



Infecção latente pelo herpesvírus bovino tipo 1 em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul

[*Bovine herpesvirus type 1 latent infection in buffalo (Bubalus bubalis) in Rio Grande do Sul*]

D.M. Medeiros¹, F.S. Campos², M. Lima³, S.O. Hubner³,
G.D.A. Vargas³, G. Fischer^{3*}

Daiana Medeiros
<https://orcid.org/0000-0002-6595-680X>
Fabricio Souza Campos
<https://orcid.org/0000-0002-5948-472X>
Marcelo de Lima
<https://orcid.org/0000-0003-3102-1659>
Sílvia de Oliveira Hübner
<https://orcid.org/0000-0003-0482-9599>
Gilberto D'Ávila Vargas
<https://orcid.org/0000-0002-5126-3607>
Geferson Fischer
<https://orcid.org/0000-0002-3521-395X>

¹Aluna do Programa de Pós-Graduação em Veterinária - Universidade Federal de Pelotas - Pelotas, RS

²Universidade Federal de Tocantins – Gurupi, TO

³Universidade Federal de Pelotas - Pelotas, RS

RESUMO

Apesar dos bovinos serem considerados os hospedeiros naturais do BoHV-1, estudos sorológicos têm sugerido que búfalos podem ser suscetíveis ao BoHV-1 e a outros alfa-herpesvírus geneticamente relacionados. O objetivo deste estudo foi detectar a presença de DNA viral de BoHV-1 em 202 amostras de gânglios trigêmeos de búfalos, pela técnica de *semi-nested* PCR, para detecção de um segmento do gene codificante da glicoproteína D (gD) do BoHV-1. Além disso, 242 amostras de soro foram analisadas pela técnica de soroneutralização (SN) para a detecção de anticorpos neutralizantes contra BoHV-1, BoHV-5 e BuHV. Todas as amostras clínicas foram coletadas em um matadouro na cidade de Pelotas, RS, Brasil. O DNA de BoHV-1 foi detectado em 61 (30,1%) gânglios, e os resultados da SN demonstraram que 27,6% dos animais apresentaram anticorpos contra, pelo menos, um dos vírus testados. O sequenciamento genômico e a análise de 14 amplicons confirmaram a presença do DNA do BoHV-1 nos tecidos analisados. Em resumo, os resultados indicam que o BoHV-1 está distribuído em rebanhos bubalinos provenientes da região Sul do Brasil. Entretanto, são necessárias investigações adicionais, no sentido de elucidar o papel exato dos búfalos na epidemiologia das infecções pelo BoHV-1.

Palavras-chave: BoHV-1, gânglio trigêmeo

ABSTRACT

Although bovines are natural hosts for BoHV-1, serologic studies in several countries have suggested that buffaloes (Bubalus bubalis) may be susceptible to BoHV-1 and other genetically related alphaherpesvirus. This study aimed to investigate the presence of BoHV-1 DNA in trigeminal ganglia from 202 buffaloes by a semi-nested PCR to amplify partially the glycoprotein D (gD) gene of BoHV-1. Additionally, 242 serum samples were tested by serum neutralization (SN) for the detection of antibodies against BoHV-1, BoHV-5 and BuHV. All clinical samples were collected in a slaughterhouse located in Pelotas, RS, Brazil. BoHV-1 DNA was detected in 61 (30.1%) of the samples and SN revealed 27.6% of the animals with neutralizing antibodies against at least one of the tested viruses. Nucleotide sequencing of 15 amplicons followed by BLAST analysis confirmed the presence of BoHV-1 DNA in the analyzed tissues. Taken together, these data indicate that BoHV-1 infection is distributed in buffaloes in southern Brazil. However, the role of buffaloes in the BoHV-1 epidemiology needs further investigation.

Keywords: BoHV-1, trigeminal ganglia

Recebido em 22 de setembro de 2017

Aceito em 9 de julho de 2018

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: geferson.fischer@gmail.com

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) está classificado na ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2015). O material genético viral consiste em uma molécula de DNA de fita dupla de aproximadamente 135kb, envolto por um capsídeo icosaédrico, e envelope glicoproteico (Davison *et al.*, 2009).

A infecção pelo BoHV-1 está associada a uma variedade de quadros clínicos, como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite pustular infecciosa (IBP), além de falhas reprodutivas, como retorno ao cio e abortamentos (Silva *et al.*, 2000). Particularmente, as manifestações reprodutivas resultam em prejuízos econômicos importantes tanto em rebanhos de corte quanto de leite (Thiry *et al.*, 2006). Além disso, o BoHV-1 também tem sido associado à enfermidade neurológica em bovinos (Sá e Silva *et al.*, 2007). A infecção pelo BoHV-1 possui distribuição mundial, e suas taxas de prevalência e incidência variam de acordo com a região geográfica (Sá e Silva *et al.*, 2007).

Após a infecção primária, o BoHV-1 estabelece latência em neurônios dos gânglios trigêmeo e sacral (Perez *et al.*, 2002), podendo ser reativado por uma ampla variedade de estímulos, entre eles fatores estressantes. A reativação leva à excreção de partículas infecciosas, com ou sem recrudescência clínica, contribuindo para perpetuação e transmissão do vírus na população bovina (Pastoret e Thiry, 1985). O vírus é transmitido pelo contato direto e indireto entre animais pelas secreções respiratórias, oculares e genitais, sendo excretado em grandes quantidades durante a infecção aguda e a reativação (Lemaire *et al.*, 1994).

Embora os bovinos sejam os hospedeiros naturais do BoHV-1, a infecção por esse vírus tem sido relatada em outras espécies de ruminantes domésticos e selvagens (Thiry *et al.*, 2006). Estudos sorológicos realizados em diversos países, como Itália, Brasil e Malásia, têm sugerido que bubalinos (*Bubalus bubalis*) são suscetíveis ao BoHV-1 (Cavirani *et al.*, 1997; Fernandes *et al.*, 2016; Fusco *et al.*, 2017), bem como a outros alfa-herpesvírus

geneticamente relacionados (Thiry *et al.*, 2006). Scicluna *et al.* (2010) demonstraram que bubalinos podem ser experimentalmente infectados com o BoHV-1 após inoculação intranasal, com excreção viral detectável em secreções nasais. Esses dados demonstram o possível papel da espécie como reservatório e potencial disseminador de BoHV-1. Embora o papel desse vírus na biologia da espécie bubalina seja desconhecido, as infecções pelo BoHV-1 podem determinar grandes prejuízos econômicos no que se refere à exploração pecuária desses animais.

Apesar de os bovinos se infectarem naturalmente pelo BoHV-1 e estudos sorológicos indicarem que esse vírus está disseminado em rebanhos bovinos de todo o país, a distribuição dessa enfermidade na espécie bubalina não tem sido estudada. Considerando que bubalinos podem ser criados juntamente ou em proximidade com rebanhos bovinos, é de grande interesse epidemiológico a investigação da circulação do BoHV-1 na espécie bubalina.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de infecção e latência pelo BoHV-1 em búfalos pela detecção do DNA viral em amostras de gânglios trigêmeos coletados de animais abatidos em frigoríficos, bem como realizar a pesquisa de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1, BoHV-5 e BuHV-1 em amostras de soro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 202 gânglios trigêmeos de búfalos com idade entre 24 e 36 meses, em um abatedouro localizado no município de Pelotas, RS. Por se tratar de coleta de órgãos de animais mortos em abatedouro, este projeto não necessitou de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel. As amostras foram submetidas ao Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e armazenadas a -70°C, para posterior utilização. Os animais eram provenientes de diferentes rebanhos bubalinos do estado do Rio Grande do Sul e não tinham histórico de vacinação contra o BoHV-1.

Resumidamente, o processo de extração de DNA consistiu na lise de um fragmento de

aproximadamente 50mg de cada gânglio, em uma solução contendo 800µL de TE⁵N 2X pH 7,4 (20mM de Tris-Cl (Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil), pH 7,4; 2mM de EDTA (Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil), pH 8,0; 200mM de NaCl), 80µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 10% (Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil), e 6µL de proteinase K 20mg/mL (Ludwig, Alvorada/RS, Brasil). Após duas horas de incubação a 56°C, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 18.000 x g, e 400µL do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos, adicionando-se 40µL de NaCl 5M (Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil) e 300µL de fenol (Sigma, São Paulo/SP, Brasil). As amostras foram agitadas durante 30 minutos a 37°C e, logo após, centrifugadas por 10 minutos a 18.000 x g. Aproximadamente 400µL da fase aquosa foram coletados e, então, adicionados 800µL de álcool absoluto em cada amostra. As amostras foram mantidas a uma temperatura de -20°C por 30 minutos, com posterior centrifugação por 10 minutos a 18.000 x g para a formação do *pellet*. Posteriormente o álcool foi desprezado para adição de 100µL de TEN 1X e 10µL da enzima RNase (Ludwig, Alvorada/RS, Brasil). Em seguida, as amostras foram mantidas a 37°C por 30 minutos e posterior armazenamento a -20°C.

Para monitorar o processo de extração da DNA, todas as amostras foram testadas por PCR para amplificação de um fragmento de 358pb da região *D-loop* do DNA mitocondrial bubalino e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%, coradas com brometo de etídio.

Para a análise da presença de DNA do BoHV-1, as amostras foram submetidas a uma *semi-nested* PCR (SN-PCR) para amplificação de um segmento do gene da glicoproteína D (gD). A primeira reação utilizou os *primers* externos P1 (5'GCTGTGGGAAGCGGTACG3') e P2 (5'-GTCGACTATGGCCTTGTGTGC-3'), resultando em um amplicon de 468 pares de bases (pb). Na segunda reação, foram usados *primers* P2 e P3 (5'-ACGGTCATATGGTACAAGGACAGCG-3') para a amplificação de um produto final de 425pb, de acordo com metodologia descrita por Wiedmann *et al.* (1993), com modificações.

A primeira reação da PCR foi realizada em uma solução contendo DNA, 10pmol de cada *primer* (P1/P2), 1,5mM de dNTP (Ludwig,

Alvorada/RS, Brasil), 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil) e água ultrapura para o volume final de 25µL. A amplificação foi realizada em termociclador (*Biocycler*®), com as seguintes condições: uma etapa de 4min a 94°C; 35 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 60°C e 1min a 72°C, seguida de extensão final de 7min a 72°C. A seguir, foram usados 3µL do produto final da primeira amplificação para a segunda reação da PCR, utilizando-se as mesmas condições descritas anteriormente. Em todas as reações, foram empregados os respectivos controles positivo e negativo.

Para a avaliação da similaridade molecular entre as amostras positivas e os isolados de referência de BoHV-1, 14 produtos resultantes da reação de *semi-nested* PCR foram purificados por meio do gel de agarose e submetidos ao sequenciamento genômico utilizando-se o *Cycle Sequencing BigDye Terminator kit v3, ABI 3130* (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As sequências obtidas foram editadas pelo *BioEdit Sequence Alignment Editor* (North Carolina State University, Raleigh, NC), e as análises de homologia realizadas utilizando-se o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e *ClustalW* (disponível *online*). O DNA extraído da cepa de referência *Cooper* do BoHV-1 foi utilizada como controle positivo.

Amostras de sangue (n= 242) foram coletadas no momento da sangria e, posteriormente à formação do coágulo, foi realizada a centrifugação para a obtenção do soro. Após incubação a 56°C por 30 minutos, as amostras foram armazenadas a -20°C até a realização dos testes sorológicos. Por questões logísticas do frigorífico onde foram coletadas as amostras, não foi possível correlacionar os gânglios com as amostras de soro. As amostras de soro foram diluídas (1:2 - 1:256) em placas de 96 orifícios e testadas individualmente frente a 100 DIC₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares) de diferentes cepas-padrão: BoHV-1 (cepa Los Angeles), BoHV-5 (cepa Riopel - RP) e BuHV (cepa B6). Após incubação por uma hora a 37°C, foi adicionada uma suspensão de células MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney*), cultivadas em meio mínimo essencial de *Eagle* (Sigma, São Paulo/SP, Brasil), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco, São Paulo/SP, Brasil). Posteriormente, as placas

contendo os cultivos foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂.

A leitura final foi realizada após 72 horas, pela observação da presença ou ausência de efeito citopático (ECP) característico. O título de anticorpos neutralizantes foi expresso como a recíproca da maior diluição capaz de inibir o ECP.

RESULTADOS

A eficiência da extração de DNA foi comprovada pela amplificação de um fragmento da região *D-loop* do DNA mitocondrial bubalino. Na grande maioria das amostras testadas, foi possível a detecção do fragmento esperado (358bp) após eletroforese do produto do PCR em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Nas amostras negativas, procedeu-se à nova etapa de extração de DNA.

De um total de 202 amostras de gânglios trigêmeos testados, 61 (30,1%) foram consideradas positivas pela técnica de *semi-nested* PCR usada no presente estudo. Os produtos obtidos por meio das reações de PCR podem ser observados na Fig. 1.

A análise de similaridade das sequências de nucleotídeos (obtidas por meio do sequenciamento genômico dos produtos de PCR) pelo BLAST demonstrou um percentual de homologia de 99-100% das amostras positivas com as sequências de nucleotídeos do gene da glicoproteína D (gD) de cepas de referência e diferentes isolados do BoHV-1 disponíveis no *GenBank*. A avaliação das sequências de nucleotídeos do mesmo gene-alvo para outros herpesvírus indicou somente 90-91% de homologia com o BuHV (cepa B6) e 89-90% com o BoHV-5 (cepa SV-507).

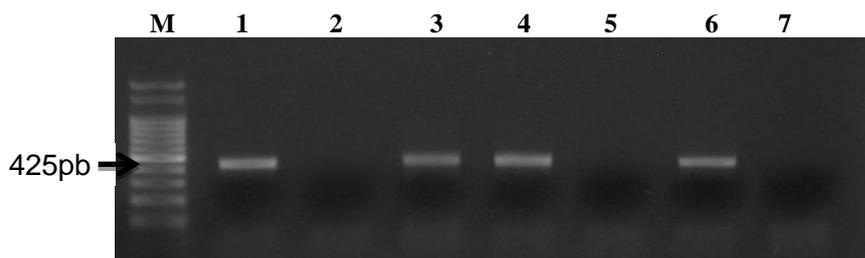


Figura 1. Amplificação parcial do gene da glicoproteína D (gD) do BoHV-1 em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. M: marcador de massa molecular 100bp DNA ladder. Linhas 1, 3 e 4 (amostras positivas na *semi-nested* PCR); linhas 2 e 5 (amostras negativas na *semi-nested* PCR); linha 6: controle positivo (cepa *Cooper* do BoHV-1); linha 7: controle negativo.

De um total de 242 amostras de soro analisadas, 67 apresentaram anticorpos neutralizantes contra pelo menos um dos vírus testados. Destas, 56 (23,14%) neutralizaram a cepa LA (BoHV-1), 50 (20,66%) apresentaram anticorpos neutralizantes contra a cepa B6 (BuHV), enquanto 54 amostras (22,31%) neutralizaram a cepa RP (BoHV-5). Os títulos neutralizantes detectados variaram entre 2 e 32 em todos os casos. Cabe ainda ressaltar que 48 amostras de soro (19,8%) apresentaram anticorpos neutralizantes contra as três cepas virais utilizadas na soroneutralização.

DISCUSSÃO

Estudos realizados em diversos estados brasileiros têm demonstrado que o percentual de animais soropositivos para o BoHV-1 varia de

27,1% a 85,7% (Rocha *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2014). Devido à ampla disseminação das infecções pelo BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos no Brasil e à ausência de testes que permitam a diferenciação sorológica da resposta imune induzida em relação a esses agentes virais, o presente estudo se torna importante, pois contribui para o esclarecimento da epidemiologia das infecções pelo BoHV-1.

Apesar de os bovinos serem considerados os hospedeiros naturais desse vírus, diversas outras espécies são suscetíveis à infecção pelo BoHV-1, incluindo o búfalo doméstico (Scicluna *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2016). No entanto, há uma escassez de informações a respeito da epidemiologia e da patogenia do BoHV-1 em búfalos. Considerando os estudos já realizados,

aparentemente ainda não é possível relacionar a infecção pelo herpesvírus bovino com casos de abortamento em búfalos (Perumal *et al.*, 2013). No entanto, ainda que a patogenia do BuHV-1 e do BoHV-1 em búfalos não esteja estabelecida, estudos sorológicos sugerem que a transmissão viral ocorra entre búfalos e bovinos. Além disso, como a exploração da espécie bubalina no país vem adquirindo expressividade, é de grande importância o conhecimento dessas características específicas.

Neste estudo, foi avaliada a presença de DNA do BoHV-1 em amostras de gânglios trigêmeos, bem como anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1, BoHV-5 e BuHV em búfalos provenientes da região sul do Rio Grande do Sul. Por questões logísticas do frigorífico onde foram coletadas as amostras, não foi possível correlacionar os gânglios com as amostras de soro. Um fragmento do DNA de BoHV-1 foi detectado em 61 (30,1%) das amostras, sugerindo uma ampla distribuição e a possibilidade de transmissão viral entre os animais testados.

O sequenciamento do genoma da cepa B6 do BuHV (Scheffer *et al.*, 2017) representa uma etapa importante para o conhecimento da evolução desse vírus e sua relação com outros herpesvírus, bem como permite a identificação precisa de diferenças em nível genômico. No presente estudo, o sequenciamento de 14 amostras positivas no *semi-nested* PCR e a subsequente análise pelo BLAST permitiram identificar um percentual de homologia de 99-100% com diferentes sequências de cepas e isolados do BoHV-1 depositadas no *GeneBank*. Por outro lado, o percentual de homologia das sequências analisadas foi de 91% para o BuHV (cepa B6) e entre 89-90% para o BoHV-5 (cepa SV 507). Os resultados indicam a presença do DNA do BoHV-1 nas amostras de gânglios trigêmeos provenientes dos búfalos avaliados. Este trabalho representa o primeiro estudo demonstrando a infecção latente pelo BoHV-1 na espécie bubalina no Brasil.

A presença de DNA viral nos gânglios trigêmeos de búfalos comprova que esses animais podem ser naturalmente infectados com BoHV-1 e permanecer com infecção latente, tornando-se portadores. Embora ainda não se conheça o papel dos búfalos na epidemiologia das infecções pelo

BoHV-1, cabe ressaltar a importância de uma investigação da possível transmissão entre bubalinos ou destes para bovinos e, principalmente, do impacto sanitário e econômico dessas infecções na espécie bubalina. Como os búfalos podem ser infectados com herpesvírus de origem bovina (Scicluna *et al.*, 2010; Fusco *et al.*, 2017), esses animais podem ser considerados potenciais fontes de infecção para bovinos.

Petrini *et al.* (2012), visando identificar a etiologia de sinais clínicos respiratórios em búfalos da região central da Itália, identificaram animais positivos pela técnica de PCR, com amplificação parcial do gene da glicoproteína E (gE) de BuHV-1. Em outro estudo, a presença do DNA do BoHV-1 pela técnica de PCR em tempo real foi detectada em búfalos da região sul da Itália (Fusco *et al.*, 2017). Estes autores, que relataram o primeiro caso de infecção natural de búfalos pelo BoHV-1 na Itália, sugerem que qualquer programa sistemático de erradicação do BoHV-1 deverá envolver não só o gado bovino, mas também os búfalos.

Além da análise em nível genômico, foi investigada a presença de anticorpos contra o BoHV-1, BoHV-5 e BuHV pela soroneutralização. De um total de 242 amostras de soro analisadas, 67 amostras apresentaram anticorpos neutralizantes contra, pelo menos, um dos vírus testados. Os índices de soropositivos foram de 23,14%, 22,31% e 20,66% para BoHV-1, BoHV-5 e BuHV, respectivamente. Particularmente no presente estudo, essas taxas de soropositividade demonstram infecção ativa, tendo em vista a ausência de histórico de vacinação contra o BoHV-1 nos búfalos analisados. Esses resultados, associados à presença do DNA viral nas amostras analisadas, sugerem que os búfalos podem atuar como portadores do BoHV-1, eliminando, eventualmente, o vírus em episódios de reativação e servindo como fonte de infecção tanto para bovinos como para bubalinos.

Apesar de ser considerada um teste-padrão pela OIE (Organização Mundial de Saúde Animal), a SN não permite uma diferenciação precisa entre animais infectados com BoHV-1 ou BoHV-5, e cerca de 92% dos animais infectados com esses vírus apresentam reações cruzadas na SN (Teixeira *et al.*, 1998). O BoHV-1 e o BoHV-5

apresentam similaridades em diversos aspectos estruturais, biológicos, antigênicos e moleculares (Thiry *et al.*, 2006). Assim, em populações de animais em que os dois vírus circulam, os testes sorológicos não permitem distinguir a resposta sorológica contra cada um deles e, como consequência, não é possível estimar a prevalência real de cada agente (Del Médico Zajac *et al.*, 2006). Em relação ao BuHV-1, os estudos antigênicos e sorológicos ainda são escassos, e os níveis de reatividade sorológica cruzada induzidos por este em relação ao BoHV-1 e ao BoHV-5 são desconhecidos. A SN pode ainda não detectar anticorpos em alguns animais que apresentem a infecção viral em estado de latência prolongada ou naqueles recentemente infectados. Nessas duas situações, os animais podem apresentar títulos basais de anticorpos neutralizantes que não são detectáveis por meio desse procedimento sorológico, originando com isso resultados falso-negativos (Wyler *et al.*, 1989). Portanto, é possível que o número de animais soropositivos seja maior do que o encontrado, visto que nem todos os animais latentemente infectados possuem anticorpos em níveis detectáveis pela técnica empregada neste estudo.

Desse modo, considerando apenas os resultados de sorologia, não é possível associar as infecções a um determinado tipo viral (BoHV-1, BoHV-5 ou BuHV), devido às reações cruzadas observadas entre esses agentes. Entretanto, os resultados da PCR aliados ao sequenciamento genômico e à análise pelo BLAST demonstraram inequivocadamente a presença do DNA do BoHV-1 nos gânglios trigêmeos dos búfalos testados.

Em resumo, os resultados deste estudo demonstram a ocorrência de infecção latente de búfalos pelo BoHV-1 e reforçam a necessidade de estudos adicionais que elucidem o exato papel dos bubalinos na epidemiologia das infecções pelo BoHV-1.

REFERÊNCIAS

- CAVIRANI, S.; CONSALVO, F.; D'ONOFRIO, G. *et al.* A serological survey of different bovine herpesviruses (BHV1, BHV2, BHV4) in dairy buffaloes of southern and northern Italy. *PROCEEDINGS OF THE WORLD BUFFALO CONGRESS*, 5., 1997, Caserta. *Proceedings...* Caserta Italy: International Buffalo Federation, 1997. p.626-630.
- DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; EHLERS, B. *et al.* The order Herpesvirales. *Arch. Virol.*, v.154, p.171-177, 2009.
- DEL MÉDICO ZAJAC, M.P.; PUNTEL M.; ZAMORANO, P.I. *et al.* BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res. Vet. Sci.*, v.81, p.327-334, 2006.
- FERNANDES, L.G.; PIMENTA, C.L.R.M.; PITUCO, E. *et al.* Fatores de risco associados com as soropositividades para BoHV-1 e BVDV em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. *Semin. Cien. Agrar.*, v.37, p.1929-1936, 2016.
- FREITAS, E.J.P.; LOPES, C.E.R.; MOURA FILHO, J.M. *et al.* Frequência de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em bovinos de corte não vacinados. *Semin. Cienc. Agrar.*, v.35, p.1301-1310, 2014.
- FUSCO, G.; AMOROSO, M.G.; APREA, G. *et al.* First report of natural BoHV-1 infection in water buffalo. *Vet. Rec.*, 2017. Available in: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/177/6/152.2.long>>. Accessed in: 23 Aug. 2017.
- INTERNATIONAL Committee on Taxonomy of Viruses, Order Herpesvirales. 2015. Available in: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Accessed in: 9 Jun. 2017.
- LEMAIRE, M.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Ann. Med. Vet.*, v.138, p.167-180, 1994.
- PASTORET, P.P.; THIRY, E. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of vírus latency. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.8, p.35-42, 1985.

- PEREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M.R. *et al.* Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet. Pathol.*, v.39, p.437-444, 2002.
- PERUMAL, P.; KUMAR, T.K.; SRIVASTAVA, S.K. Infectious causes of infertility in buffalo bull (*Bubalus bubalis*). *Buf. Bul.*, v.32, p.71-96, 2013.
- PETRINI, S.; AMOROSO, M.G.; PERUGINI, G. *et al.* Rilievo del bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) in un allevamento di bufali nel centro Italia. *Larg. An. Rev.*, v.18, p.113-116, 2012.
- ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A.M.G.; LOBATO, Z.I.P. *et al.* Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, p.645-647, 2001.
- SÁ E SILVA, M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. *et al.* Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). *Pesqui. Vet. Bras.*, v.27, p.403-408, 2007.
- SCHEFFER, C.M.; VARELA, A.P.M.; CIBUÇSKI, S.P. *et al.* Genome sequence of bubaline alphaherpesvirus 1 (BuHV1) isolated in Australia in 1972. *Arch. Virol.*, v.162, p.1169-1176, 2017.
- SCICLUNA, M.T.; CAPRIOLI, A.; SARALLI, G. *et al.* Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of bovine herpesvirus 1 infection? *Vet. Microbiol.*, v.43, p.81-88, 2010.
- SILVA, T.C.; OLIVEIRA, E.A.S.; MELO, S.V. *et al.* Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) isolated from semen. *Virus Vet. Res.*, v.5, p.116, 2000.
- TEIXEIRA, M.B.; ROEHE, P.M.; COELHO, C.S.S. *et al.* Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). *Pesqui. Agrar. Gaucha*, v.4, p.61-65, 1998.
- THIRY J.; KEUSER V.; MUYLKENS B. *et al.* Ruminant alphaherpesvirus related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.*, v.37, p.169-190, 2006.
- WIEDMANN, M.; BRANDON, R.; WAGNER, P. *et al.* Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *J. Virol. Methods*, v.44, p.129-140, 1993.
- WYLER, R.; EHGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1989. p.1-72.