

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

**ANALISE ANTIGÊNICA DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1 (BoHV-1) E 5
(BoHV-5) COM ANTICORPOS MONOCLONAIS**

Suzana Pereira de Melo Borges Caixeta

Porto Alegre

2008

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

**ANALISE ANTIGÊNICA DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1 (BoHV-1) E
5 (BoHV-5) COM ANTICORPOS MONOCLONAIS**

Suzana Pereira de Melo Borges Caixeta

**Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva – Virologia Veterinária.**

Orientador: Paulo Michel Roehle

Porto Alegre

2008

Dedico esse trabalho a minha mãe, uma guerreira que sempre lutou pelo o que há de mais precioso: a vida. E ao meu pai, meu eterno herói.

Agradecimentos

Aos meus pais, José Alberto e Eula, pela vida, pelo amor e pela luta. Esse sim foi o meu maior aprendizado.

Aos meus irmãos, Bruno e Simone, por não terem me deixado desistir dessa conquista.

A minha avó, Dália e ao meu amigo, irmão, pai, tio Marquinho pelo carinho e conselhos.

A minha grande (no tamanho e no coração) família, pelo ombro e por estarem tão perto, mesmo distante.

As minhas amigas Carol, Kelly e Michelle, por serem verdadeiras irmãs.

A Denise e a Wilia, pela paciência, ajuda e companheirismo em todos os momentos.

Um agradecimento especial aos meus novos e eternos amigos Diógenes, Thais, Carine, Ju e Samuca, pela ajuda, compreensão e incentivo.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Michel Roehe, pela oportunidade, orientação e ensinamentos obtidos.

A professora Ana Cláudia Franco, por estar sempre pronta a me ajudar, compartilhando seus conhecimentos de uma forma clara e simples.

Ao IPVDF, que permitiu o desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço ainda, aos animais, que foram os principais responsáveis para que eu escolhesse essa profissão e sempre serão os principais responsáveis para que eu continue apaixonada pela Medicina Veterinária.

ANALISE ANTIGÊNICA DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1 (BoHV-1) E 5 (BoHV-5) COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

RESUMO

Os herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) são responsáveis por uma série de patologias em bovinos. A diferenciação entre tipos e subtipos desses vírus é importante para a compreensão da epidemiologia das infecções associadas a eles, assim como para permitir a tomada de medidas de controle adequadas. No presente estudo foram efetuadas análises antigênicas utilizando anticorpos monoclonais (AcMs) preparados contra antígenos específicos de herpesvírus bovinos. Quarenta e cinco amostras virais foram examinadas com um painel de 36 AcMs previamente preparados, em testes de imunoperoxidase em monocamada. Quatro amostras virais, sendo três BoHV-1 e uma BoHV-5, não apresentaram reatividade frente a nenhum dos AcMs avaliados. Oito dos 36 AcMs reagiram com todas as demais 41 amostras de herpesvírus bovinos. Por outro lado, oito amostras virais (três BoHV-5 e cinco BoHV-1) reagiram com todos os AcMs testados. Um AcM foi capaz de diferenciar o subtipo “c” do BoHV-5 das demais amostras. Os demais resultados obtidos sugerem que não há uma clara correlação entre tipos e subtipos genomicamente determinados de herpesvírus bovinos e os AcMs aqui avaliados.

ANTIGENIC ANALYSIS OF BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BoHV-1) AND (BoHV-5) USING MONOCLONAL ANTIBODIES.

ABSTRACT

Bovine herpesvirus 1(BoHV-1) and 5 (BoHV-5) are associated to different clinical conditions of cattle. The differentiation between types and subtypes of these viruses maybe important for a better understanding of the epidemiology of bovine herpesvirus infections, as well as to provide support for adequate control measures. In the present study, antigenic analyses were performed with monoclonal antibodies (Mabs) prepared to bovine herpesviruses specific antigens. Fourty five virus isolates/strains were examined with a panel of 36 previously prepared Mabs, immunoperoxidase monolayer assays. Four virus isolates, of which three BoHV-1 and one BoHV-5, did not react with any of the Mabs tested. Eight of the 36 Mabs reacted with all other 41 bovine herpeviruses. On the other hand, eight viruses (three BoHV-5 and five BoHV-1) reacted with all Mabs tested. One Mab was capable of distinguishing BoHV-5 subtype "c" from the other subtypes. Additional results revealed that no clearcut correlation could be established between bovine herpesviruses types and subtypes determinated by molecular methods and the Mabs here evaluated.

LISTA DE ABREVIATURAS

BICP: *bovine infected cell protein*
BoHV-1: Herpesvírus bovino tipo 1
BoHV-1.1: Herpesvírus bovino tipo 1 subtipo 1
BoHV-1.2a: Herpesvírus bovino tipo 1 subtipo 2a
BoHV-1.2b: Herpesvírus bovino tipo 1 subtipo 2b
BoHV-1.3: Herpesvírus bovino tipo 1 subtipo 3
BoHV-5: Herpesvírus bovino tipo 5
BoHV-5a: Herpesvírus bovino tipo 5 subtipo a
BoHV-5b: Herpesvírus bovino tipo 5 subtipo b
DMEM: Meio mínimo essencial modificado de Dulbecco
DICC₅₀: Doses infectantes para 50% cultivos celulares
E: Classe de genes expressos cedo após a infecção (*early*)
ECP: efeito citopático
EDTA: ácido etileno diaminotetra-acético
ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*
HSV: Herpes simplex vírus
ICAM-I: Moléculas de adesão intracelular tipo I
IE: imediatamente precoces ("*immediate early*")
IFN (α/β): Interferon
IgA: Imunoglobulina A
IgD: Imunoglobulina D
IgE: Imunoglobulina E
IgG: Imunoglobulina G
IgM: Imunoglobulina M
IL: Interleucinas
IPB: Balanopostite pustular infecciosa
IPV: Vulvovaginite pustular infecciosa
IPVDF: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
IPX: Imunoperoxidase
IR: Sequência repetida interna
L: Classe de genes expressos tardiamente após a infecção (*late*)
LAT: Transcrito associado à latência
LR: Região relacionada à latência
MDBK: Células de rim de bovino Madin-Darby
MEM: Meio mínimo essencial de Eagle
MHC-I: Complexo maior de histocompatibilidade tipo I
NK: *natural killer cells*
Kbp: Kilo (10^3) pares de bases
PBMCs: Células mononucleares periféricas do sangue
PBS: solução de tampão salino com fosfatos
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PRV: Vírus da Pseudo-raiva (Herpesvírus suíno tipo 1)
REA: Análise com enzimas de restrição
SDS: Sódio dodecil-sufato
SN: Soroneutralização
Th1: Linfócito T *helper* 1
Th2: Linfócito T *helper* 2
TNF ($-\alpha$): Fator de necrose tumoral

TR_s: Sequência repetida terminal

UL: Segmento longo único

US: segmento curto único

Vhs: *Virus-host shut off*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia eletrônica de um virion de um alphaherpesvirus	15
Figura 2 - Organização genômica dos alphaherpesvirus	16
Figura 3 - Reação negativa ao teste de imunoperoxidase	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais glicoproteínas de BoHV-1 e BoHV-5	20
Tabela 2 - Amostras virais	36
Tabela 3 - Tipagem/Isotipagem dos AcMs	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Perfil de reatividade dos BoHV frente aos AcMs em teste de IPX	43
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Características gerais dos herpesvírus	15
2.2. Comparação genômica e antigênica entre BoHV-1 e BoHV-5	16
2.3. Glicoproteínas virais	17
2.4. Replicação Viral	20
2.4. Latência	22
2.5. Transmissão	23
2.6. Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)	23
2.7.1. Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR)	24
2.7.2. Vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite pustular infecciosa (IBP)	25
2.8. Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)	25
2.8.1. Encefalites	27
2.9. Resposta Imune	27
2.9. 1. Resposta imune inata	27
2.9.1. Resposta imune adaptativa humoral	28
2.9.3. Resposta imune adaptativa celular	29
2.10. Diagnóstico	29
2.10.1. Diagnóstico Laboratorial	29
2.10.1.2. Diagnóstico Sorológico	30
a) Soroneutralização (SN)	30
b) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	30
c) Imunoperoxidase (IPX)	31
2.11. Anticorpos	32
2.11.1. Anticorpos Monoclonais (AcM) e o BoHV	32

3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.2. Células	35
4.1. Amostras Virais	35
4.3. Multiplicação das amostras virais	36
4.4. Anticorpos Monoclonais	37
4.5. Isotipagem dos AcMs	37
4.6 Teste de imunoperoxidase em monocamada (IPX)	37
5. RESULTADOS	39
5.1. Isotipagem dos AcMs	39
5.2. Caracterização das Amostras de BoHV	39
5.3. Teste de imunoperoxidase	39
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	45
8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	46
9. ANEXOS	61

1. INTRODUÇÃO

A espécie bovina é hospedeira natural de vários membros da família *Herpesviridae*, dentre os quais aqui serão destacados os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) (Murphy *et al.*, 1999; Knipe *et al.*, 2001). Ambos os vírus compartilham diversas propriedades biológicas, antigênicas e moleculares (Delhon *et al.* 2003). Apesar da grande similaridade, o BoHV-1 e o BoHV-5 podem ser diferenciados por análises de restrição enzimática de seus genomas (Engels *et al.*, 1986; Bulach & Studdert, 1990), por testes de neutralização cruzada (Bagust & Clarck, 1972; Metzler *et al.*, 1986), pela cinética de neutralização (Bratanich *et al.*, 1991), por SDS-PAGE com polipeptídeos marcados (Metzler *et al.*, 1986), pela reatividade com anticorpos monoclonais (AcMs) (Engels *et al.* 1986, Metzler *et al.* 1986, Bratanich *et al.* 1991, Roehe *et al.* 1997, D'Arce *et al.* 2002, Souza *et al.* 2002) e pela caracterização dos genes que codificam as glicoproteínas gC (Chowdhury, 1995), gD (Abdelmagid *et al.*, 1992), gG (Engelhardt & Keil, 1996), gH (Meyer *et al.*, 1999) e gE (Chowdhury *et al.*, 2000).

Por meio dessas técnicas as amostras de BoHV-1 foram subdivididas em dois subtipos, denominados BoHV-1.1 e BoHV-1.2. O subtipo BoHV-1.2 ainda foi subdividido em BoHV-1.2a e BoHV-1.2b (Metzler *et al.*, 1985). O subtipo 1 (BoHV-1.1) geralmente está relacionado ao grupo que causa doença respiratória clássica; o subtipo 2a (BoHV-1.2a) abrange as cepas associadas com a rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) e abortos, enquanto o subtipo 2b (BoHV-1.2b) causa vulvovaginite ou balanopostite, mas geralmente não está associado com abortos (Miller, 1991).

O BoHV-5 é o agente etiológico da encefalite herpética bovina (Roizman & Pellett, 2001). Amostras de BoHV-5 eram no passado consideradas “variantes encefalitogênicas” de BoHV-1, sendo chamadas de BoHV-1.3, devido às amplas reações cruzadas entre estes dois vírus encontradas em testes sorológicos (Bratanich *et al.*, 1991, Teixeira *et al.*, 1998). Entretanto, características epidemiológicas distintas destas infecções, amparadas em estudos antigênicos e moleculares, levaram a criação do tipo 5 para enquadrar este agente encefalitogênico em um *taxon* diferente (Roizman *et al.*, 1992). Estudos comparativos entre amostras brasileiras e de outros países, utilizando enzimas de restrição, mostraram que o BoHV-5 subdivide-se em BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5 “não a-não b”, ou “c” (D'Arce *et al.*, 2002).

Contudo, não existe nenhuma associação definitiva entre tipo/subtipo e quadro clínico, principalmente porque o BoHV-5 já foi isolado de sêmen (Gomes *et al.*, 2003), tecidos de fetos abortados (Carrillo *et al.*, 1983; Suarez Heinlen *et al.*, 1993) e de órgãos (baço e pulmão) de animais com infecções sistêmicas (Suarez *et al.* 1993). Por outro lado, BoHV-1 tem sido ocasionalmente isolado do sistema nervoso central de animais apresentando doenças neurológicas (Magyar *et al.*, 1993; Furuoka *et al.*, 1995; Ely *et al.*, 1996; Roels *et al.*, 2000; Penny *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007). Além disso, isolados genitais, quando inoculados experimentalmente, podem causar infecções respiratórias (Spilki *et al.*, 2004).

Visto que há uma grande similaridade entre os tipos e subtipos do BoHV, os testes sorológicos tradicionais de diagnóstico são incapazes de diferenciar a resposta induzida por uma amostra de BoHV-5 daquela induzida pelo BoHV-1 (Teixeira *et al.*, 1998). Em consequência disso, até o presente não existem dados corretos sobre as reais prevalências de infecções causadas por BoHV-1 ou BoHV-5 (Souza *et al.*, 2002).

Os anticorpos monoclonais podem constituir-se em importantes ferramentas na distinção das infecções causadas pelos herpesvírus bovinos. Dependendo de suas especificidades, os AcMs podem permitir estudos sobre a biologia dos herpesvírus, tais como a caracterização de sua composição protéica e a análise das variantes (Souza *et al.*, 2002; D'Arce *et al.*, 2002). Um de seus usos mais frequentes tem sido a busca da caracterização antigênica de amostras (Meyer *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2002; Oldoni *et al.*, 2004). As evidências levantadas pela aplicação dos AcMs têm contribuído para o desenvolvimento de testes diagnósticos, alguns deles inclusive capazes de diferenciar tipos e subtipos do vírus (apesar de ainda escassos até o presente). Como ferramenta diagnóstica, os AcMs também podem ser de grande utilidade na precisa identificação de um agente suspeito, apresentando o potencial de permitir a determinação correta do agente causador de determinado quadro.

Em estudo prévio (Oliveira, 2006), 48 AcMs foram produzidos através da imunização de camundongos BALB-C com antígenos de BoHV-1 e BoHV-5. No presente estudo, 36 destes AcMs foram utilizados para analisar as características antigênicas de 45 amostras de BoHV-1 e BoHV-5.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais dos herpesvírus

Os herpesvírus pertencem à família *Herpesviridae*, a qual inclui mais de 200 vírus isolados de diferentes espécies, incluindo moluscos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Roizman *et al.*, 2001). Essa variedade de hospedeiros evidencia a capacidade de adaptação dos herpesvírus na natureza, assim como sua co-evolução junto a diferentes espécies ao longo do tempo (Davison, 2002).

Os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1, BoHV-5) estão classificados na subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2007). Os membros dessa subfamília caracterizam-se por apresentarem um ciclo de replicação curto, porém com rápida disseminação em cultivos celulares e pela indução de lise nas células infectadas. Outra característica importante desta subfamília é a capacidade de estabelecer infecções latentes em gânglios nervosos (Fenner *et al.*, 1993).

Os herpesvírus possuem um nucleocapsídeo icosaédrico com 100 -110 nm de diâmetro, consistindo em 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros). O virion é circundado por uma zona eletrodensa de material amorfo denominado tegumento e por um envelope lipídico onde glicoproteínas virais projetam-se da superfície em forma de espículas, sendo as glicoproteínas B, C e D as mais abundantes (Thiry *et al.*, 2007). Todo este conjunto forma um virion pleomórfico de 120-300nm de diâmetro (Figura 1) (Roizman & Pellett, 2001).

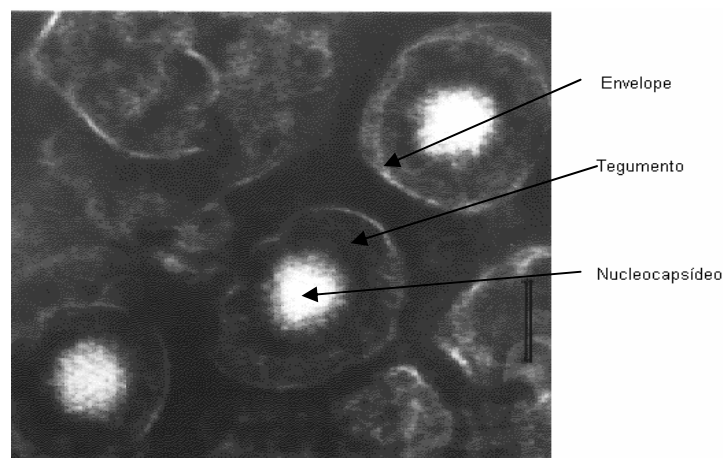


Figura 1. Microscopia eletrônica de um virion de um alphaherpesvirus (HSV) (Frank Fenner, com modificações, John Curtin School, Australian National University - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB.html>).

O genoma dos alphaherpesvírus consiste em uma fita dupla de DNA linear com aproximadamente 135-140 mil pares de base (Kpb) (Muyklens *et al.*, 2007). A disposição genômica é típica dos herpesvírus do grupo “D”, em que o genoma pode ser dividido em um segmento longo único (“unique long”, ou UL) de aproximadamente 102 a 104 Kpb e um segmento curto único (“unique short”, US) de aproximadamente 10,5 a 11 Kpd, flanqueado por regiões repetidas invertidas de aproximadamente 24 Kpb, denominadas repetição interna (IR) e terminal (TR) (Figura 2) (Roizman & Knipe, 2001).

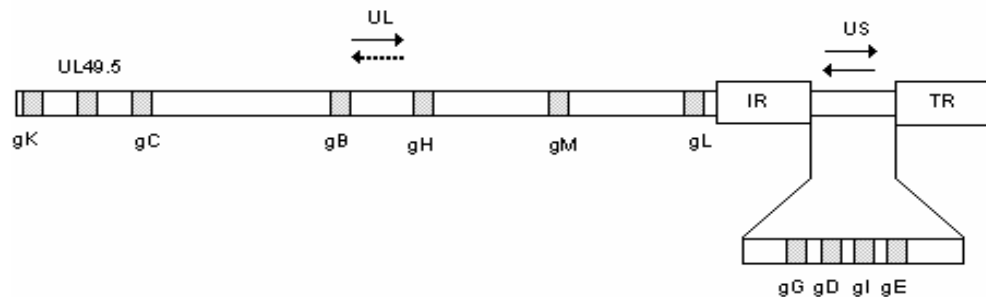


Figura 2. Organização genômica dos alphaherpesvírus. O genoma consiste em uma fita dupla de DNA linear. O rearranjo contém um segmento longo único (UL) e um curto único (US) flanqueado por duas seqüências invertidas repetidas: repetição interna (IR) e repetição terminal (TR). O segmento US pode apresentar duas possíveis orientações enquanto que o segmento UL apresenta predominantemente uma orientação (representado pelas flechas, a flecha pontilhada ilustra que a orientação do segmento UL pode variar em torno de 5%) (Thiry *et al.*, 2007).

2.2. Comparação genômica e antigênica entre BoHV-1 e BoHV-5

O BoHV-1 e 5 apresentam uma homologia de 82% a 85% no genoma (Engels *et al.*, 1986; Delhon *et al.*, 2003). As diferenças na seqüência de nucleotídeos entre esses dois vírus estão distribuídas por todo o genoma (Engels *et al.*, 1981; Chowdhury, 1995). Estudos comparativos entre esses dois vírus mostraram que o BoHV-5 possui, aproximadamente, 138.390 pares de bases (pb) e uma taxa de guanina/citosina (G/C) de 72 %. Já o BoHV-1 possui 2.518 pb a mais totalizando em 75 % de G/C (Schwyzer & Ackermann, 1996; Meyer *et al.*, 1997; Delhon *et al.*, 2003; Thiry *et al.*, 2007). O genoma do BoHV-1 compreende 67 genes únicos, enquanto que o BoHV-5 apresenta 68 genes únicos. Ambos apresentam dois genes duplicados, que codificam para as proteínas BICP4 e BICP22, localizados nas repetições internas (Delhon *et al.*, 2003).

Antigênicamente, o BoHV-1 e 5 são homólogos em 95% (Delhon *et al.*, 2003). As proteínas que possuem maior identidade com o BoHV-1 são aquelas envolvidas na replicação do DNA viral (codificada pelos genes UL5, UL15, UL29 e UL39) e as que

compõem o tegumento (codificadas pelos genes UL14, UL48) e o capsídeo (codificadas pelos genes UL19, US6) do vírion (Delhon *et al.*, 2003).

Análises com anticorpos monoclonais (AcMs) têm demonstrado diferenças antigênicas entre as principais glicoproteínas (gB, gC e gD) do BoHV-5 e do BoHV-1. Diferenças na ligação da gC do BoHV-1 e 5 aos seus receptores pode indicar uma modulação na habilidade do vírus se espalhar para o sistema nervoso central (Liman *et al.*, 2000), contribuindo para as diferenças na patogênese da doença respiratória e da doença neurológica entre esses dois vírus (Chowdhury, 1995).

2.3. Glicoproteínas virais

O genoma do BoHV codifica mais de 70 produtos, entre os quais 10 a 12 são glicoproteínas do envelope (Tikoo *et al.*, 1995). Estas glicoproteínas desempenham um papel fundamental na interação vírus-célula e estão envolvidas nos diferentes processos do ciclo viral, tais como reconhecimento e adsorção, penetração, disseminação de célula para célula, maturação e liberação do vírus (Tabela 1) (Thiry *et al.*, 2007).

O segmento UL inclui genes que codificam as glicoproteínas gB (UL27) (Whitbeck *et al.*, 1988), gC (UL44) (Fitzpatrick *et al.*, 1988), gH (UL22) (Baranowski *et al.*, 1995), gL (UL1) (Khattar *et al.*, 1996), gK (UL53) (Khadr *et al.*, 1996) e gM (UL10) (Wu *et al.*, 1998), enquanto que o segmento US abriga os genes que correspondem a gG (US4) (Keil *et al.*, 1996), gD (US6) (Tikoo *et al.*, 1990), gI (US6) (Rijsewijk *et al.*, 1995) e gE (US8) (Rijsewijk *et al.*, 1993).

As glicoproteínas são importantes alvos para a resposta imune do hospedeiro devido à sua localização no envelope viral e superfície (membrana plasmática) da célula infectada. Desta forma, elas desenvolvem funções relevantes na patogênicidade do vírus à célula hospedeira, estando relacionadas com os mecanismos de entrada, dispersão (Baranowski *et al.*, 1996; Spear, 1993) e modulação da resposta imune do hospedeiro (Dubin *et al.*, 1991). Além disso, as propriedades imunogênicas atribuídas as glicoproteínas são importantes para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnósticos (Thiry *et al.*, 2007).

Geralmente, as glicoproteínas interagem entre si (Davis-Poynter *et al.*, 1994), formando homo - ou heterodímeros estáveis, tais como gH com gL e gE com gI (Johnson *et al.*, 1988; Hutchinson *et al.*, 1992; Tyborowska *et al.*, 2000). Alguns destes complexos são essenciais para a multiplicação viral e além de funcionar como receptores para imunoglobulinas (Scwyzer *et al.*, 1996; Khattar *et al.*, 1996). Outros se

ligam ao fator C3b do complemento, interferindo na modulação da resposta imune pelo hospedeiro (Bryant *et al.*, 2003).

A gC é a glicoproteína de maior divergência entre esses vírus, seguido da gB e gD (Thiry *et al.*, 2007). A gC mantém a eficiência da replicação viral no hospedeiro (Liang *et al.*, 1992), mediando a ligação a receptores presentes na superfície celular, tais como heparina (Okazaki *et al.*, 1991). A sequência de aminoácidos (aa) do segmento amino-terminal da gC é consideravelmente menor no BoHV-5 do que no BoHV-1 (Collins *et al.*, 1993; Chowdhury, 1995; Roehe *et al.*, 1997). Isso contribui para a ausência de dois sítios prováveis de glicosilação no BoHV-5 e para diferenças nas cargas das regiões amino-terminal de ambos os vírus. Essas diferenças podem influenciar nas propriedades biológicas do BoHV-5, incluindo a neuroinvasividade (Chowdhury, 1995).

A gB é uma das principais glicoproteínas do envelope viral e também é encontrada na membrana plasmática de células infectadas (van Drunen Littel-van Den Hurk *et al.*, 1984; Marshall *et al.*, 1986). Essa glicoproteína induz uma forte resposta por anticorpos neutralizantes (Babiuk *et al.*, 1987) e é reconhecida por linfócitos T CD4+ (Hutchings *et al.*, 1990; Leary & Splitter, 1990). Estudos preliminares identificaram importantes epítomos presentes na gB que estão envolvidos na indução de anticorpos neutralizantes (Fitzpatrick *et al.*, 1990). A gB, totalmente glicosilada (gBa), apresenta uma massa molecular de 130kDa e é parcialmente clivada por proteases celulares, gerando duas subunidades, a gBb (75kDa) e a gBc (55kDa) (Marshall *et al.*, 1986; Okazaki *et al.*, 1986; van Drunen Littel-van Den Hurk *et al.*, 1984, 1992). A clivagem da gB é necessária para a disseminação do vírus entre células (Kopp *et al.*, 1994; Keil *et al.*, 2005).

Quatro co-receptores para a glicoproteína D foram identificados (HveA, B, C, D e HigR) (Geraghty *et al.*, 1998; Montgomery *et al.*, 1996; Warner *et al.*, 1998). A interação da gD com receptores celulares resulta uma ligação estável (Karger & Mettenleiter, 1993; Spear, 1993) o que facilita a disseminação viral intercelular (Liang *et al.*, 1995). Desta forma, a gD confere uma conformação adequada para a ligação de outras glicoproteínas (Schroder *et al.*, 1997). Além disso, células expressando a gD resistem a infecção pelo vírus homólogo e heterólogo (HSV e PRV), um fenômeno conhecido como interferência. A interferência ocorre em nível de penetração nas células, sugerindo o uso de receptores em comum para a rota de entrada viral (Campadelli-Fiume *et al.*, 1988; Johnson & Spear, 1989). O mesmo não ocorre quando estas mesmas células são infectadas com BoHV-5, podendo-se inferir que BoHV-5

utilize receptores alternativos na infecção celular (Dasika & Letchworth, 2000). A gD do BoHV consegue induzir uma resposta imune no hospedeiro mais forte e consistente que a gB e a gC, resultando em redução significativa da replicação e excreção viral (van Drunen Littel-van Den Hurk *et al.*, 1993) Assim a gD é a glicoproteína de escolha para a produção de vacinas de subunidade. (Tikoo *et al.*, 1995).

A gE é uma glicoproteína transmembrana do tipo I presente em menor quantidade no envelope viral, em contraste com as glicoproteínas imunodominantes gB, gC e gD (Rebordosa *et al.*, 1994). A gE do BoHV-1 associa-se formando um heterodímero com a gI, logo após a sua síntese (Johnson *et al.*, 1988; Whitbeck *et al.*, 1996). Esse complexo gE/gI mostrou-se importante para a virulência e disseminação do vírus entre as células (Chowdury *et al.*, 2000). Em alguns herpesvírus, este complexo funciona como receptor Fc (FcR) específico para a imunoglobulina G (IgG) (Johnson *et al.*, 1988). Mutantes virais dos quais foram deletados os genes codificantes para gE e gI, apresentaram redução da virulência (Dingwell *et al.*, 1994; Dingwell *et al.*, 1995; Kaashoek *et al.*, 1995a; van Engelenburg *et al.*, 1995; Rebordosa *et al.*, 1996; Hübner *et al.*, 2005). Em cultivos celulares essas cepas defectivas apresentam como característica um fenótipo de formação de placas menores (Balan *et al.*, 1994; Whitbeck *et al.*, 1996). A glicoproteína US9 é uma proteína do tipo II bastante conservada nos herpesvírus neurotrópicos. Atua em conjunto a gE e gI promovendo uma eficiente infecção transneuronal anterógrada no sistema nervoso (Enquist *et al.*, 2002).

Tabela 1: Principais glicoproteínas de BoHV-1 e BoHV-5 (Esteves 2001, com modificações).

Glicoproteínas		
	Nomenclatura	Características
Região UL	gB	Altamente imunogênica, induz anticorpos neutralizantes, essencial para os processos de adsorção, penetração e difusão (Tikoo <i>et al.</i> , 1995; Schwyzer <i>et al.</i> , 1996).
	gC	Altamente imunogênica, não essencial à replicação viral, durante a adsorção liga-se a receptores de heparina. Relacionada a virulência (Hecht <i>et al.</i> , 1995; Tikoo <i>et al.</i> , 1995; Schwyzer <i>et al.</i> , 1996).
	gH	Essencial, conservada, atua no processo de entrada, difusão e saída do vírus (Schwyzer <i>et al.</i> , 1996).
	gK	Não essencial, participa da fusão do vírus à célula (Khadr <i>et al.</i> , 1996; Schwyzer <i>et al.</i> , 1996).
	gL	Não essencial, participa do transporte e da modelagem da gH (Khattar <i>et al.</i> , 1996; Schwyzer <i>et al.</i> , 1996).
	gM	Não essencial, participa do processo de difusão célula-célula (Schwyzer <i>et al.</i> , 1996; Wu <i>et al.</i> , 1998).
Região US	gD	Altamente imunogênica, induz anticorpos neutralizantes, não essencial (Schroder <i>et al.</i> , 1999), liga-se a receptores de manose (Schwyzer <i>et al.</i> , 1996), induz apoptose (Meyer <i>et al.</i> , 1998)
	gE	Não essencial, participa da difusão viral e, quando complexada a gI atua como receptore para a região Fc de IgG (Schwyzer <i>et al.</i> , 1996; Chowdhury <i>et al.</i> , 2000)
	gG	Não essencial (Schwyzer <i>et al.</i> , 1996), atua no processo de difusão célula a célula (Nakamichi <i>et al.</i> , 2000).
	gI	Não essencial, participa do processo de difusão e quando complexada a gE atua como receptor para a região Fc da IgG (Tikoo <i>et al.</i> , 1995; Schwyzer <i>et al.</i> , 1996; Chowdhury <i>et al.</i> , 2000).

2.4. Replicação Viral

O início da infecção pelo BoHV-1 e pelo BoHV-5 em células permissivas ocorre com a ligação de glicoproteínas virais aos receptores celulares (Tikoo *et al.* 1995). Existem pelo menos quatro classes de moléculas que compõem os receptores celulares,

porém acredita-se que a nectina-1 (membro da família das imunoglobulinas) é o receptor de maior participação no processo de adsorção viral (Geraghty *et al.*, 1998).

As principais glicoproteínas envolvidas no processo de adsorção viral são a gC e gB que se ligam com os receptores já reconhecidos de glucosaminoglicano sulfato de heparina (Li *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1998) seguidos da gD que interage com outros receptores de forma estável (Campadelli-Fiume *et al.*, 2000). Finalmente, ocorre a interação de outras glicoproteínas que atuam como coadjuvantes na adsorção, porém seus efeitos são essenciais para o processo de entrada viral (Klupp *et al.*, 1991)

A penetração do vírus requer a fusão do envelope viral com a membrana plasmática e depende da ação das gB, gD, gH e gL (Spear *et al.*, 2000). Após a fusão, o nucleocapsídeo é transportado ao núcleo através de microtúbulos celulares. No núcleo, os processos de transcrição iniciam de maneira temporalmente regulada por três classes de RNA mensageiro (mRNA) denominadas “immediate early” (IE ou α), “early” (E ou β) e “late” (L ou γ) que são transcritas pela RNA polimerase II (RNAPol II) celular (Fenner *et al.*, 1993; Tikoo *et al.*, 1995; Roizman, 1996).

O estágio IE é mediado pela ação do fator α -transindutor (α -TIF), que é uma proteína estrutural presente no tegumento e responsável pela transcrição dos genes IE juntamente com os fatores de transcrição celular (Oct-2) (Misra *et al.*, 1995). As proteínas IE (BICP0, BICP4, BICP22, BICP 27 e BICP 47), funcionam induzindo a transcrição de genes E, traduzindo-os em proteínas tais como timidina quinase e DNA polimerase (Fenner *et al.* 1992, Tikoo *et al.* 1995, Jones, 2003). As proteínas E são predominantemente envolvidas na replicação do DNA viral e na indução de síntese de proteínas L, tais como gB, gD e gC, as quais são expressas tardiamente na infecção (Roizman, 1996).

A replicação do genoma e a montagem do nucleocapsídeo ocorrem no núcleo das células infectadas. Os ciclos de replicação do DNA viral iniciam com a desnaturação do material genético pela proteína UL9. Helicases e outras proteínas que se ligam ao DNA de fita simples, associam-se ao complexo DNAPolimerase para a síntese de DNA. Uma vez que o crescimento da nova fita progride, a estrutura circular da replicação é cortada para formar um intermediário de um círculo rolante. As fitas de DNA são “encapsidadas” pela interação de proteínas de clivagem/empacotamento com sinais específicos de empacotamento (seqüências "a") no fim dos genomas virais (Wagner, 2007).

O capsídeo contendo o material genético migra através da membrana nuclear para tornar-se envelopado. As glicoproteínas virais são traduzidas no retículo endoplasmático rugoso e então transportadas para o complexo de Golgi em vesículas para continuar o processo de glicosilação. As glicoproteínas são transportadas então nas vesículas até a membrana nuclear ou plasmática. O capsídeo viral associa-se com as membranas modificadas pelo vírus, podendo envolver a interação com as proteínas da matriz, codificadas pelo vírus. A liberação final do virion envelopado da célula envolve o vírus sendo incorporado em vesículas exocíticas sendo a seguir liberado da célula como vírus infeccioso livre.

2.5. Latência

Uma importante característica biológica dos vírus da subfamília Alphaherpesvirinae é o estabelecimento de latência. Nessa situação, os animais infectados tornam-se portadores inaparentes, com episódios esporádicos de reexcreção viral e potenciais transmissores do vírus. Essa característica determina a perpetuação e disseminação da infecção pelo BoHV no rebanho (Pastoret *et al.*, 1982).

A infecção latente ocorre nos neurônios sensoriais, geralmente nos gânglios trigêmeo ou sacral, dependendo do local da primo-infecção (Jones 2003). O processo ocorre com o transporte do vírus através dos microtubulos dos axônios até o corpo do neurônio (Thiry *et al.*, 2007), onde os genomas virais associam-se com histonas do hospedeiro e persistem como mini-cromossomas (Mettenleiter *et al.*, 2006).

Evidências mostram que o BoHV-1, BoHV-5 e outros alfaherpesvírus também estabelecem latência em outros locais como os centros germinativos das tonsilas faríngeas (Winkler *et al.*, 2000). Além disso, BoHV-1 tem sido encontrado em linfócitos T CD4+ e em células mononucleares periféricas do sangue (Winkler *et al.*, 2000; Lovato *et al.*, 2000).

Após a entrada do vírus nas células, a expressão de genes virais é extinta, com exceção do gene que codifica a transcriptase associada à latência (LAT) (Jones 2003). Tikoo *et al.* (1995) demonstraram que o mecanismo da latência ocorre devido a um conjunto de fatores: o primeiro sugere que o mRNA do LAT controla a expressão dos genes IE. Outro fator é a de que o mesmo mRNA codifica uma proteína regulatória de transcrição. Os mesmos autores sugerem a hipótese de existirem mecanismos específicos das células nervosas que interferem de maneira negativa sobre fatores de transcrição. A manutenção da latência é definida como um período em que as partículas

virais infecciosas não são detectadas por procedimentos padrões de isolamento viral (Barbosa, 2004).

Animais latentemente infectados servem de reservatório natural para o vírus durante toda a vida (Devireddy & Jones, 1998). Fatores externos como estresse (ex.: transporte, introdução do animal em um novo rebanho, precárias condições de manejo, ocorrência de infecções ou infestações respiratórias) ou tratamento com corticoídes podem reativar o vírus latente, ocorrendo a síntese de novas partículas virais infecciosas e restabelecendo novamente o ciclo lítico e disseminação viral (Rock, 1994; Van Oirschot, 1995).

2.6. Transmissão

A transmissão do BoHV-1 e BoHV-5 pode ocorrer de forma direta através de aerossóis e contato com secreções (respiratórias, oculares, genitais) de animais infectados (Wyler *et al.*, 1989; Mars *et al.*, 2000) e de forma indireta através de fômites, inseminação artificial e transferência de embriões (van Oirschot *et al.*, 1993; Wyler *et al.*, 1989; Bielanski & Dubuc, 1994).

O vírus penetra no animal principalmente pelas mucosas oro-nasal, genital e ocular. Nas células epiteliais dessas regiões ocorrem a replicação e posteriormente a disseminação célula a célula do BoHV, causando lise destas e produzindo infecção localizada. A infecção sistêmica acontece quando partículas virais invadem linfonodos e vasos linfáticos seguido de uma viremia associada a linfócitos e disseminação pelo organismo (Engels & Ackermann 1996).

O período de incubação varia entre 2 e 6 dias, dependendo da dose e rota de inoculação (Kahrs, 1977). Disseminação viral em secreções nasais foi encontrada num período entre 12 e 18 dias, embora haja relatos de isolamento viral intermitente num período de até 578 dias (Studert, 1989).

Conseqüente a uma pronunciada resposta imune, esta infecção é geralmente auto-limitada ocorrendo a recuperação em uma ou duas semanas. As lesões locais podem facilitar infecções secundárias gerando outros quadros clínicos como pneumonias, enterites, mastites, metrites, dermatites e tonsilites (Blood *et al.*, 1988).

2.7. Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

O BoHV-1 é um importante agente infeccioso de bovinos, que causa perdas significativas na pecuária (Hage *et al.* 1996). Este vírus pode ser dividido em dois

subtipos, BoHV-1.1 e BoHV-1.2, e este último em 2a e 2b, através de análises de restrição enzimática e de reações antigênicas frente a anticorpos monoclonais (Engels *et al.*, 1986, Rijsewijk *et al.*, 1999; D'Arce *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002). As afecções causadas pelo BoHV-1 e seus subtipos estão geralmente relacionadas com problemas de ordem respiratória e reprodutiva.

O BoHV-1 possui distribuição mundial e, tanto bovinos quanto outras espécies animais (suínos, ovinos, caprinos e búfalos, além de espécies selvagens como cervos) apresentam anticorpos reagentes contra BoHV-1 (Teixeira 1998, Straub 2001).

No Brasil, grande parte das propriedades apresentam animais sorologicamente positivos para o BoHV-1 (Ravazzolo *et al.*, 1989; Lovato *et al.*, 1995; Vidor *et al.*, 1995). Estima-se que pelo menos 30 % do rebanho nacional esteja infectado com este vírus, isso equivaleria a cerca de 50 milhões de bovinos infectados, para um rebanho próximo a 170 milhões de cabeças. Em alguns países da Europa, a infecção já se encontra erradicada ou em vias de erradicação (Ackermann & Engels, 2006).

2.7.1. Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR)

A infecção de animais por BoHV-1.1 e BoHV-1.2a pode desencadear alterações associadas a problemas respiratórios (IBR) e a problemas reprodutivos como abortos e reabsorção embrionária (Edwards *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1991; Spilki, 2001). A IBR apresenta-se de forma aguda e possui como sinais clínicos febre (40,5 - 42°C), anorexia, dispnéia, tosse, corrimento nasal seroso ou sero-hemorrágico e, posteriormente purulento, hiperemia, pústulas e erosões da mucosa nasal (Kaashoek *et al.*, 1996). À auscultação pulmonar nota-se aumento do murmúrio vesicular, em consequência da obstrução parcial das vias respiratórias altas. Em alguns casos podem ser observadas conjuntivite, sialorréia e ulcerações na mucosa oral (Fenner *et al.*, 1992; Riet-Correa *et al.*, 1996).

O aborto pode ocorrer quando a vaca prenhe é infectada com amostras virais de alta virulência, principalmente entre o 5º e o 8º mês de gestação e após um período de incubação de 3 a 6 semanas (Wyler *et al.*, 1989). A doença geralmente é mais grave em bovinos confinados do que em bovinos de leite ou de corte mantidos a campo por estarem os primeiros em condições de estresse (Riet-Correa *et al.* 1996).

Na forma respiratória, o índice de morbidade pode chegar a 100 %, a mortalidade, embora incomum, pode chegar a 10% podendo aumentar quando o quadro é complicado com infecções bacterianas secundárias ou infecções víricas superpostas

(Kahrs 1981). A manifestação clínica reprodutiva é uma das principais causas de perdas econômicas (Wyler *et al.*, 1989).

2.7.2. Vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite pustular infecciosa (IBP)

As infecções genitais estão associadas principalmente com o BoHV-1.2b. Nas fêmeas, a IPV caracteriza-se por hiperemia e edema da mucosa vulvovaginal com disseminação de pequenas pústulas que evoluem formando úlceras. O animal pode apresentar descarga vaginal mucopurulenta, causada por infecção bacteriana secundária (Wyler *et al.*, 1989).

Nos machos, a sintomatologia clínica da IBP inclui lesões localizadas nas mucosas do pênis e no prepúcio. A infecção em touros é de extrema importância para a inseminação artificial, já que o vírus é eliminado pelo sêmen e, desta forma, pode ser transmitido para fêmeas susceptíveis (Miller 1991, Fenner *et al.* 1992, Riet-Correa *et al.* 1996, Rocha *et al.* 1999, Puente 2003).

Na ausência de infecções secundárias, a fase aguda da IPB e IBP tem um curso clínico de quatro a sete dias. Muitos casos são subclínicos ou inaparentes e podem passar despercebidos, dificultando o controle da infecção (Riet-Correa *et al.* 1996, Rocha *et al.* 1999, Puente 2003).

Apesar do subtipo 1.2b do BoHV-1 estar relacionado a uma manifestação clínica genital, estudos demonstram que a inoculação experimental de isolados genitais ocasionaram infecções respiratórias (Spilki *et al.*, 2004), sugerindo que as infecções estão mais relacionadas as vias de infecção e ao manejo do que a características inerentes aos subtipos do BoHV-1. O BoHV-1 também já foi detectado no encéfalo de bovinos, com ou sem doença neurológica, sugerindo que o mesmo possa estar associado com doença neurológica (D'Offay *et al.*, 1995; Roels *et al.*, 2000; Penny *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2007).

2.8. Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)

O BoHV-5 é o agente etiológico da encefalite herpética bovina (Roizman & Pellett, 2001), causando infecções caracterizadas por meningocefalites fatais em bovinos de até 8 meses e, ocasionalmente, em animais até dois anos de idade (French, 1962; Bulach & Studert, 1990).

Este vírus apresenta uma distribuição geográfica restrita, sendo mais freqüentemente detectado no hemisfério sul do que no hemisfério norte (D'Arce *et al.*, 2002). Já foi relatado em países como Austrália (Gardiner & Nairn, 1964; Johoston *et al.*, 1962), Hungria (Bartha *et al.*, 1969), Canadá (Gough & James, 1975), Estados Unidos (Barentus *et al.*, 1963; Reed *et al.*, 1973; Eugster *et al.*, 1974), Itália (Ros & Belák, 1999) e Argentina (Carrilo *et al.*, 1983). No Brasil, existem dados de isolamento deste vírus desde 1989 (Weiblen *et al.*, 1989; Riet-Correa *et al.*, 1989; Salvador *et al.*, 1998).

Amostras de BoHV-5 eram no passado consideradas “variantes encefalitogênicas” de BoHV-1, sendo chamadas de BoHV-1.3, baseado nas amplas reações cruzadas entre estes dois vírus encontradas em testes sorológicos (Bratanich *et al.*, 1991, Teixeira *et al.*, 1998) e no efeito citopático em cultivo de células (Friedly & Metzler, 1987). Atualmente o BoHV-5 é reconhecido como um agente distinto do BoHV-1 (Roizamann, 1992). A principal diferença está relacionada à neuroinvasividade e neurovirulência (Bagust & Clark, 1972; Belknap *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 2001). De acordo com perfis eletroforéticos de clivagens utilizando enzimas de restrição e frente à reação com anticorpos monoclonais o BoHV-5 subdividi-se em BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5 não a/não b (D'Arce *et al.*, 2002).

Em testes de diagnóstico convencionais, a resposta induzida por uma amostra de BoHV-5 não é claramente diferenciado daquela induzida pelo BoHV-1 (Teixeira *et al.*, 1998). Devido a essa grande semelhança antigênica e genômica (Engels *et al.*, 1986; Delhon *et al.*, 2003) e ao fato de que a vacinação contra o BoHV-1 pode mascarar as infecções causadas pelo BoHV-5 (Cascio *et al.*, 1999) é que a real prevalência do BoHV-5 continua desconhecida (Roehe *et al.*, 1997).

Embora a infecção pelo BoHV-5 já tenha sido relatada em países do hemisfério norte, a diferenciação entre as duas infecções permanece um problema essencialmente sul-americano. No Brasil, os estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul apresentam grande incidência dessa doença, demonstrando baixa morbidade e taxas de mortalidade próximas a 100 %, afetando animais de 6 a 60 meses (Salvador *et al.*, 1998; Roel *et al.*, 2000; Colodel *et al.*, 2000). Sanches *et al.* (2000) consideram o BoHV-5 como sendo a segunda maior causa de doenças víricas do sistema nervoso central, superado apenas pelo vírus rábico.

2.8.1. Encefalite

O BoHV-5 chega ao sistema nervoso central através das terminações nervosas do nervo trigêmeo (ramos maxilar e mandibular) (Hall *et al.*, 1966; Wyler *et al.*, 1989, Meyer *et al.* 2001), do nervo olfatório (Meyer *et al.* 2001) e das meninges (Furuoka *et al.*, 1995). Os sinais clínicos que caracterizam a infecção do SNC por esse vírus consistem em depressão, anorexia, incoordenação, hipersalivação, ataxia, tremor muscular, cegueira, ranger de dentes e, eventualmente, morte (Wyler *et al.*, 1989; Meyer *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2002, Colodel *et al.*, 2002).

Análises histopatológicas no sistema nervoso central descrevem meningoencefalites não supurativa, com infiltrados de células mononucleares no parênquima cerebral e meninges, necrose neuronal, gliose focal e difusa, hemorragias, ruptura de neuropila, neurofagia e satelitose (Hubner, 2004).

A infecção pelo BoHV-5 também foi relacionado a abortos (Heinlen *et al.* 1993; Ely *et al.* 1996) assim como infecções por BoHV-1 parecem estar envolvidas com encefalites (D'Offay *et al.*, 1993) uma vez que o sistema nervoso central (SNC) possui receptores para todas as variantes de BoHV, incluindo os tipos 1 e 5. Além disso, a inoculação experimental do BoHV-5 em bezerros resulta em doença respiratória (Belknap *et al.* 1994, Vogel *et al.* 2004).

2.9. Resposta Imune

2.9.1. Resposta imune inata

Durante a infecção primária a síntese de proteínas virais induz uma série de eventos que estimulam a imunidade inespecífica do hospedeiro (Babiuck *et al.*, 1996). A resposta imune inespecífica consiste na primeira tentativa de defesa do hospedeiro, tendo como objetivo eliminar ou amenizar a infecção viral. Nesta fase ocorre a produção e liberação de interferon que age modulando o transporte de leucócitos e de outras células efetoras como as células mononucleares periféricas (PMNCs), macrófagos, células *natural killers* (NK) ao local da infecção (Bielefeldt Ohman *et al.*, 1991).

Citocinas inflamatórias produzidas nas fases iniciais da infecção são responsáveis pelo aumento da expressão das moléculas de adesão (seletina P e ICAM-I - moléculas de aderência intracelular tipo I), facilitando a passagem de leucócitos e das células efetoras do vaso sanguíneo para o sitio da infecção. Neste local, neutrófilos e macrófagos liberam óxido nítrico (NO), metabólitos do ácido aracídônico e enzimas para

eliminar partículas virais e células infectadas (Campos *et al.*, 1986; Campos *et al.*, 1989; Shappell *et al.*, 1989; Machado *et al.*, 2004).

Outras citocinas, como a interleucina 2 (IL-2), possuem participação importante na fase inicial. A IL-2 induz a produção de INF- γ , que por sua vez estimula as células NK e macrófagos a eliminar células infectadas (Campos *et al.*, 1989; Jensen & Schultz, 1990). A IL-2 também participa da diferenciação de células T auxiliares 0 (Th0) em células T auxiliares 1 (Th1), influenciando no desenvolvimento de resposta imune específica (Muylkens *et al.*, 2006).

2.9.2. Resposta imune adaptativa humoral

A resposta imune específica é também ativada na infecção primária, sendo a resposta imune humoral detectada a partir do 7º dia pi (pós-inoculação), persistindo por vários anos (Wyler *et al.*, 1989; Babiuk *et al.*, 1996; Spilki *et al.*, 2001). A produção de anticorpos contra o BoHV parece ter menos importância na fase inicial da infecção, pois o pico ocorre quando o hospedeiro já se encontra em recuperação.

Os anticorpos detectados são as imunoglobulinas M (IgM), IgG e IgA. A IgM e a IgG atingem os maiores níveis séricos a partir do 14º dia pi, porém, após esse período, as taxas de IgM são rapidamente reduzidas enquanto que as taxas de IgG declinam mais lentamente (Madick *et al.*, 1995). A atividade neutralizante da IgA é detectada em secreções nasais e genitais principalmente entre os dias 4-30 pi (Wyler *et al.*, 1989; Spilki *et al.*, 2001). Animais recém-nascidos adquirem anticorpos principalmente após a ingestão do colostro que podem apenas amenizar a agressividade da doença e não impedir a infecção.

O papel da resposta humoral é questionável, na infecção primária, eles parecem não participar da disseminação viral célula a célula, uma vez que o vírus apresenta mecanismos de escape e persiste mesmo na presença de anticorpos neutralizantes (Wyle *et al.*, 1989; Babiuk *et al.*, 1996). Porém, numa infecção secundária ou numa reativação viral, a imunidade humoral auxilia prevenindo a infecção, pois os anticorpos exercem maior atividade nas partículas virais extracelulares (Babiuk *et al.*, 1996). Alternativamente, os anticorpos podem ser adjuvantes no mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, ao se ligarem às células infectadas, permitindo a ação de células NK (Machado *et al.*, 2004).

Anticorpos neutralizantes permanecem circulantes por vários anos após o primeiro contágio (Mechor *et al.*, 1987; Van der Poel *et al.*, 1995; Kaashoek *et al.*,

1996c). No caso de uma reativação viral, os níveis de anticorpos podem ou não sofrer alterações (Madic *et al.*, 1995).

2.9.3. Resposta imune adaptativa celular

A resposta imune mediada por células é detectada entre os 7-10 dias pós-infecção, com a ativação de linfócitos T (LT). Os LT vão exercer citotoxicidade pelo reconhecimento de epítopos virais, como os epítopos das glicoproteínas gB, gC, gD, gE, gI e gG, associados à moléculas de MHC na superfície das células infectadas, causando lise destas (Denis *et al.*, 1993; Denis *et al.*, 1996; Babiuk *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 2004). Linfócitos T CD8⁺ reconhecem epítopos virais associados a proteínas de MHC-I e linfócitos T CD4⁺ à epítopos associados à MHC-II. Os linfócitos CD4⁺ também contribuem com as células B na produção de anticorpos (Wang & Slitter, 1998; Machado *et al.*, 2004).

Linfócitos sensibilizados agem em conjunto a interleucinas, linfotoxinas, fator quimiotático e prostaglandinas para eliminação do vírus intracelular, ao qual os anticorpos não têm acesso.

2.10. Diagnóstico

2.10.1. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da infecção pelo BoHV-1 e BoHV-5 não deve ser baseado apenas em sinais clínicos, pois estes são sugestivos, mas não patognomônicos, devendo então ser o mesmo confirmado por exames laboratoriais. Um diagnóstico completo em nível laboratorial deve ser baseado no isolamento do vírus em cultivo celular ou, ainda, através de métodos moleculares e identificação de componentes virais ou de anticorpos específicos para o BoHV (Van Donkersgoed & Babiuk 1991; Roehe *et al.*, 1997; OIE 2002).

O isolamento viral em cultivo celular é um dos métodos mais utilizados para a identificação do agente (Halfen & Vidor 1998, Flores 1999, Schynts *et al.* 1999). Nos casos de IBR, IPB ou IPV, os espécimes clínicos geralmente utilizados são esfregaços de secreções nasais, oculares, genitais e sêmen (Rocha *et al.* 1999), além de material de fetos abortados (como órgãos e/ou os cotilédones placentários) (Flores 1999, OIE 2002). Em casos de encefalites, fragmentos do cérebro são utilizados (Roehe *et al.*, 1997).

O vírus se multiplica bem em uma grande variedade de células como as de rim, pulmão e testículo de bovino, células derivadas de pulmão fetal, traquéia ou ainda em

linhagens estabelecidas como a Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) (Madin *et al.*, 1956; McKercher, 1963; Baugust & Clark, 1972).

In vitro, a infecção por BoHV causa efeito citopático característico, isto é, ruptura do tapete celular com células arredondadas e agrupadas, formando placas virais entre 2 a 4 dias pi. Para confirmação do agente viral, outras técnicas podem ser empregadas, tais como as que seram descritas a seguir.

2.10.1.2. Diagnóstico Sorológico

a) Soroneutralização (SN)

A técnica de SN é bastante utilizada, sendo considerada a técnica padrão para o diagnóstico sorológico dos herpesvirus (Teixeira *et al.*, 1998; OIE, 2002). A SN consiste na neutralização da partícula viral pelos anticorpos presentes no soro do animal infectado (House & Baker, 1971 Bitsch, 1978; Del Fava *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2003). É uma técnica trabalhosa e que depende da existência de um estoque de vírus e de cultivos celulares adequados, além disso, o resultado é obtido em 3 a 5 dias (Bitsch *et al.*, 1978).

O teste de SN não permite a diferenciação precisa de animais infectados com BoHV-1 ou BoHV-5. Cerca de 92% dos animais infectados com BoHV-1 e BoHV-5 apresentam reações cruzadas à SN (Teixeira *et al.*, 1998).

b) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

O ELISA é uma técnica que vem substituindo provas sorológicas como a SN (Collins *et al.*, 1985). É uma técnica rápida e permite o processamento de um grande número de amostras. É uma técnica onde os reagentes possuem um custo mais baixo quando comparados a SN e que os anticorpos podem ser quantificados através do uso de espectrofotômetro (Hilderbrand, 1979; Botton *et al.*, 1981).

Os testes de ELISA, disponíveis até o presente, também detectam reações cruzadas entre o BoHV-1 e 5 (Teixeira *et al.*, 1998; Esteves *et al.*, 1999). Entretanto, Spilki *et al.* (2005) desenvolveram um ELISA associado a anticorpos monoclonais e que permitiu a distinção entre os subtipos de BoHV-1.1 e BoHV-1.2, baseado em diferenças na gC.

Wellenberg *et al.* (2001) relataram a existência de um ELISA que diferencia a resposta imunológica do BoHV-1 e do BoHV-5 através da detecção de anticorpos contra a gE, porém só foram analisadas seis amostras e o estudo não teve validação

estatística. Contudo, é de extrema importância o desenvolvimento de provas sorológicas que sejam capazes de diferenciar a resposta imunológica entre tipos BoHV-1 e BoHV-5, a fim de obter-se um melhor conhecimento da prevalência destas infecções nos rebanhos bovinos.

Atualmente, o uso de vacinas diferenciais, largamente utilizadas em países europeus (Kaashoek *et al.*, 1994; Stegeman *et al.*, 1994; Kaashoek *et al.*, 1995b; Van Oirschot *et al.*, 1996; Strube *et al.*, 1996; Van Oirschot *et al.*, 1997), tem permitido a diferenciação da resposta imunológica de animais vacinados, imunizados com cepa viral mutante, da resposta imunológica dos animais infectados com o vírus selvagem (Van Oirschot *et al.*, 1997; Van Oirschot *et al.*, 1999). Juntamente com estas vacinas, o desenvolvimento de testes sorológicos diferenciais tem permitido um maior controle das infecções e a implementação de programas de erradicação da doença (Kit *et al.*, 1992). Estes testes, principalmente do tipo ELISA de competição ou de bloqueio, baseiam-se no uso de anticorpos monoclonais dirigidos contra domínios antigênicos da glicoproteína viral cujo gene codificante foi deletado da amostra vacinal (Van Oirschot *et al.*, 1997; Van Oirschot *et al.*, 1999; Lehman *et al.*, 2002; Beer *et al.*, 2003).

Testes deste tipo são importantes para uma melhor compreensão da infecção pelo BoHV a campo, auxiliando no controle das infecções e na implementação de programas de erradicação e controle das infecções, uma vez que permitem a diferenciação antigênica. (Kit *et al.*, 1992).

c) Imunoperoxidase (IPX)

A técnica de IPX também é bastante empregada na detecção de isolados virais bem como na análise sorológica de animais suspeitos da infecção (Dereget & Prins, 1998; Wellenberg *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2002; Keuser *et al.*, 2004). Essa técnica tem como princípio geral a detecção da reação antígeno-anticorpo (poli ou monoclonal) por um segundo anticorpo marcado com a peroxidase (conjugado), que, ao reagir com a água oxigenada, produz uma coloração (Teixeira, 1998; OIE, 2002).

A IPX tem-se mostrado ser tão ou mais específica na detecção de antígenos virais que alguns testes sorológicos, principalmente quando se utiliza anticorpos monoclonais. Estudos relatam que o desenvolvimento de uma IPX associada a anticorpos monoclonais permite a caracterização de diferentes amostras de BoHV (Wellenberg *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2002; D'Arce *et al.*, 2002), dentre elas, a diferenciação entre amostras de BoHV-1 e 5 (Roehe *et al.*, 1997; Roehe *et al.*, 2002).

2.11. Anticorpos

Anticorpos são proteínas pertencentes à classe das imunoglobulinas, produzidas pelo sistema imune como parte da resposta humoral frente a infecções. As células responsáveis pela produção e secreção de anticorpos são os linfócitos B (Alberts *et al.*, 1997). Cada linfócito B produz um tipo de anticorpo que reconhece um único tipo de sítio antigênico (epítipo), esse anticorpo específico para apenas um epítipo é denominado anticorpo monoclonal.

Em 1975, George Köhler e Cesar Milstein introduziram o primeiro método de produzir anticorpos monoclonais *in vitro*. A produção destes consiste na imunização de camundongos com um determinado antígeno. Ainda no animal, ocorre a proliferação de células B secretoras de anticorpos específicos para aquele antígeno. O animal é sacrificado e o baço é removido, os esplenócitos são individualizados e fusionados com células de mieloma imortais, dando origem às células híbridas ou hibridomas. O hibridoma secretor de anticorpo específico contra o epítipo do antígeno é então selecionado com meio de cultura e expandido como clone individual. A vantagem dos hibridomas é que eles são capazes de multiplicar-se em cultivos celulares, diminuindo a utilização de animais e, podendo, assim, secretar anticorpos por tempo indeterminado (Harlow & Lane, 1988).

A utilização de anticorpos monoclonais tem sido uma alternativa empregada em várias áreas da saúde, sendo sua aplicação cada vez mais comum e essencial em técnicas de diagnósticos e na pesquisa. A manipulação de anticorpos permite a sua utilização em inúmeros processos como isolamento de um antígeno específico, determinação da correta concentração do antígeno no organismo do hospedeiro e identificação de outras macromoléculas que possam estar relacionadas na interação do antígeno-anticorpo.

2.11.1 Anticorpos Monoclonais (AcM) e o BoHV

A utilização de AcMs nos estudos com BoHV aprimorou os conhecimentos sobre a biologia do vírus, incluindo uma melhor caracterização de sua composição protéica e também na avaliação da variabilidade antigênica do BoHV-1 e BoHV-5, sendo empregados na classificação e diferenciação de isolados do vírus (Meyer *et al.*, 1999; Roehe *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2002; D'Arce *et al.*, 2002; Oldoni *et al.*, 2004).

Estudos mostram que a determinação de padrões de reatividade das amostras de vírus frente aos AcMs permitiu a diferenciação entre os tipos de BoHV (BoHV-1 e

BoHV-5), além da diferenciação de seus subtipos BoHV-1.1, BoHV-1.2 (BoHV-1.2a e BoHV-1.2b), BoHV-5a e BoHV-5b (Roehe *et al.*, 1997; Alfieri, 2000; Souza *et al.*, 2002; OIE 2002, D'Arce *et al.*, 2002). A produção de um AcM reagente contra a região amino-terminal da glicoproteína C do BoHV-1.1 e não do BoHV-1.2, permitiu também o desenvolvimento e padronização de um ELISA capaz de diferenciar as respostas sorológicas entre os subtipos BoHV-1.1 e BoHV-1.2 (Spilki *et al.*, 2005). Porém, ainda existe uma grande necessidade de se desenvolver outros testes sorológicos de rotina capazes de diferenciar os tipos e subtipos de BoHV, uma vez que há uma extensa reatividade cruzada entre amostras (D'Arce *et al.*, 2002).

Anticorpos monoclonais podem ser aplicados também na identificação de epítomos para o isolamento de proteínas virais tais como a gB, gC e gD que são os principais imunógenos reconhecidos por anticorpos presentes no soro de animais infectados (van Drunen Littel-van den Hurk & Babiuk, 1986). A produção e utilização de AcM a partir de vírus com deleções genéticas são importantes para o entendimento tanto de proteínas que possuem maior representação imunogênica quanto para aquelas que possuem um papel ainda não muito claro. A imunização de camundongos com antígenos de uma cepa defectiva na glicoproteína C (gC) permitiu a obtenção de AcMs contra outras proteínas virais, estes AcMs podem ser úteis para o mapeamento de epítomos neutralizantes nestas outras glicoproteínas que não a gC (Winkelmann *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi analisar 45 isolados de BoHV frente a 36 anticorpos monoclonais, procurando determinar características antigênicas entre as amostras virais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Células:

As células utilizadas foram as da linhagem *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK), cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (EMEM - GIBCO[®]) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB-Soraly[®]) e 0,001% de enrofloxacin (Baytril 5%, Bayer[®]), sendo multiplicadas seguindo Freshney (1992) com uma taxa de divisão de 1:4 a 1:6.

4.2. Amostras Virais:

As amostras virais utilizadas no presente estudo foram gentilmente cedidas por laboratórios nacionais e internacionais (Tabela 2), sendo mantidas nos estoques da FEPAGRO Saúde Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF).

Tabela 2: Amostras virais utilizadas no estudo e provável tipo (determinado com base no quadro clínico do animal de qual a amostra foi isolada)

	Vírus	Classificação proposta	Sinais clínicos no animal de origem	Referência/fonte
1	LA INTA	BoHV 1.1	Encefalite	Madin <i>et al.</i> (1956)
2	LAM	BoHV 1.1	Rinotraqueite	Van Engelenburg <i>et al.</i> (1994)
3	LAM gE-	BoHV 1.1	Amostra recombinante ^c	Franco 2002
4	LAM US9-	BoHV 1.1	Amostra recombinante ^f	Franco 2002
5	EVI 14/94	BoHV 1.1	Rinotraqueite	Souza <i>et al.</i> (2002)
6	SV 56/90	BoHV 1.1	Rinotraqueite	Heinlein <i>et al.</i> (1993)
7	COOPER	BoHV 1.1	Rinotraqueite	Madin <i>et al.</i> (1956)
8	EVI 123/98	BoHV 1.1	Rinotraqueite	Souza <i>et al.</i> (2002)
9	T3	BoHV 1.1	Rinotraqueite	FVURU ^b
10	UY 2002/06	BoHV 1.2	Rinotraqueite	FVURU
11	UY 2004/02	BoHV 1.2	Bálanopostite	FVURU
12	SV 265/96	BoHV 1.2	Rinotraqueite	UFSM ^c
13	SV 265/96 gE-	BoHV 1.2	Amostra recombinante ^g	Franco <i>et al.</i> , 2002
14	SV 453/93	BoHV 1.2	Vulvovaginite	Canabarro <i>et al.</i> (1993)
15	PG 1779/03	BoHV 1.2	Aborto	IPVDF ^a
16	Retiro	BoHV 1.2	Vulvovaginite	Roehe <i>et al.</i> (2002).
17	IOWA	BoHV 1	Rinotraqueite	Madin <i>et al.</i> (1956)
18	SV 299/03	BoHV 1	Rinotraqueite	UFSM
19	299/03 mss	BoHV 1	Rinotraqueite	UFSM

20	SV 1613/93	BoHV 1	Rinotraqueite	UFSM
21	SV 57/90	BoHV-1	Rinotraqueite	UFSM
22	SV 55/02	BoHV-1	Rinotraqueite	UFSM
23	SV 609/03	BoHV 1	Rinotraqueite	UFSM
24	EVI 88/95	BoHV 5.a	Encefalite	Souza <i>et al.</i> (2002)
25	EVI 88/95 TD	BoHV 5.a	Amostra recombinante ^h	Franco <i>et al.</i> , 2002
26	V175	BoHV 5.a	Sêmen	Esmeraldino <i>et al.</i> (1996)
27	A663	BoHV 5.b	Encefalite	Carrillo <i>et al.</i> (1983)
28	ISO94/232	BoHV 5.c	Encefalite	Souza <i>et al.</i> (2002)
29	ISO95/97	BoHV 5.c	Encefalite	Souza <i>et al.</i> (2002)
30	ISO 87/97	BoHV 5.c	Encefalite	Souza <i>et al.</i> (2002)
31	SV 507	BoHV 5	Encefalite	Delhon <i>et al.</i> (2003)
32	N569	BoHV 5	Encefalite	Brake and Studdert (1985)
33	EVI 99	BoHV 5	Encefalite	Souza <i>et al.</i> (2002)
34	SV 198/05	BoHV 5	Encefalite	UFSM
35	EVI 340/96	BoHV 5	Encefalite	Caron <i>et al.</i> (2001)
36	RP	BoHV 5	Encefalite	Souza <i>et al.</i> (2002)
37	SV136/88	BoHV 5	Encefalite	Souza <i>et al.</i> (2002)
38	T2	BoHV 5	Encefalite	FVURU
39	P160/96	BoHV 5	Encefalite	Souza <i>et al.</i> (2002)
40	AA 05	BoHV 5	Encefalite	Souza <i>et al.</i> (2002)
41	AA 01	BoHV 5	Encefalite	UEL ^d
42	RIM	BoHV-5	Encefalite	IPVDF
43	T1	BoHV-5	Encefalite	FVURU
44	EVI 130	BoHV-5	Encefalite	IPVDF
45	T4	BoHV-5	Encefalite	FVURU
46	EVI 192/03	PRV		IPVDF

a: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor.

b: Universidad de la República, Uruguay

c : Universidade Federal de Santa Maria

d: Universidade Estadual de Londrina

e: Amostra LAM, cujo gene codificante para a glicoproteína E foi deletado

f: Amostra LAM, cujo gene codificante para a proteína US9 foi deletado

g: Amostra SV 265/96, cujo gene para a glicoproteína E foi deletado

f: Amostra EVI 88/95, cujo genes para as glicoproteínas E, I e para a proteína US9 foram deletados.

4.3. Multiplicação das amostras virais

Células MDBK foram mantidas em garrafas de 25 cm². Uma vez formada a monocamada confluenta, num período de 24 horas após o repique, o meio foi removido, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) e inoculadas com 500 µL de uma suspensão vírica com títulos entre 10^{6,5} e 10⁷ doses infectantes para 50 % cultivos celulares (DICC₅₀). As garrafas foram incubadas por 1

hora a 37°C para a adsorção viral. Após, o inóculo era removido e 10 mL de EMEM sem SFB adicionado. As garrafas eram então incubadas a 37°C até que 90% do tapete celular apresentassem efeito citopático (ECP). A seguir, as mesmas eram congeladas a -70°C e descongeladas, repetindo-se este processo três vezes. As suspensões obtidas eram clarificadas por centrifugação a 1000 X g, o sobrenadante coletado e distribuído em criotubos em volumes de 500 µL e armazenado a -70°C.

4.4. Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais (AcMs) utilizados foram preparados em nosso laboratório em estudo prévio (Oliveira, 2006). Os 36 AcMs foram obtidos pela imunização de camundongos BALB-C com as amostras EVI 123/98 de BoHV-1 e EVI 88/95 de BoHV-5 (Oliveira, 2006) seguindo a técnica descrita por Harlow & Lane (1988).

4.5. Isotipagem dos AcMs

Para a isotipagem dos anticorpos monoclonais foi utilizado um "kit" de ensaio imunoenzimático comercial (Sigma ISO-2®). O teste utilizado, do tipo ELISA de captura, foi executado de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6. Teste de imunoperoxidase em monocamada (IPX)

As amostras de BoHV foram testadas frente aos AcMs pela técnica de imunoperoxidase em monocamada (IPX) (Saunders, 1977), com algumas modificações descritas a seguir. Utilizando placas de cultivo celular de 96 orifícios, foram adicionados 50 µL de 100 DICC₅₀ de cada amostra viral (previamente titulada) a ser testada, em todos os orifícios, exceto na última linha de orifícios na placa (linha "H"), que foi mantida como controle negativo não infectado. A seguir, 3 X 10⁴ células MDBK/orifício foram semeadas e a placa incubada a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Quando o ECP era evidente em aproximadamente 20% do tapete celular, o meio era removido e as placas eram lavadas com PBS e secadas em estufa seca a 37°C. Após a completa secagem dos orifícios, as placas eram congeladas a -20°C por pelo menos uma hora. Em seguida, foi adicionado 100 µL de acetona a 20% (diluída em PBS) em cada orifício, durante 30 minutos a 4°C. A seguir as placas foram lavadas com PBS até a remoção total da acetona. Após, foram adicionados 50µL dos respectivos AcMs e as placas foram incubadas por uma hora a 37°C em câmara úmida com

atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esse período, as placas foram submetidas a três lavagens com líquido de lavagem (PBS - Tween 80; vide fórmula no anexo) e um conjugado polivalente (Polyclonal rabbit anti-mouse Immunoglobulins-HRP, Dako) diluído a 1:200 (em líquido de diluição; vide fórmula no anexo) sendo as placas novamente incubadas a 37°C em câmara úmida por uma hora. Outras três lavagens foram executadas com líquido de lavagem e a prova foi revelada com adição de substrato (15 µL de H₂O₂ (30 volumes); 300 µL de 3-amino-9-etilcarbazol a 4% em 5 mL de tampão acetato (pH 5.0) de acordo com Harlow & Lane (1988). A reação antígeno-anticorpo específica foi evidenciada pela coloração carmim nas células infectadas

5. RESULTADOS

5.1. Isotipagem dos AcMs

A tipagem/isotipagem dos AcMs está apresentada na Tabela 3. Dos 36 AcMs obtidos, todos pertencem à classe IgG; 11 são do isotipo 2a, 16 do isotipo IgG2b e 9 do isotipo 3.

Tabela 3: Tipagem/Isotipagem dos AcMs utilizados para a caracterização das amostras de BoHV. Todos os AcMs pertencem a família G das imunoglobulinas, sendo onze da subfamília IgG2a, 16 da subfamília IgG2b e 9 da subfamília IgG3.

Anticorpos Monoclonais	Tipagem
1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 21, 22	IgG2a
8, 15, 16, 17, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 34, 35, 36	IgG2b
7, 9, 10, 14, 18, 19, 30, 31, 33,	IgG3

5.2. Caracterização das Amostras de BoHV

Os resultados obtidos com os testes de IPX estão apresentados no Quadro 2. As amostras virais que apresentaram reatividade com os AcMs estão nas áreas negritadas, as que não apresentaram reações estão em branco. As amostras de vírus foram dispostas de acordo com os perfis de reatividade observados. A amostra PRV foi utilizada como controle negativo (Figura 3).



Figura 3: Reação negativa ao teste de imunoperoxidase (IPX) usando anticorpo monoclonal. MDBK inoculada com uma amostra de vírus da pseudo-raiva PRV (Aumento 40 X)

5.3. Teste de imunoperoxidase

Este estudo apresentou diversos padrões de reatividade entre 45 amostras virais e 36 AcMs. Dentre esses padrões destacam-se quatro perfis: o primeiro perfil

(apresentado nas linhas 42, 43, 44 e 45 do quadro 1) mostrou que quatro das 45 amostras virais, N569 (BoHV-5), RIM, T4 (ambos descritos genomicamente como BoHV-1, Sousa, 2007 - dados não publicados) e Retiro (BoHV-1.2), não reagiram com nenhum anticorpos monoclonal.

O segundo perfil apresentado foi que as demais 41 amostras reagiram com 8 dos 36 AcMs (apresentados na primeira coluna do quadro 1).

Oito amostras, SV265/96 gE-, EVI 123/95, COOPER, SV 453/93, SV 1613/93 (BoHV-1), T1, AA 01 e SV136/88 (BoHV-5) reagiram positivamente com os todos AcMs testados (perfil apresentado nas linhas de 1 a 8).

Finalmente, o último perfil analisado (apresentado nas linhas 28, 29 e 30) foi que as amostras ISO 94/232, ISO 95/97 e ISO 87/97 (todos genomicamente determinados no subtipo c do BoHV-5) apresentaram o mesmo perfil, não reagindo com 10 dos 36 AcMs (apresentado nas colunas 20 a 29), destaque para o AcM 28 (coluna 21) que apresenta reatividade com 41 amostras virais exceto com essas amostras determinadas como BoHV-5c.

As demais reações apresentadas no quadro 1 foram consideradas reações “atípicas”, pois a análise das amostras de herpesvírus bovino frente aos AcMs não apresentou nenhuma relação que permitisse que fossem colocadas dentro de um perfil de reatividade específico ou dentro de um perfil descrito acima.

	Amostras Virais	Classificação proposta	Tipos/Subtipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29				
				AcMs																																
				1 a 8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	18	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36				
1	EVI 123/98	Rinotraqueite	BoHV 1.1																																	
2	COOPER	Rinotraqueite	BoHV 1.1																																	
3	SV 453/93	Vulvovaginite	BoHV1.2																																	
4	SV 265/96 gE-	Recombinante	BoHV 1.2																																	
5	SV1613/93	Rinotraqueite	BoHV 1																																	
6	T1	Encefalite	BoHV 5																																	
7	AA 01	Encefalite	BoHV 5																																	
8	SV136/88	Encefalite	BoHV 5																																	
9	LA INTA	Encefalite	BoHV 1.1																																	
10	LAM	Rinotraqueite	BoHV 1.1																																	
11	SV 265/96	Rinotraqueite	BoHV 1.2																																	
12	PG 1779/03	Aborto	BoHV 1.2																																	
13	EVI 14/94	Rinotraqueite	BoHV 1.1																																	
14	SV 56/90	Rinotraqueite	BoHV 1.1																																	
15	T3	Rinotraqueite	BoHV 1.1																																	
16	SV 57/90	Rinotraqueite	BoHV 1																																	
17	SV 609/03	Rinotraqueite	BoHV 1																																	
18	JOWA	Rinotraqueite	BoHV 1																																	
19	UY 2002/06	Rinotraqueite	BoHV 1.2																																	
20	UY 2004/02	Balanopostite	BoHV 1.2																																	
21	SV 299/03	Rinotraqueite	BoHV 1																																	
22	SV 55/02	Rinotraqueite	BoHV 1																																	
23	299/03 mss	Rinotraqueite	BoHV 1																																	
24	EVI 88/95	Encefalite	BoHV 5.a																																	
25	V175	Semen	BoHV 5.a																																	
26	RP	Encefalite	BoHV 5																																	
27	A663	Encefalite	BoHV 5.b																																	
28	ISO94/232	Encefalite	BoHV 5.c																																	
29	ISO 95/97	Encefalite	BoHV 5.c																																	
30	ISO 87/97	Encefalite	BoHV 5.c																																	
31	T2	Encefalite	BoHV 5																																	
32	EVI 99	Encefalite	BoHV 5																																	
33	SV 198/05	Encefalite	BoHV 5																																	
34	P160/96	Encefalite	BoHV 5																																	
35	AA 05	Encefalite	BoHV 5																																	
36	EVI 130	Encefalite	BoHV-5																																	
37	SV 507	Encefalite	BoHV 5																																	
38	EVI 340/96	Encefalite	BoHV 5																																	
39	LAM US9-	Recombinante	BoHV 1.1																																	
40	LAM gE-	Recombinante	BoHV 1.1																																	
41	EVI 88/95 TD	Recombinante	BoHV 5.a																																	
42	N569	Encefalite	BoHV 5																																	
43	RIM	Encefalite	BoHV 5																																	
44	T4	Encefalite	BoHV 5																																	
45	Retiro	Vulvovaginite	BoHV 1.2																																	
46	EVI 192/03		PRV																																	

Quadro 1: Perfil de reatividade das amostras de herpesvírus examinadas com anticorpos monoclonais (AcMs) em testes de imunoperoxidase (IPX). LEGENDA:

■ Reação positiva □ Reação negativa

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, 45 amostras de BoHV foram analisadas frente a 36 AcMs, quatro perfis de reatividade puderam ser destacados. O primeiro perfil destacado foi que as amostras N569, RIM, T4 e Retiro, não reagiram com nenhum dos AcMs em questão, sugerindo estas amostras apresentam alterações protéicas que inibem a expressão de epítomos capazes de serem reconhecidos pelos anticorpos. A manipulação excessiva, o mau acondicionamento e a exposição acidental destas amostras a reagentes físicos e químicos podem ter sido a causa das alterações protéicas.

Outro perfil apresentado foi que 41 amostras virais reagiram com oito dos 36 AcMs, sendo esses anticorpos os mais amplamente reativos. AcMs não discriminativos em relação ao tipo de vírus poderão ter aplicações importantes, tais como o desenvolvimento de testes de diagnóstico capazes de identificar tanto BoHV-1 quanto BoHV-5 (Souza *et al.*, 2002).

Oito amostras de BoHV-1 e 5 (EVI 123/95, COOPER, SV 453/93, SV 1613/93, T1, AA 01 e SV136/88), incluindo uma amostra recombinante, apresentando deleção no genoma (SV265/96 gE-), reagiram com todos os 36 AcMs. Esta análise demonstra que os AcMs não foram capazes de estabelecer uma relação entre os tipos de BoHV genomicamente determinados com a análise antigênica dos AcMs testados.

O último perfil apresentado foi que as amostras genomicamente determinadas como BoHV-5c (ISO 94/232, ISO 95/97 e ISO 87/97) apresentaram o mesmo padrão, reagindo com 26 dos 36 anticorpos. Destacando o AcM 28 que não reagiu apenas com essas amostras, sugerindo que esse AcM possa ser capaz de diferenciar amostras do subtipo BoHV-5c com outros isolados de BoHV-1 e BoHV-5.

Como já mencionado, o BoHV-1 relaciona-se geneticamente com BoHV-5 em 85% (Delhon *et al.*, 2003) e antigênicamente em 95% (Delhon *et al.*, 2003). Estudos de mapeamento do genoma de alguns isolados de BoHV-1 e BoHV-5, utilizando a restrição enzimática, mostraram ser este um dos melhores métodos para diferenciar isolados. Entretanto, Nadin-Davis *et al.* (1996) apontam que somente ensaios de restrição enzimática não conseguem correlacionar os tipos genéticos virais e os sinais clínicos apresentados pelos animais infectados.

A diferenciação entre isolados de BoHV-1 e BoHV-5 através de AcMs é descrita por alguns autores (Meyer *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2002; Roehe *et al.*, 2002; Oldoni *et al.*, 2004). Assim, estudos conduzidos com o objetivo de elucidar as diferenças

antigênicas entre os tipos de BoHV têm-se concentrado nas glicoproteínas virais que apresentam as maiores diferenças (gB, gC e gD) (Chowdhury, 1995). Além disso, a determinação das diferenças genômicas e antigênicas entre os herpesvírus bovino favorecem uma análise comparativa dos novos isolados, inclusive no que concerne ao desenvolvimento de testes sorológicos específicos (Costa *et al.*, 2005 MG).

Análises comparativas entre as seqüências de diferentes alfa herpesvírus revelaram que a gC é a glicoproteína que possui maior divergência entre o BoHV-1 e BoHV-5 (Engles *et al.*, 1987), além de ser a mais abundante presente no envelope viral. Por isso a maioria dos AcMs produzidos com antígenos do BoHV-1 reagem contra a gC (Friedli & Metzler, 1987; Shen *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1993; Oldoni *et al.*, 2004). As principais diferenças entre a gC do BoHV-1 e do BoHV-5 estão na região amino e terminal (Collins *et al.*, 1993; Chowdhury, 1995) Análises utilizando AcMs produzidos contra epítomos da gC puderam diferenciar os subtipos de BoHV-1 (Rijsewijk *et al.*, 1999).

Outras glicoproteínas que apresentam uma certa divergência entre os isolados de herpesvírus bovino são a gB e a gD. Essas glicoproteínas estão presentes em grande quantidade no envelope de vírions e na membrana de células infectadas e são bastante imunogênicas (Babiuk *et al.*, 1987). Ros & Belak (2001) demonstraram que o gene da gB do BoHV-5 codifica um produto de 947 aa, 15 aa a mais do que a gB do BoHV-1. Abdelmagid *et al* (1995) determinaram também que a região carboxi terminal da gD do BoHV-5 difere da seqüência do BoHV-1.

Winkelmann (2006), produziu e caracterizou AcMs com especificidades protéicas que não a gC, o estudo revelou que esses AcMs foram possivelmente construídos contra epítomos das glicoproteínas B e D. Esses AcMs são importantes para o mapeamento de epítomos específicos capazes de diferenciar os tipos e subtipos de BoHV.

Oldoni *et al* (2004) produziram onze AcMs a partir de antígenos de BoHV-5 dois deles não reagiram com isolados de BoHV-1 e outros três falharam em reconhecer uma amostra apresentando o gene que codifica para a gC deletado, indicando que esse AcMs reagem com epítomos que não o da gC. Assim a correta identificação antigênica desses vírus depende de anticorpos estritamente específicos para cada um destes agentes (D'Arce *et al.* 2002, Souza *et al.* 2002, Oldoni *et al.* 2004).

A produção de anticorpos monoclonais com reatividade específica por tipos e/ou subtipos de BoHV permite também o desenvolvimento de testes para diagnóstico

sorológico diferencial do tipo ELISA (Spilki *et al.*, 2005). AcMs com outras especificidades protéicas podem ser úteis para diversos estudos da biologia e das interações do vírus com o sistema imunológico, além de apresentarem aplicação potencial em técnicas de diagnóstico (Meyer *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2002; Oldoni *et al.*, 2004). Porém estudos complementares como mapeamento de epítomos neutralizantes, análises de Western Blot e a expressão de antígenos virais em vetores poderão auxiliar em uma melhor identificação e caracterização de polipeptídeos virais (Marshall *et al.*, 1986; Metzler *et al.*, 1986), permitindo a diferenciação entre subtipos e tipos do BoHV (Metzler *et al.*, 1986; Friedli & Metzler, 1987; Souza *et al.*, 2002).

7. CONCLUSÃO

No presente estudo foram avaliados 45 amostras de herpesvírus bovino frente a 36 AcMs. Quatro amostras virais das 45 analisadas, sendo três BoHV-1 e uma BoHV-5 não reagiram com nenhum dos AcMs. As 41 amostras restantes reagiram com oito dos 36 AcMs. Oito das 41 amostras (sendo quatro amostras BoHV-1, três BoHV-5 e uma amostra BoHV-1 mutante - SV 265/96 gE-), reagiram com todos os AcMs, mostrando que não houve nenhuma correlação entre os tipos e subtipos de herpesvirus bovino genomicamente determinados com as análises antigênicas dos AcMs testados. E um anticorpo não reagiu apenas com amostras do subtipo BoHV-5c (ISO 94/232, ISO 95/97 e ISO 87/97) sugerindo que esse AcM possivelmente possa diferenciar esse subtipo dos demais BoHV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABDELMAGID, O.Y.; ORTEN, D.J.; XUE, W.; BLECHA, F.; MINOCHA, H.C. Anti-idiotypic antibodies to bovine herpesvirus- 1 inhibit virus infection in cell cultures. **Archives of Virology**, Viena, v.122, n.1-2, p.163–173, 1992.
- ACKERMANN M, BELAK S, BITSCH V, EDWARDS S, MOUSSA A, ROCKBORN G, THIRY E. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/ infecious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology** v. 23, p. 361-363, 1990.
- ACKERMANN, M. & ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.113, n.3-4, p.293-302, 2006.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. 3ª Ed. Artes Médicas, Porto Alegre, c.23, p.1196-1206, 1997.
- ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5. **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, n.8, p.613-621, 2001.
- ASHBAUGH, K.; THOMPSON, K.; BELKNAP, E.; SCHULTHEISS, P.; CHOWDURY, S.; COLLINS, J. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.9, n.4, p.387-394, 1997.
- BABIUK, L.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HUCRK, S.; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p.31-42, 1996.
- BAGUST, T.J.; CLARK, L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rinothraqueitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 82, p. 375-383, 1972.
- BAGUST, T.J.; CLARK. L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v.82, p.375-383, 1972.
- BARANOWSKI, E.; DUBUISSON, J.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, A.L.; MICHEL, A.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Synthesis and processing of bovine herpesvirus-1 glycoprotein H. **Virology**, v. 206, p.651-4, 1995.
- BARANOWSKI, E.; KEIL, G.; LYAKU, J.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VAN OIRSCHOT, J.T.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.53, n.1-2, p.91–101, 1996.
- BARBOSA, A.C.V.C. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no estado de Goiás. **Dissertação de mestrado**– Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2004.

BARENFUS, M.; DELLI QUADRI, C.A.; McINTYRE, R.W.; SHOEDER, R.J. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.143 p. 725-728, 1963.

BARTHA, A.; HAJDU, G.; ALDASY, P.; PACZOLAY, G. Occurrence of encephalomyelitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. **Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 19, p. 145-151, 1969.

BAUGUST, T.J. & CLARK, L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, New York, v.82, n.1, p.375-383, 1972.

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; AYERS, V.K. *et al.* Experimental infectious of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 358-365, 1994.

BIELANSKI, A. & DUBUC, C. In-Vitro Fertilization and Culture of Ova from Heifers Infected with Bovine Herpesvirus-1 (BoHV-1). **Theriogenology**, New York, v.41, n.6, p.1211-1217, 1994.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M.; HENDERSON, J.A. Rinotraqueítis bovina infecciosa (nariz roja) (RIB). **In: Medicina Veterinaria Nva. 6° ed.** Editorial Interamericana. México, p.873-879, 1988.

BRATANICH, A.C. Comparative studies of BOHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. **Zentralbl Veterinarmed**, v.38, p.41-48, 1991.

BRATANICH, A.C.; SARDI, S.I.; SMITSAART, E.N.; SCHUDEL, A.A. Comparative studies of BOHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, p. 41-48, 1991.

BULACH, D.M. & STUDDERT, M.J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. **Archives of Virology**, Viena, v.113, n.1-2, p.17-34, 1990.

BULACH, D.M.; STUDDERT, M.J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. **Archives of Virology**, v.113, p.17-34, 1990.

CAMPADELLI-FIUME, G.; COCCHI, F.; MENOTTI, L.; LOPES, M. The novel receptors that mediated the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesvirus into cells, **Reviews in medical virology**. v.10, p. 305-319, 2000.

CAMPOS, M.; ROSSI, C.R. Cytotoxicity of bovine herpesvirus lymphocytes after treatment with lymphokines. **American Journal Veterinary Research**, v.47, p. 1524-1528, 1986.

CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SCHERER, C.F.C.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; ODEON, A.; SUR, J.H. Latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Veterinary Microbiology**, v. 4, p. 285-295, 2002.

CARRILLO, B.J.; AMBROGÍ, A.; SHUDEL, A.A; VAZQUEZ, M.; DAHME, E., POSPISCHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine**, v.38, p. 327-332, 1983.

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

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

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; ONDERECI, M.; WEISS, M. L.; MOSIER, D. Neurovirulence of glycoprotein C (gC) –deleted bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) expressing BoHV-1 gC in rabbits seizure model. **Journal of Neurovirology**, v.6, p. 284-295, 2000.

CHRISTENSEN, L.S.; MADSEN, K.G.; NYLIN, B.; RONSHOLT, L. A contribution to systematization of bovine herpesvirus type 1 based on genomic mapping by restriction fragment pattern analysis. **Virus Research**, v.46, n.1-2, p.177-182, 1996.

CIACCI-ZANELLA, J.; STONE, M.; HENDERSON, G., JONES, C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death, **Journal of Virology**, v.73, p. 9734-9740, 1999.

CLAUS, M.P *et al.* Isolation and partial characterization of bovine herpesvirus in cattle with neurological signs. **Virus Reviews & Research**, v.5, n.2, p.120, 2000.

CLAUS, M.P. Detecção do herpesvírus bovino tipos 1 e 5 por amplificação parcial do gene da glicoproteína C e estudo retrospectivo da meningoencefalite herpética bovina – **Tese de Mestrado** - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

CLAUS, M.P.; ALFIERI A.F.; ALFIERI A.A. Meningoencephalitis by Herpesvirus Type 5 **Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 131-141. 2002.

COLLINS, J.K; AYERS, V.K.; WHESTONE, C.A.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S. Antigenic differences between the mayor glycoprotein ok bovine herpesvirus type 1.1 and bovine encephalitis herpesvirus type 1.3. **Journal of General Virology**, v. 74. p. 1509-1517, 1993.

COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO., R.M; SILVA, R.R.P.; SOUZA, M.A.; FILHO, J.A.O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causado por herpesvirus no estado do Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, p. 293-298, 2002.

COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, G.D.R.; ROCHA, M.A. Utilização de parte da região codificadora da glicoproteína b na diferenciação do herpesvírus bovino 1.1, herpesvírus bovino 1.2 e herpesvírus bovino 5 **Arquivos Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.143-149, 2005.

D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.88, n.4, p.315-324, 2002.

D'OFFAY JM, ELY RW, BALDWIN CA, WHITENACK DL, STAIR EL, COLLINS JK. Diagnosis of encephalitic herpesvirus type 5 (BoHV-5) infections in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. **J Vet Diag Invest** 7: 247-251. 1995.

DAVISON A.J., Evolution of Herpesviruses, **Veterinary Microbiology**, n. 86, p. 315-324, 2002.

DAVIS-POYNTER, N.; BELL, S.; MINSON, T.; BROWNE, H. Analysis of the contribution of herpes simplex virus type 1 membrane proteins to the induction of cell-cell fusion. **Journal of Virology**, Washington, v.68, n.2, p.7586-7590, 1994.

DELHON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z.; AFONSO, C.L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, Washington, v.77, n.19, p.10339-10347, 2003.

DEREGT, D. & PRINS, S. A Monoclonal Antibody-Based Immunoperoxidase Monolayer (Micro-Isolation) Assay for Detection of Type 1 and Type 2 Bovine Viral Diarrhea Viruses **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.62, n.1, p.152-155, 1998.

DERIVEDDY, C.W. & JONES, C. Alternative splicing of the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1 yields was containing unique open reading frames. **Journal of Virology**, v.72, p.7294-7301, 1998.

DUBIN, G.; SOCOLOF, E.; FRANK, I.; FRIEDMAN, H.M. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. **Journal of Virology**. V. 65, p, 7046-50, 1991

DUBUISSON, J.; ISRAEL, B.A.; LETCHWORTH, G. Mechanisms of bovine herpesvirus type 1 neutralization by monoclonal antibodies to glycoproteins gI, gIII and gIV. **Journal of General Virology**, Berks, v.73, n.8, p.2031-2039, 1992.

EDWARDS, S.; NEWMAN, R.H.; WHITE, H. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 isolated in the U.K. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.22, n.1-2, p.213-223, 1991.

EGYED, L.; BROCCHI, E.; RUSVAI, M.; BARTHA, A. Study of bovine herpesvirus type 1 strains with monoclonal antibodies, **Acta veterinária**, v.40, p. 225-230, 1992.

ELY, R.W.; D'OFFAY, J.M.; RUEFER, A.H.; CASH CAROLIN, Y. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin fixed, paraffin-embedded brain tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.8, p.487-492, 1966.

ENGELS, M., GUILIAN, C., WILD, P., BECK, T.M., LOEPFE, E., WYLER, R., The genome of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential

compared to known BoHV 1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. **Virus Research**, v.6, p. 57-73. 1986.

ENGELS, M.; STECK, F.; WYLER, R. Comparison of the genomes of infectious bovine

ENGLES, M. *et al.* The genome of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BoHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. **Virus Research**, v.6, p.57-73, 1987.

ENGLES, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 3-15, 1996.

ESTEVEES, P.A. Desenvolvimento de um ELISA com antígeno recombinante específico para detecção de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1). **Dissertação de mestrado** – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

ESTEVEES, P.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; HÜBNER, S.O.; PUENTES, R.; MAISONNAVE, J.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.; BATISTA, H.B.; TEIXEIRA, T.F.; DEZEN, D.; OLIVEIRA, A.P.; DAVID, C.; ARNS, C.W.; ROEHE, P.M. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). **Virus Research**, v.131(1), p.16-22. 2007.

FEHLER, F.; HERMANN, J.M.; SAALMULLER, A.; METTENLEIR, T.C.; KEIL, G.M. Glycoprotein IV of bovine herpesvirus 1 expressing cell-lines complements and recues a conditionally lethal viral mutant. **Journal of Virology**. v.66. p. 831-839, 1992.

FENNER, F., BACHMANN, P.A., GIBBS, E.P.J., MURPHY, F.A., STUDDERT, M.J., WHITE, D.O. Rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strain by restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v.67, p.169-174, 1981.

FITZPATRICK, D.R.; ZAMB, T.; PARKER, M.D.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, L.A.; LAWMAN, M.J. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoproteins gI and gIII in transfected murine cells. **Journal of Virology**, v.62, p. 4239-48, 1988.

FRANCO, A.C. Recombinantes de herpesvírus bovino tipo 1 com deleções nos genes gE e US9. 193f. **Tese de doutorado**– Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A.M. Construction and characterization of a bovine herpesvirus type 5 mutant with a deletion of the gE, gI and US9 genes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Submitted for publication

FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; ROEHE, P.M. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v.33, n.1, p.274–278, 2002.

- FRENCH, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Australian Veterinary Journal**, Artarmon, v.38, n.1, p.216-221, 1962.
- FRIEDLI, K. & METZLER, A.E. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus (BOHV-1) strain and to proteins of representative BOHV-1 strains. **Archives of Virology**, Viena, v.94, n.1-2, p.109-122, 1987.
- FURUOKA, H.; IZUMIDA, N.; HORIUCHI, M.; OSAME, S.; MATSUI, T. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. **Acta Neuropathology**, v.90, n.6, p.565-571, 1995
- GARDINER, M.R.; NAIRN, M.E. Viral meningoencephalitis in calves in western Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.40, p. 225-228, 1964.
- GERAGHTY, R.J.; KRUMMENACHER, C.; COHEN, G.H.; EISENBERG, R.J.; SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. **Science**, New York, v.280, n.5369, p.1618-1620, 1998.
- HAGE JJ, SCHUKKEN YH, BARKEMA HW. Population dynamics of bovine herpes 1 infection in a dairy herd. **Veterinary Microbiology**, v.53, p. 317-343. 1996.
- HALFEN, D.C.; VIDOR, T. Infecção por herpesvírus bovino 1 e herpesvírus bovino 5. In: Riet-Correa F, Schild AL, Méndez MDC. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. Universitaria/UFPEL, Pelotas, p.82-91, 1998.
- HALL, W.T.K.; SIMMONS, G.C.; FRENCH, E.L. *et al.* The pathogenesis of encephalitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**. v.42, p.229-237, 1966.
- HARLOW, E. & LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. Cold Spring Harbour, USA. 1988
- HEINLEIN, A.; METZLER, A.E.; WEIBLEN, R.; BERRIOS, P.; SCHUDEL, A.A.; RODRIGUEZ, M. Molecular characterization of south american bovine herpesvirus 1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. **Journal of Veterinary Medicine**. v.40, p.125-130, 1993.
- HENDRESON, G.; ZHANG, Y.; JONES, C. The bovine herpesvirus 1 gene encoding infected cells protein 0 (bcIP0) can inhibit interferon-dependent transcription in the absence of other viral genes. **Journal of General Virology**, v.86, p. 2697-2702, 2005.
- HINKLEY, S.; AMBAGALA, A.P.; JONES, C.J.; SRIKUMARAN, S. A vhs-like activity of bovine herpesvirus-1. **Archives of Virology**, v. 145 (10), p. 2027-2046, 2000.
- HÜBNER, S.O. Aspectos da patogenia à infecção por herpesvírus bovino tipo 5 (BOHV-5) em bovinos. 104f. **Tese de doutorado**– Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; SILVA, D.A.; SPILKI, F.R.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v.28, n.3, p.187-196, 2005.

HUENER, H.P.; LARCHER, C.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HUCK, S.; BABIUK, L.A. Species selective interaction of Alphaherpevirinae with “unspecific” immune system of the host. **Archives of Virology**, v. 130, p. 353-364, 1993.

HUTCHINGS, D.L.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BABIUK L.A. Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle. *Journal of Virology*, v. 64, p. 5114-22, 1990.

HUTCHINSON, L.; BROWNE, H.; WARGENT, V.; DAVIS-POYNTER, N.; PRIMORAC, S.; GOLDSMITH, K.; MINSON, A.C.; JOHNSON, D.C. A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. **Journal of Virology**, Washington, v.66, n.4, p.2240-2250, 1992.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_herpe.htm [consulted 6 june 2007].

JOHNSON, D.C.; FRAME, M.C.; LIGAS, M.W.; CROSS, A.M.; STOW, N.D. Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two glycoproteins, gE and gI. **Journal of Virology**, Washington, v.62, n.4, p.1347-1354, 1988.

JOHNSTON, L.A.Y.; SIMMONS, G.C., McGAVIN, M.D. A viral meningoencephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, v.38, p. 207-215, 1962.

JONES C, NEWBY TJ, HOLT T, DOSTER A, STONE M, CIACCI-ZANELLA J, WEBSTER CJ, JACKWOOD MW 2000. Analysis of latency in cattle after inoculation with a temperature sensitive mutant of bovine herpesvirus 1. **Vaccine** v.18, n.27, p. 3185-3195, 2003.

KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.103-110. 1996a.

KAASHOEK, M.J.; SRAVER, P.H., VAN ROOIJ, E.M.; QUAK, J. VAN OIRSCHOT, T.J. Virulence, immunogeneticity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. **Veterinary Record**, v.139, p.416-421, 1996b.

KAASHOEK, M.J.; VAN OIRSHOT, J.T. Early immunity induced by a live gE-negative bovine herpesvirus 1 marker vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.53, p. 191-197, 1996c.

KAHRS, R.F. Viral diseases of cattle, **Iowa State University Press**, Iowa, p.299. 1981.

KEIL GM, ENGELHARDT T, KARGER A, ENZ M. Bovine herpesvirus 1 U(s) open reading frame 4 encodes a glycoproteoglycan. **Journal of Virology**, v. 70, p. 3032-8, 1996.

KEIL, G.M.; HÖHLE, C.; GIESOW, K.; KÖNIG, P. Engineering glycoprotein B of bovine herpesvirus 1 to function as transporter for secreted proteins: a new protein expression approach. **Journal of Virology**, Washington, v.79, n.2, p.791–799, 2005.

KEUSER, V.; SCHYNTS, F.; DETRY, B.; COLLARD, A.; ROBERT, B.; VANDERPLASSCHEN, A.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Improved Antigenic Methods for Differential Diagnosis of Bovine, Caprine, and Cervine Alphaherpesviruses Related to Bovine Herpesvirus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.3, p.1228–1235, 2004.

KHADR A, TIKOO SK, BABIUK LA, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S. Sequence and expression of a bovine herpesvirus-1 gene homologous to the glycoprotein K-encoding gene of herpes simplex virus-1. **Gene**. v. 168, p. 189-93, 1996.

KHATTAR SK, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HARKE S, ATTAH-POKU SK, BABIUK LA, TIKOO SK. Identification and characterization of a bovine herpesvirus-1 (BOHV-1) glycoprotein gL which is required for proper antigenicity, processing, and transport of BOHV-1 glycoprotein gH. **Virology**, v. 219, p.66-76, 1996.

KIT, S.; OTSUKA, H.; KIT, M. Blocking ELISA for distinguishing infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV)-infected animals from those vaccinated with a gene-deleted marker vaccine. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.40, n.1, p.45-56, 1992.

KLUPP, B.G.; BAUMEISTER, J.; KARGER, A.; VISSER N.; METTENLEITER, T.C. Identification and characterization of a novel structural glycoprotein in pseudorabies virus, gL. **Journal of Virology**, Washington, v.68, n.8, p.3868-3878, 1991.

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

KONIG, P.; GIESOW, K.; KEIL, G.M. Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BOHV-1) is non-essential for replication in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BOHV-1 infected cells. **Veterinary Microbiology**, 86, p. 37-49, 2002.

KOPPERS-LALIC, D.; REITS, E.A.; RESSING, M.E.; LIPINSKA, A.D.; ABELE, R.; KOCH, J.; MARCONDES REZENDE, M.; ADMIRAAL, P.; VAN LEEUWEN, D.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; METTENLEITER, T.C.; RIJSEWIJK, F.A.; TAMPÉ, R.; NEEFJES, J.; WIERTZ, E.J. Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, p.5144-5149, 2005.

KOPPERS-LALIC, D.; RIJSEWIJK, F.A.; VERSCHUREN, S.B.; VAN GAANS-VAN DEN BRINK J.A.; NEISIG, A.; RESSING, M.E.; NEEFJES, J.; WIERTZ, E.J. The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. **Journal of General Virology**, v.82, p. 2071-2081, 2001.

LI, Y.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, L.A.; LIANG, X. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C and D: identification of dual cell-binding function of gB. **Journal of Virology**, v. 69, p. 4758-4768, 1995.

LIAM, A.; ENGELS, M.; MEYER, G.; ACKERMANN, M. Glycoprotein C of bovine herpesvirus type 5 (BOHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BOHV-1. **Archives of Virology**, v.145, p. 2047-2059, 2000.

LIANG, X., BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S.; FITZPATRICK, D.R.; ZAMB, T.J. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII and gIV. **Journal of Virology**, v. 65, p. 1124-1132, 1991.

LIANG, X.; BABIUK, L.A., ZAMB, T.J. An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 mutant expressing beta-galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. **Virology**, v.189, p. 629-639, 1992.

LIMAN, A.; ENGELS, M.; MEYER, G.; ACKERMANN, M. Glycoprotein C of bovine herpesvirus 5 (BOHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BOHV-1. **Archives of Virology**, Vienna, v.145, n.10, p.2047-2059, 2000.

LOVATO, L. T.; WINKLER, M. T.; STONE-INMAN, M.; DOSTER, A.; JONES, C. Detection of bovine herpesvirus type 1 (BOHV-1) viral DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). In: Proceedings of the 81st Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease. Iowa University Press, USA, p. 129, 2000.

LOVATO, L.T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F.L.; MORAES, M.P. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB 1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.25, n.3, p.425-430, 1995.

LYAKU, J.R.S.; MCKENNA, P.K.; FREDRICKSON, R.A.; KIBENGE, F.S.B. Characterization of monoclonal antibodies against bovine herpesvirus 1 gD fusion protein expressed in *E. coli*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.83, n.1-2, p.83-89, 1999

MACHADO, P.R.L.; CARVALHO, L.; ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais brasileiros de dermatologia**. Rio de Janeiro, n.79, p.647-662, 2004.

MADICK, J.; MAGDALENA, J.; QUAK, J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Isotype-specific antibody responses in sera and mucosal secretions of calves experimentally infected with bovine herpesvirus 1. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.46 (3-4), p. 267-283, 1995.

MADIN, S.H.; YORK, C.J.; McKERCHER, D.G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science**, New York, v.129, n.1, p.721-722, 1956.

MARS, M.H.; JONG, M.C.M.; VAN MAANEN, C.; HAGE, J.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. **Veterinary Microbiology** v.76, p. 1-13. 2000.

MCKERCHER, D.G. Studies of etiologic agents of infectious bovine rhinotracheitis and bläschenausschlag (coital vesicular exanthema). **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.24, p.501-508, 1963.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes **Current opinion in microbiology**, v. 9, p.423-429, 2006.

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

METZLER, A. *et al.* European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v.85, p.57-59, 1985.

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

MEYER, G. *et al.* Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. **Journal of General Virology**, v.80, p.2849-2859, 1999.

MEYER, G., LEMAIRE, M., ROS, C. BELAK, K. Comparative pathogenesis ok acute and latent infectious of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v. 146, p. 633-652, 2001

MEYER, G.; VILCEK, C.; PACES, V.; O'HARA, M.K.; PASTORET, P.; THIRY, E.; SCWYZER, M. Sequences analysis of the bovine herpesvirus type 1 genes homologus to the DNA polymerase (UL30), the mayor DNA-binding protein (UL29) and the ICP 18.5 assembly protein (UL28) genes of herpes simplex virus. **Archives of Virology**, 142, p. 28-102, 1997.

MILLER, J.M.; WHETSTONE, C.A.; BELLO, L.J.; Lawrence, W.C. Determination of ability of a thymidine kinase negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.52, n.7, p.1038-1043, 1991.

MURPHY, J.K. Epstein-Barr virus and primary brain lymphomas. **American Journal Clinical Pathology**, v. 112, p. 881-2,1999.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus infection and bovine herpesvirus rinothraqueitis. **Veterinary Research** v.38, p. 181-209. 2007.

NADIN-DAVIS SA, LUTZE-WALLACE C, ZHONG X. Bovine herpesvirus 1 isolates contain variable copy numbers of GC-rich tandem repeats in the gI non-coding regions of their genomes. *Virus Genes*, v. 13, p. 263-8, 1996.

NICOLAI, F.P.; OLIVEIRA, M.E.; APOLINÁRIO, T.M.; RESENDE, M. Differentiation between bovine herpesvirus type 1 and 5 Brazilian strains by hybridization using gE gene. **Virus Reviews and Research: Journal of the Brazilian Society for Virology**, Rio de Janeiro, v.5, n.2, s.1, p.117, r.HS20, 2000.

Office International des Epizooties (OIE) International Animal Health Code. Disponível em: <http://oie.int/norms/mmanual>. 2002.

OKAZAKI, K.; HONDA, E.; KONO, Y. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein g III by a recombinant baculovirus insect cells. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 901-904, 1994.

OLDONI I, WEIBLEN R, INKELMANN MA, FLORES EF. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, p. 213-21. 2004.

OLIVEIRA, A.P. Produção de anticorpos monoclonais contra herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e caracterização de amostras de herpesvírus bovinos. **Dissertação de mestrado**— Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PASTORER, P.P.; THIRY, E.; Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Disease**, v.8, p.35-42, 1985.

PEREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, M.R.; LEUNDA, F.A.; OSORIO, E.A.; FLORES, E.F.; ODEON, A.C. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, Madison, v.39, n.4, p.437-444, 2002.

PERRIN, P.; PERRIN, M.; MOUSSA, M.; COUDERT, M. Evaluation of a commercial gE blocking ELISA test for the detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. **The Veterinary Record**, London, v.138, n.2, p.520, 1996.

PIDONE, C.L.; GALOSI, C.M.; ECHEVERRIA, M.G.; NOSETTO, E.O.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. Restriction Endonuclease Analysis of BOHV-1 and BOHV-5 Strains Isolated in Argentina. **Journal of veterinary medicine**, v.46, n.7, p.453-456, 1999.

RAVAZZOLO, A.P.; DAL PIZZOL, M.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, UFRGS, Porto Alegre, v.17, n.1, p.98-95, 1989.

REED, D.E.; BICKNELL, E.J.; BURY, R.J. Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves. **American journal of veterinary medicine**. Ass. 163, p. 753-755, 1973.

RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.C. Meningoencefalites e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvirus bovino tipo 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.9, p.13-16, 1989.

RIJSEWIJK, F.A.M.; VERSCHUREN, S.B.E.; MADIC, J.; RUULS, R.C.; RENAUD, P.; VAN OIRSCHOT, J.T. Spontaneous BOHV1 recombinants in which the gI/gE/US9 region is replaced by a duplication/inversion of the US1.5/US2 region. **Archives of Virology**, Viena, v.144, n.5, p.1527-1537, 1999.

RIJSEWIJK, F.A.M.; KAASHOEK, M.J.; MADIC, J.; PAAL, H.; RUULS, R.; GIELKENS, A.L.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Characterization of DNA rearrangement found in the unique short region of the Za strain of bovine herpesvirus type 1 and the vaccine properties of this strain. **Herpesvirus Workshop**, Pittsburg, PA, USA, p. 67, 1993.

RIJSEWIJK, F.A.M.; KAASHOEK, M.J.; LANGEVELD, J.P.M.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; MAGDALENA, J.; VERSCHUREN, S.; VAN OIRSCHOT, J.T. Epitopes on glycoprotein E and on the glycoprotein E/glycoprotein I complex of bovine herpesvirus-1 are expressed by all 222 isolates and 11 vaccine strain. **Archives of Virology**, v.145, p.921-36, 2000.

ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A.M.G.; LEITE, R.C. Bovine herpesvírus-1 in semen. **Ciência Rural**, v.29, p.373-380, 1999.

ROCK, D.L. Latent infection with bovine herpesvirus type 1 **Seminars of Virology**, v.5, p.233-240, 1994.

ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B.; OLIVEIRA, L.B.; ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BoHV-1) e vírus da encefalite bovina (BoHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p.41-44, 1997.

ROELS, S.; CHARLIE, G.; LETELLIER, C.; MEYER, G.; SCHYNTS, F.; KERKHOFS, P.; THIRY, E.; VANOPDENBOSH, E. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **Veterinary Record**. v.146, p. 596-588, 2000.

ROIZMAN, B., PELLET, P.E. The family herpesviridae: A brief introduction, in: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. **Field's virology**, Philadelphia-USA, 4th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, v.1, cap. 71, p.2381-2398, 2001.

ROIZMAN, B.; KNIPE, M.D., Herpes simplex virus and their reolication, in: Knipe, M.D., Howley, **Field's virology**, Philadelphia-USA, 4th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, v.1, cap. 71, p.2399 - 2461, 2001.

SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSORIO, A.L.A.R. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino 5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 18, p.76-83, 1998.

SANCHES, A. W.D.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L.; BARROS, C.S.L. Doenças do sistema nervosa central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, p.113-118, 2000.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular Virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.17-29, 1996.

SCHYNTS, F.; BARANOWSKI, E.; LEMAIRE, M.; THIRY, E. A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. **Veterinary Microbiology** v.66, p. 187-195, 1999.

SHEN, D.T.; BURGER, D.; LI, Z.; GORHAM, J.R.. Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus Type 1 LA Strain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.28, n.1, p.25–37, 1991.

SILVA, A.D. Proteção contra infecções pelo BoHV-5 induzida por uma vacina para BoHV-1 e por uma amostra recombinante de BoHV-5. **Dissertação de mestrado** – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SILVA M.S., BRUM M.C.S., WEIBLEN R. FLORES E.F. Biological, antigenic and molecular characterization of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) isolates associated with neurological disease in cattle **Virus Research** (In press) 2007

SILVA, M.S.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Identification and differentiation of herpesvirus types 1 and 5 isolated from clinical samples in central-southern Brazil, Argentina and Uruguay (1987-2006), **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 10, 2007.

SILVA, T.C.S.; OLIVEIRA, E.A.S.; MELO, S.V.; SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.R.; MOOJEN, V.; ESMERALDINO, A.M.; ROEHE, P.M. Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) isolated from semen. **Virus Reviews**, Rio de Janeiro, v.5, n.2, s.1, p.116, r. HS18, 2000.

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.; GONÇALVES, D.A.; SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIDA, R.S.; VICENTINI, F.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) com anticorpos monoclonais **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.22, n.1, 2002.

SPEAR, P.G. Entry of alpha herpesviruses into cells. **Seminars in Virology**, New York, v.4, n.1, p.167–180, 1993.

SPILKI, F.R. Patogenicidade de vacinologia de amostras brasileiras de herpesvírus bovino tipo 1. **Dissertação de mestrado**– Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; DA SILVA, A.D.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.; ROEHE, P.M. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.129, n.2, p.191-193, 2005.

SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; de LIMA, M.; FRANCO, A.C.; CHIMINAZZO, C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; DRIEMEIR, D.; ROEHE, P.M. Comparative

pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2a (BoHV-1.2a). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.24, n.1, p.43-49, 2004.

STRAUB, O.C. Advances in BOHV1 (IBR) Research. **Deutsche tierärztliche Wochenschrift**, v.108, p.419-422. 2001.

TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, L.G.; ROEHE, P.M. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) por testes de soroneutralização. **Pesquisa Veterinária Gaúcha**, Rio de Janeiro, v.4, n.1, p.61-65, 1998.

TIKOO SK, FITZPATRICK DR, BABIUK LA, ZAMB TJ Molecular cloning, sequencing, and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells. **Journal of Virology**, v. 64, p. 5132-42, 1990.

TIKOO, S.K., CAMPOS M., BABIUK, L.A. Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Advances in virus research**, v.45, p.191-223, 1995.

TRAPP, S.; OSTERRIEDER, N.; KEIL, G.M.; BEER, M. Mutagenesis of a bovine herpesvirus type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 301-306, 2003.

TYBOROWSKA, J.; BIEŃKOWSKA-SZEWCZYK, K.; RYCHOWSKI, M.; van OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A.M. The extracellular part of glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 is sufficient for complex formation with glycoprotein I but not for cell-to-cell spread. **Archives of Virology**, Viena, v.145, n.2, p.333-351, 2000.

VAN DER POEL, W.H.; KRAMPS, J.A.; QUAK, J.; BRAND, A.; VAN OIRSHOT, J.T. Persistence of bovine herpesvirus 1 specific antibodies in cattle after intranasal vaccination with a live virus vaccine. **Veterinary Record**, v. 137 (14), p. 347-238, 1995.

VAN DONKERSGOED, J.V. & BABIUK, L.A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, v. 86, p. 86-98, 1991.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DER HURK, S.; HUGHES, G.; BABIUK, L.A. The role of carbohydrate in the antigenic and immunogenic structure of bovine herpesvirus type 1 glycoproteins gI and gIV. **Journal of General Virology**, v.71, p.2053-2063, 1990.

VAN ENGELBURG, F.A.C.; KAASHOEK, M.J.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A.M. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. **Journal of General Virology**, Berks, v.76, n.2 p.387-2 392, 1995.

VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmissions: a brief review. **Veterinary Quarterly**, v.17, p.29-33, 1995.

VIDOR, T.; HALFEN, D.C.; LEITE, T.E.; COSWIG, L.T. Herpesvirus bovino tipo 1 (BOHV 1): sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.25, n.2, p.421-424, 1995.

VILCEK, S.; NETTLETON, P.F.; HERRING, J.A.; HERRING, A.J. Rapid Detection of Bovine Herpesvirus-1 (BOHV-1) Using the Polymerase Chain-Reaction. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.42, n.1, p.53-64, 1994.

VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V.; BASTOS, R.G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.10, p.4512–4520, 2003.

WAGNER, E. University of California-IrvineIrvine, California, USA American Society of Microbiology <http://www.microbelibrary.org> [consulted in dec 28, 2007] .

WANG, C. & SPLITTER, G.A. CD4+ cytotoxic T-limphociyte activity macrophages pulsed with bovine herpesvirus 1 polypeptides. **Journal of Virology**, v. 72, p. 7040-7047, 1998.

WHITBECK, J.C.; BELLO, L.J.; LAWRENCE, W.C.Comparison of the bovine herpesvirus 1 gI gene and the herpes simplex virus type 1 gB gene. **Journal of Virology**. V. 62, p.3319-27, 1988.

WILD, P.; SCHRANER, E.M.; PETER, J.; LOEPFE, E.; ENGELS, M. Novel entry pathway of bovine herpesvirus type 1 and 5. **Journal of Virology**, v.72, p. 9561- 9566, 1998.

WINKELMANN, E.R. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra uma cepa do herpesvírus bovino tipo 1 defectiva no gene da glicoproteína C - **Dissertação de mestrado** - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

WINKLER, M.T.; DOSTER, A.; JONES, C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of infected calves. **Journal of Virology**, Washington, v.74, n.11, p.5337-5346, 2000.

WINKLER, M.T; DOSTER, A.; JONES, C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4+ T lymphocytes and induced programmed cell death during acute infection of cattle. **Journal of Virology**, v. 73, p. 8657-8668, 1999.

WU, S.X; ZHU, X.P.; LETCHWORTH, G.J. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. **Journal of Virology**, v. 72, p. 3029-36, 1998.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BOHV1). In: G. Wittman and Y. Becker, Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs. Developments in veterinary virology ser. Kluwer Academics Publishers, Boston, v.1, p.1-72, 1989.

9. ANEXOS

9.1. SOLUÇÕES PARA CULTIVO CELULAR

9.1.1. MEM (Meio Mínimo Essencial) (pH 7.2)

MEM (Gibco)	9,6 g
Tris hidroximetilamino metano 2,4%	50 mL
H ₂ O destilada qsp	1000 mL

9.1.2. Tripsina Versene (pH 7.6)

Tripsina	0,5 g
NaCl	8 g
KCl	0,4 g
EDTA	0,2 g
Vermelho de fenol 1%	1,2 mL
H ₂ O destilada qsp	1000 mL

9.2. SOLUÇÕES PARA IPX

9.2.1 Líquido de Lavagem

PBS 1X	995 mL
Tween 80	5 mL

9.2.2 Líquido de Diluição

NaCl	29,5 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1,55 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,23 g
Tween 80	5 mL
H ₂ O destilada qsp	1000 mL

9.2.3 Tampão Acetato (pH 5.0)

Ácido acético glacial	0,89 mL
Acetato de sódio	2,89 g
H ₂ O destilada qsp	1000 mL

9.2.4 Solução Estoque Carbazole

Aminoetil carbazole	0,16 g
n'n' dimetilformamida	24 mL

9.2.5 Substrato

Solução estoque carbazole	0,3 mL
Tampão acetato	5 mL
10 V H ₂ O ₂	15 µL

9.2.6 PBS 10X (pH 7,4)

NaCl	85,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	19,43 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3,11 g
H ₂ O qsp	1000 mL

9.3. TESTE DE IMUNOPEROXIDASE (IPX):

- Colocar 50 µL de 100 DICC₅₀ do vírus a ser testado e 50 µL de 3 x 10⁴ de células/orifício. Incubar a 37°C em estufa com ambiente de 5% de CO₂ e aguardar até que o tapete celular apresente 20% de ECP.
- Retirar com cuidado, se possível utilizando a multicanal, o meio das placas de cultivo celular.
- Lavar com PBS (3X).
- Colocar as placas em estufa seca para secar.
- Após completamente secas, congelar a -20°C as placas por pelo menos uma hora (nessa etapa, podem-se armazenar as plaquinhas).
- Depois de congeladas, adicionar 100 acetona e refrigerar a 4°C por meia hora.
- Lavar 3X com PBS.
- Colocar 50 µL dos Acs a serem testados e incubar por uma hora a 37 em câmara úmida.
- Lavar 3X com líquido de lavagem.
- Colocar 50 µL do conjugado na diluição indicada (Diluir com líquido de diluição) e incubar por uma hora a 37°C em câmara úmida.
- Lavar 3X com líquido de lavagem.
- Para revelar, colocar 50 µL da solução: 5mL de tampão fosfato, 300 µL e carbazole e 60 µL de água oxigenada.
- Aguardar o aparecimento do efeito (coloração carmim) a temperatura ambiente.
- A reação pode ser parada adicionando H₂O destilada.