

ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 (BHV-5)¹

RENATA SERVAN de ALMEIDA², SILVIA VALIM de MELO³, TAMIR CALCAGNOTTO da SILVA⁴, LILIANE GUIMARÃES OLIVEIRA⁵, RICARDO ANTONIO AMARAL LEMOS⁶, PAULO MICHEL ROEHE⁷

RESUMO – Dez hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (AcMs) contra antígenos do Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5) foram selecionados por sua capacidade de ligar-se a células infectadas com amostras do Herpesvírus da Encefalite Bovina (BHV-5), em testes de imunoperoxidase (IPX). Nove dos dez AcMs produzidos reconheceram antígenos em 10/10 amostras de BHV-5 testadas. Um dos AcMs reconheceu nove entre dez amostras classificadas como BHV-5.

Palavras-chave: herpesvírus bovino, encefalite, anticorpo, BHV-5.

MONOCLONAL ANTIBODIES TO BOVINE HERPESVIRUS TYPE 5 (BHV-5)

ABSTRACT – Ten hybridomas secreting monoclonal antibodies (Mabs) were produced to bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) antigens. The hybridomas were selected with basis on their capacity to bind to cells infected with isolates of bovine encephalitis herpesvirus (BHV-5), in immunoperoxidase (IPX) tests. Nine of the ten Mabs recognized antigens on 10/10 isolates tested. The remainder Mab recognized antigens on nine out of ten BHV-5 samples.

Key words: bovine herpesvirus, bovine encephalitis virus, monoclonal antibodies, BHV-5.

INTRODUÇÃO

O Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5) é um vírus pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae* (PORTERFIELD, 1989). Este vírus é responsável por infecções no sistema nervoso central de bovinos, causando meningoencefalites não-purulentas (CARRILLO et al., 1983; WEIBLEN et al., 1989). Infecções por BHV-5 vêm despertando grande interesse devido à sua disseminação aparentemente ampla em países do hemisfério sul, bem como por sua associação com baixa morbidade e alta mortalidade (BAGUST e CLARKE, 1972). No Brasil, encefalites causadas por BHV-5 têm sido confirmadas de forma crescente nos rebanhos, principalmente nas regiões Sul e Central do País (WEIBLEN et al., 1989; RIET-CORREA et al., 1989; ROEHE et al., 1997).

As amostras hoje classificadas como BHV-5, durante muito tempo, foram consideradas subtipos do Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) devido ao alto grau de homologia existente entre os genomas de ambos os vírus (ENGELS et al., 1987; BULACH e STUDDERT, 1990) e às extensas reações sorológicas cruzadas entre suas infecções (FRENCH, 1962). Portanto, a prevalência das infecções por BHV-5 é desconhecida, uma vez que,

até o presente momento, não existem testes sorológicos capazes de diferenciar estas infecções daquelas causadas por BHV-1 (ROEHE et al., 1997). Em levantamentos sorológicos, é importante a determinação dos níveis de anticorpos, tanto frente a amostras de BHV-1 quanto de BHV-5, caso contrário uma significativa proporção de amostras positivas para um ou outro agente poderá não ser detectada (TEIXEIRA et al., 1996).

Com base no interesse despertado pela existência de diferentes amostras de herpesvírus bovino e pela crescente ocorrência de infecções encefalitogênicas causadas pelo BHV-5, este estudo teve como objetivo a produção e caracterização de anticorpos monoclonais (AcMs) contra antígenos do BHV-5.

MATERIAL E MÉTODOS

Células

As células utilizadas para a produção dos antígenos virais e triagem dos hibridomas foram da linhagem MDBK (Madin Darby Bovine Kidney). Estas células foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,2 ml/l de enrofloxacin a 5%, seguindo metodologia usual (PAUL, 1970). As células de mieloma da linhagem Sp2/

1. Trabalho elaborado como parte da Dissertação de mestrado da primeira autora.

2. Méd. Vet., M.Sc. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor – CPVDF – Caixa Postal 47, 92990-000 Eldorado do Sul – RS/BRASIL.

3. Estudante de graduação do Curso de Farmácia – Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DM-ICBS/UFRGS). Bolsista de Iniciação Científica.

4. Méd. Vet., M.Sc. – IRFA Química e Biotecnologia Industrial Ltda.

5. Méd. Vet. – FEPAGRO/CPVDF

6. Méd. Vet., M.Sc. – Departamento de Medicina Veterinária, UFMS.

7. Méd. Vet., Ph.D. – FEPAGRO/Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, Caixa Postal 2076, 90001-970 Porto Alegre – RS/BRASIL. DM-ICBS/UFRGS, E-mail: proche@vortex.ufrgs.br – Autor para correspondência.

Recebido para publicação em 25/11/1997.

O-Ag14 foram utilizadas para a produção dos hibridomas. Estas células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 0,3 g/l de glutamina, 0,11 g/l de dextrose, 2,3 g/l de HEPES, 2,0 g/l de bicarbonato de sódio e 50mg/ml de gentamicina. O soro fetal utilizado no crescimento celular foi previamente testado para garantir a inexistência de anticorpos específicos contra BHV-1 e BHV-5, assim como contaminação por bactérias, fungos, micoplasma e pelo Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV).

Amostras virais

As amostras de vírus foram consideradas como pertencendo ao subtipo 5 com base nas características clínico-epidemiológicas dos casos dos quais foram isoladas. Estas amostras apresentaram um perfil de reatividade distinto daquele apresentado por amostras de BHV-1 frente a AcMs produzidos contra este último (ROEHE et al., 1997). A amostra de BHV-5 "EVI 88" foi utilizada nas imunizações dos camundongos e triagem dos hibridomas. Esta amostra é proveniente de um caso de encefalite bovina e possui um perfil de reatividade compatível com BHV-5 quando testada frente a AcMs já disponíveis no laboratório (SILVA, 1995). A amostra "EVI 88" e as demais amostras utilizadas neste trabalho foram obtidas dos estoques do Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF) e estão citadas e referenciadas na Tabela 1.

Produção de antígeno

As células MDBK cultivadas em garrafas de ROUX receberam 5 ml/garrafa de suspensão viral a uma multiplicidade de infecção de 0,1 a 1 dose infectante/célula para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀). Quando o efeito citopático (ECP) atingiu aproximadamente 90%, a suspensão foi coletada e centrifugada a 2.000 x g por 10 minutos, sendo o "pellet" de células desprezado. O sobrenadante obtido centrifugado a 100.000 x g por 2 horas. O pellet de vírus foi então ressuspensão em MEM sem SFB, sonificado a 60 microamperes (Ultrasonics Ltd.) três vezes durante 30 segundos, com intervalos de 30 segundos.

Produção de anticorpos monoclonais

Camundongos da linhagem endocruzada BALB/c com 45 a 60 dias de idade foram inoculados intraperitonealmente com uma emulsão contendo 250ml de antígeno viral e 250ml de adjuvante completo de Freund (ACF). Estes camundongos foram reinoculados duas vezes com intervalos de 21 dias, com uma emulsão semelhante, somente substituindo o ACF por adjuvante incompleto de Freund. Cinco dias antes de cada fusão, os mesmos foram inoculados via intravenosa com 200ml de antígeno viral sem adjuvante. O método para a preparação dos hibridomas foi essencialmente descrito por

KÖHLER e MILSTEIN (1975) com algumas adaptações sugeridas por HARLOW e LANE (1988): o baço do camundongo imunizado foi removido, os esplenócitos foram separados com o auxílio de pinças e lavados duas vezes com meio RPMI sem SFB. As células de mieloma foram lavadas uma vez igualmente em meio RPMI sem SFB e misturadas aos esplenócitos numa proporção de 4 a 8 linfócitos para uma célula de mieloma. A mistura foi submetida a um processo de lavagem e a fusão das células foi realizada pela adição cuidadosa de polietilenoglicol (PEG) fundido a 56°C e diluído a 30% em meio RPMI sem SFB contendo 15% de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a fusão, a mistura foi centrifugada a 1.000 x g por 10 minutos e o pellet celular ressuspensão em 60 ml de meio RPMI suplementado com HAT (Hipoxantina 0,1 mM, Aminopterina 0,0004 mM, Timidina 0,016 mM) e 20% de SFB. A suspensão celular foi distribuída em microplacas de 96 orifícios a uma concentração de 1x10⁶ células/ml e as placas foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo 3% de CO₂. O meio HAT foi trocado em 50% no terceiro, sétimo, décimo e décimo quarto dias após a fusão. No décimo sétimo dia, o meio HAT foi substituído em 50% por meio RPMI contendo HT (Hipoxantina 0,1mM e Timidina 0,016mM) e 10% de SFB que, por sua vez, também foi trocado em 50% por mais quatro vezes. Os hibridomas produtores de anticorpos para amostra EVI 88 foram triados pela técnica de imunoperoxidase (IPX), expandidos e clonados por, no mínimo, duas vezes através da técnica das diluições limitantes (KÖHLER e MILSTEIN, 1975). Os hibridomas clonados foram testados frente a 25 amostras de herpesvírus em testes de IPX e em sua capacidade de produzir anticorpos neutralizantes em testes de soroneutralização.

Imunoperoxidase (IPX) sobre cultivos celulares

O teste de IPX permite a seleção dos hibridomas positivos, através da capacidade de ligação dos AcMs produzidos por estes, às células infectadas (SILVA, 1995). Células MDBK foram cultivadas em microplacas de 96 orifícios e infectadas com 100 DICC₅₀ da amostra viral EVI 88. Quando evidenciado o início do ECP as placas foram submetidas à fixação das células com acetona a 20% e secagem a 37°C durante 4 horas. Para a execução do teste de IPX, as células foram reidratadas por 5 minutos com PBS T-80 (8,5 g NaCl; 1,55 g Na₂HPO₄·2H₂O; 0,23 g; NaH₂PO₄·H₂O; 5 ml Tween 80; H₂O q.s.p. 1 l). Após a remoção do líquido hidratante, foram adicionados às placas 50 ml de sobrenadante puro do cultivo dos hibridomas. Soro controle positivo (soro policlonal anti-EVI 88 produzido em camundongos) e negativo (soro de camundongos normais) foram incluídos em cada teste. As placas foram submetidas a incubação a 37°C durante 15 minutos e, logo a seguir, a três

lavagens com PBS T-80. Foram adicionados, então, 50 ml de conjugado peroxidase/anti imunoglobulina de camundongo (Sigma), adequadamente diluído em líquido de diluição (29,5 g NaCl; 1,55 g Na₂HPO₄·2H₂O; 0,23 g NaH₂PO₄·H₂O; 5 ml Tween 80; H₂O q.s.p. 1 l; pH 6,4) e subsequentemente as placas foram novamente incubadas a 37°C por 15 minutos. Após novo processo de lavagem, a prova foi revelada pela adição do substrato AEC (15 ml dimetil-formamida; 0,1 g 3-amino-9-etilcarbazol) diluído como recomendado (HARLOW e LANE, 1988).

Isotipagem dos AcMs

Os isotipos dos AcMs produzidos foram determinados através de um teste imunoenzimático do tipo ELISA de captura, adquirido comercialmente (Sigma) e seguindo metodologia recomendada pelo fabricante.

Análise da reatividade dos AcMs por IPX frente às amostras virais

O teste de IPX também foi utilizado para análise da atividade dos anticorpos monoclonais produzidos frente a diferentes amostras de BHV-1 e BHV-5 listadas na Tabela 1. O teste foi realizado como descrito na triagem dos hibridomas e repetido, no mínimo, uma vez.

Teste de soroneutralização (SN)

O teste de SN foi utilizado para a avaliação da capacidade neutralizante dos AcMs produzidos, frente a

amostra "EVI 88", isolada em 1995 a partir de um caso de encefalite (ROEHE et al., 1997). Para a realização do teste seguiu-se essencialmente protocolo descrito por HOUSE e BAKER (1971). Para a avaliação da capacidade neutralizante dependente de complemento, o teste de SN foi repetido na presença de 10% de soro de cobaio como fonte de complemento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados dez hibridomas reativos para a amostra EVI 88 de BHV-5. Estes hibridomas foram denominados BBD10, 2B6, 2C3, 2C5, 3A2, 3B12, 3D2, 3D11, 5E2 e 6A2. A isotipagem dos hibridomas revelou que um dos AcMs (BBD10) era pertencente à classe IgM. Os demais AcMs (2B6, 2C3, 2C5, 3A2, 3B12, 3D2, 3D11, 5E2 e 6A2) são pertencentes à classe IgG₁. No teste de SN, nenhum dos AcMs produzidos apresentou capacidade neutralizante frente à amostra EVI 88, tanto na presença como na ausência de complemento.

Teste de IPX para análise da reatividade dos AcMs frente às amostras virais:

Os dez hibridomas positivos foram analisados frente às 10 amostras de BHV-5. O resultado desta análise encontra-se na Tabela 2. Nove dos AcMs produzidos reconheceram antígenos em todas as amostras de BHV-5. O AcM BBD10 reconheceu todas as amostras de BHV-5 testadas, à exceção da amostra EVI 190.

TABELA 1 – Amostras de Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5) utilizadas na caracterização dos anticorpos monoclonais produzidos, de acordo com o quadro clínico associado e procedência

AMOSTRA	QUADRO CLÍNICO	PROCEDÊNCIA
EVI 88	Encefalite	CPVDF ¹
EVI 345	Encefalite	CPVDF ¹
EVI 190	Encefalite	CPVDF ¹
EVI 289	Encefalite	CPVDF ¹
EVI 214	Encefalite	CPVDF ¹
TAIM	Encefalite	UFPEL ²
SV 136/88	Encefalite	HEINLEIN et al., 1993 ³
A 663	Encefalite	CARRILLO et al., ⁴ 1983
AA 01	Encefalite	FUEL ⁴
AA 05	Encefalite	FUEL ⁴

1- Amostras isoladas no Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor; 2- Amostras gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Telmo Vidor, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL); 3- Amostras cedidas pelo Prof. Dr. Rudi Weiblen, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); 4- Amostras cedidas pelo Prof. Dr. Amauri Alfieri, Fundação Universidade Estadual de Londrina (FUEL); ** De acordo com SILVA, (1995)

TABELA 2 – Perfil de reatividade dos anticorpos monoclonais (AcMs) produzidos, frente a diferentes amostras de Herpesvírus Bovino tipo 5 (BHV-5)

Amostras de vírus	AcMs									
	BB D10	2B6	2C3	2C5	3A2	3B1	3D2	3D1	5E2	6A2
EVI 88	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
EVI 345	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
EVI 190	.	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
EVI 289	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
EVI 214	2+	4+	2+	2+	4+	4+	4+	4+	4+	2+
TAIM	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
SV136/88	2+	2+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
A 663	1+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
AA 01	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
AA 05	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+

Obs: – Reação negativa; 1+ Reação de intensidade baixa; 2+ Reação de intensidade média; 3+ Reação de intensidade forte; 4+ Reação de intensidade muito forte

Devido ao elevado nível de semelhança antigênica entre BHV-1 e BHV-5, pouca importância vinha sendo dada ao BHV-5 como agente de uma enfermidade distinta daquelas causadas por amostras típicas de BHV-1. No hemisfério norte, mesmo em casos de encefalite associadas a herpesvírus bovinos, a maioria das amostras de vírus isoladas tem sido BHV-1, e não BHV-5 (d'OFFAY et al., 1993). A similaridade antigênica entre os dois tipos de vírus, associada à pequena ocorrência do BHV-5 naquele hemisfério, certamente vinham contribuindo para o limitado conhecimento sobre a epidemiologia de infecções pelo BHV-5, bem como sobre sua importância para a pecuária mundial. Por esta razão, com o intuito de fornecer subsídios para a análise de infecções por BHV-5 e das características antigênicas desse tipo de vírus, o presente estudo foi realizado visando a produção de anticorpos monoclonais contra antígenos do BHV-5. A amostra EVI 88 foi escolhida para a produção dos AcMs por ter sido isolada de um caso clínico típico de encefalite bovina, além de apresentar um perfil de reatividade comum às demais amostras de BHV-5 disponíveis no laboratório, quando testada frente a AcMs preparados com antígenos de BHV-1 (SILVA, 1995). Além disso, seu perfil de restrição enzimática é similar ao de outras amostras de BHV-5 descritas na literatura (d'OFFAY et al., 1993; HEINLEIN et al., 1993), e distinto daquele apresentado por amostras de BHV-1 (dados não apresentados).

Para a triagem dos hibridomas, titulação e caracterização dos AcMs produzidos frente às amostras virais, o teste escolhido foi a IPX. Embora outros autores tenham utilizado ensaios imunoenzimáticos do tipo

ELISA com essa finalidade (CHANG et al., 1986; MARSHALL et al., 1986; SHEN et al., 1981), trabalhos anteriores realizados pelo mesmo grupo (SILVA, 1995) evidenciaram que o teste de ELISA por vezes não permitia uma diferenciação clara entre resultados positivos e negativos, gerando um grande número de resultados inconclusivos por ocasião da seleção dos hibridomas, o que dificultava em muito o trabalho de triagem. O teste de IPX, embora menos sensível que os ensaios imunoenzimáticos (HARLOW e LANE, 1988), se mostrou bastante eficaz e seguro na diferenciação dos resultados positivos e negativos, facilitando a operacionalização das triagens. Não obstante, em trabalhos futuros, seria conveniente utilizar o teste de ELISA como prova adicional ao IPX na seleção de hibridomas, uma vez que é possível que alguns anticorpos sejam reagentes somente em testes de ELISA, e não à IPX. Assim, alguns AcMs poderiam ser reconhecidos por somente um dos dois métodos de triagem, os quais, nesse caso, poderiam ser perdidos.

Igualmente, para a caracterização dos AcMs produzidos frente a diferentes amostras de herpesvírus, a principal ferramenta utilizada também foi o teste de IPX. Por esta técnica, nove dentre os dez AcMs obtidos reagiram com todas as amostras de BHV-5. Esta constatação revela que os AcMs aqui obtidos apresentam potencial para uso com ferramentas para o diagnóstico de infecções pelo BHV-5. Em estudo prévio foi demonstrada a possibilidade de diferenciar entre amostras de BHV-1 e BHV-5, porém, somente através da ausência de reatividade de AcMs anti-BHV-1 frente a algumas amostras de BHV-5 (SILVA, 1995; ROEHE et al., 1997).

Em comparação com aqueles, os AcMs anti-BHV-5 aqui descritos representam um passo evolutivo, uma vez que os mesmos reconhecem positivamente epitopos presentes em amostras de BHV-5. No entanto, não foi ainda avaliada a capacidade de reação dos mesmos frente a amostras de BHV-1 ou outros herpesvírus. Esta avaliação permanece mandatória, e deverá ser realizada em estudos futuros, envolvendo um número significativo de amostras de herpesvírus bovinos e de outras espécies.

Um dos AcMs (BBD10) reconheceu um epitopo comum a nove das dez amostras de BHV-5 aqui testadas. Este AcM merece atenção especial, pois foi o único que apresentou perfil de reatividade distinto dentre todos os dez AcMs obtidos. No entanto, seu perfil de reatividade distinto já permite antever diferenças entre as amostras de vírus classificadas como tipo 5. Estas diferenças, na verdade, tem sido também detectadas em testes de neutralização cruzada (dados não apresentados).

A maioria dos AcMs aqui produzidos reagiu com quase todas as amostras de BHV-5 testadas. O perfil uniforme de reatividade dos AcMs obtidos revela a existência de epitopos imunodominantes na preparação antigênica utilizada. Isto indica que a obtenção de AcMs que reconheçam diferenças menores entre amostras provavelmente necessitarão de preparações de antígeno mais purificadas. A utilização de antígenos preparados com proteínas purificadas por eletroforese ou por imunoafinidade poderiam ainda proporcionar preparações contendo epitopos mais raros, aumentando assim a chance de obtenção de AcMs com maior capacidade discriminatória (HARLOW e LANE, 1988).

Estudos subsequentes deverão ser realizados a fim de determinar com precisão em que proteínas encontram-se os epitopos reconhecidos por estes AcMs. Além disso, a avaliação dos mesmos frente a outros herpesvírus, particularmente BHV-1, será objeto de estudo futuro.

CONCLUSÕES

1— Os AcMs produzidos foram capazes de reconhecer antígenos em todas as dez amostras de BHV-5 testadas no presente trabalho.

2— Os perfis de reatividade obtidos sugerem que existem diferenças antigênicas entre amostras de BHV-5.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- BAGUST, T.J.; CLARKE L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *Journal of Comparative Pathology*, London, v. 82, p. 375-383, 1972.
- 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, p.17-34, 1990.
- CARRILLO, B.J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A.A.; VAZQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPICHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, Jena, v. 30, p. 327-332, 1983.
- CHANG, L.W.S.; ZEE, Y.C.; PRITCHETT, R.F.; ARDANS, A.A. Neutralizing monoclonal antibodies directed to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Archives of Virology*, Viena, v. 88, p. 203-215, 1986.
- D'OFFAY, J.M., MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle to North America. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 54, p. 534-539, 1993.
- ENGELS, M.; GIULIANI, C.; WILD, P.; BECK, T.M.; LOEPF, E.; WYLER, R. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Research*, Amsterdam, v. 6, p.57-73, 1986.
- FRENCH, E.L. Relationship between infectious bovine rhinotracheitis and a virus isolated from calves with encephalitis. *Australian Veterinary Journal*, Brunswick, v. 38, p. 555-556, 1962.
- HARLOW, E; LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory: Cold Spring Harbour, New York, 1988. 726 p.
- 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 B*, Berlin, v. 40, p.125-130, 1993.
- HOUSE, J.A.; BAKER, J.A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. *Cornell Veterinarian*, New York, v. 61, p.320-335, 1971.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, London, v. 256, p. 495-497, 1975.
- MARSHALL, R.L.; RODRIGUEZ, L.L. LETCHWORTH III, G.J. Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. *Journal of Virology*, Washington, v. 3, p.745-753, 1986.
- PAUL, J. *Cell and tissue cultures*. 4. ed. London: Livingstone, 1970. 470p.
- PORTERFIELD, S.J. *Andrewes' viruses of vertebrates*. 5. ed. London: Baillière Tindall, 1989. 457 p.
- RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. Meningoencefalite e necrose da córtex cerebral em bovinos causados por herpesvírus bovino - 1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 9, n.1/2, p.13-16, 1989.
- ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B., OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da

rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e vírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 41-44, 1997.

SHEN, D.T.; BURGER, D.; LI, Z.; GORHAM, J.R. Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type 1, Los Angeles strain. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 28, p. 25-37, 1991.

SILVA, T.C. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1)**. Porto Alegre, UFRGS, 1995. 73p. Dissertação (Mestrado) – Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

TEIXEIRA, M.B.; ROEHE, P.M.; COELHO, C.S.S.; TEIXEIRA, J.C.; ROSA, J.C.A.; SILVA, T.C. Evaluation of antibodies to bovine herpesviruses types 1 (BHV-1)

and 5 (BHV-5) in cattle by serum neutralization. In: *ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA*, 8., 1996. *Anais...* São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, 24-27/11. p. 22

WEIBLEN, R.; LOMBARDO DE BARROS, C.S.; CANABARRO, T.F.; FLORES, I.E Bovine meningo-encephalitis from IBR virus. *Veterinary Record*, London, v. 124, p. 666-667, 1989.

AGRADECIMENTOS

Pelo apoio na realização do trabalho de pesquisa, agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.