mL centrifuge tube filled up to 10 mL with the above mentioned medium without supplements. After centrifugation at 10.500 g for 10 minutes at 4 °C, the supernatant was diluted to 1:10 and 5 mL was inoculated

onto cells monolayer of a 25 cm² bottle, incubated 1 hour at 37 °C in a CO₂ incubator. The inoculum was then removed, the monolayer washed with phosphate buffered saline (PBS) and then 10 mL of growth medium was added. The same procedure was performed with a bottle that just received maintenance medium, as control. We have followed during a 10-12 day period looking for cytopathogenic effects.

Electron microscopy: cells were infected with the isolated virus, when the cytopathic effect was generalized, from 5 to 7 days, the bottles were frozen then thawed 3 times. Cell debris were removed by centrifugation at 10.500 g x 10 min, and the supernatant concentrated to 1/10 of the original volume in a Amicon filter (Amicon-Millipore, MA, USA), with membrane pores which had a 10 Kd limit exclusion. The concentrated was applied to a 30% sucrose cushion and centrifuged at 100.000 g for 90 minutes in a Beckman ultracentrifuge (Beckman-Coulter, CA, USA). The pellets were re-suspended in TEN buffer (100 mM NaCl, 10 mM Trizma and 1mM EDTA), pH 7.2, and a drop was laid on a 200 mesh carbon-coated electron microscopy grid. A drop of 2% phosphotungstic acid was added for 3 – 5 minutes and then the exceeding liquid removed with filter paper. The grids were visualized in a Jeol electron microscopy (Jeol, Tokyo, Japan) at 300 x 10³ magnification.

Polymerase chain reaction: we have done the same procedure described by (Donofrio et al., 2000), with minor modifications, summarized as follows: a 1000 µl sample of the semi purified virus was treated with 0,5% of sodium duodecyl sulphate and 100 µg of proteinase K per mL in TEL buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) at 56°C for 1 hour. Three repeated DNA extractions were done with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and twice with chloroform only, and then ethanol precipitated. For the remaining, cycling conditions, reagent concentration, primers, restriction enzyme digestion and electrophoresis the protocol was exactly the same.

DNA fingerprinting: was performed as described previously by (Osorio et al., 1985). Five µg of the extracted DNA was digested with 20 units of each restriction enzyme, Bam HI and Hind III, at 37 °C for 2 hours. The digestion product was subjected to electrophoresis at 15 V in 0,8% agarose. Then stained with ethidium bromide and visualized under U.V., photo documentation system (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

DISCUSSION

It was our intention, in this study, to characterize in an unequivocal manner a virus isolate from a cow suffering from postpartum metritis, taking advantage of the available epidemiological information, as well as, the valuable data existing in the literature about this clinical disorder in cattle. To pursuit this task, efforts were made to explore the well-documented biological properties such as nature and dynamics of

cytopathic effect development, when it was possible to realize in our inoculated cell cultures the appearance of enlarged cells dispersed over the monolayer 48 hours post infection, in a sequence of morphological modifications the emission of cells prolongements containing several small balloons along them and finally complete cell lysis by the 7th day.

The analysis of virus particles negatively stained revealed morphology, compatible with a herpesvirus in size and shape. Also characteristic was the presence of an envelope loosely arranged around the nucleocapsid and a space between them containing protein structures not resolved by conventional electron microscopy which maintains the envelope apart from the nucleocapsid, as described by (Theodoridis et al., 1971).

From the point of view of the molecular genome evaluation, the polymerase chain reaction, generated product had a molecular weight of 2571bp, which after Hind III digestion produced four fragments with a base pair composition in accordance with the reference methodology (Donofrio et al., 2000).

Restriction endonuclease analysis of viral DNAs has been used as a tool to discriminate virus strains that share biological and immunological properties. Taking in account the tree classes of prDNA determined by the total sizes of hyper molar fragments and the number and migration pattern of the digestion products we decided to choose two restriction enzymes that are almost present in any methodology of similar work. Bam HI and Hind III, as seen in Figure 04, produced the typical hyper molar band of class II prDNA, and the designated diagnostic bands, respectively. From the above mentioned data we are sure to conclude that the viral agent involved and characterized is the BoHV-4 appertaining to DN 599 group. As far as we know, it is the first time this pathogen is made known in our country.

REFERENCES

Bartha, A., Juhasz, M & Liebermann H. (1966). Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. A preliminary report. *Acta Vet Acad Sci Hung* 16, 357 – 358.

Castrucci, G., Frigeri F., Cilli V., Donelli, G. Ferrari M., Chicchini V. & Bordoni, E. (1986). A study of an herpesvirus isolated from dairy cattle with a history of reproductive disorders. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 9,13-21.

Donofrio, G., Cavirani S., Flammini C.F. & Scatozza F. (2000). Molecular typing of a Bovine herpesvirus 4 field isolate. *Vet Res Commun* 24, 411-422.

Donofrio, G., Herath, S., Sartori C., Cavirani S., Flammini C.F. & Sheldon I. M. (2007). Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction*. 134, 183-187.

Frazier, K., Pence, M., Mauel, M.J., Liggett, A., Hines II, M.E., Sangster, L., Lehmkuhl, H.D., Miller, D., Styer, E., West, J. & Baldwin, C.A., (2001). Endometritis in post parturient cattle associated with Bovine herpesvirus – 4 infection: 15 cases. *J Vet Diagn Invest* 13, 502 – 508.

Markine-Goriaynoff, N., Minner, F., DeFays, K., Gillet. L., Thiry. E., Pastoret, P. P. & Vanderplasschen. A (2003). L'herpèsvirus bovin 4. *Ann Méd Vét* 147, 215-247.

Mehrotra, M. L., Schucla, D.C. & Srivastava, N. C. (1986). Isolation of a new herpesvirus from cases of reproductive disorders in cows. *Indian J An Sci* 56, 1196-1199.

Mohanty, S. B., Hammond, R.C., & Lillie, M.G. (1971)..A new bovine herpesvirus and its effects on experimentally infected calves. *Arch Gesamte Virusforsch* 34, 394-395.

Monge, A., Elvira, L., Gonzales, J.V, Astiz, S. & Wallenberg, G. J. (2006). Bovine herpesvirus-4 associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. *Res Vet Sci* 80, 120-125.

Nikolin, V., Donofrio, G., Milosevic, B., Taddei, S., Rodosavljevic V & Milicevic N. (2007). First Serbian isolates of Bovine herpesvirus-4 (BoHV-4) from a herd with history of postpartum metritis. *New microbiol* 30, 53-57.

Osorio, F.A., Reed. D.E., Van der Maaten M.J. & Metz C.A., (1985). Comparison of the herpesvirus of cattle by DNA restriction endonuclease analysis and serological analysis. *Am J Vet Res* 46, 2104-2109.

Parks, J.B. & Kendrick, J. W. (1973). The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. *Arch Gesamte Virusforsch* 41, 211-215.

Theodoridis, A. (1978). Preliminary characterization of viruses isolated from cases of epididymitis and vaginitis in cattle. *Onderstepoort J Vet Res* 45, 187-195.

Zimmermann, W., Broll, H., Ehlers, B., Bulk H. J., Rosenthal, A & Goltz, M. (2001). Genome sequence of Bovine herpesvirus-4, a bovine rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J Virol* 75, 1186-1194

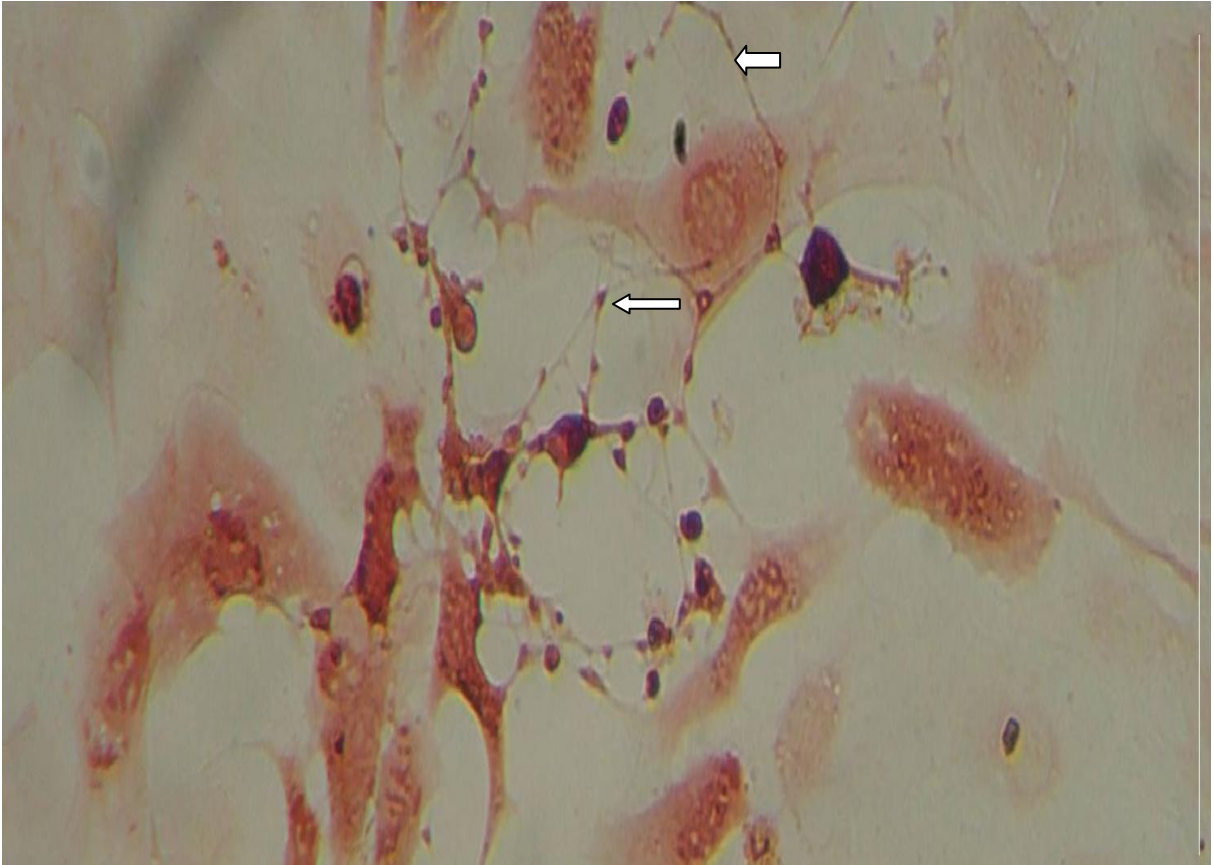


Figura 01: BoHV-4/SU cytopathic effect in TraFB cells.

Isolated from swabs drawn of cow suffering from postpartum metritis in 1999.

Legends:

⇒ *Small balloons*

⇒ *Strands*

Source: authors

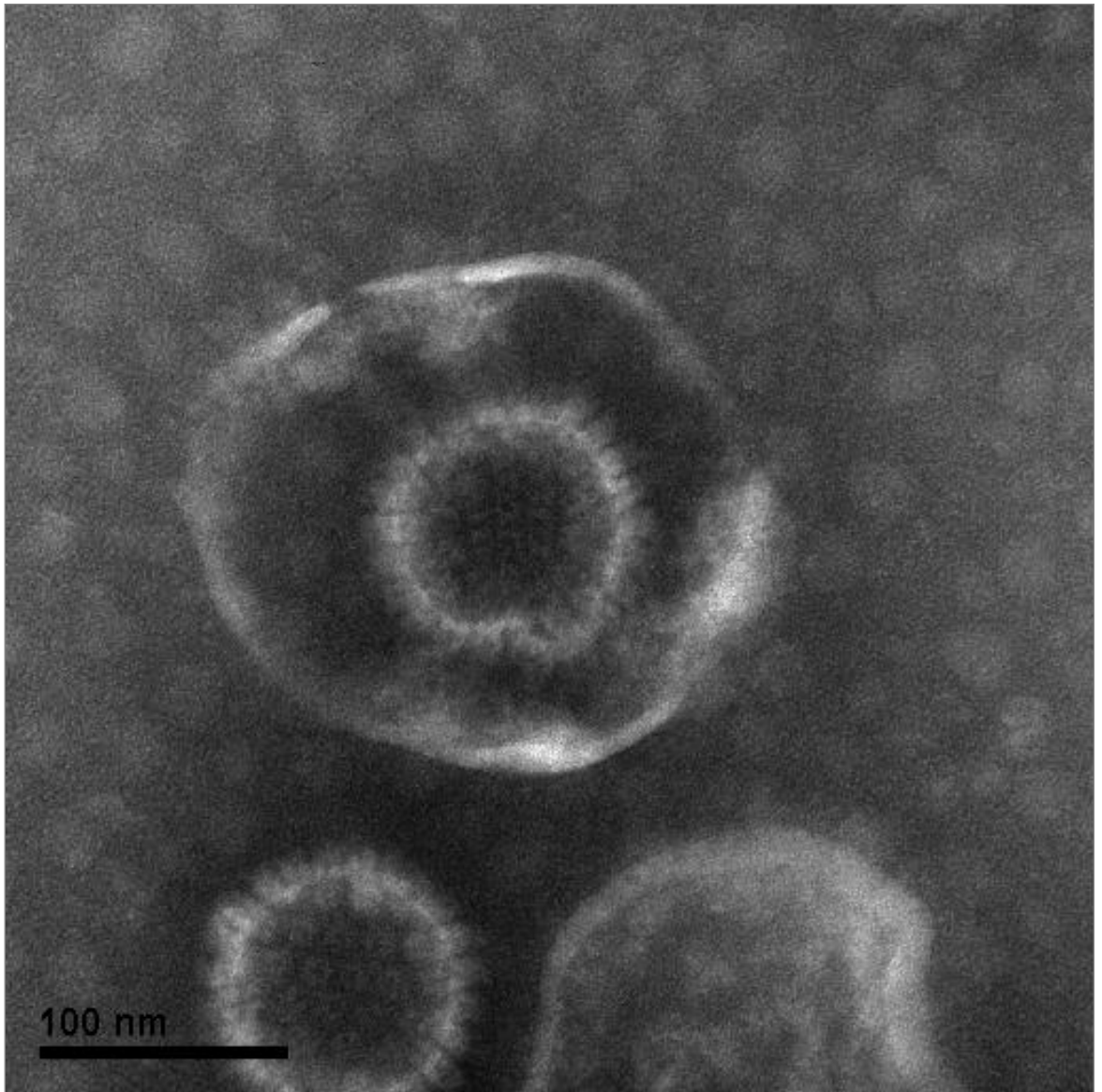


Figure 02: BoHV-4/SU electron microscopy. Magnification 300×10^3 .

Isolated from *swabs* drawn of cow suffering from postpartum metritis in 1999.

Source: authors

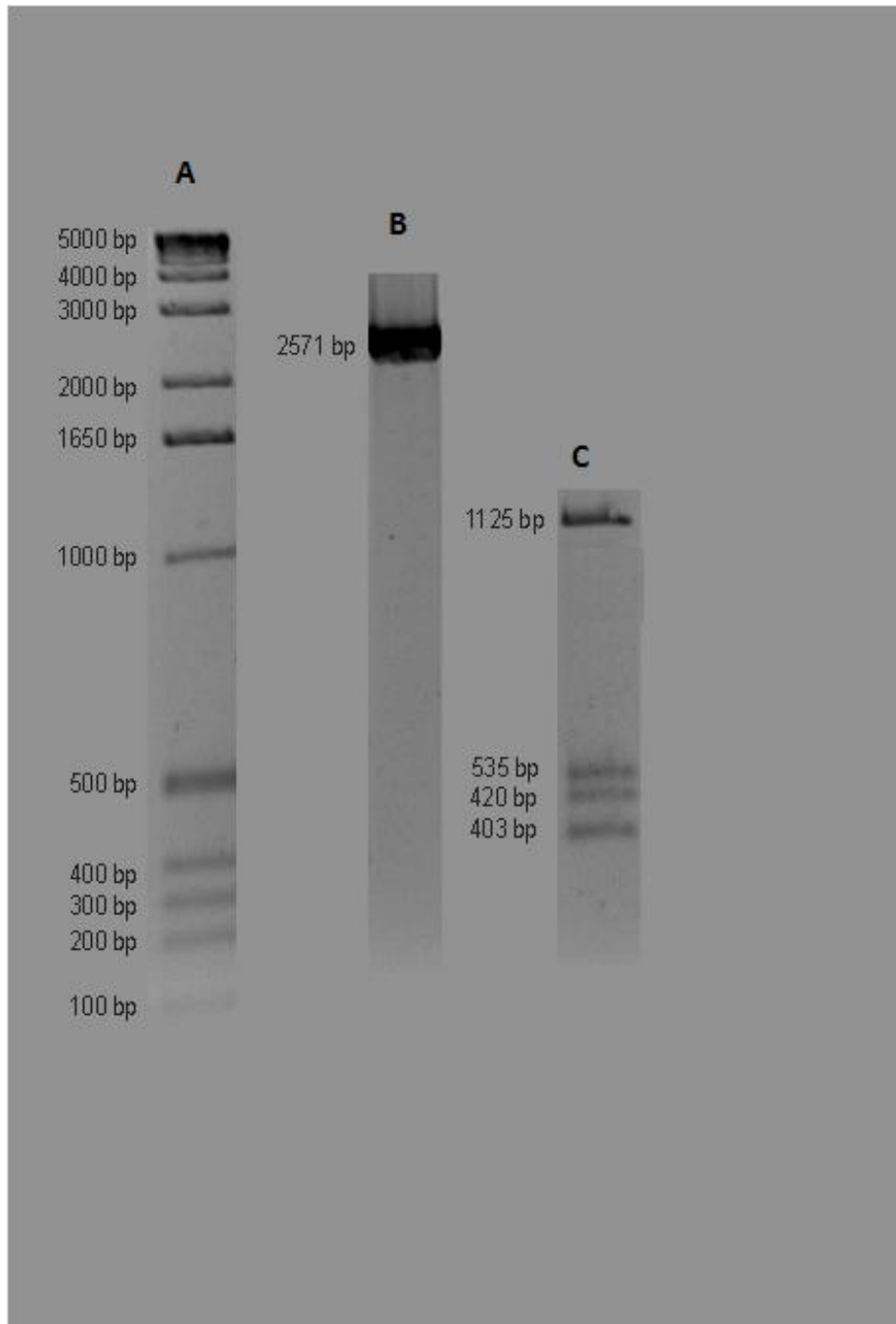


Figura 03: PCR amplification of BoHV-4/SU DNA.

Legends:

Lane A: Molecular weight marker 1kb.

Lane B: BoHV-4/SU PCR amplicon.

Lane C: PCR amplicon after Hind III digestion.

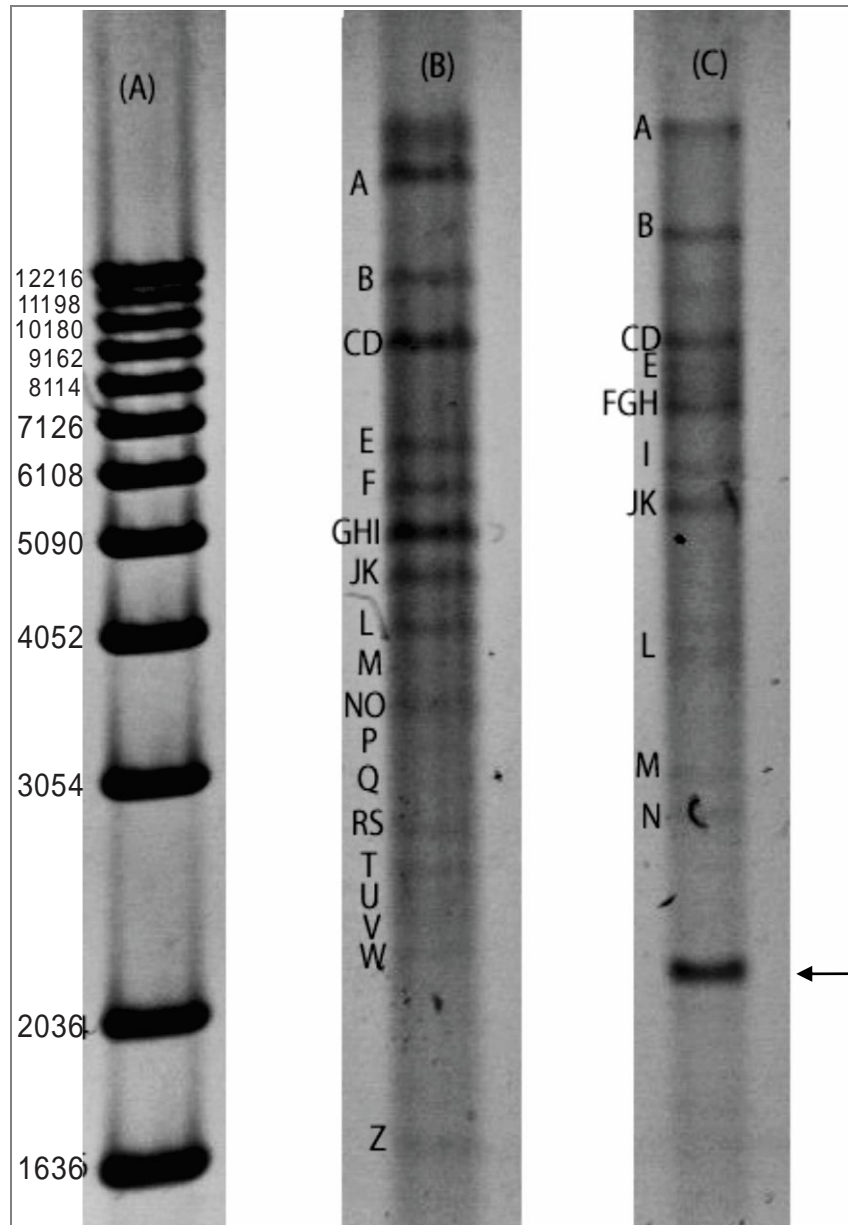


Figure 04: BoHV-4/SU DNA after restriction enzyme treatments.

Legends:

Lane A: molecular weight marker 1 kb

Lane B: BoHV-4/SU Hind III digestion

Lane C: BoHV-4/SU Bam HI digestion

→ : 2350 bp

5.2 DEVELOPMENT AND EVALUATION OF AN INDIRECT ELISA, AND A SEROLOGICAL SURVEY TO DETECT SPECIFIC ANTIBODIES TO BOVINE HERPESVIRUS – 4, IN BRAZIL

E.R. Krüger^a, T.R. Penha^b, F. C. Hummelgen^c, J.B. Agottani^b, D. Reva^d, R.L. Gonçalves^d, V.T. Soccol^e

^{a, e} Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti – Rua Jaime Balão, 575, Hugo Lange, 80.040-340 – Curitiba – PR – Brazil

^{b, e} Instituto de Tecnologia do Paraná – Rua João Americo de Oliveira, Juvevê-330-80035-060-Curitiba – PR – Brazil

^cUniversidade Tuiuti do Paraná – Rua Sydnei A. Santos, 238 Santo Inácio – 82.010-330 - Curitiba – PR – Brazil

^d Biogeneses Bagó Saúde Animal Ltda- Avenida Manoel Ribas, 985, 5º andar – Mercês- 80.810-000 - Curitiba – PR – Brazil

^eUniversidade Federal do Paraná –Programa de Doutorado em Processos Biotecnológicos-Centro Politécnico-Rua F.H. Dos Santos,100,81531-990- Curitiba – Paraná – Brazil

Abstract

Introduction: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is a powerful and practical technology for serological studies and has been applied to detect antibodies to a myriad of animal pathogens. **Objective:** The aim of this work was to develop and evaluate an indirect ELISA and serological inquires for specific antibodies to BoHV-4. **Material and Methods:** Collection of bovine serum samples was obtained at different Brazilian states, and probed in an indirect ELISA assay for the presence of antibodies to BoHV-4 and BoHV-1. **Results:** The serological results obtained showed that the indirect ELISA assay can be applied for detection of specific antibodies to BoHV-4, and allowed us to conclude that BoHV-4 infects bovines in every Brazilian state from which serum samples were harvested. **Conclusion:** Besides, the ELISA assay system has been standardized and proved useful for epidemiological studies of BoHV-4.

Keywords: BoHV-4; indirect ELISA; serology

1 INTRODUCTION

Bovine herpesvirus-4 (BoHV-4) is a gammaherpesvirus of cattle, and a member of the Rhadinovirus genus, as revealed on grounds of gene arrangement and phylogenetic analysis (Zimmermann et al., 2001). This virus has been associated with several reproductive disorders in bovine females such as postpartum metritis, with or without peritonitis, and in a case control study, an epidemiological association between BoHV-4 and abortion was reported (Czaplick; Thiry, 1988).

Besides the controversy around BoHV-4 pathogenesis, if really it is a bovine pathogen in a true conception of the term, once experimentally infected animals have results outcome that are non uniform, non reproducible in each experiment, leaving the Koch postulates partially fulfilled, the scientific curiosity has maintained a search for an evolutive meaning for this virus that is an unique example for a lateral transfer of a gene that codifies an enzyme with implication to the host immune system, the core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (β 1,6 GnT) (Markine-Goriaynoff et al., 2003). In several countries, mainly in Europe and United States, and in almost all continents, researchers have made efforts to detect specific antibodies to BoHV-4 (Markine-Goriaynoff et al., 2003).

Diagnostic serology as a tool to identify Bovine herpesvirus-4 infection is still a cumbersome issue or in other words, there is no methodology recognized as gold standard to support a definitive animal categorization. Serum neutralization (SN) has been used for animal Herpesvirus other than BoHV4, to generate binomial results or titers, but it is not feasible to this virus, since it induces low or none antibody titers in naturally or experimentally infected animals (Dubuisson et al., 1988). An endometriotropic strain was mentioned as useful for SN, being capable of generating titers ranging from 1:8 to 1:32 (Frazier et al., 2002). Most traditionally, indirect immunofluorescence has been the technique of choice, besides its well known drawbacks, when a large number of samples must be evaluated (Osorio, et al. 1985; Dewals et al. 2005). Additionally, to detect specific antibodies to BoHV-4, methodologies such as complement fixation, dot immunobinding and immunoperoxidase has been employed (Guo et al. 1988; Esmail et al., 1999; Welleberg et al., 1999; Monge et al., 2006).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is a powerful and practical technology for serological studies and has been applied to detect antibodies to a myriad of animal pathogens. Its use in seroepidemiological inquires to find out specific antibodies to BoHV-4 is documented in several published data (Edward and Newman, 1985; Metzler; Wyler, 1986; Czaplick; Thiry, 1998; Asano et al. 2002).

In this paper we describe the development and evaluation of an indirect ELISA and its application in a serological survey looking for specific antibodies to BoHV-4.

2 MATERIAL AND METHODS

Cells: from a primary cell culture obtained of a bovine fetus tracheal epithelium, a cell lineage was derived and named TraFB. These cells were grown in F10-199 medium (Sigma, MI, USA), plus 5% of fetal calf serum (FSC) and 10% of tryptose broth phosphate (TPB). Penicilin at 100 UI/mL^{-1} , streptomycin at 100 ug/mL^{-1} and fungizon at 2.5 ug/mL^{-1} , were utilized as antimicrobials.

Viruses: an isolated of BoHV-4 in our diagnostic routine, that has been characterized and designated BoHV-4/SU (Kruger et al., 2012) was utilized for serum neutralization and ELISA antigen production. BoHV-1, Los Angeles strain, was employed for the same purposes before mentioned.

Serum samples: a collection of 1810 serum samples, obtained from 13 different Brazilian states, were probed in a indirect ELISA for the presence of antibodies to BoHV-4 and 92 samples to both BoHV-4 and BoHV-1. These samples were acquired as a consequence of a technical support offered by a vaccine company to farmers interested in its biological products.

Serum neutralization (SN): we followed the protocol established by (Bitsch, 1978). In brief, sera were inactivated at 56°C for 30 minutes and then diluted to 1:2 and 1:4 in 50 µl of maintenance medium (MM), the same growth medium, without FCS and TPB. Fifty micro liters of each virus suspension containing 100 TCID_{50/50} µl was added to each well and incubated overnight at 4 °C. From a cell suspension having 3 x 10⁵ cells/mL, 100 µl was joined to each well. Plates were incubated in a CO₂ incubator adjusted to 5% of CO₂ and temperature of 37 °C, during five days for BoHV-1 and 7 days for BoHV-4. Plates were read each every other day.

ELISA antigen production: the same procedure was applied to both viruses BoHV-4 and BoHV-1. Roller bottles were seeded with TraFB cells and after monolayer have reached plain confluence were inoculated with 10 mL of 10⁻³ TCID_{50/50} µl of BoHV-4 and 10⁻⁵ TCID_{50/50} µl, of BoHV-1, approximately the same 100 TICD₅₀ utilized in serum neutralization. The bottles were incubated for 1 hour at 37° C, and after 50 mL of MM was added. When cytopathic effect was generalized, the bottles were frozen and thawing three times. To remove cell debris the medium was submitted to clarification at 10.000 g for 20 minutes and in sequence concentrated in a Amicon filter (Amicon-Millipore, MA, USA) to 1/10 of the original volume, which had 10.000 nominal molecular weight limit membrane. The concentrated virus was applied to a 30% sucrose cushion and centrifuged at 100.000 g for 1 hour and 30 minutes. The virus pellet was resuspended in TEN buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris and 1 mM EDTA) and then submitted to tree sonication cycles, 15 seconds each, 20 kHz, at a potency of 70 Watts. After was stored at -80°C until use.

Indirect ELISA: after a check board titration was performed, the antigen titer was defined, and then the plates (Greiner Bio One GmbH) were coated with 50 µl of each virus antigen in carbonate – bicarbonate buffer (0,15 M and 0,35 M, respectively, pH 9.6) per well. The plates were incubated overnight at 4°C or 2 hours at 37°C, after washed four times with washing buffer (0.15M NaCl, 1.8mM Na₂HPO₄, 8.5mM Na₂HPO₄, 0.5 mL Tween 20, pH 7.2), blocked with 100 µl per well of blocking buffer (0,15M NaCl, 0.05M Trizma, 0.001 M EDTA, 0.5 mL Tween 20 and 3.0% BSA), pH 7.2, and incubated 1 hour at 37°C. Sera were diluted to 1:25 in blocking buffer, and 50 µl of each dilution added to two wells. Positive and negative control either. Incubation was followed for 1 hour at 37°C. The plates were washed in the same

manner and 50 μL of rabbit anti-bovine IgG conjugate (Sigma, St Louis, MI, USA) was added to each well. Plates were incubated and washed as above mentioned. A 50 μL of substrate/cromogen solution (0.4 mg mL^{-1} of OPD in 0,05 M of citric acid, plus 0.03% H_2O_2) was added to each well. After a 15 minutes incubation, the reaction was stopped by addition of 50 μL H_2SO_4 1N, and the plates were read at 492 nm wave length. The optical density (OD) mean of each serum was expressed according to the formula:

$$\frac{\text{OD sample} - \text{OD negative control}}{\text{OD positive control} - \text{OD negative control}}$$

$$\text{OD positive control} - \text{OD negative control}$$

ELISA Control sera: positive and negative control sera for BoHV-4 and BoHV-1 were selected by SN.

Statistical analysis: The indirect ELISA values were analyzed with Pearson correlations, percentage of global concordance and non-weighted Kappa index. Frequency of the result of ELISA assay was analyzed using Chi-squared and Z-test probabilities. Statistical significance was for $p < 0.05$.

3 RESULTS

Serum Neutralization: was performed having in mind just one purpose, to find positive and negative control sera for both BoHV-4 and BoHV-1. We took advantage of our serological diagnostic routine, which allowed us easily to find a set of BoHV-1 positive (SN titers from 1:64 to 1:256) and negative sera. For BoHV-4, an scarce number of positive samples were found, which had titers of 1:2 or 1:4, while there was no trouble to find negative ones.

BoHV-4 versus BoHV-1 indirect ELISA (specificity): it was our intention, in this experiment, to indentify a real chance of having a cross reactivity between humoral immune responses to BoHV-4 and BoHV-1. Out of 92 sera screened, 20 were positive to BoHV-1 (ELISA value ≥ 0.400) and negative to BoHV-4 (ELISA value ≤ 0.200). Two of them were positive for both viruses, and tree were positive to first one and the ELISA value fut in the gray zone (≥ 0.201 and ≤ 0.399) of the second. Just one sample was positive to BoHV-4 and negative to BoHV-1 (Tables 1 and 2).

BoHV-4 indirect ELISA: a total of 1810 samples were evaluated for the presence of antibodies to BoHV-4, that were taken from 13 different Brazilian states and the total of farms distributed among them summed up 315. The overall results can be stated as follow: positive = 366 (20.2%), negative = 1105 (61.0%) and gray zone samples = 339 (18.7%). Table 3 shows more detailed information about sample size and state distribution.

BoHV-4 indirect ELISA value for negative farms (specificity): to better define a threshold value for a judicious discrimination between positive and negative samples, we evaluated the ELISA values for 201 samples coming from 22 farms in which there were no positive or gray zone results, and we found a mean ELISA value of 0.014 for 114 samples and minus 0.008 for 87 ones.

Statistical analysis: Regarding the indirect ELISA assay, it was observed high possibility frequency in MG, RJ, and AM; low positive frequency was observed in SC, RS, RO, MS, and MT, and low negative frequency only in MG. For gray zone, it was observed high frequency in MG and low frequency in RG and MG (Table 2) ($p < 0.05$; Z-test).

Concordance analysis for the data of indirect ELISA assay for BoH-4 versus BoH-1, showed a very low percentage of global concordance of 8.7% and a Kappa index of -9.03%. Data analyzed by Pearson correlation showed a correlation index of 0.206 ($p=0.311$) and a random error ($1-R^2$) of 95%. These results suggest that no association whatsoever was found for BoHV-4 and BHV-1 indirect ELISA assay.

4 DISCUSSION

Since its discovery antibodies, by its nature and physiological properties, what means specific linkage to critical epitopes, have been understood to play a major role in the interaction host-pathogen, driven to health or disease, as well as in the co evolution of these biological systems. Exploring the refined link up of these protein molecules, several methodologies have been developed with intention of, as early as possible, and in a non doubtful way to put in evidence the connection cause-effect between infection and clinical manifestation. ELISA technology has met this goal in a manner which both requirements, for an almost ideal serological test, sensitivity and specificity, are put together, generating results to support decision making, rationally and in required time.

Efforts made until now are convincing that indirect ELISA can be applied for detection of specific antibodies to BoHV-4, even if, there are some difficulties to be overcome, such as, to define rigorously the lowest cutoff value and the possible cross reactivity with other bovine herpesvirus as mentioned by (Mohanty et al.,1984). Conscious of these limitations we tried to get away from them, by adopting some strategies that we judged coherent and available to our working conditions. First of all, we tried to find positive and negative control sera, and through serum neutralization, was possible to identify them. In a second step we have scrutinized sera of hundred percent of animals from tree different farms, in order to find at least one with no reactors, prevalence zero, and we did find it. This work allowed us to realize that the mean ELISA value was far below 0.200 (data not mentioned in this paper). We did

prefer to select 201 samples from farms included in this work, in which, results were convincingly negatives, and we got a mean ELISA value of 0.014 for 114 samples and minus 0.008 for 87 ones. Considering the above mentioned experimental data, we were sure to stipulate ELISA value up to 0.200 as negative results.

The second major concern was the possibility of cross reactivity between BoHV-4 and BoHV-1. As we wrote in our results, we did not had any evidence that antibodies specific for BoHV-1 can interfere in ELISA results for BoHV-4. This was evidenced mainly in an unidirectional way, strong positive serums to BoHV-1 are negative to BoHV-4. Two serums were positive to both viruses, and we considered as discussed before by (Metzler; Wyler, 1986) prudent to understand as an double infection. Since we still don't have any methodology that could help us to establish a clear cut value, to define presence or absence of specific antibodies to BoHV-4, and considering the possibility of mismanipulation, and also the biological variables among animals, we judged reasonable to include a gray zone, in which, values range from 0.201 to 0.399. We are seriously convinced that the vast majority of sera included in this category are really positives, especially those ones generated from farms having positive reactors.

The serological results allowed us to conclude with confidence that BoHV-4 infects bovines in every state from which serum samples were harvested, and although the sample size was quite small for some areas, it is fair to assume that this disease is enzootic in some regions of our country. This serological study lays the basis for future prevalence setting works, since our ELISA system has been standardized and proved useful for epidemiological studies. It may also bring clinician's attention to pathologies associated to this virus such as those mentioned by farmers when asked to fill out the forms. Abortion, heat repetitions and very interesting almost hundred percent of farms that had cases of placenta retention there were positive results.

5 REFERENCES

- Asano A, Inoshima Y., Murakami K., Iketani Y., Yamamoto Y., Sentsui H., 2002. Latency and persistence of Bovine herpesvirus 4, strain B11-41, in bovine nervous tissue. *J.Vet. Med. Sci.* 65(1), 87-93.
- Bitsch V., 1978b. The p37\24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. *Acta Vet.Scand.* 19, 497-505.
- Czaplick G. and Thriry, E., 1998. An association exists between Bovine herpesvirus-4 seropositivity and abortion in cows. *Prev. Vet. Med.* 33, 235-240.

Dewals B., Gillet L., Gerdes T., Taracha E. L. M., Thiry E., Vanderplasschen., 2005. Antibodies against Bovine herpesvirus 4 are highly prevalent in wild African buffaloes throughout eastern and southern Africa. *Vet. Microbiol.* 110,209-220.

Dubuisson J., Thiry E., Thasasso F., Bublot M., Pastoret P.P., 1988. Biological and biochemical comparison of Bovine herpesvirus 4 strains. *Vet. Microbiol.* 16, 339-349.

Essmail M., Baker B., Collins J., Vandewoude S., Salman M., Hegazy A.A.,1999. Dot immunobinding assay for detection of Bovine herpesvirus 4 antibodies in rabbits. *J.Vet. Invest.* 11, 237-239.

Edwards S., Newman R.H., 1985. Detection of antibodies to Bovid herpesvirus 4 by Elisa. *Vet Microbiol.* 10, 149-154.

Frazier K., Baldwin C.A. Pence M., West J., Bernard J., Ligget A. Miller D., Hines M.E., 2002. Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic Bovine herpesvirus 4. *J.Vet. Diagn. Invest.* 14, 457-462.

Guo W.Z., Shen D.T., Evermann J.F., Gohram J.R.,1998. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and a complement fixation test for detection of IgG to Bovine herpesvirus 4 (bovine cytomegalovirus). *Am. J. Vet. Res.* 49, 667-670.

Markine – Goriaynoff N., Georgin J.P., Goltz M., Zimmermann W., Broll H., Wamwayi H.M., Pastoret P.P., Sharp P.M., Vanderplasschen.,2003. The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyl transferase-mucin encoded by Bovine herpesvirus 4 was acquired from an ancestor of the African buffalo. *J. Virol.* 77, 1784-1792.

Markine– Goriaynoff N., Minner F., De Fayes K., Gillet L., Thiry E., Pastoret P.P., Vanderplasschen A.2003. L'herpèsvirus bovin 4. *Ann. Méd. Vet.* 147, 215-247.

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

Mohanty S.B., Rockemann D.D., Snyder D.B. (1984). Serologic cross-reaction between Bovine herpesvirus 1 and 4 by enzyme – linked immunosorbent assay. *Microbiologica* 7, 179-186.

Monge A., Elvira L., Gonzales J.V., Astiz S., Wellemberg G.J. (2006). Bovine herpesvirus 4 associated postpartum metritis in a Spanish herd. *Res. Vet. Sci.* 80, 120-135.

Osorio F.A., Reed D.E., Van Der Maater M.J., Metz C.A. (1985). Comparison of the herpesvirus of cattle by DNA restriction endonuclease analysis and serological analysis. *Am. J. Vet. Res.* 46, 2104-2109.

Wellemberg G.J., Van Rooij E.M., Maissan J., Van Oirschot J.T. (1999). Evaluation of a newly developed immunoperoxidase monolayer assay for detection of antibodies against Bovine herpesvirus 4. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 447-451.

Zimmermann W., Broll H., Ehlers B., Buhk H.J., Rosenthal A.,Goltz M.(2001).Genome sequence of Bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication.*J. Virol.* 75,1186-1194.

TABLE 1 – BOVINE SERA SAMPLES. INDIRECT ELISA VALUES, BoHV-4
VERSUS BoHV-1

SERUM SAMPLE	BoHV-4 ABSORBANCE	ELISA VALUE	BoHV-1 ABSORBANCE	ELISA VALUE
1426	0.189	0.193	0.540	1.009
1435	0.172	0.146	0.338	0.517
1436	0.266	0.410	0.164	0.092
1444	0.124	0.011	0.314	0.458
1452	0.166	0.129	0.503	0.919
1453	0.192	0.202	0.542	1.014
1455	0.086	0.095	0.488	0.882
1456	0.277	0.300	0.556	1.048
1458	0.124	0.011	0.592	1.136
1459	0.138	0.050	0.438	0.760
1460	0.148	0.078	0.646	1.268
1461	0.102	-0.050	0,377	0,514
1462	0.266	0.410	0.542	1.014
1463	0.088	0.089	0.304	0.434
1464	0.132	0.033	0.528	0.980
1465	0.092	0.078	0.492	0.892
1466	0.116	0.011	0.474	0.848
1467	0.102	0.050	0.480	0.863
1468	0.372	0.707	0.664	1.312
1470	0.153	0.092	0.528	0.980
1472	0.250	0.308	1.045	2.089
1498	0.118	-0.033	0.592	0.936
1510	0.166	0.090	0.552	0.834
1511	0.164	0.085	0.570	0.880
1513	0.128	-0.007	0.626	1.022
1514	0.111	-0.051	0.675	1.147

TABLE 2 - RESULTS OF INDIRECT ELISA ASSAY IN BOVINE SERA SAMPLES

ELISA values		RESULTS	
BoHV-4	BoHVI-1	BoHV-4	BoHV-1
0.193	1.009	N	P
0.146	0.517	N	P
0.41	0.092	P	N
0.011	0.458	N	P
0.129	0.919	N	P
0.202	1.014	GZ	P
0.095	0.882	N	P
0.3	1.048	GZ	P
0.011	1.136	N	P
0.05	0.76	N	P
0.078	1.268	N	P
-0.05	0.514	N	P
0.41	1.014	P	P
0.089	0.434	N	P
0.033	0.98	N	P
-0.078	0.892	N	P
-0.011	0.848	N	P
-0.05	0.863	N	P
0.707	1.312	P	P
0.092	0.98	N	P
0.308	2.089	GZ	P
-0.033	0.936	N	P
0.09	0.834	N	P
0.085	0.88	N	P
-0.007	1.022	N	P
-0.051	1.147	N	P

N – negative; P – positive; GZ – gray zone

ELISA values, P ≥ 0,400; N ≤ 0,200; GZ - 0,201 to 0,399

TABELA 3 – ORIGIN OF BOVINE SERUM SAMPLE HARVESTED IN THIRTEEN BRAZILIAN STATES AND RESULTS BY INDIRECT ELISA

STATE	FARMS SAMPLED	SERUM SAMPLES	POSITIVE		NEGATIVE		GRAY ZONE	
			Number	%	Number	%	Number	%
Minas Gerais	81	442	157	35.5	156	35.2	129	29.1
Goiás	69	370	77	20.8	227	61.4	66	17.8
Santa Catarina	43	241	36	14.9	168	69,7	37	15.3
Paraná	41	211	38	18,0	133	63,0	40	18.9
Rio Grande do Sul	15	126	3	2.4	116	92.0	7	5.6
Rondônia	18	117	11	9.4	89	76.0	17	14.5
São Paulo	14	82	12	14.6	56	68.2	14	17.0
Mato Grosso do Sul	10	65	3	4.6	52	80.0	10	15.4
Bahia	20	64	13	20.3	40	62.5	11	17.2
Mato Grosso	8	54	1	1.8	49	90.7	4	7.4
Rio de Janeiro	3	17	7	41.2	8	47.0	2	11.8
Distrito Federal	2	12	2	16.6	8	66.6	2	16.6
Amazonas	1	9	6	66.6	3	33.3	0	0
TOTAL	315	1810	366		1105		339	

6 DISCUSSÃO GERAL

Herpesvírus bovino 4 foi originalmente isolado de animais com ceratoconjuntivite e problemas respiratórios na Hungria (BARTHA et al., 1966). Desde então, sucessivos isolamentos e inquéritos sorológicos têm sido realizados nos diferentes continentes, revelando a associação deste vírus a um espectro crescente de manifestações clínicas envolvendo os aparelhos respiratório, digestório, reprodutivo e também com doenças cutâneas e neoplásicas. Trabalhos experimentais afirmam a correlação positiva, medida por metodologias estatísticas, entre infecção por BoHV-4 e metrite pós-parto, aborto e infertilidade (MONGE et al., 2006; CZAPLICKI; THIRY, 1998; GÜR; DOGAN, 2010).

A região codificadora do ácido nucleico do BoHV-4, foi completamente sequenciada (ZIMMERMANN et al., 2001). Os genes e suas respectivas posições determinadas, as proteínas e suas funções biológicas conhecidas. Dentre as quais, três proteínas cujos genes foram capturados do hospedeiro por transferência lateral têm suas atividades estritamente associadas a patogênese dos Gamaherpesvírus. As proteínas ν Bcl₂ e ν FLIP são inibidoras da apoptose e uma terceira a C₂GnT promove modificações estruturais e translacionais em glicoproteínas, o que sugere participação na evasão da resposta imune. A glicoproteína codificada pelo ORF10, envolvida na adsorção do vírus à célula, encobre o antígeno indutor de anticorpos neutralizantes, ambas devem se constituir no alvo para desenvolvimento de vacinas com subunidades virais, associadas a um adequado adjuvante. No que tange a imunidade celular, ainda se desconhece quais polipeptídeos ou proteínas são apresentados aos linfócitos T em conjunto com o MHC, o que será seguramente o segundo componente de futuras vacinas.

O controle de diversas doenças infecciosas de animais por vacinação é, sem dúvida, a mais elevada conquista da medicina veterinária no último século. Uma das falhas no controle de certos patógenos deve-se à pequena ênfase dada à imunidade celular quando da escolha de proteínas e adjuvantes na elaboração de vacinas contra estes patógenos. Metodologias como genética reversa e abordagem que contempla o uso de poliepítopos estão sendo postas em prática para preencher esta lacuna do conhecimento científico (HEDGE; SRIKUMARAM, 2000).

Com o desenvolvimento da possibilidade de cultivar células *in vitro*, no começo de 1900, criou-se a alternativa para os virologistas abandonarem o uso de ovos embrionados e os animais de laboratório para isolamento viral *in vitro*. Mas, somente na década de 70 com a disponibilidade de reagentes purificados e o uso do plástico para produção de frascos descartáveis, o cultivo celular foi incluído na rotina do diagnóstico virológico. O isolamento viral em cultivo celular constitui-se em metodologia *gold standard* para a detecção viral e a este procedimento outros são comparados. Os chamados NAATs (*Nucleic Acid Amplification Tests*), que aumentam a rapidez e não exigem as habilidades necessárias ao cultivo celular, tiveram sua validação com o isolamento viral *in vitro*.

Assume-se como verdade que células de cultivo primário que possuem toda gama de receptores para crescimento e diferenciação se constituem no mais eficiente instrumento para isolamento viral e que em passagens sucessivas, os chamados antígenos embrionários são perdidos. Com esta visão buscamos nossas próprias linhagens de células, a partir de cultivos primários de traqueia, timo e testículo de feto bovino. As células de traqueia já foram utilizadas para isolamento viral desde a condição de cultivo primário até a passagem centésima sem que tenha ocorrido perda de permissibilidade ao isolamento, o que gerou produção massiva do BoHV-4 para os NAATs, bem como para antígeno de uso no teste ELISA.

Para o que se pode esperar do uso de microscopia eletrônica em virologia, dados de ultraestrutura que podem indicar a que família pertence o vírus em estudo, pode-se afirmar que a forma e o tamanho das partículas estão de acordo com a descrição detalhada da morfologia dos Herpesvírus e correspondem a exatamente o que foi descrito para o BoHV-4 por Theodoridis (1985). Bastante escassa é a literatura sobre o uso de microscopia eletrônica para estudos do BoHV-4, enquanto dispomos de farta documentação fotográfica de excelente qualidade, o que justificaria uma publicação específica no assunto.

Polimorfismo genético tem sido considerado como instrumento revelador para estudos epidemiológicos, uma vez que permite a distinção entre duas ou mais amostras virais. Produtos de PCR podem ser digeridos por enzimas de restrição e sua composição global avaliada por eletroforese e se um refinamento maior for justificável, os produtos podem ser utilizados para sequenciamento, permitindo estudos de epidemiologia e evolução molecular. Ambas metodologias foram

empregadas em nossos trabalhos e revelaram informações consistentes e de acordo com o publicados por outros autores (BUBLOT et al., 1990; DONAFRIO et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2000). Isso permitiu identificar o vírus em estudo, bem como estabelecer a que amostra de referência seu material genético está relacionado. Vale ressaltar o potencial e a necessidade do estudo da diversidade de genótipos do BoHV-4 e o esforço feito pela comunidade internacional na busca de uma vinculação entre variabilidade genética, propriedades biológicas e patogênese. O Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti possui uma coleção considerável de amostras de BoHV-4 por mim isoladas, que devem ser submetidas a este processo para conhecimento e cooperação com outros grupos, de modo que haja avanços no conhecimento dos mecanismos da doença.

Quanto ao diagnóstico sorológico do BoHV-4, metodologias convencionais vem sendo utilizadas. O ELISA indireto desponta como a mais promissora com suas já sabidas vantagens, como dispensar o uso de cultivo celular, que requer soros de qualidade segura, e a elevada sensibilidade $<1\mu\text{g/mL}$. Face a inexistência dos chamados testes de referência (*gold standard*) que, apesar da significância, possuem seus aspectos negativos, pois soroneutralização, universalmente reconhecido como a referência para sorologia viral, é um teste centrado na detecção de imunoglobulinas G, anticorpo de elevada afinidade, requer concentração $\pm 10\ \mu\text{g}$ de proteína por mililitro, e há que se observar um prazo mínimo de 10 dias entre infecção e detecção do anticorpo. Se faz necessário o desenvolvimento de metodologia sensível, possivelmente direcionada à busca de IgM específica ao BoHV-4, que são produzidos no começo da infecção.

Para os testes ELISA que estão sendo empregados para sorologia do BoHV-4, percebe-se ausência de critérios para padronização de valores que estabeleçam de forma segura os resultados positivo e negativo (EDWARD; NEWMAN, 1985; GUO et al., 1988; ASANO et al., 2002). Apesar de todos os testes se tratarem de ELISA indireto, as metodologias foram diferentes, bem como o cálculo empregado para medir a absorvância de cada amostra de soro. No sistema ELISA por nós desenvolvido podemos estabelecer um paralelo àquele desenvolvido por Asano et al. (2002), que se dá pela similaridade metodológica, tendo em vista que o grupo japonês entendeu que o valor da absorvância, a partir do qual um soro seria considerado positivo, foi fixado em 0,900, valor arbitrário, que considerou a

possibilidade de reação cruzada com o BoHV-1. Para o nosso trabalho, o valor da absorvância foi fixado em 0,400, mas experimentalmente foi eliminada a possibilidade de detecção de anticorpos ao BoHV-1.

Na busca de uma racionalidade que oferecesse suporte ao entendimento do que é um animal verdadeiramente negativo, expresso pelo valor da absorvância em ELISA, tivemos a oportunidade de verificar que soros procedentes de propriedades com prevalência zero para o BoHV-4, os valores de ELISA se aproximam de zero, quando não são negativos. Entendemos como necessário um trabalho com infecção experimental quando possa ser avaliada a cinética de produção de anticorpos em que classes e isotipos sejam considerados. Importante mencionar que o antígeno viral utilizado em nosso teste ELISA, foi produzido em células de traqueia de feto bovino, que não são usadas comercialmente para a produção de vacinas, assim a chance de produção de anticorpos para antígenos celulares é reduzida. Fato que foi observado quando o antígeno celular foi utilizado para validação do teste, com soros incluídos na zona cinza, os valores da absorvância não se modificaram de forma sensível e os soros permaneceram na zona cinza. Outro aspecto refere-se ao grau de pureza do antígeno: o vírus sofreu processo de semi purificação em colchão de sacarose e, quando foi avaliado por microscopia eletrônica, não existiam fragmentos celulares, mas tão somente partículas virais. Isso é válido para o BoHV-1 e BoHV-4, usados com antígeno. Outra consideração importante diz respeito à especificidade do teste, mais particularmente a possibilidade de reação cruzada com BoHV-1, como relatada por Mohanty et al. (1984); Metzler e Wyler (1986) podemos verificar experimentalmente que esta situação não existe, conforme demonstrado na Tabela 1 do anexo 6. Acreditamos ser um avanço considerável este resultado, para o diagnóstico de BoHV-4. Recomendável seria o prosseguimento deste trabalho, com avaliação do *Alcelaphine herpesvirus 1* (AIHV-1), que em imunofluorescência indireta apresenta reação cruzada com o BoHV-4.

Em nossos resultados de ELISA, ficou patente a maior frequência de anticorpos para o BoHV-4 em soros bovinos procedentes do estado de Minas Gerais (MG), valores que se aproximam aos da Bélgica (MARKINE-GORIAYNOFF et al., 2003) na região onde as raças europeias se formaram a partir do *Bos primigenius*. Chama a atenção que na região de Mineiros, no estado de Goiás, o percentual de positivos se assemelha aos de MG, uma bem provável conexão epidemiológica se

faz notar. O estado de Minas Gerais pode ser considerado como colonizador no que diz respeito a irradiação de animais a outras regiões do país, especialmente norte e nordeste. Isolamentos virais e caracterização de amostras destas regiões devem permitir estudos de epidemiologia molecular e, conseqüentemente, ligação entre difusão viral e migração de bovinos. Em outros estados onde foi possível reunir um número significativo de amostras (PR, SC, GO), os percentuais de positividade se aglutinam em torno de um valor de 20%, percentual que vem sendo relatado em outros países (*vide* 2.13, epidemiologia).

Na concepção deste trabalho, sempre observamos a necessidade de por em prática o preconizado para o conhecimento e controle de uma doença infecciosa emergente: i) desenvolver um eficiente sistema de isolamento do agente, associado ao domínio de metodologias com suficiente poder de resolução para caracterizá-lo; ii) desenvolver meios e métodos de diagnóstico, especialmente sorológicos, para o conhecimento da epidemiologia da doença; e iii) conhecer e caracterizar polipeptídeos e proteínas imunogênicos para produção de vacinas e controle. Inclui-se neste conjunto a clonagem de genes e expressão em vetores e uso da rica biodiversidade brasileira para busca de novos adjuvantes. As primeiras duas fases foram vencidas de forma convincente. Para a terceira, seria recomendável viabilizar um projeto que permita avaliar a resposta imune de animais com infecção natural e/ou experimental para as diferentes proteínas e, especialmente, as glicoproteínas.

7 CONCLUSÃO

Os trabalhos realizados com PCR permitiram nos afirmar que o agente viral isolado trata-se de BoHV-4, como também, com a análise do DNA genômico com enzimas de restrição, foi possível inclui-lo no grupo de amostras, cuja referência é o DN-599, que ocorre na América do Norte.

Houve presença de soros positivos por ELISA indireto, em amostras colhidas nos diferentes estados e em alguns destes, pela elevada frequência de soros positivos, pode-se assegurar que a doença é enzoótica.

O teste de ELISA indireto desenvolvido revelou-se específico e sensível, o que justifica sua recomendação para uso em diagnóstico sorológico de rotina, ou para estudos epidemiológicos.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. **Vet. Microbiol.**, v. 113, p. 211-222, 2006.
- ALEXANDER, R.A., PLOWRIGHT, W., HAIG, D.A. Cytopathogenic agents associated with lumpy skin disease of cattle. **Bull. Epiz. Dis. Afr.**, v. 5, p. 489-492, 1957.
- ANSON, M. A., BENFIELD, D.A., MCADARAGH, J.P. Bovine herpesvirus-5 (DN599) antigens in cells derived from bovine ocular squamous cell carcinoma. **Can. J. Comp. Med.**, v. 46, p. 334-337, 1982.
- ALLSOPP, T. E., FAZAKERLEY, J.K. Altruistic cell suicide and the specialized case of the virus-infected nervous system. **Trends. Neurosci.**, v. 23, p. 284-290, 2000.
- ASANO, A., INOSHIMA, Y., MURAKAMI, K., IKETANI, Y., YAMAMOTO, Y., SENTSU H. Latency and persistence of Bovine herpesvirus type 4, strain b11-41, in bovine nervous tissues. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 65, p. 87-93, 2003.
- AUGSBURGER, H. R., METZLER, A. E. In vitro growth characteristics of Bovine herpesvirus 4 (BHV-4) as revealed by indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies and polyvalent antisera. **Arch. Virol.**, v. 104, p. 309-321, 1989.
- AZAWI, O. I. Postpartum uterine infection in cattle. *An. Reprod. Sci.*, 105, 187-208, 2008
- BARTHA, A., JUHASZ, M., LIEBERMANN, H. Isolation of a Bovine herpesvirus from calves with respiratory diseases and keratoconjunctivitis. A preliminary report. **Acta Vet. Acad. Sci. Hung.**, v. 16, p. 357-358, 1966.
- BLAKE, N. Immune evasion by gammaherpesvirus genome maintenance proteins. **J. Gen. Virol.**, v. 91, p. 829-846, 2010.
- BOERNER, B., WEIGELT, W., BUHK, H.J., CASTRUCCI, G., LUDWIG, H. A sensitive and specific PCR/Southern blot assay for detection of Bovine herpesvirus 4 in calves infected experimentally. **J. Virol. Methods**, v. 83, p. 169-180, 1999.
- BROLL, H., BUHK, H.J., ZIMMERMANN, W., GOLTZ, M. Structure and function of the prDNA and the genomic termini of the gamma2-herpesvirus Bovine herpesvirus type 4. **J. Gen. Virol.**, v. 80, p. 979-986, 1999.
- BUBLOT, M., VAN BRESSEM, M.F., THIRY, E., DUBUISSON, J., PASTORET, P.-P. Bovine herpesvirus 4 genome: cloning, mapping and strain variation analysis. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 133-142, 1990.

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

_____, _____, FERRARI, M., CILLI, V., ALDROVANDI, V., RAMPICHINI, L., GATTI, R. A study of the pathogenesis of Bovid herpesvirus-4 in calves. **Zentralbl. Veterinarmed. [B]**, v. 34, p. 473-479, 1987.

_____, _____, _____, ALDROVANDI, V., DI LUCA, D., GATTI, R. Comparative study of two strains of Bovid herpesvirus-4. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 11, p. 143-151, 1988.

CAVIRANI, S., ALLEGRI, G., FLAMMINI, C.F. Tipizzazione sierologica di stipiti di Bovid herpesvirus-4 (BHV-4) isolate in corso di glossite ulcerativa cronica della bovina da latte e comportamento dell'infezione sperimentale. **Selezione Veterinaria**, v. 31, p. 1261-1269, 1990.

_____, MARTELLI, P., CABASSI, C.S., LAVAZZA, A., ALLEGRI, G., FLAMMINI, C.F. Isolation of Bovine herpesvirus 4 (BHV-4) from dairy cows with digital dermatitis. In: WORLD BUIATRIC CONGRESS, 19., 1996. **Proceedings of the...**, 1996. p. 121.

CHOI, K. H., OSORIO, F.A., CHENG, P. W. Mucin biosynthesis: bovine C2GnT-M gene, tissue-specific expression, and herpesvirus-4 homologue. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 20, p. 710-719, 2004.

COSTA, G. A.; VASCONCELOS, A. C.; BOMFIM, M. R. A.; AMORIM, H. B.; LIMA, G. B. L.; COELHO, F. M.; RESENDE, M. Neurological disorder in cattle associated with Bovine herpesvirus-4. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, n. 4, p. 828-835, 2011.

CRANDELL, R.A., SELLS, A.D.M., GALLINA, A.M. The isolation and characterization of a new Bovine herpesvirus associated with abortion. **Theriogenology**, v. 6, n. 1, p. 1-18, 1976.

CZAPLICKI, G., THIRY, E. An association exists between Bovine herpesvirus-4 seropositivity and abortion in cows. **Prev. Vet. Med.**, v. 33, p. 235-240, 1998.

DEIM, Z., SZEREDI, L., EGYED, L. Detection of Bovine herpesvirus 4 DNA in aborted bovine fetuses. **Can. J. Vet. Res.**, v. 71, p. 226-229, 2007.

DEWALS, B., GILLET, L., GERDES, T., TARACHA, E.L.N., THIRY, E.; VANDERPLASSCHEN, A. Antibodies against Bovine herpesvirus 4 are highly prevalent in wild African buffaloes throughout eastern and southern Africa. **Vet. Microbiol.**, v. 110, p. 209-220, 2005.

DEWALS, B.; THIRION, M.; MARKINE-GORIAYNOFF, N; GILLET, L.; FAYS, K. de; MINNER, F; DAIX, P.M.S.; VANDERPLASSCHEN, A. Evolution of Bovine herpesvirus 4: recombination and transmission between African buffalo and cattle. **J. Gen. Viral**, v. 87, p. 1509-1519, 2006.

DONOFRIO, G., CAPOCEFALO, A., FRANCESCHI, V., DE LORENZI, L., VAN SANTEN, V., PARMA, P. Integration of Bovine herpesvirus 4 genome into cultured persistently infected host cell genome. **Virology Journal**, v. 7, p. 246-249, 2010.

_____, CAVIRANI, S., FLAMMINI, I C.F., SCATOZZA, F. Molecular typing of a BHV-4 (Bovine herpesvirus 4) field isolate. **Vet. Res. Commun.**, v. 24, p. 411-422, 2000a.

_____, CAVIRANI, S., VAN SANTEN, V.L. Establishment of a cell line persistently infected with Bovine herpesvirus-4 by use of a recombinant virus. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 1807-1814, 2000b.

_____, HERATH, S., SARTORI, C., CAVIRANI, S., FLAMMINI, C. F., SHELDON, I. M. Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. **Reproduction**, v. 134, p. 183-197, 2007.

DUBUISSON, J., THIRY, E., BUBLLOT, M., PASTORET, P.-P. Intervention du complément dans la neutralisation du Bovid herpesvirus 4. **Ann. Méd. Vét.**, v. 131, p. 69-73, 1987.

_____, _____, THALASSO F., BUBLLOT M., PASTORET P.-P. Biological and biochemical comparison of Bovid herpesvirus-4 strains. **Vet. Microbiol.**, v. 16, p. 339-349, 1988.

_____, BOULANGER, D., BUBLLOT, M., THIRY, E., PASTORET, P.-P. Proteins specified by Bovine herpesvirus type 4: structural proteins of the virion and identification of two major glycoproteins by using monoclonal antibodies. **J. Gen. Virol.**, v. 70, p. 1743-1753, 1989.

EDWARDS, S., NEWMAN, R.H. Detection of antibodies to Bovid herpesvirus 4 by ELISA. **Vet. Microbiol.**, v.10, p. 149-154, 1985.

EGELHOF, S., BARTHA, A., MAGYAR, G. The existence of Bovine herpesvirus 4 (BHV-4) in lions. In: INTERNATIONAL HERPESVIRUS WORKSHOP, 16., 1991. **Proceedings of the...** Pacific Grove, CA, 1991. p. 245.

EGYED, L., BALLAGI-PORDANY, A., BARTHA, A., BELAK, S. Studies of in vivo distribution of Bovine herpesvirus type 4 in the natural host. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1091-1095, 1996.

EGYED, L., KLUGE, J.P., BARTHA, A. Histological studies of Bovine herpesvirus type 4 infection in non- ruminant species. **Vet. Microbiol.**, v. 57, p. 283-289, 1997.

_____, BARTHA A. PCR studies on the potential sites for latency of BHV-4 in calves. **Vet. Res. Commun.**, v. 22, p. 209-216, 1998.

_____. Replication of Bovine herpesvirus type 4 in human cells in vitro. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2109-2111, 1998.

_____, SASSI, G., TIBOLD, J., MÁDL, I., SZENCI, O. Symptomless intrauterine transmission of Bovine herpesvirus 4 to bovine fetuses. **Microbial Pathogenesis**, v. 50, p. 322-325, 2011.

EHLERS, B., BUHK, H.J., LUDWIG, H. Analysis of bovine cytomegalovirus genome structure: cloning and mapping of the monomeric polyrepetitive DNA unit, and comparison of European and American strains. **J. Gen. Virol.**, v. 66, p. 55-68, 1985.

EIHASSAN, A.M., FADOL, M.A., EIHUSSEIN, A.M. Seroprevalence of Bovine herpesvirus-1, Bovine herpesvirus-4 and bovine diarrhea virus in dairy cattle in Sudan. **Pakistan Vet. J.**, v. 31, n.4, p. 317-320, 2011.

ESSMAIL, M., BAKER, D., COLLINS, J., VANDEWOUDE, S., SALMAN, M., HEGAZY, A.A. Dot immunobinding assay for detection of Bovine herpesvirus 4 antibodies in rabbits. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 11, p. 237-239, 1999.

EYANGA, E., JETTEUR, P., THIRY, E., WELLEMANS, G., DUBUISSON, J., VAN OPDENBOSCH, E., MAKUMBU, S., PASTORET, P.P. Research on antibodies against BHV-1, BHV-2, BHV-4, BVD-MD virus , bovine adenovirus A e B, rotavirus and coronavirus in cattle in western Zaire: complementary results. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.**, 1989, 42, 155-161.

EUGSTER, A.K. Isolation of Bovine herpesvirus III from diarrheic feces. **Vet. Microbiol.**, v. 3, p. 199-204, 1978/1979.

EVERMANN, J.,F., MUELLER, G.M., DILBECK, P.M. Clinical and diagnostic implications of Bovid herpesvirus type 4 (bovine cytomegalovirus) infections. **Amer. Assoc.Vet. Lab. Diag. Proc.**, v. 27, p. 125-136, 1985.

_____, HENRY, B.E. Herpetic infections of cattle : a comparison of bovine cytomegalovirus and bovine rhinotracheitis. **Comp., Food Animal**, v. 11, p. 205-215, 1989.

FABRICANT, C.G., GILLESPIE, J.H., KROOK, L. Intracellular and extracellular mineral crystal formation induced by viral infection of cell cultures. **Infect. Immun.**, v. 3, p. 416-419, 1971.

_____, _____. Identification and characterization of a second feline herpesvirus. **Infect. Immun.**, v. 9, p. 460-466, 1974.

FRAZIER, K., PENCE, M., MAUEL, M.J., LIGGETT, A., HINES 2ND, M.E., SANGSTER, L., LEHMKUHL, H.D., MILLER, D., STYER, E., WEST, J., BALDWIN, C.A. Endometritis in postparturient cattle associated with Bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 13, p. 502-508, 2001.

_____, BALDWIN C.A., PENCE M., WEST J., BERNARD J., LIGGETT A., MILLER D., HINES 2ND, M.E. Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic Bovine herpesvirus-4. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 14, p. 457-46, 2002.

GALIK, P.K., VAN SANTEN, V.L., STRINGFELLOW, D.A., BIRD, R.C., WRIGHT, J.C., SMITH, P.C. Development of a DNA probe for identification of Bovine herpesvirus 4. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, p. 653-659, 1993.

GILLET, L., MINNER, F., DETRY, B., FARNIR, F., WILLEM, L., LAMBOT, M., THIRY, E. PASTORET, P. P., SHYNTS, F., VANDERSPLASSEHEN, A. Investigation of the susceptibility of human cell lines to Bovine herpesvirus 4 infection: demonstration that human cells can support a nonpermissive persistent infection which protects them against tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **J. Virol.**, v. 78, p. 2336–2347, 2004.

_____; DEWALS, B., FARNIR, F., de LEVAL, L., VANDERPLASSCHEN, A. Bovine herpesvirus 4 induces apoptosis of human carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Res.**, v. 65, p. 20, Oct., 2005.

GODFROID, J., CZAPLICKI, G., KERKHOF, P., WEYNANTS, V., WELLEMANS, G., THIRY, E., LETESSON, J.-J. Assessment of the cell-mediated immunity in cattle infection after Bovine herpesvirus 4 infection, using an *in vitro* antigen-specific interferon-gamma assay. **Vet. Microbiol.**, v. 53, p. 133-141, 1996.

GRECO, A., BAUSCH, N., COUTE, Y., DIAZ, J.J. Characterization by two-dimensional gel electrophoresis of host proteins whose synthesis is sustained or stimulated during the course of herpes simplex virus type 1 infection. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2522-2530, 2000.

GUO, W.Z., SHEN, D.T., EVERMANN, J.F., GORHAM, J.R. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and a complement-fixation test for the detection of IgG to Bovine herpesvirus type 4 (bovine cytomegalovirus). **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, p. 667-670, 1988.

GÜR, S., DOGAN, N. The possible role of Bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. **Anim. Sci. J.**, v. 81, p. 304-308, 2010.

HEDGE, N.R., SRIKUMARAM, S. Reverse immunogenetic and polyepitopic approach for the induction of cell mediated immunity against bovine viral pathogens. **An. H. Res. Rev.**, v.1, n.2, p. 103-118, 2000.

HOUSE, J.A., WILSON, T.M., EL NAKASHLY, S., KARIM, I.,A., ISMAIL, I., EL DANAF, N., MOUSSA, A.M., AYOUB, N.N. The isolation of lumpy skin disease virus and Bovine herpesvirus-4 from cattle in Egypt. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 2, p. 111-115, 1990.

IZUMI, Y., TSUDUKU, S., MURAKAMI, K., TSUBOI, T., KONISHI, M., HARITANI, M., KAMIYOSHI, T., KIMURA, K., SENTSU, H. Characterization of Bovine herpesvirus type 4 isolated from cattle with mastitis and subclinical infection by the virus among cattle. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 68, p. 189-193, 2006.

KÁLMÁN, D., JÁNOSI, S., EGYED, L. Role of Bovine herpesvirus 4 in bacterial bovine mastitis. **Microb Pathog.**, v. 37, p. 125-129, 2004.

KAMINJOLO, J.S., MUGERA, G.M., ROSTED ,A.F. Isolation of a Herpes-type Virus from some Tumours of Bovine Origin. **Zentralbl. Veterinarmed. [B]**, v. 19, p. 626-632, 1972.

KARLSSON, K.A. Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. **Mol. Microbiol.**, v. 29, p. 1-11, 1998.

KRÜGER, J.M., OSBORNE, C.A., GOYAL, S.M., WICKSTROM, S.L., JOHNSTON, G.R., FLETCHER T.F., BROWN P.A. Clinical evaluation of cats with lower urinary tract disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 199, p. 211-216, 1991.

_____, _____. Recurrent, nonobstructive, idiopathic feline lower urinary tract disease: an illustrative case report. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 31, p. 312-316, 1995.

_____,_____. Prevalence of Bovine herpesvirus-4 infection in cats in central Michigan. **J. Vet. Intern. Med.**, 14, 593-597, 2000.

KWANG, M.J. Virus isolation and serological investigation of Bovine herpesvirus type 4 in Taiwan. **J. Chin. Soc. Vet. Sci.**, 25, 50-54, 1999.

LIEBERMANN, H., SCHULZE, P., KOKLES, R., HANTSCHHEL, H. Isolation and identification of another new Bovine herpesvirus. **Arch. Exp. Veterinarmed.**, v. 21, p. 761-776, 1967.

LITTEL-VAN DEN HURK, Silvia Van Drunen. Cell mediated immune responses induced by BoHV-1: rational vaccine design. **Expert Review of Vaccines**, v. 6, n. 3, p. 369-380, June 2007.

LUINI, M., FABBI, M., CERVIO, G. Isolamento di un herpesvirus da lesioni erosive linguali del bovino. **Estratto sel.Vet.**, v. 26, p. 1131-1133, 1985.

_____, FIONI E. Frequency of Bovid-herpesvirus-4 (BHV 4) infection in cattle in Lombardia and Emilia Romagna (Abstract). **Atti Società It. Buiat.**, v. 18, p. 329-339, 1986.

MACHIELS, B., LÉTÉ, C., deFAYS, K., MAST, J., DEWALS, B., STEVENSON, P.G., VANDERPLASSCHEN, A., GILLET, L. The Bovine herpesvirus 4 Bo10 gene encodes a nonessential viral envelope protein that regulates viral tropism through both positive and negative effects. *J. Virol.* v. 85, p. 1011-1024, jan 15, 2011.

MARKINE-GORIAYNOFF, N., MINNER, F., DE FAYS, K., GILLET, L., THIRY, E., PASTORET, P. P., VANDERPLASSCHEN, A. L'herpèsvirus bovin 4. *Ann Méd Vét.*, v. 147, p. 215–247, 2003.

MARCHOT, P., THIRY, E., JETTEUR, P., LEROY, P. Serological survey on the prevalence of Bovine type-4 herpesvirus infection in cattle in the Accra plains of Gana. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 1991, 44, 405-406, 1991.

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

_____, OSSENT, P., GUSCETTI, F., RUBEL, A., LANG, E.M. Serological evidence of herpesvirus infection in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *J. Wildl. Dis.*, 26, 41-49, 1990.

MOHANTY, S.B., HAMMOND, R.C., LILLIE, M.G. A new Bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. *Arch. Gesamt. Virusforsch.*, v. 34, p.394-395, 1971.

_____, ROCKEMANN, D.D., SNYDER, D.B. Serological cross-reaction between Bovine herpesvirus 1 and 4 by enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol.*, v. 7, p. 179-186, 1984.

MEHROTRA, M.L., SHUKLA, D.C., SRIVASTAVA, N.C. Isolation of a new herpesvirus from cases of reproductive disorders in cow. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 56, n. 12, p. 1196–1199, 1986..

MONGE, A., ELVIRA, L., GONZALES, J.V., ASTIZ, S. WELLEMBERG, G.J. Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. *Res. Vet. Sci.*, v. 80, p. 120-125, 2006.

MORENO-LOPEZ, J., GOLTZ, M., REHBINDER, C., VALSALA, K.V., LUDWIG, H. A Bovine herpesvirus (BHV-4) as passenger virus in ethmoidal tumours in Indian cattle. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, v. 36, p. 481-486, 1989.

MORISSETTE, G., FLAMAND, L. Herpesvirus and cromossomal integration. *J. Virol.*, v.84, p. 12100-12109, dec. 2010.

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

NAEEM, K., GOYAL, S.M. A dot immunobinding assay on nitrocellulose for the detection of Bovine herpesvirus-4 antibodies. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 2, p. 107-110, 1990.

_____, MURTAUGH, M.P., GOYAL, S.M. Tissue distribution of Bovine herpesvirus-4 in inoculated rabbits and its detection by DNA hybridization and polymerase chain reaction. **Arch. Virol.**, v. 119, 239-255, 1991.

NAKANE, T., HARA, T., SAIKA, K., HIROSE, O., KAZAMA, T. Isolation of Bovine herpesvirus type 4 from the spinal cord of a cow. In: **Abstract book of the 129th Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science**, 2000.

NIKOLIN, V.M., DONOFRIO, G., MILOSEVIC, B., TADDEI, S., RADOSAVLJEVIC, V., MILICEVIC, V. First Serbian isolates of Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a herd with a history of postpartum metritis. **New Microbiologica**, v. 30, p. 53-57, 2007.

O'BRIEN, V. Viruses and apoptosis. **J. Gen. Virol.**, v. 79, p. 1833-1845, 1998.

OSORIO, F.A., REED, D.E. Experimental inoculation of cattle with Bovine herpesvirus-4: evidence for a lymphoid-associated persistent infection. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p. 975-980, 1983.

_____, _____, VAN DER MAATEN, M.J., METZ, C.A. Comparison of the herpesviruses of cattle by DNA restriction endonuclease analysis and serologic analysis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 46, p. 2104-2109, 1985.

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

PHILLIPS, R.M., EDWARDS, A.J., SMITH, J.C. The isolation of Bovine herpesvirus 3 (DN-599) and a serological survey of feedlot cattle for antibodies to this virus. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 393-398, 1983.

_____, NASSAR, R.F. A serological study of human herpesvirus simplex 1 and Bovine herpesvirus 1, 2 and 4 in Kansas cattle. **Bov. Pract.**, 24, 14-17, 1989.

POTGIETER, L.N., MARE, C.J. Assay and antigenic interrelationships of the recently isolated bovine herpesviruses, DN599, FTC, and V11. **Arch. Gesamte Virusforsch.**, v. 46, p. 238-247, 1974.

REED, D.E., LANGPAP, T.J., ANSON, M.A. Characterization of herpesviruses isolated from lactating dairy cows with mammary pustular dermatitis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 38, p.1631-1634, 1977.

REUTER, G., GABIUS, H.J. Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool? **Cell Nat. Life Sci.**, v. 55, p. 368-422, 1999.

REYNOLDS, A.E., ENQUIST, L.W. Biological interactions between herpesviruses and cyclooxygenase enzymes. **Rev. Med. Virol.**, v. 16, p. 393-403, 2006.

RICH, L.J., FABRICANT, C.G. Urethral obstruction in male cats: transmission studies. **Can. J. Comp. Med.**, v. 33, p. 164-165, 1969.

ROIZMAN, B., PELLET, P.E. The family *Herpesviridae*: a brief introduction. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. (Eds.). **Fields Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001. p. 2381-2397.

ROSSITER, P.B., GUMM, I.D., STAGG, D.A., CONRAD, P.A., MUKOLVE, S., DAVIES, F.G., WHITE, H. Isolation of Bovine herpesvirus-3 from African buffaloes (*Syncerus caffer*). **Res. Vet. Sci.** 46, 337-343, 1989.

RWEYEMAMU, M.M., LORETU, K. Isolation of "non-syncytia forming" herpesviruses from cattle in Tanzania. **J. Comp. Pathol.**, v. 83, p. 377-386, 1973.

SHACKELTON, L.; HOLMES, E. C. The evolution of large DNA viruses: combining genomic information of viruses and their hosts. **Trend Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 458-465, 2004.

SHELDON, I.M., WILLIAMS, E.J., MILLER, A.N.A., WASH, D.M., HERATH, S. Uterine diseases in cattle after parturition. **The Vet. J.**, 176, 115-121, 2008.

SMITH, P.C., CUTLIP, R.C., RITCHIE, A.E., YOUNG, J.K. A bovine herpesvirus associated with a disease of the upper respiratory tract of feedlot cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 161, p. 1134-1141, 1972.

STORZ, J. Comments on malignant catarrhal fever. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 152, p. 804-806, 1968.

TAYLOR, G. S., MAUTNER, J., MÜNZ, C. Autophagy in herpesvirus immune control and immune scape. **Herpesviridae**. v. 2, p. 1-7, 2010.

THEODORIDIS, A. Preliminary characterization of viruses isolated from cases of epididymitis and vaginitis in cattle. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 45, p. 187-195, 1978.

_____. Studies on bovine herpesviruses. Part 1. Isolation and characterization of viruses isolated from the genital tract of cattle. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 52, p. 239-254, 1985.

THIRY, E., PASTORET, P.-P., DESSY-DOIZE, C., HANZEN, C., CALBERG-BACQ, C.M., DAGENAIX, L., VINDEVOGEL, H., ECTORS F. Réactivation d'un herpèsvirus en culture de cellules testiculaires prélevées chez un taureau atteint d'orchite et d'azoospermie. **Ann. Méd. Vét.**, v. 125, 207-214, 1981.

TODD, W.J., STORZ, J. Morphogenesis of a cytomegalovirus from an american bison affected with malignant catarrhal fever. **J. Gen. Virol.**, v. 64, p. 1025-1030, 1983.

TOHO, T., KANAYA, K., OKI, Y. Experimental transmission to calf and goat of the virus associated with the cultured T cell lymphoma cell line from the calf type of bovine leukosis. I. Detection of antibodies to BTLA by immunofluorescence assay. **Bull. Nipp. Vet. Zootech. Coll.**, v. 34, p. 23-26, 1985.

TRUMAN, D., LUDWIG, H., STORTZ, J. Bovine herpesvirus type-4 (BHV-4) : studies on biology and transmission in cattle herds and insemination bulls. *Zentralbl. Veterinarmed.(B)*, 33, 485-501, 1986.

VAN DER MAATEN, M. J., BOOTHE, A. D. Isolation of an herpes-like virus from lymphosarcomatous cattle. **Arch. Gesamte Virusforsch.**, v. 37, n. 1, p. 85-96, 1972.

VAN MALDEREM, G, VAN OPDENBOSCH, E., VELLEMAN, G. Bovine herpesvirus 1 and 4 : een sero-epidemiologisch onderzoek van de Belgische Rundveestapel. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 56, 364-371, 1987.

VAN OPDENBOSCH, E., WELLEMAN, G., OOMS, L.A., DEGRYSE, A.D. BHV4 (Bovine herpesvirus 4) related disorders in Belgian cattle: a study of two problem herds. **Vet. Res. Commun.**, v. 12, p. 347-353, 1988.

VANDERPLASSCHEN, A., MARKINE-GORAYNOFF, N., LOMONTE. P., SUZUKI. M., HIRAOKA. N., YEH. J.C., BUREAU, F., WILLEMS, L., THIRY, E., FUKUDA, M., PASTORET, P.-P. A multipotential beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase is encoded by Bovine herpesvirus type 4. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 5756-5761, 2000.

WELLEMAN, G. Symptomatologie variée apparaissant lors des métrites chroniques associées à un virus herpes chez les bovins. **Ann. Méd. Vét.**, v. 128, p. 614-615, 1984.

_____, VAN OPDENBOSCH, E. Association entre l'infection par le BHV-4 et l'avortement chez la vache. **Ann. Méd. Vét.**, v. 133, p. 347-350, 1989.

WELLENBERG, G.J., VAN ROOIJ, E.M., MAISSAN, J., VAN OIRSCHOT, J.T. Evaluation of newly developed immunoperoxidase monolayer assays for detection of antibodies against Bovine herpesvirus 4. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 6, p. 447-451, 1999.

_____, VAN DER POELW.,H.M., VAN DER VORST, T.J.K., VAN VALKENGOED, P.H.R., SCHUKKEN, Y.H., WAGENAAR, F., VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine herpesvirus 4 in bovine clinical mastitis. **Vet. Rec.**, v. 147, p. 222-225, 2000.

WOLDEMESKEL, M., KEBEDE, E., YIGEZU, L., POTGIETER, L.N. Prevalence of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine herpesvirus-4 (BHV-4) in cattle from Ethiopia. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 107, 464-466, 2000.

YAMAMOTO, Y., MURAKAMI, K., INOSHIMA, Y., NAKANE T., SAIKA, K., SENTSUI, H. Characterization of a Bovine herpesvirus type 4 isolated from the spinal cord of a cow with astasia. **Arch. Virol.**, v. 145, p. 2363- 2370, 2000.

ZIMMERMANN, W., BROL, L H., EHLERS, B., BUHK, H.J., ROSENTHAL, A., GOLTZ, M. Genome sequence of Bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. **J. Virol.**, v. 75, p. 1186-1194, 2001.