

Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais¹

V.F. Souza^{2,3}, S.V. Melo^{2,3}, P.A. Esteves^{2,3}, C.S. Schmidt^{2,3}, D.A. Gonçalves^{2,3}, R. Schaefer^{2,3}, T.C. Silva², R.S. Almeida², F. Vicentini², A.C. Franco^{2,3}, E.A. Oliveira^{2,3}, F.R. Spilki², R. Weiblen⁴, E.F. Flores⁴, R.A. Lemos⁵, A.A. Alfieri⁶, E.M. Pituco⁷ e P.M. Roehle^{2,3*}

ABSTRACT- Souza V.F., Melo S.V., Esteves P.A., Schmidt C.S.R., 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. & Roehle P.M. 2002. [**Monoclonal antibody characterization of bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5).**] Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 22 (1): 13-18. Depto Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, and Centro de Pesquisas Universitárias Desidério Finamor, Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS 90001-970, Brazil. E-mail: proehle@vottex.ufrgs.br

The antigenic profile of 45 herpesviruses (44 viruses from cattle, including six reference BHV-1 strains and 15 putative BHV-1; three reference BHV-5 strains and 20 putative BHV-5) and one buffalo isolate (BuHV) were examined with a panel of monoclonal antibodies (Mabs) prepared against bovine herpesvirus antigens. Tests were performed by immunoperoxidase (IPX) on infected cell cultures, with the Mabs as primary antibodies. Immunostaining allowed the differentiation between types 1 and 5 viruses. All isolates from cases of encephalitis displayed BHV-5 profiles. Four BHV-5 isolates obtained from geographically distinct areas displayed different and highly variable IPX patterns of reactivity. Two viruses with BHV-5 antigenic profile were isolated from semen of asymptomatic bulls. The results showed that the antigenic characterization with the Mab panel employed here is useful for typing BHV-1 and BHV-5 isolates.

INDEX TERMS: Bovine herpesvirus, BHV-1, BHV-5, monoclonal antibodies, immunoperoxidase.

RESUMO- O perfil antigênico de 45 herpesvírus (44 de bovinos, sendo seis amostras de referência de BHV-1 e 15 prováveis BHV-1; três amostras de referência de BHV-5 e 20 prováveis

veis BHV-5) e uma amostra de herpesvírus bubalino (BuHV) foi examinado com um painel de anticorpos monoclonais (Acms) produzidos contra antígenos de herpesvírus bovinos. Para os exames, foi utilizada a prova de imunoperoxidase (IPX) sobre cultivos de células infectadas, tendo os Acms como anticorpos primários. A determinação dos padrões de reatividade das amostras de vírus frente aos Acms permitiu a diferenciação entre os tipos 1 e 5. Todas as amostras isoladas de casos de encefalite apresentaram perfil de BHV-5. Quatro amostras de BHV-5 isoladas de áreas geograficamente distintas apresentaram perfis de reatividade diferenciados em relação às demais amostras do tipo 5. Duas amostras de vírus com perfil antigênico de BHV-5 foram isoladas de sêmen de animais infectados. Estes resultados comprovam a utilidade da caracterização antigênica com este painel de Acms na tipagem de amostras de BHV-1 e BHV-5.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Herpesvírus bovino 1, BHV-1, herpesvírus bovino 5, BHV-5, anticorpos monoclonais, imunoperoxidase.

¹Aceito para publicação em 9 de janeiro de 2002.

²Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 90050-170.

³Equipe de Virologia, FEPAGRO Saúde Animal, Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (CPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS 90001-970.

⁴Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900.

⁵Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS 79070-900.

⁶Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR 86051-970.

⁷Instituto Biológico, São Paulo, SP.

*Autor correspondente. Caixa Postal 2076, Porto Alegre RS 90001-970. E-mail: proehle@vortex.ufrgs.br

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) e o herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* (Porterfield 1989). O BHV-1 tem sido associado a várias síndromes, tais como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite infecciosa (IPV), balanopostite, conjuntivite e abortos, tipicamente com alta morbidade e baixa mortalidade (Gibbs & Rweyemamu 1977, Kahrs 1977). O BHV-5, por sua vez, causa encefalites ou meningoencefalites, usualmente afetando animais até oito meses de idade, embora ocasionalmente envolvendo animais mais velhos, com baixa morbidade e alta mortalidade (French 1962, Bulach & Studdert 1990, Salvador et al. 1998). Até recentemente, amostras de BHV-5 eram consideradas “variantes encefalitogênicas” de BHV-1, devido às amplas reações cruzadas entre os dois vírus detectadas em testes sorológicos (Bratanich et al. 1991, Teixeira et al. 1998). Entretanto, as características epidemiológicas distintas destas infecções, amparadas em estudos antigênicos e moleculares, levaram à criação do tipo 5 para enquadrar este “novo” agente encefalitogênico em um *taxon* diferente (Roizman et al. 1992). Até o presente, não é possível determinar a real prevalência de infecções por BHV-5, visto que testes sorológicos capazes de distinguir respostas frente a BHV-1 e BHV-5 ainda não se encontram disponíveis. As infecções pelo BHV-5 são raras no hemisfério norte (D’Offay et al. 1995, Cascio et al. 1999), diferindo das observações na América do Sul. No Brasil, evidências acumuladas por grupos atuantes na área sugerem que uma significativa proporção de bovinos cujo diagnóstico sorológico havia sido estabelecido como BHV-1 eram provavelmente causadas por BHV-5 (Teixeira et al. 1998, Heinlein et al. 1993, Weiblen et al. 1989). Não obstante, a verdadeira prevalência de infecções pelo BHV-1 e BHV-5 só será precisamente determinada quando testes diferenciais se tornarem amplamente disponíveis.

Na busca de um melhor entendimento da biologia desses vírus, 44 herpesvírus bovinos, incluindo seis amostras de referência de BHV-1 e outras 15 amostras de prováveis BHV-1, bem como três amostras de referência de BHV-5 e 20 prováveis BHV-5, além de um isolado de herpesvírus bubalino, tiveram sua composição antigênica examinada com um painel de anticorpos monoclonais (Acms) dirigidos contra antígenos de BHV-1 e BHV-5, em testes de imunoperoxidase sobre cultivos celulares infectados. O presente estudo descreve os achados destas análises.

MATERIAL E MÉTODOS

Vírus

As amostras de vírus utilizadas neste estudo estão listadas no Quadro 1. Seis amostras de referência de BHV-1 foram incluídas: “Los Angeles”, “Cooper”, “Iowa” (Madin et al. 1956), “Oxford” (Dawson et al. 1962), “Lam gE” e “Lam” (Van Engelenburg et al. 1994). Para BHV-5, as três amostras de referência utilizadas foram “N569” (French 1962), “A663” (Carrillo et al. 1983) e “A613” (Caron et al. 2001). Além dessas, foi incluída uma amostra de herpesvírus bubalino (BuHV), denominada “Buffalo G”. Todas as demais foram obtidas de rebanhos brasileiros. A maior parte delas foi obtida dos

estados do Mato Grosso do Sul (ou áreas vizinhas) e do Rio Grande do Sul. Uma amostra (“AA Par”) foi isolada de um caso de encefalite em uma fazenda no Paraguai, próxima à fronteira com o Brasil. A amostra “ISO 97/45” é proveniente do Estado de Minas Gerais (MG). A amostra “ISO 97/87” foi isolada no Estado de São Paulo (SP). A amostra P96/169 foi isolada no Estado do Rio de Janeiro (RJ).

Células

Células da linhagem “Madin Darby Bovine Kidney” (MDBK; ATCC CCL-22) foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM, Inlab) contendo 6-10% de soro fetal bovino (Nutricell) e 10 mg/mL de enrofloxacina (Baytril), sendo multiplicadas seguindo técnicas usuais (Freshney 1992). Estoques de vírus foram produzidos pela inoculação de 250 mL das suspensões virais com títulos entre $5 \times 10^{5.0}$ e $5 \times 10^{7.0}$ doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀), em células MDBK. Quando o efeito citopático se tornou evidente em 90% das células da monocamada, as garrafas foram congeladas a -70° C, descongeladas rapidamente e o sobrenadante clarificado por centrifugação a 1500 x g por 10 minutos, dividido em alíquotas e estocado a -70° C.

Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais (Acms) foram obtidos pela imunização de camundongos BALB-C com a amostra Oxford de BHV-1 (Dawson et al. 1962) ou com a amostra EVI 88/95 de BHV-5, como previamente descrito (Almeida et al. 1997, Roehe et al. 1997). O soro policlonal (controle positivo) foi obtido de camundongos inoculados com a amostra “EVI 88/95”. Soro de camundongos não imunizados foi usado como controle negativo.

Teste de imunoperoxidase

O teste de imunoperoxidase sobre monocamadas de cultivos celulares (IPX, Saunders 1977), foi realizado com pequenas modificações descritas previamente (Almeida et al. 1997, Roehe et al. 1997).

RESULTADOS

Os resultados obtidos aos testes de IPX com os vírus examinados são apresentados no Quadro 2. As amostras de vírus foram dispostas com base nos perfis de reatividade observados. Três padrões de reatividade bastante distintos puderam ser diferenciados. O primeiro perfil a ser destacado foi o apresentado por 17 das 18 amostras de BHV-1, caracterizado pela reatividade com nove dos dez Acms preparados contra BHV-5, bem como pela reação com os quatro Acms preparados contra BHV-1. O segundo perfil foi o apresentado pela maioria das amostras de BHV-5, as quais reagiram com todos os Acms anti-BHV-5 mas somente com um dos Acms anti-BHV-1 (Acm 2G5). Estes dois perfis permitiram distinguir amostras de BHV-1 e BHV-5. Um terceiro perfil foi o revelado pelos Acms 3D2, 5E2 e 2G5, os quais reagiram com todas as amostras testadas.

Dentre as amostras com histórico indeterminado (“Ind 1, 2 e 3”), duas delas (“Ind 1 e 2”) apresentaram um perfil de BHV-1, enquanto que a amostra “Ind 3” apresentou perfil de BHV-5. Duas amostras isoladas de sêmen (“V175” e “Lim”) também apresentaram perfil de BHV-5.

Outras amostras apresentaram variações em seu perfil de reatividade. Duas amostras de BHV-1gE-negativas não reagiram com o Acm 2C5. As amostras de BHV-5 “ISO 97/

Quadro 1. Amostras de herpesvírus examinadas e provável tipo (determinado com base no quadro clínico apresentado pelo animal do qual a amostra foi isolada)

Amostra	Suposto tipo de vírus	Quadro clínico ou origem da amostra	País ou Estado de origem	Referência / fornecedor da amostra
Los Angeles	BHV-1^a	IBR ^b	EUA ¹	Madin et al. 1956 (13)
Cooper	"	"	"	"
Iowa	"	"	"	"
Oxford	"	"	GBR ²	Dawson et al. 1962 (13)
Lam	"	"	HOL ³	12
Lam gE⁻	"	DIVA ^c	"	"
SV 265/96 gE ⁻	"	DIVA	RS ⁴	13
Retiro	"	IBR	"	14
Camapuã	"	"	"	13
EVI 123/98	"	"	"	"
SV 265/96	"	"	"	15
SV 035/90	"	"	MS ⁵	Heinlein et al. 1993 (13)
SV 056/90	"	IPV ^d	RS	"
SV 453/93	"	"	"	15
EVI 014/94	"	Feto abortado	"	13
009	"	Sêmen ^e	"	16
V 175	"	"	"	"
Lim	"	"	"	"
Ind 1	? ^f	?	?	13
Ind 2	?	?	?	"
Ind 3	?	?	?	"
A663	BHV-5	Encefalite	ARG ⁶	Carrillo et al. 1983 (15)
N569	"	"	AUS ⁷	French 1962/12
A 613	"	"	ARG	Caron et al. 2001 (15)
EVI 340/96	"	"	MS	13
EVI 88/95	"	"	"	"
EVI 214/95	"	"	"	"
EVI 345/96	"	"	"	"
Osório	"	"	RS	"
Guaporé	"	"	"	"
RP	"	"	"	14
AA Par	"	"	PAR ⁸	17
AA 01	"	"	MS	"
AA 05	"	"	"	"
SV 136/88	"	"	RS	15
Taim	"	"	"	14
N 533/99 ^g	"	"	"	13
N 534/99 ^g	"	"	"	"
N 535/99 ^g	"	"	"	"
Iso 97/45	"	"	MG ⁹	18
Iso 97/87	"	"	SP ¹⁰	"
P 96/160	"	"	RJ ¹¹	"
P 169/87	"	"	"	"
Buffalo 6	"	Prepúcio	BuHV	St. George & Philpott 1992 (12)

^aAmostras de referência em negrito;

^bRinotraqueíte infecciosa bovina;

^cAmostras de vacinas diferenciais gE⁻ (Van Engelenburg et al. 1994);

^dVulvovaginite pustular infecciosa;

^eIsolados de sêmen de touros assintomáticos (Esmeraldino 1996);

^fIndeterminado;

^gAmostras de diferentes animais de um mesmo surto de meningoencefalite.

1: Estados Unidos da América; 2: Grã-Bretanha; 3: Holanda; 4: Rio Grande do Sul; 5: Mato Grosso do Sul; 6: Argentina; 7: Austrália; 8: Paraná; 9: Minas Gerais; 10: São Paulo; 11: Rio de Janeiro; 12: Institute for Mammalian Virology, Lelystad, Netherlands (ID-DLO); 13: Equipe de Virologia, Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (CPVDF); 14: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL); 15: Setor de Virologia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); 16: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); 17: Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual de Londrina (UEL); 18: Instituto Biológico de São Paulo (IB-SP).

Quadro 2. Perfil de reatividade das amostras de herpesvírus examinadas com os anticorpos monoclonais (Acms) em testes de imunoperoxidase (IPX). Tipos (1 ou 5) determinados com base nos perfis de reatividade obtidos

Amostras ^a	Tipo	Acms anti-BHV-5								Acms anti-BHV-1					
		BD10	2B6	2C3	2C5	3A2	3B12	3D11	6A2	3D2	5E2	2G5	5A5	7F12	11H6
Los Angeles	BHV-1	[Reactive profile for BHV-1: Positive for BD10, 2B6, 2C3, 2C5, 3A2, 3B12, 3D11, 6A2, 3D2, 5E2; Negative for 2G5, 5A5, 7F12, 11H6]													
Cooper	"														
Iowa	"														
Oxford	"														
Lam	"														
Lam gE	"														
SV 265/96 gE	"														
Retiro	"														
Camapuã	"														
EVI 123/98	"														
SV 265/96	"														
SV 035/90	"														
SV 056/90	"														
SV 453/93	"														
EVI 014/94	"														
009	"														
Ind1	"														
Ind2	"														
A663	BHV-5	[Reactive profile for BHV-5: Positive for 2G5, 5A5, 7F12, 11H6; Negative for BD10, 2B6, 2C3, 2C5, 3A2, 3B12, 3D11, 6A2, 3D2, 5E2]													
N569	"														
A613	"														
V175	"														
Lim	"														
Ind3	"														
EVI 340/96	"														
EVI 88/95	"														
EVI 214/95	"														
EVI 345/96	"														
Osório	"														
Guaporé	"														
RP	"														
AA Par	"														
AA 01	"														
AA 05	"														
SV 136/98	"														
Taim	"														
N533/99	"														
N534/99	"														
N535/99	"														
ISO 97/45	"														
ISO 97/87	"														
P 96/160	"														
P 169/87	"														
EVI 190/93	"														
Buffalo 6	BuHV	[Reactive profile for BuHV: Positive for BD10, 2B6, 2C3, 2C5, 3A2, 3B12, 3D11, 6A2, 3D2, 5E2; Negative for 2G5, 5A5, 7F12, 11H6]													

^aAmostras de referência em negrito. BHV-1: herpesvírus bovino tipo 1; BHV-5: herpesvírus bovino tipo 5; BuHV: herpesvírus bubalino. Amostras denominadas como no Quadro 1. Espaços vazios = reação negativa. Áreas negras = reação positiva.

45", "ISO 97/87", "P 169/96" e "P 169/87" não reagiram com diversos Acms anti-BHV-5, diferenciando-as dos demais BHV-5. As amostras "EVI 190/93" (BHV-5) e "Buffalo 6" apresentaram perfis de reatividade iguais, não sendo reconhecidos pelos Acms BD10, 5A5, 7F12 e 11H6 (Quadro 2).

DISCUSSÃO

O BHV-1 está presente em forma enzoótica na maioria dos países onde a pecuária bovina é praticada (Gibbs &

Rweyemamu 1977). O BHV-5, por sua vez, parece peculiar em sua distribuição; raras são as amostras de BHV-5 isoladas no hemisfério norte (D'Offay et al. 1995, Cascio et al. 1999). Por outro lado, no hemisfério sul, a detecção do BHV-5 vem aumentando significativamente. No Brasil, casos clínicos de encefalites por BHV-5 foram a segunda maior causa de encefalites com etiologia determinada, suplantada somente pela raiva (Sanches et al. 2000).

Os perfis de reatividade observados permitiram a dife-

reconhecimento entre as amostras de BHV-1 e BHV-5. O Acm BD10 reconheceu antígenos em 25 das 26 amostras do tipo 5 (à exceção da amostra "EVI 190/93"), bem como não reconheceu 17 das 18 amostras de BHV-1, sendo a única exceção a amostra Los Angeles. Note-se que esta amostra, em pelo menos um estudo, foi descrita como tendo sido obtida de um caso de encefalite (Engels et al. 1986), embora universalmente reconhecida como BHV-1.

Por outro lado, os Acms 5A5, 7F12 e 11H6 (preparados contra BHV-1), não reconheceram antígenos em nenhuma das amostras de BHV-5 testadas. O conjunto de resultados obtidos com esses Acms permitiu uma clara distinção entre amostras dos tipos 1 e 5.

Os padrões identificados permitiram também inferir o provável tipo de amostras com histórico desconhecido. Assim, das três amostras com origem indeterminada, duas se tratavam de prováveis BHV-1, sendo a outra um provável BHV-5. Além disso, das três amostras isoladas de sêmen, uma apresentou perfil de BHV-1 ("009"), enquanto as outras duas amostras ("V175" e "Lim"), apresentaram perfil de BHV-5. Em estudo subsequente, os tipos destas amostras foram confirmados através de análises genômicas com enzimas de restrição (D'Arce, 2000, Silva et al. 2000). Os vírus "V175" e "Lim" são, provavelmente, as primeiras amostras de BHV-5 isoladas de sêmen, confirmando a presença desse tipo de vírus em órgãos genitais, o que sugere que provavelmente o mesmo também possa ser transmitido por via sexual, tal qual o BHV-1 (Gibbs & Rweyemamu 1977, Esmeraldino 1996). A caracterização mais aprofundada destas amostras será objeto de estudos futuros.

O Acm BD10 não reagiu com o herpesvírus bubalino ("Buffalo 6"), originariamente considerada como BHV-1 (St. George & Philpott 1972). Entretanto, "Buffalo 6" não foi reconhecido pelos Acms 5A5, 7F12 and 11H6, como as amostras de BHV-5. Alguns autores sugeriram que BHV-1, BHV-5 e BuHV estariam em um nível de divergência genética similar em relação a um provável ancestral comum (Bulach & Studdert 1990). Com base nos resultados aqui obtidos, é claro o alto grau de semelhança antigênica apresentado pelos três vírus, o que favorece a hipótese de um ancestral comum. Note-se a amostra de BHV-5 "EVI 190/93" apresentou o mesmo perfil da amostra "Buffalo 6". Comparações futuras deverão ser realizadas para revelar com maior precisão o nível de identidade entre estas duas amostras.

As amostras "ISO 97/45", "ISO 97/87", "P 169/96" e "P 169/97", originadas de casos de encefalite, a despeito de apresentarem claro perfil de BHV-5 com os Acms mais discriminativos acima mencionados, reagiram pobremente com alguns dos Acms que reconheceram todas as demais amostras do tipo 5 (Acms "2B6", "2C3", "2C5", "3A2", "3B12", "3D11" e "6A2"). Este achado revela diferenças na constituição antigênica dessas amostras. É importante mencionar que estes vírus com perfis "atípicos" eram provenientes de regiões geográficas distintas, tendo sido isoladas nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, enquanto as demais haviam sido isoladas em sua maioria no Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. É possível que a segregação

geográfica, talvez associada a particularidades não identificadas no manejo, tenha levado a que amostras daqueles estados apresentassem maior variabilidade antigênica do que as encontradas nos outros estados. Entretanto, a confirmação desta hipótese terá que aguardar a identificação de um maior número de isolamentos de vírus destas áreas específicas.

As amostras Lam gE⁻ e SV 265 gE⁻ apresentam uma deleção no gene que codifica a glicoproteína E (gE), sendo utilizadas como vírus constituintes de vacinas diferenciais (Van Oirschot et al. 1997, Franco et al. 2001). Ambas apresentaram perfis iguais às demais amostras de BHV-1 examinadas, à exceção da reação negativa com o Acm 2C5. Este anticorpo provavelmente reconhece epitopos nesta proteína, razão pela qual o mesmo não reagiu com as duas amostras gE⁻.

Os Acms 3D2, 5E2 e 2G5 reconheceram todas as amostras de herpesvírus bovinos, sendo estes os mais amplamente reativos dentre todos os avaliados. Estes Acms não discriminativos em relação ao tipo de vírus poderão ter aplicações importantes, tais como o desenvolvimento de testes diagnósticos capazes de identificar tanto BHV-1 como BHV-5.

No presente estudo, os Acms foram utilizados em testes de IPX com a finalidade de revelar perfis antigênicos das amostras de vírus estudadas. Em estudos futuros, as análises com Acms deverão ser complementadas por estudos genômicos, envolvendo a determinação de perfis de restrição enzimática e de sequenciamento de genes. Tais estudos, alguns deles já em andamento (D'Arce et al. 2000, Silva et al. 2000) deverão ampliar o conhecimento da biologia do BHV-1 e BHV-5 e contribuir para a determinação da importância destes agentes à pecuária bovina em nosso meio.

Agradecimentos.- Este projeto foi financiado com recursos do PRONEX, CNPq, FAPERGS, Governo do Estado do Rio Grande do Sul. PMR é pesquisador 1C, e RW pesquisador 1B do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Almeida R.S., Melo S.V., Silva T.C., Oliveira L.G., Lemos R.A. & Roehle P.M. 1998. Produção de anticorpos monoclonais contra o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5). *Pesq. Vet. Gaúcha*, Porto Alegre, 4 (1): 67-72.
- Bratanich A.C., Sardi S.I., Smitsaart E.N. & Schudel A.A. 1991. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo - in vitro tests. *J. Vet. Med. B* 38:41-48.
- Bulach D.M. & Studdert M.J. 1990. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and Buffalo herpesvirus. *Arch. Virol.* 113: 17-34.
- Caron L.A., Flores E.F., Weiblen R., Scherer C.F., Irigoyen L.F., Roehle P.M., Odeon A. & Sur J-He. 2001. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet. Microbiol.* (In publication).
- Cascio K.E., Belknap E., Schultheiss P.C., Ames A.D. & Collins J.K. 1999. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *J. Vet. Diagn. Lab. Invest.* 11:134-139.
- Carrillo B.J., Ambrogi A., Schudel A.A., Vazques M., Dahme E. & Pospischil A. 1983. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B* 30:327-332.

- D'Arce R.C.F., Gisler A.C.F., Oliveira E.A.S., Schmidt C.S.R., Coswig L.T., Roehe P.M. & Arns C.W. 2000. Restriction endonuclease analysis of Brazilian isolates of herpesviruses types 1 and 5. *Virus Rev. Res.* 5 (2) (Supl. 1), Abstr. HS3, p.112.
- Dawson P.S., Darbyshire J.H., Losmore R.M., Paterson A.B. & Faull W.B. 1962. Infectious bovine rhinotracheitis (IBR). A clinical condition of the cattle occurring in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 74:1379-1383.
- D'Offay J.M., Ely R.W., Baldwin C.A., Whitenack D.L., Stair E.L. & Collins J.K. 1995. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:247-51
- Esmeraldino A.M.T. 1996. Detecção de vírus no sêmen bovino. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 95 p.
- Engels M., Giuliani C., Wild P., Beck T.M., Loepfe E. & Wyler R. 1986. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potencial compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res.* 6:57-73.
- Franco A.C., Rijsewijk F.A.M., Flores E.F., Weiblen R. & Roehe P.M. 2001. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. *Revta Bras. Microbiol.* (Em publicação).
- French E.L. 1962. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of causal agent. *Aust. Vet. J.* 38:216-221.
- Freshney R.I. 1992. *Animal Cell Culture: A practical approach*. 2nd ed. Oxford University Press, New York. 329 p.
- Gibbs E.P.J. & Rweyemamu M.M. 1977. Bovine herpesvirus. Part. I. Bovine herpesvirus 1. *Vet. Bulletin* 47:(5)317-343.
- Heinlein A., Metzler A.E., Weiblen R., Berrios P., Schudel A.A. & Rodriguez M. 1993. Molecular characterization of South American bovine herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and sds-page. *J. Vet. Med. B* 40:125-130
- Kahrs R.F. 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171:1055-1064.
- Madin S.H., York C.J. & McKercher D.G. 1956. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science* 124:721-722.
- Porterfield J.S. 1989. *Andrewes' Viruses of Vertebrates*. 5th ed. Baillière Tindall, London. 457 p.
- Roehe P.M., Silva T.C., Nardi N.B., Oliveira L.G. & Rosa J.C.A. 1997. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina e herpesvírus da encefalite bovina com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.* 17(1):41-44.
- Roizman B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. & Studdert M.J. 1992. The family herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 123:425-448.
- Salvador S.C., Lemos R.A.A., Riet-Correa F., Roehe P.M., & Osório A.L.R. 1998. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 18(2):76-83.
- Sanches A.W.D., Langohr I.M., Stigger A.L. & Barros C.S.L. 2000. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 20(3):113-118.
- Saunders G.C. 1977. Development and evaluation of an enzyme-labeled antibody test for rapid detection of hog cholera antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 38:(1)21-25.
- 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. 2000. Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) isolated from semen. *Virus Rev. Res.* 5 (2) (Supl. 1), Abstr. HS18, p.116.
- St. George T.D. & Philpott M. 1972. Isolation of IBR virus from the prepuce of water Buffalo bulls in Australia. *Aust. Vet. J.* 48:126.
- Teixeira M.B., Esteves P.A., Coelho C.S.S., Silva T.C., Oliveira L.G. & Roehe P.M. 1998. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. *Pesq. Vet. Gaúcha* 4 (1):61-65.
- Van Engelenburg F.A.C., Kaashoek M.J., Rijsewijk F.A.M., Van Den Burg L., Moerman A., Gielkens A.L.J. & Van Oirschot J.T. 1994. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J. Gen. Virol.* 75:2311-2318.
- Van Oirschot J.T., Kaashoek M.J., Maris-Veldhuis M.A., Weerdmeester K. & Rijsewijk F.A.M. 1997. An enzyme linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *J. Virol. Meth.* 67(1):23-34.
- Weiblen R., Barros C.S.L., Canabarro T.F. & Flores I.E. 1989. Bovine meningoencephalitis from IBR Virus. *Vet. Rec.* 124:666-667.