

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS  
POLICLONAIS PARA VÍRUS BOVINOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Tatiane Goulart de Lima**

**Uruguaiana, RS, Brasil  
2013**

**TATIANE GOULART DE LIMA**

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS PARA VÍRUS  
BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Mário Celso Sperotto Brum

**Uruguaiiana  
2013**

**TATIANE GOULART DE LIMA**

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS PARA  
VÍRUS BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade Animal

Dissertação defendida e aprovada em: 09 de agosto de 2013.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Mário Celso Sperotto Brum  
Orientador  
Curso de Medicina Veterinária – UNIPAMPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia de Avila Botton  
Curso de Medicina Veterinária – UFSM

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Larissa Picada Brum  
Curso de Zootecnia – UNIPAMPA

## AGRADECIMENTO

Ao meu orientador e exemplo Mário Celso Sperotto Brum pela oportunidade de aprendizado e convivência que muito acrescentaram em minha formação profissional e pessoal. A esta pessoa meu eterno respeito, gratidão e admiração.

Aos meus pais pelo amor, carinho e incentivo em todas as etapas da minha vida.

Ao Daniel Ruschel pelo amor, apoio e compreensão incondicional, e por tornar meus dias mais felizes.

À Universidade Federal do Pampa e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade de educação e formação.

Aos colegas pós-graduandos, em especial, Antônio Carlos Galarça Guimarães, Cibele Lima Lhamas, Fernanda Porcela dos Santos e Pamela Laiz Paré da Rosa pelos momentos de auxílio, companheirismo e amizade.

Aos estagiários do Laboratório de Virologia da UNIPAMPA, por me ajudarem em todas as etapas do experimento, pelos momentos de aprendizagem mútua, e por tornarem o trabalho em equipe alegre e produtivo.

A toda equipe do Setor de Virologia da UFSM pela acolhida durante nossa estadia, e auxílio com materiais indispensáveis ao andamento do experimento.

As entidades Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro do experimento, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A **Deus**, que em sua infinita misericórdia, sempre me guiou pelo melhor caminho.

## RESUMO

Os vírus são importantes agentes patogênicos de várias espécies animais, entre elas bovinos. No Brasil, diversos agentes virais foram descritos causando infecções no rebanho bovino, e produzindo perdas econômicas significativas. A identificação dos animais infectados por um vírus pode ser realizada de diferentes formas; no entanto, a confirmação definitiva requer a demonstração do agente ou da resposta imune. Para isto, vários métodos com capacidade de detectar a partícula viral, atividade biológica, genoma, antígenos virais, ou então a resposta imune específica foram desenvolvidos. Os imunoenaios são testes amplamente utilizados na rotina laboratorial para detecção de antígenos virais em amostras clínicas ou de pesquisa. Estes ensaios apresentam boa sensibilidade, especificidade e facilidade de execução. A metodologia dos imunoenaios tem como base, o emprego de anticorpos monoclonais ou policlonais específicos para os antígenos virais. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi produzir anticorpos policlonais para alguns vírus bovinos, e avaliar a reatividade destes em testes de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*. Para isto, cepas e/ou isolados do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2), herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), herpesvírus bovino tipo 5 gE deletado (BoHV-5 gEΔ), vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), vírus da língua azul (BTV) e vírus da vaccínia (VACV) foram amplificados em cultivo celular e o sobrenadante utilizado para imunizar coelhos. Os animais foram imunizados cinco vezes pela via subcutânea, e cinco dias após o último reforço coletou-se sangue. O soro foi separado do sangue por centrifugação. O soro foi diluído em PBS (1:100 a 1:204.800) e utilizado como anticorpo primário nos ensaios de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*. A diluição de trabalho foi selecionada pela diluição que produziu reação específica nas células infectadas, e sinal fraco ou ausente nas células controle. Os antissoros apresentaram maior reatividade na técnica de imunoperoxidase do que na imunofluorescência e *slot blot*. Ainda, para os antissoros do BoHV-1, BoHV-5, BVDV e BRSV demonstrou-se a reatividade com amostras heterólogas nos ensaios de imunofluorescência e imunoperoxidase. Conclui-se que os anticorpos policlonais produzidos em coelhos possuem elevadas concentrações de anticorpos específicos, o que foi detectado pela reatividade nos ensaios de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*. Desta maneira, estes reagentes podem ser considerados uma importante ferramenta para a detecção e caracterização de vários vírus bovinos na rotina de diagnóstico e pesquisa.

Palavras-chave: vírus bovinos, diagnóstico, imunoenaios, anticorpos policlonais.

## ABSTRACT

The viruses are significant important pathogenic agents of several animal species, including cattle. In Brazil, several viral agents causing infections have been described in cattle and they produce significant economic losses. The identification of animals infected by a virus can be performed in different ways; however, definitive confirmation requires demonstration of the agent or immune response. For this purpose, various methods with the capacity to detect the viral particle, biological activity, genome, viral antigens, or specific immune response have been developed. Immunoassays are widely used in laboratory routine for detection of viral antigens in clinical or research. These assays exhibit good sensitivity, specificity and easy for implantation. The immunoassay methodologies are based on the employment of monoclonal or polyclonal antibodies specific to the viral antigens. Therefore, the aim of this study was to produce polyclonal antibodies for some bovine virus, and evaluate their reactivity in immunofluorescence, immunoperoxidase and slot blot tests. For this purpose, strains and/or isolates of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), bovine herpesvirus type 2 (BoHV-2), bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5), bovine herpesvirus type 5 gE deleted (BoHV-5 gE $\Delta$ ), bovine viral diarrhea virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), bluetongue virus (BTV), and vaccinia virus (VACV) were amplified in cell culture and the supernatant were used to immunize rabbits. The animals were immunized five times by the subcutaneous route, and five days after the last boost the blood was collected. The serum was obtained by centrifugation. The serum was diluted (1:100 a 1:204.800) and used as primary antibodies in the immunofluorescence, immunoperoxidase and slot blot assays. The working dilution was selected among those produced specific reaction with infected cells and absent or weak background in control cells. The antiserum showed higher reactivity in immunoperoxidase technique than the immunofluorescence and slot blot. The antiserum of the BoHV-1, BoHV-5, BVDV and BRSV presented the reactivity when tested with heterologous isolates in immunofluorescence, immunoperoxidase assays. In summary, that the polyclonal antibodies raised in rabbits have high concentrations of specific antibodies, which were demonstrated by the reactivity in immunofluorescence, immunoperoxidase and slot blot assays. Additionally, these reagents can be considered an important tool for the detection and characterization of various bovine viruses in diagnostic and research routine.

Keywords: bovine viruses, diagnostic, immunoassay, polyclonal antibodies.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Etapas de produção de anticorpos monoclonais..... 21

### CAPÍTULO 1

Figura 1: Técnica de imunofluorescência. **A:** células infectadas com BoHV-1 x soro policlonal (2.1) na diluição 1:800. **B:** células controle x soro policlonal (2.1) na diluição 1:800. **C:** células infectadas com BoHV-2 x soro policlonal (21.1) na diluição 1:3.200. **D:** células controle x soro policlonal (21.1) na diluição 1:3.200. **E:** células infectadas com BRSV x soro policlonal (5.1) na diluição 1:800. **F:** células controle x soro policlonal (5.1) na diluição 1:800. **G:** células infectadas com BTV x soro policlonal (16.1) na diluição 1:1.600. **H:** células controle x soro policlonal (16.1) na diluição 1:1.600. **I:** células infectadas com VACV x soro policlonal (24.1) na diluição 1:3.200. **J:** células controle x soro policlonal (24.1) na diluição 1:3.200. Todas as imagens com objetiva 40x..... 42

Figura 2: Técnica de imunoperoxidase. **A:** células infectadas com BoHV-1 x soro policlonal (2.1) na diluição 1:12.800. **B:** células controle x soro policlonal (2.1) na diluição 1:12.800. **C:** células infectadas com BoHV-5 x soro policlonal (7.1) na diluição 1:800. **D:** células controle x soro policlonal (7.1) na diluição 1:800. **E:** células infectadas com BoHV-2 x soro policlonal (21.1) na diluição 1:6.400. **F:** células controle x soro policlonal (21.1) na diluição 1:6.400. **G:** células infectadas com BVDV x soro policlonal (4.1) na diluição 1:12.800. **H:** células controle x soro policlonal (4.1) na diluição 1:12.800. **I:** células infectadas com BRSV x soro policlonal (5.1) na diluição 1:1.600. **J:** células controle x soro policlonal (5.1) na diluição 1:1.600. **K:** células infectadas com BTV x soro policlonal (16.1) na diluição 1:12.800. **L:** células controle x soro policlonal (16.1) na diluição 1:12.800. **M:** células infectadas com VACV x soro policlonal (24.1) na diluição 1:12.800. **N:** células controle x soro policlonal (24.1) na diluição 1:12.800. Todas as imagens com objetiva 40x e sem filtro..... 43

Figura 3: Técnica de *slot blot*. Lisado de cultivo celular infectado com **BoHV-1** (+) e controle (-) x soro policlonal (2.1) na diluição 1:8.000. Lisado de cultivo celular infectado com **BoHV-5** (+) e controle (-) x soro policlonal (7.1) na diluição 1:2.000. Lisado de cultivo celular infectado com **BoHV-2** (+) e controle (-) x soro policlonal (21.1) na diluição 1:10.000. Lisado de cultivo celular infectado com **BVDV** (+) e controle (-) x soro policlonal (4.1) na diluição 1:10.000. Lisado de cultivo celular infectado com **BRSV** (+) e controle (-) x soro policlonal (5.1) na diluição 1:6.000. Sobrenadante de cultivo celular infectado com **BTV** (+) e controle (-) x soro policlonal (16.1) na diluição 1:10.000. Sobrenadante de cultivo celular infectado com **VACV** (+) e controle (-) x soro policlonal (24.1) na diluição 1:20.000..... 44

## LISTA DE QUADROS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1: Principais agentes virais e enfermidade víricas identificadas no rebanho bovino brasileiro.....	16
Quadro 2: Metodologia, vantagens e desvantagens de alguns ensaios de detecção viral.....	19

### CAPÍTULO 1

Quadro 1: Imunógenos utilizados para produção dos anticorpos policlonais em coelhos.....	40
Quadro 2: Diluições de trabalho dos antissoros produzidos frente aos vírus homólogos em imunoenaios.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

AEC: aminoetilcarbazol

BHK-21: *baby hamster kidney 21*

BRSV: vírus respiratório sincicial bovino

BTV: vírus da língua azul

BVDV: vírus da diarreia viral bovina

BoHV-1: herpesvírus bovino tipo 1

BoHV-2: herpesvírus bovino tipo 2

BoHV-5: herpesvírus bovino tipo 5

BoHV-5 gE deletado: herpesvírus bovino tipo 5 com deleção na glicoproteína E

CRIB: *cells resistant to infection with bovine viral diarrhea virus*

ECP: efeito citopático

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

DNA: ácido desoxirribonucleico

dpv: dias pós-vacinação

FITC: isotiocianato de fluoresceína

HRPO: *horseradish peroxidase*

IFA: imunofluorescência direta

IFI: imunofluorescência indireta

Ig: imunoglobulinas

IHQ: imuno-histoquímica

IPX: imunoperoxidase

IPMA: imunoperoxidase em monocamada

MDBK: *Madin-Darby bovine kidney*

MEM: meio essencial mínimo

mg: miligramas

mL: mililitros

PBS: tampão fosfato-salino

PBST: tampão fosfato-salino com Tween 80

PCR: reação em cadeia da polimerase

RNA: ácido ribonucleico

RPM: rotações por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

TCID: *tissue culture infection dose*

VACV: vírus da vaccínia

VERO: células de rim de macaco-verde-africano

## **LISTA DE SIGLAS**

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

PPGCA: Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

UFSM: Universidade Federal de Santa Maria

UNIPAMPA: Universidade Federal do Pampa

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Vírus.....	15
2.2 Viroses no rebanho bovino brasileiro.....	16
2.3 Imunoensaios para detecção viral.....	18
2.4 Anticorpos monoclonais e policlonais.....	20
2.4.1 Anticorpos monoclonais.....	20
2.4.2 Anticorpos policlonais.....	21
3 CAPÍTULO 1. Produção e avaliação de anticorpos policlonais para vírus bovinos.....	23
Abstract.....	24
Resumo.....	25
Introdução.....	26
Material e Métodos.....	28
Resultados.....	31
Discussão.....	33
Referências.....	36
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

## 1 INTRODUÇÃO

Os vírus são considerados os menores parasitas intracelulares obrigatórios (CONDIT, 2001). A organização estrutural dos vírus é bastante simples e estes micro-organismos não possuem as estruturas necessárias para produção de energia e autorreplicação, conseqüentemente dependem de uma célula viva para produzir a sua progênie (FLINT et al., 2000; VAN REGENMORTEL, 2005). Devido a isto, desenvolveram capacidade de infectar todas as formas de vida celular, incluindo: animais (vertebrados e invertebrados), plantas, fungos e bactérias (MURPHY et al., 1999). A replicação viral no interior de uma célula pode produzir um desequilíbrio em sua homeostasia, com conseqüentes alterações drásticas nas estruturas ou funções celulares (KENNEDY; GREENACRE, 2005). A manifestação desta desorganização ocasionará alterações no metabolismo e na arquitetura celular ou do organismo hospedeiro, o que pode levar à produção de sinais clínicos (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

A importância econômica e social dos agentes virais está relacionada à sua capacidade de infectar e produzir doenças em humanos, animais e plantas (DeFILIPPIS; VILLARREAL, 2001). As evidências demonstram que os vírus afetam seus hospedeiros a milhares de anos, muito antes da determinação de sua estrutura (FLINT et al., 2000; DOMINGO; HOLLAND, 2005). O reconhecimento destes agentes e o entendimento de sua biologia permitiram o desenvolvimento de métodos eficazes para o estudo estrutural, das formas de replicação, bem como métodos de tratamento, controle e prevenção. Isto aconteceu concomitante com o desenvolvimento de reagentes e técnicas de diagnóstico, produção de medicamentos antivirais e vacinas (CARTER; SAUNDERS, 2007).

Devido à ampla variabilidade de formas e estratégias de replicação, a identificação e caracterização do agente viral causador de uma infecção pode ser realizada de várias formas (DARLING et al., 1998; STORCH, 2000). Em determinadas situações o diagnóstico presuntivo é realizado pela observação dos sinais clínicos, dados epidemiológicos e patológicos. No entanto, a confirmação da presença e a identidade viral requer a execução de procedimentos laboratoriais (QUINN et al., 2002; KENNEDY, 2005). Devido à grande variabilidade de vírus existente, das formas de infecção, e das possibilidades de manifestações clínicas, onde muitas vezes mais de um agente pode produzir os mesmos sinais clínicos, não existe ainda uma metodologia universal utilizada para todos os vírus (CANDEIAS, 1996). Diversos métodos foram desenvolvidos com o objetivo de confirmar a presença viral em uma amostra ou de caracterizá-la (DARLING et al., 1998). As metodologias possuem como base *i*)

detecção direta da partícula viral; *ii*) detecção das propriedades biológicas do vírus; *iii*) detecção de antígenos virais; *iv*) detecção do ácido nucleico viral e *v*) detecção da resposta imune no hospedeiro (MURPHY et al., 1999). Estas podem ser aplicadas numa ampla variedade de técnicas, que dependem do próprio agente pesquisado, da amostra disponível e do objetivo final do estudo (STORCH, 2000). Em todos os casos, as metodologias variam em sensibilidade, especificidade, disponibilidade e custo (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

Os métodos para detecção de antígenos foram desenvolvidos na final da década de 60 e representaram uma revolução na identificação e caracterização dos vírus (CHERNESKY, 1989). A detecção de antígenos tem como base a reação específica vírus-anticorpo, podendo ser realizada em células de cultivo, tecidos infectados ou antígenos livres (KENNEDY, 2005; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). As técnicas que utilizam esta metodologia são dependentes da disponibilidade de anticorpos específicos para o vírus ou antígenos virais, que podem ser monoclonais ou policlonais (LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005).

O Brasil é detentor do maior rebanho mundial de bovinos com mais de 200 milhões de animais (IBGE, 2010). Estes animais são afetados por diversas viroses, causando perdas produtivas e prejuízos econômicos (LUCENA et al., 2010; ASSIS-BRASIL et al., 2013). O diagnóstico destas infecções é realizado pela evidência dos sinais clínicos, achados patológicos e detecção da presença viral, antígenos ou ácidos nucleicos em amostras de animais suspeitos (KENNEDY, 2005). A disponibilidade de reagentes, entre eles os anticorpos monoclonais ou policlonais, depende da produção pelos laboratórios, aquisição comercial nacional ou importação (LIPMAN et al., 2005). O objetivo deste estudo foi produzir anticorpos policlonais para vários vírus bovinos, e avaliar a sua reatividade em ensaios de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Vírus

Os vírus foram reconhecidos como agentes causadores de doenças em humanos e animais somente no final do século XIX, e nesta mesma época foram definidos como agentes filtráveis (LEVINE, 2001). No entanto, as evidências da presença da circulação viral são encontradas desde os primeiros registros da atividade humana. Desde então, vários métodos foram desenvolvidos para detectar e controlar a disseminação das infecções entre as populações (FLINT et al., 2000).

A partícula viral, ou vírion, consiste de um genoma (ácido nucleico) envolto por uma camada proteica (capsídeo). O material genético pode ser um ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA). O capsídeo apresenta variações no formato, podendo ser icosaédrico, helicoidal ou de simetria complexa. A reunião do capsídeo e genoma formam o nucleocapsídeo. Ainda, alguns vírions possuem uma camada lipídica externa ao capsídeo denominada de envelope. O envelope é derivado das membranas celulares e contém proteínas de origem viral (MURPHY et al., 1999; KAHRS, 2001).

Os vírus por possuírem estruturas relativamente simples são incapazes de realizar sua multiplicação. Assim sendo, necessitam infectar uma célula hospedeira para replicar e produzir a sua progênie (VAN REGENMORTEL, 2005). Na fase replicativa, que ocorre no interior da célula, o genoma viral direciona a maquinaria celular para sintetizar proteínas virais e novas cópias do genoma (CARTER; SAUNDERS, 2007; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). O ciclo de multiplicação viral pode ser convenientemente dividido em: *i*) adsorção; *ii*) penetração; *iii*) desnudamento; *iv*) transcrição do genoma viral; *v*) tradução dos mRNA virais; *vi*) replicação do genoma; *vii*) reunião e/ou morfogênese e *viii*) liberação das partículas recém-formadas (QUINN et al., 2002; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

A classificação viral é elaborada de acordo com as características morfológicas, tipo e formato do ácido nucleico e estratégias de replicação (KENNEDY; GREENACRE, 2005; VAN REGENMORTEL, 2005). *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* é a organização responsável pela classificação taxonômica dos vírus, e a mais recente publicação indicou a existência de seis ordens, 87 famílias, 19 subfamílias, 349 gêneros e 2.284 espécies virais conhecidas (CARSTENS, 2012).

## 2.2 Víruses no rebanho bovino brasileiro

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, constituído de mais de 200 milhões de animais (IBGE, 2010). Entre as diversas causas de enfermidades infecciosas de bovinos, os agentes virais possuem especial destaque (KAHRS, 2001; LUCENA et al., 2010). Estes agentes são classificados nas mais diversas famílias, e podem causar uma ampla variedade de sinais clínicos, sendo que algumas enfermidades podem ter grande impacto sanitário e econômico (KAHRS, 2001). A repercussão da presença viral em uma determinada população pode causar além das perdas diretas aos bovinos, prejuízos na comercialização de animais e produtos de origem animal (OIE, 2011). O Quadro 1 apresenta os vírus e viroses já relatados infectando o rebanho bovino brasileiro.

Quadro 1: Principais agentes virais e enfermidade víricas identificadas no rebanho bovino brasileiro

Agente	Doença	Referência
Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)	Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR); vulvovaginite pustular (IPV); balanopostite pustular infecciosa (IPB); infecção sistêmica e aborto.	LOVATO et al., 1995; MÉDICI et al., 2000; BARBOSA et al., 2005.
Herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2)	Mamilite herpética bovina	ALICE, 1977; TORRES et al., 2009.
Herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV-4)	Associado com metrite, mastite e doença neurológica.	COSTA et al., 2011.
Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)	Meningoencefalite bovina	WEIBLEN et al., 1989; RISSI et al., 2006.
Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)	Doenças das mucosas; enfermidade respiratória, digestiva ou hemorrágica; transtornos reprodutivos e malformação congênita.	BOTTON et al., 1998; FLORES et al., 2005.
Vírus respiratório sincicial bovino (BRSV)	Pneumonia intersticial	DRIEMEIER et al., 1997; PEIXOTO et al., 2000.
Vírus da língua azul (BTV)	Língua azul	ANTONIASSI et al., 2010; COSTA et al., 2006.
Vírus da vaccínia (VACV)	Vaccínia	DAMASO et al., 2000; LOBATO et al., 2005.
Vírus da estomatite vesicular (VSV)	Estomatite vesicular	DE STEFANO et al., 2003.
Vírus da raiva (RabV)	Raiva	LANGOHR et al., 2003; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2011.
Rotavírus bovino (RTV)	Enfermidade digestiva	BRITO et al., 2000.
Coronavírus bovino (BCoV)	Enfermidade digestiva	TAKIUCHI et al., 2009.
Vírus da pseudocowpox (PCPV)	Pseudocowpox	CARGNELUTTI et al., 2012.
Vírus da estomatite papular bovina (BPSV)	Estomatite papular bovina	SANT'ANA et al., 2012.
Vírus da febre aftosa (FMDV)	Febre aftosa	LYRA; SILVA, 2004.
Papilomavírus bovino (BPV)	Papilomatose	CLAUS et al., 2009.

O desenvolvimento de uma infecção vírica em bovinos pode resultar desde uma infecção subclínica, até a progressão da doença. A severidade dos sinais clínicos é resultado da associação de fatores como amostra viral, hospedeiro e meio ambiente (KAHRS, 2001). Conforme o local da replicação viral, o bovino pode manifestar sinais respiratórios, digestivos, neurológicos, reprodutivos, cutâneos, entre outros. A infecção viral pode gerar perdas produtivas e reprodutivas significativas, e muitas vezes levar a morte do animal (KAHRS, 2001; LUCENA et al., 2010). A infecção bacteriana secundária ocorre frequentemente, e é considerada um fator complicador do quadro inicial (MURPHY et al., 1999).

As doenças víricas estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em bovinos (LUCENA et al., 2010; ASSIS-BRASIL et al., 2013) e são constantemente alvos de medidas e/ou programas de controle (OIE, 2011). As enfermidades que possuem grande impacto econômico e social, como a febre aftosa e raiva, são controladas por programas oficiais (MAPA, 2009). No entanto, o diagnóstico e prevenção das enfermidades classificadas como de menor relevância econômica são responsabilidades de técnicos e produtores (FLORES; CARGNELUTTI, 2012). As medidas de controle e prevenção têm como objetivo reduzir as manifestações clínicas, diminuir a circulação viral entre os animais e finalmente reduzir significativamente ou erradicar o vírus de uma determinada população ou região (KAHRS, 2001). Para isto, todo programa de controle das enfermidades víricas tem como base o correto diagnóstico (FLORES; CARGNELUTTI, 2012).

Adicionalmente às manifestações clínicas, dados epidemiológicos e lesões patológicas, a identificação de uma infecção viral necessita da confirmação através de um teste laboratorial (MURPHY et al., 1999; KENNEDY, 2005). A detecção do agente em uma amostra suspeita pode ser realizada, principalmente pela observação direta das partículas; detecção da atividade biológica; presença de antígenos ou material genético viral; ou identificação de resposta imune específica (STORCH, 2000). O desenvolvimento das técnicas para uma determinada infecção é realizado de acordo com a forma de replicação dos vírus, e com a necessidade da rapidez do resultado (BRUM; WEIBLEN, 2012). Desta forma, o método diagnóstico deve cumprir alguns requisitos como: sensibilidade, especificidade, rapidez, repetibilidade e baixo custo (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Para a execução do diagnóstico laboratorial é necessário o controle de qualidade dos reagentes e procedimentos utilizados, estes fatores contribuem significativamente para precisão dos resultados (DARLING et al., 1998). Alguns reagentes podem ser obtidos de fontes comerciais, ou desenvolvidos pelo próprio laboratório de diagnóstico e/ou pesquisa (LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005).

### 2.3 Imunoensaios para detecção viral

A detecção da presença viral em uma amostra clínica ou de pesquisa pode ser realizada de várias formas (DARLING et al., 1998). Devido à grande variabilidade das características biológicas dos vírus e das diferentes possibilidades de patogenicidade, não existe ainda, uma técnica de diagnóstico que pode ser aplicada de forma universal para todos os agentes (CANDEIAS, 1996; KENNEDY, 2005). Para isto, diversas metodologias foram desenvolvidas e aperfeiçoadas ao longo do tempo (Quadro 2) (CHERNESKY, 1989).

Os imunoensaios foram desenvolvidos com a finalidade de aprimorar a identificação viral e de seus antígenos, e como consequências acabaram substituindo algumas técnicas tradicionais de diagnóstico (STORCH, 2000). Atualmente existe uma enorme variação de imunoensaios que são aceitos e utilizados tanto em rotina de diagnóstico como na pesquisa científica (FLINT et al., 2000). Isto é devido à facilidade e simplicidade de execução das técnicas, da qualidade dos resultados obtidos e principalmente pela disponibilidade de reagentes e equipamentos (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

Apesar das variações metodológicas observadas entre as diversas técnicas, algumas características são comuns a todos os ensaios: *i*) afinidade da reação antígeno-anticorpo, e *ii*) amplificação do sinal enzimático por meio de reações químicas. Aspectos como equipamentos, materiais de uso geral e as enzimas utilizadas para os ensaios estão todos padronizados e estabelecidos (KURSTAK, 1985).

A metodologia dos imunoensaios pode variar, porém, o princípio da reação antígeno-anticorpo permanece constante (CHERNESKY; MAHONY, 1984). Existem duas variações de acordo com a formatação do teste, que são denominadas de ensaios diretos ou indiretos (FLINT et al., 2000). Nos ensaios diretos os antígenos são desafiados com anticorpos diretamente conjugados com enzimas ou fluorocromos. Nos ensaios indiretos os antígenos são confrontados com anticorpos específicos, sendo posteriormente incubados com anticorpos secundários (anti-anticorpo) marcados com fluorocromo ou enzimas. Em ambos os casos, direto ou indireto, a presença da reação colorimétrica/enzimática é considerada como resultado positivo (FLINT et al., 2000; CARTER; SAUNDERS, 2007). Entre os imunoensaios que utilizam esta metodologia encontram-se a imunofluorescência (IFA ou IFI), imunoperoxidase (IPX), imuno-histoquímica (IHQ), *immunoblots*, e *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e possíveis variações (KENNEDY, 2005; FLORES; CARGNELUTTI, 2012).

Quadro 2: Metodologias, vantagens e desvantagens de alguns ensaios de detecção viral

Método	Vantagens	Desvantagens
<i>Detecção direta da partícula</i>		
Microscopia eletrônica	Rápido, visualização e identificação direta do vírion.	Necessidade de altas concentrações de vírus na amostra, equipamento caro e requerimento de pessoal especializado.
<i>Detecção do vírus infeccioso</i>		
Isolamento viral em cultivos celulares	Simples, sensível.	Demorado, aplicável apenas a alguns vírus, sensíveis à contaminação, o vírus deve estar viável.
Isolamento viral em ovos embrionados	Simples, sensível, baixo custo.	Demorado, aplicável apenas a poucos vírus, o vírus deve estar viável.
<i>Detecção de antígenos virais</i>		
IFA <sup>a</sup> ou IFI <sup>b</sup>	Rápido, sensível, específico.	Equipamentos elaborados, reações inespecíficas, custo moderado a alto (anticorpo conjugado).
IPX <sup>c</sup>	Rápido, sensível, específico.	Reações inespecíficas, custo moderado a alto (anticorpo conjugado).
IHQ <sup>d</sup>	Rápido, sensível, específico.	Custo moderado a alto (anticorpo conjugado), conhecimento técnico.
<i>Immunoblots</i>	Rápido, sensível, específico.	Reações inespecíficas, custo moderado a alto (anticorpo conjugado).
ELISA <sup>e</sup>	Simples, sensível, específico, disponível em <i>kits</i> comerciais.	Custo elevado dos reagentes e <i>kits</i> , não é aplicável a todos os vírus.
<i>Detecção de ácidos nucleicos</i>		
PCR <sup>f</sup> e suas variantes	Rápido, sensível, específico, quantidades mínimas da amostra.	Custo elevado, sensíveis à contaminação, equipamento e pessoal especializado.
Hibridização <i>in situ</i>	Sensível, específico.	Delicado, custo moderado a alto.
<i>Detecção da resposta imunológica</i>		
Soroneutralização	Sensível e específico	Sorotoxicidade, demorado, detecção de somente anticorpos neutralizantes, necessidade de cultivo celular.
ELISA	Rápido, sensível, específico, Disponível em <i>kits</i> comerciais.	Custo elevado dos reagentes e <i>kits</i> , não é aplicável a todos os vírus.
Inibição da hemaglutinação	Rápido, sensível, específico.	Aplicável somente a vírus hemaglutinantes, possibilidade de reações falso-positivo.
Fixação do complemento	Boa sensibilidade e especificidade.	Demorado, trabalhoso.
Imunodifusão	Simples, baixo custo, disponível em <i>kits</i> .	Baixa sensibilidade, demorada, restrita apenas a alguns vírus.
IFI, IPX, <i>immunoblots</i>	Simples, rápido, sensível, específico.	Reações inespecíficas, equipamentos elaborados (IFI), disponibilidade de reagentes.

a. imunofluorescência direta; b. imunofluorescência indireta; c. imunoperoxidase; d. imuno-histoquímica; e. *enzyme-linked immunosorbent assay*; f. reação em cadeia da polimerase. Adaptado de MURPHY et al., 1999; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; FLORES; CARGNELUTTI, 2012.

## 2.4 Anticorpos monoclonais e policlonais

Os anticorpos ou imunoglobulinas são moléculas que possuem especificidade de reconhecimento e ligação com antígenos (LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005). Devido a esta característica, os anticorpos são amplamente utilizados como reagentes para detectar antígenos em imunoenaios (KURSTAK, 1985). Desta forma, constituem-se como ferramentas fundamentais e indispensáveis em laboratórios de diagnóstico e/ou pesquisa das mais variadas áreas do conhecimento (HAU; HENDRIKSEN, 2005).

Estes reagentes possuem inúmeras características que os distinguem, a começar por sua produção, os anticorpos monoclonais são produzidos com uma etapa *in vivo* e uma *in vitro*, enquanto que, os policlonais são obtidos de animais hiperimunizados (BETHELL; HOWARD, 2000). O uso de adjuvantes pode ser associado às metodologias de produção de ambos os tipos de anticorpos (STILLS, 2005). Outro aspecto que difere significativamente entre estes dois tipos de anticorpos é a sua especificidade, sendo os monoclonais específicos para um determinado epítipo, e os policlonais com capacidade de reconhecimento de inúmeros determinantes antigênicos em um mesmo antígeno (HARLOW; LANE, 1988; LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005). Com relação à aplicabilidade, características como: disponibilidade, custos, e reatividade inespecífica no ensaio devem ser considerados (LIPMAN et al., 2005).

### 2.4.1 Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais são uma população homogênea de imunoglobulinas descendentes de um clone de linfócito B (USAHA, 1984). Como reagentes, são amplamente utilizados em técnicas de pesquisa e diagnóstico, sendo ferramentas importantes para a detecção e caracterização do antígeno (DEWAR et al., 2005). Estes reagentes são utilizados em vários tipos de testes, pois são altamente específicos na sua ligação ao antígeno, e uma vez desenvolvidos, fornecem uma fonte homogênea e inesgotável do mesmo material, desde que o hibridoma secretor de anticorpos seja mantido em condições adequadas de manutenção (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Por estas razões, as principais vantagens dos anticorpos monoclonais são a sua especificidade, a homogeneidade e a consistência (LIPMAN et al., 2005).

No início de 1970, grupos de pesquisa trabalharam em diferentes métodos para prolongar a vida útil de células secretoras de anticorpos *in vitro*. Em 1975, Milstein & Köhler

produziram os primeiros anticorpos monoclonais, através de uma técnica que permitiu o crescimento de populações clonais de células secretoras de anticorpos (HARLOW; LANE, 1988; MURPHY et al., 1999). Naquele experimento de produção de anticorpos monoclonais, as linhagens celulares foram produzidas pela fusão de células de mieloma com células esplênicas de camundongo. O objetivo inicial foi entender a expressão e as interações das cadeias de imunoglobulinas (Ig) das linhagens parentais. Esta nova linhagem celular (hibridomas) foram mantidas *in vitro* e continuaram a secretar anticorpos com a mesma especificidade e afinidade, por tempo indeterminado (MILSTEIN; KÖHLER, 1975; HARLOW; LANE, 1988).

Desde 1975 até os dias atuais, a metodologia descrita por Milstein & Köhler para produção de anticorpos monoclonais é largamente utilizada (DEWAR et al., 2005). A Figura 1 ilustra todas as etapas de produção deste reagente.

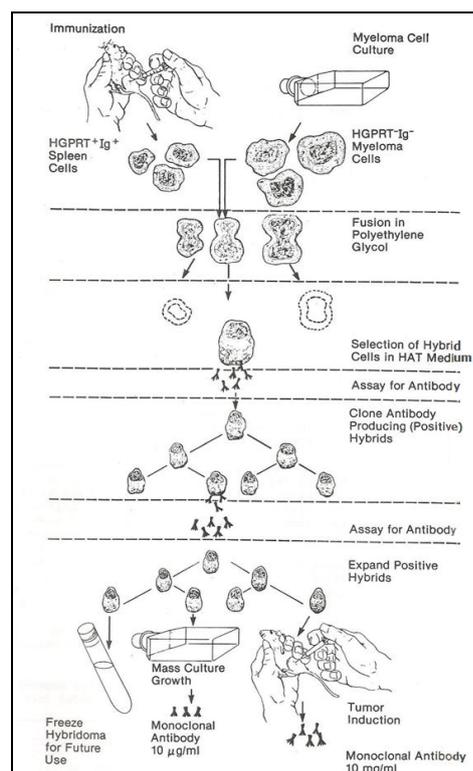


Figura 1: Etapas de produção de anticorpos monoclonais.  
Fonte: USAHA, 1984.

## 2.4.2 Anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais são uma população heterogênea de anticorpos que reconhecem e se ligam a diferentes epítopos do antígeno, esta característica aumenta a sensibilidade na detecção do antígeno (CANN, 1999; LIPMAN et al., 2005). Este tipo de

anticorpo é obtido no soro de animais infectados naturalmente, ou então, imunizados em condições controladas (HARLOW; LANE, 1988). As espécies selecionadas para a produção de anticorpos policlonais variam entre camundongos, ratos, *guinea-pig*, coelhos e cabras (CANN, 1999; LIPMAN et al., 2005). Para a escolha da espécie, alguns fatores como: disponibilidade de animais, custo e volume de soro desejado devem ser levados em consideração (BEAN, 2000). Após a definição da espécie, o procedimento de imunização deve ser conduzido (HARLOW; LANE, 1988). Neste momento, alguns requisitos devem ser considerados, incluindo: a natureza do antígeno, o número de imunizações, a via de administração do antígeno, e o uso de adjuvantes. No final do processo de imunização o soro do animal é coletado e usado diretamente como anticorpos primários nos ensaios (BETHELL; HOWARD, 2000; LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005).

A principal desvantagem dos anticorpos policlonais é a desuniformidade da resposta imune gerada pelos animais. Esta variabilidade pode ocorrer entre animais que foram imunizados simultaneamente, e em diferentes momentos de coleta do mesmo animal (KURSTAK, 1985). Outra desvantagem dos antissoros é a sua composição, pois além dos anticorpos gerados para o antígeno específico (1-10% do total de imunoglobulinas), o soro possui anticorpos para outros antígenos. Entretanto, os antissoros podem ser purificados por meio de colunas de afinidades para anticorpos ou para o antígeno (KURSTAK, 1985; HARLOW; LANE, 1988). Com relação à aplicação nos ensaios, uma desvantagem ao uso desse reagente é a possibilidade de reações inespecíficas (BETHELL; HOWARD, 2000; LIPMAN et al., 2005). Desta forma, todo antissoro deve ser testado e avaliado de forma individual a cada coleta (CANN, 1999; BEAN, 2000).

### 3 CAPÍTULO 1.

#### **Produção e avaliação de anticorpos policlonais para vírus bovinos**

Tatiane Goulart de Lima<sup>1</sup>, Luana Marchi Quadros<sup>1</sup>, Leandro Abel Mallmann<sup>2</sup>,  
Mário Celso Sperotto Brum<sup>2\*</sup>

*Artigo a ser submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira, 2013.*

---

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Laboratório de Virologia, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana. Uruguaiana, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Curso de Medicina Veterinária, Laboratório de Virologia, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana. Uruguaiana, RS, Brasil.

\*Autor para correspondência: Laboratório de Virologia, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, BR 472, KM 585, Caixa Postal 118, Uruguaiana, RS, Brasil. CEP 97.501-009. E-mail: mariobrum@unipampa.edu.br

**ABSTRACT.-** de Lima T.G., Quadros L.M., Mallmann L.A. & Brum M.C.S. 2013. [Production and evaluation of polyclonal antibodies for bovine viruses.] Produção e avaliação de anticorpos policlonais para vírus bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00 (0): 00-00. Laboratório de Virologia, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, Rodovia BR 472, Km 592, P.O. Box 118, Uruguaiana, RS, 97.501-009, Brazil. E-mail: [mariobrum@unipampa.edu.br](mailto:mariobrum@unipampa.edu.br)

In Brazil, several viruses were described causing infections in cattle and generating significant economic losses. The confirmation of viral infection requires demonstration of the etiological agent or immune response. The immunoassays are tests used in laboratory routine for detection of viral antigens and they need specific antibodies. The aim of this study was to produce polyclonal antibodies for some bovine virus, as well as to evaluate their reactivity in immunofluorescence, immunoperoxidase and slot blot tests. Strains and/or isolates of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), bovine herpesvirus type 2 (BoHV-2), bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5), bovine herpesvirus type 5 gE deleted (BoHV-5 gE $\Delta$ ), bovine viral diarrhea virus (BVDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), bluetongue virus (BTV), and vaccinia virus (VACV) were amplified individually in cell culture, and the supernatant was used to immunize rabbits. The supernatant of cultures infected with VACV is pathogenic for rabbits, thus it was previously inactivated and mixed with aluminum hydroxide adjuvant (20%). The animals were immunized five times by the subcutaneous route, in intervals of 14-21 days between immunizations, and five days after the last dose, blood was collected from each animal. The antiserum was obtained by centrifugation of the blood, aliquoted and stored at -20°C until all of the tests were performed. During the immunization, it was not observed clinical signs or adverse reactions in animals. After the processing of the blood, it was obtained about 15 mL of hyperimmune serum of each animal. These were applied as primary antibody in immunofluorescence, immunoperoxidase and slot blot tests against cells infected with homologous virus. The determination of the working dilution was performed by testing of various dilutions (1:100 to 1:204.800) of the antiserum during three assays, being considered the working dilution as the highest dilution able of to react specifically. The working dilutions established varied from 1:800 to 1:51.200 according to the assay. In general, the working dilutions were higher in the immunoperoxidase when compared with immunofluorescence and slot blot. Dilutions lower than 1:800 presented nonspecific reactions, even when tested front of uninfected cells. Additionally, antiserum anti-BoHV-1, -BoHV-5, -BVDV and -BRSV reacted positively in immunofluorescence and immunoperoxidase assays against heterologous isolates. In summary, the rabbit antisera

present high concentrations of specific antibodies for the virus tested, which were demonstrated by the reactivity in immunofluorescence, immunoperoxidase and slot blot assays. Additionally, the polyclonal antibodies could constitute an important tool for detection and characterization of bovine viruses in routine diagnosis and/or research in the assays tested.

INDEX TERMS: antiserum, viral detection, immunoassay, diagnostic.

**RESUMO.**- No Brasil, diversos agentes virais foram descritos causando infecções em rebanhos bovinos gerando perdas econômicas significativas. A confirmação da infecção viral em um animal requer a demonstração do agente ou da resposta imune. Os imunoenaios são testes utilizados na rotina laboratorial para detecção de antígenos virais e necessitam de anticorpos específicos. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi produzir anticorpos policlonais para alguns vírus bovinos, e avaliar a reatividade destes em testes de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*. Para isto, cepas e/ou isolados do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2), herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), herpesvírus bovino tipo 5 gE deletado (BoHV-5 gEΔ), vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV), vírus da língua azul (BTV), e vírus da vaccínia (VACV) foram amplificados individualmente em cultivo celular e o sobrenadante foi utilizado para imunizar coelhos. O sobrenadante de cultivos infectados com VACV é patogênico para coelhos, por isso, foi previamente inativado e homogeneizado com adjuvante hidróxido de alumínio (20%). Os animais foram imunizados cinco vezes pela via subcutânea, com intervalos de 14-21 dias entre as imunizações, e cinco dias após a última dose coletou-se sangue. O antissoro foi obtido por centrifugação do sangue, aliquotado e armazenado a -20°C até o momento dos testes. Durante o período das imunizações não foram observados sinais clínicos ou reações adversas nos animais. Após o processamento do sangue, obteve-se em média 15 mL de soro hiperimune de cada animal. Estes foram empregados como anticorpo primário em testes de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot* frente a células infectadas com vírus homólogos. A determinação da diluição de trabalho foi realizada pela avaliação de diversas diluições (1:100 a 1:204.800) dos antissoros nos três ensaios, sendo considerada a diluição de trabalho como a maior diluição capaz de reagir especificamente. As diluições de trabalho estabelecidas variaram entre 1:800 e 1:51.200 de acordo com o ensaio, sendo que, de modo geral foram superiores na imunoperoxidase quando

comparadas com a imunofluorescência e *slot blot*. Diluições inferiores a 1:800 apresentaram reações inespecíficas, mesmo quando testadas frente a células não infectadas. Ainda, os antissoros anti-BoHV-1, -BoHV-5, -BVDV e -BRSV reagiram positivamente em ensaios de imunofluorescência e imunoperoxidase contra isolados heterólogos. Conclui-se que os antissoros produzidos em coelhos possuem elevadas concentrações de anticorpos específicos para os vírus, o que foi demonstrado pela reatividade nos ensaios de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*. Desta forma, constituem uma importante ferramenta para detecção e caracterização de vírus bovinos na rotina de diagnóstico e/ou pesquisa nos ensaios testados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: antissoro, detecção viral, imunoensaio, diagnóstico.

## INTRODUÇÃO

Os agentes virais são importantes patógenos de bovinos e ocasionam consideráveis perdas econômicas (Lucena et al. 2010, Assis-Brasil et al. 2013). Os vírus são estruturas relativamente simples, sendo o material genético (DNA ou RNA) envolvido por uma estrutura proteica denominada de capsídeo. Alternativamente, alguns vírus possuem uma camada externa fosfolipídica derivada das membranas celulares chamada de envelope (Murphy et al. 1999). Estes agentes não possuem metabolismo próprio, por isso, são obrigados a infectar células para realizar a sua replicação e produção de progênie (Van Regenmortel 2005). Em alguns casos, a replicação viral produz um desequilíbrio das funções celulares, que pode gerar danos celulares irreversíveis. O acúmulo destas lesões nas células teciduais ocasiona um desequilíbrio do órgão, podendo produzir a enfermidade no hospedeiro (Kennedy & Greenacre 2005).

Devido à diversidade das características morfológicas e estratégias de replicação das diferentes famílias virais, inúmeras metodologias para identificação e caracterização do agente e ciclo replicativo foram desenvolvidas (Chernesky 1989, Darling et al. 1998, Storch 2000). Os ensaios baseiam-se principalmente na: *i*) detecção dos vírions; *ii*) observação de propriedades biológicas; *iii*) detecção de antígenos ou genoma viral e *iv*) detecção da resposta imune específica (Kennedy 2005, Brum & Weiblen 2012). Estas técnicas possuem variações quanto à metodologia, sensibilidade, especificidade e custo de execução (Murphy et al. 1999). Os ensaios, ou imunoensaios, para detecção de antígenos virais foram desenvolvidos nos anos

de 1960, e desde então, são amplamente utilizados na rotina de pesquisa e diagnóstico viral (Chernesky 1989). A difusão destes ensaios deve-se a facilidade de execução, repetibilidade, disponibilidade de reagentes e resultados produzidos (Kurstak 1985).

Os imunoenaios baseiam-se na reação específica vírus-anticorpo, seguido da identificação desta reação com enzimas ou fluorocromos (Flint et al. 2000). Diversos ensaios que empregam este princípio estão disponíveis, entre os quais destacam-se imunofluorescência (IFA), imunoperoxidase (IPX), imuno-histoquímica (IHQ), *Western blot*, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Estes testes são aplicados na detecção de antígenos em células de cultivo, tecidos ou livres no meio (Chernesky & Mahony 1984, Kennedy 2005). Deste modo, os ensaios que utilizam estas metodologias são condicionados à disponibilidade de anticorpos específicos para o vírus ou antígenos virais (MacLachlan & Dubovi 2011). Estes reagentes podem ser obtidos comercialmente ou então produzidos de acordo com a necessidade do laboratório (Leenaars & Hendriksen 2005).

Os anticorpos utilizados nos imunoenaios podem ser monoclonais ou policlonais, de acordo com a metodologia e características de produção (Lipman et al. 2005). Os anticorpos monoclonais são específicos para um determinante antigênico, e obtidos após a geração de um hibridoma resultante da fusão *in vitro* de linfócitos B com mieloma (Milstein & Köhler 1975). Os anticorpos policlonais são produzidos após sucessivas imunizações de animais e coleta do soro hiperimune (Bethell & Howard 2000). Devido à metodologia de produção, os anticorpos monoclonais são mais demorados e dispendiosos para serem obtidos; no entanto são específicos e podem ser gerados continuamente, a partir do cultivo *in vitro* do hibridoma. Os anticorpos policlonais, ou antissoros são facilmente gerados, e reagem com vários epítomos do imunógeno, porém são limitados ao volume de soro coletado, e quando não purificados podem gerar reações inespecíficas (Kurstak 1985, Leenaars & Hendriksen 2005, Lipman et al. 2005).

Vários anticorpos monoclonais ou policlonais para viroses bovinas estão disponíveis comercialmente, ou então, gerados pelos próprios laboratórios, de acordo com a sua necessidade. Em diversas situações a obtenção destes reagentes depende de importação, que além de ser demorada, eleva consideravelmente os custos. O objetivo do presente trabalho foi produzir anticorpos policlonais para alguns vírus bovinos, e avaliar a sua reatividade em ensaios de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Células e vírus

Os procedimentos de multiplicação e quantificação viral foram realizados em células de linhagem de rim bovino (MDBK – *Madin-Darby bovine kidney*), células de linhagem de rim bovino resistente ao BVDV (CRIB – *cells resistant to infection with bovine viral diarrhea virus*), células de rim de hamster jovem (BHK-21 – *baby hamster kidney 21*) e células de rim de macaco-verde-africano (VERO). As linhagens celulares MDBK, CRIB, BHK-21 foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), as células VERO em meio RPMI, ambos os meios de manutenção contendo penicilina (1,6 mg/L) e estreptomicina (0,4 mg/L), suplementado com 5 % de soro fetal bovino ou soro equino (Botton et al. 1998a, Cargnelutti et al. 2012). Para produção dos anticorpos policlonais foram utilizadas cepas e/ou isolados de vírus bovinos (Quadro 1). Ainda, a reatividade cruzada de alguns antissoros foi testada contra diferentes isolados heterólogos, esses foram, anti-BoHV-1 (SV 169/06, SV 453/93, SV 299/03), anti-BoHV-5 (71/07D, 437/07, 511/09, 97/642, 344/06), anti-BVDV (NADL, 66-07, SV 260, 56/03, 713/09, 241/10) e anti-BRSV (SP 24/05/99), respectivamente. As células e amostras virais foram gentilmente cedidas pelo Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

### Produção do antígeno

Para a produção do imunógeno foi utilizado o sobrenadante de cultivos celulares infectados. Para isso, monocamadas foram previamente preparadas em frascos T-75 (75 cm<sup>2</sup>), inoculados individualmente com amostras dos vírus descritos no Quadro 1. Após adsorção de 1 h com agitação suave a cada 15 min., o inóculo foi removido, e o meio de cultivo contendo 2% de soro fetal bovino ou equino foi adicionado. A multiplicação viral foi monitorada pelo efeito citopático (ECP), que ao atingir aproximadamente 90% das células o sobrenadante foi coletado. Este foi então centrifugado a 3.500 RPM/10 min. à 4°C para remoção dos debris celulares (Chand et al. 2009). O sobrenadante foi então aliquotado e congelado a -70°C até o momento do uso. A amostra viral do vaccínia com potencial zoonótico e patogênico para coelhos foi inativada. A inativação foi realizada a 56°C durante 2 h e a infectividade foi testada negativa pela inoculação em cultivo celular. Posteriormente, este foi homogeneizado com adjuvante hidróxido de alumínio (Hipra Saúde Animal LTDA) em uma concentração final de 20%.

### **Imunização dos animais**

Para a produção de anticorpos policlonais, coelhos com aproximadamente 60 dias de idade foram utilizados (Quadro 1). Os animais foram mantidos em gaiolas de 80 cm de largura x 45 cm de altura x 60 cm de comprimento recebendo alimento e água *ad libidum*. A utilização, manutenção e manipulação dos animais seguiram as normas de bem estar animal e foram devidamente aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Pampa (sob-registro nº 005/2011) e recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram imunizados cinco vezes com intervalos aproximados de 14-21 dias (0, 21, 35, 49 e 65 dias pós-vacinação – dpv). O volume administrado foi de 1 mL via subcutânea para sobrenadante contendo vírus vivo, ou então, pela via intramuscular com o imunógeno inativado. No dia 70 dpv, com os animais sob anestesia geral profunda (Zoletil 50<sup>®</sup>), realizou-se a coleta de sangue total pela punção cardíaca e os animais foram posteriormente eutanasiados com cloreto de potássio. Para separação do soro, o sangue permaneceu em temperatura ambiente por 1 h para formação de coágulo. Após este período, centrifugou-se a 3.500 RPM/10 min. a 4°C. O soro obtido foi aliquoteado, identificado e armazenado a -20°C até o momento dos testes.

### **Reatividade dos antissoros**

A reatividade dos soros hiperimunes, contendo anticorpos policlonais, foi avaliada em ensaios de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*. Anterior aos testes, os anticorpos policlonais foram diluídos serialmente na base 2 em PBS estéril, pH 7,1 (1:100 até 1:204.800). Cada diluição foi testada frente ao vírus homólogo como controle positivo e células não infectadas como controle negativo. Nos três ensaios, a determinação da diluição de trabalho foi considerada a maior diluição que apresentou reação positiva específica nas células infectadas, e ausência de reação nas células não infectadas.

### **Imunofluorescência indireta (IFI)**

Os antissoros foram testados pela técnica de imunofluorescência indireta conforme descrito por Botton et al. (1998a), com algumas adaptações. Para isto, células infectadas e não infectadas foram preparadas e adsorvidas em lâminas *multispots* e incubadas em câmara úmida por 2 h a 37°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após este período, as células foram fixadas com acetona absoluta por três min. a 4°C, lavadas em água, e secas em temperatura ambiente. Para as lâminas infectadas com BVDV, a solução de fixação foi paraformaldeído 5,5% (Elahi et al. 1997). Para as lâminas destes agentes foi efetuado um tratamento de permeabilização

celular com PBS + 0,05% Triton X-100 por cinco min. em temperatura ambiente seguida de lavagem com PBS pH 7,1 e secagem em temperatura ambiente (Al-Mubarak et al. 2007). As diferentes diluições dos antissoros foram testadas como anticorpo primário (50 µL/orifício), incubadas em câmara úmida por 1 h a 37°C e lavadas três vezes em PBS e água destilada. Como anticorpo secundário utilizou-se anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) na diluição de 1:1.000 (50 µL/orifício), seguida de incubação em câmara úmida por 1 h a 37°C, e lavagens conforme descrito anteriormente. Posteriormente, as células foram coradas com Azul de *Evans*, montadas com glicerol:PBS (50:50) e lamínulas e observadas ao microscópio de epifluorescência. A reatividade foi revelada pela visualização de células coradas em verde fluorescente.

### **Imunoperoxidase em monocamada (IPMA)**

A IPMA foi realizada em placas de 96 cavidades contendo células infectadas e não infectadas seguindo os protocolos descritos por Roehe et al. (1997) e Botton et al. (1998a) com adaptações. As monocamadas foram fixadas com acetona:metanol (50:50) por 10 min. em temperatura ambiente, e posteriormente lavadas três vezes com PBS pH 7,1. Para os cultivos infectados com BVDVs e seus controles realizou-se fixação com paraformaldeído 5,5% (Elahi et al. 1997) e permeabilização com PBS + 0,05% Triton X-100 sob agitação de 250 RPM por 30 min. (Al-Mubarak et al. 2007), seguidas de duas lavagens com PBS pH 7,1. As reações inespecíficas foram bloqueadas com 5% leite em pó desnatado diluído em PBS + 0,05% Tween 80 por 30 min. a 37°C, seguidas de dois ciclos de lavagens com PBS + 0,05% Tween 80 (PBST). As diluições do anticorpo primário (100 µL/poço) foram incubadas pelo período de 1 h a 37°C sob agitação constante a 250 RPM, seguido de três lavagens com PBST. O anticorpo secundário, anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (HRPO), 100 µL/poço (1:1.000), foi adicionado em cada poço e incubado por 1h a 37°C sob constante agitação (250 RPM), sucedido de lavagens conforme descrito anteriormente. As reações foram reveladas pela adição de 100 µL/poço de AEC [solução 0,05 M tampão acetato de sódio (pH 5,2), contendo 5,2% de 3-amino-9-etilcarbazole (AEC), e 0,8% de peróxido de hidrogênio]. A revelação foi interrompida com a adição de PBS após 20 min. da adição do substrato. A avaliação foi realizada auxílio de microscópio óptico invertido, e as reações positivas foram confirmadas pela coloração carmin nas células infectadas.

### ***Slot blot***

A capacidade do antissoro em reconhecer proteínas imobilizadas em membranas de nitrocelulose foi realizada pela técnica de *slot blot*. Lisados de células infectadas e não infectadas foram preparados conforme descrito por Harlow & Lane (2005) 150 mM NaCl + 0,1% Triton X-100 + 50 mM Tris HCl pH 8,0 (Tampão de lise NP-40). Para o BTV e VACV foram utilizados sobrenadantes de cultivos infectados e não infectados como antígenos. Os lisados ou sobrenadantes foram transferidos para membranas de nitrocelulose com o auxílio de vácuo e de um aparelho de *slot blot* (Gibco Life Technologies). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com PBST + 5% leite em pó desnatado por 1h em temperatura ambiente, e posterior lavagem com PBS. Como anticorpo primário foram utilizados diferentes diluições de pelo menos um antissoro de cada vírus que foram testadas contra seu antígeno homólogo. As incubações do anticorpo primário e secundário foram realizadas conforme descrito para o ensaio de IPMA. A reação positiva foi revelada pela adição do substrato AEC e posterior marcação das “bandas” na coloração carmim.

## **RESULTADOS**

As imunizações dos animais produziram antissoros capazes de reagir especificamente com antígenos virais em diferentes imunoenaios. A capacidade de detecção dos anticorpos policlonais para cada ensaio foi definida pela avaliação de diferentes diluições frente às células infectadas e não infectadas. Sendo que, a maior diluição demonstrando reação positiva específica foi considerada a diluição de trabalho. Geralmente, as diluições de trabalho para imunofluorescência foram inferiores às diluições de trabalho para a imunoperoxidase e *slot blot* (Quadro 2). Ainda, diluições inferiores a 1:800 produziram reações inespecíficas.

Durante os procedimentos de imunização não foram observadas reações locais ou sistêmica nos animais. Um animal (#7.2) imunizado com o vírus BoHV-5 (SV 507 wt) foi encontrado morto no dia 50 dpv, por causas não relacionadas com a imunização ou infecção viral. Após cinco dias da última imunização (70 dpv) coletou-se sangue por punção cardíaca, e obteve-se em média 15 mL de soro por animal (Quadro 1). Sendo este utilizado como anticorpo primário nos imunoenaios.

No teste de imunofluorescência foi detectada marcação verde fluorescente nas membranas citoplasmáticas e/ou difusas no citoplasma das células infectadas (Fig. 1). As diluições de trabalho variaram de 1:1.600 para a maioria dos antissoros, até 1:12.800 para o

antissoro do BoHV-1 (Quadro 2). As reações inespecíficas foram mais intensas nas menores diluições (<1:800), e reduziram à medida que o antissoro foi diluído. Este padrão de reação foi observado independente de se utilizarem células infectadas ou controle, o que caracteriza como sendo *background* ou reações inespecíficas. Os soros anti-BTV e anti-VACV produziram reações inespecíficas em maior intensidade nas células controle, porém, com possibilidade de diferenciação entre células infectadas e não infectadas. O teste de IFI utilizando o antissoro anti-BVDV não produziu reação clara e específica com células infectadas e fixadas com acetona. Assim sendo, utilizou-se paraformaldeído (5,5%) para fixar e Triton X-100 (0,05%) para permeabilizar as células. Após este tratamento, observou-se marcação positiva nas células infectadas e diminuição considerável das reações inespecíficas.

Na IPMA os antissoros produzidos reagiram especificamente com as células infectadas com os vírus homólogos e produziram uma coloração carmim difusa no citoplasma destas (Fig. 2). Esta coloração não foi observada nas células controle não infectada. Houve grandes variações nas diluições de trabalho estabelecidas para este ensaio (1:800 a 1:51.200) (Quadro 2). A presença de reações inespecíficas foi visualizada somente nas menores diluições dos soros (<1:800). Novamente, os antissoros anti-BTV e anti-VACV reagiram inespecificamente de forma mais intensa. Assim como na IFI, a IPMA dos antissoros anti-BVDV frente às células infectadas com BVDV e fixadas com acetona:metanol (50:50), produziram reações fracas ou nulas, indistinguíveis dos controles negativos. No entanto, a fixação das células com paraformaldeído (5,5%), e permeabilização com Triton X-100 produziu reações específicas que puderam ser diferenciadas entre células infectadas e não infectadas.

Em um segundo momento, avaliou-se a capacidade dos antissoros anti: BoHV-1, BoHV-5, BVDV e BRSV de reagirem frente a amostras heterólogas destes vírus (dados não mostrados). A avaliação foi realizada por IFI e IPMA e testou-se somente a diluição de trabalho de cada antissoro estabelecida previamente. Todos os antissoros testados foram capazes de reconhecer amostras heterólogas de vírus da mesma espécie, demonstrando assim uma ampla reatividade.

Os antissoros reagiram especificamente na técnica de *slot blot*, e foi possível a visualização da banda na coloração carmim nos lisados de células infectadas (Fig. 3). As diluições de trabalho dos antissoros estabelecidas para esta técnica estão apresentadas no Quadro 2. Assim como nos outros ensaios, reações inespecíficas foram observadas, porém, com a diluição do anticorpo primário e algumas vezes, com diluições do anticorpo secundário estas reações foram inibidas.

De modo geral, os resultados demonstraram que os antissoros produzidos em coelhos, após cinco imunizações, foram capazes de reconhecer de forma específica antígenos virais em três diferentes técnicas. Estes antissoros foram capazes de detectar os antígenos homólogos e, em alguns casos, antígenos heterólogos em diferentes imunoenaios podendo ser utilizados na detecção destes agentes.

## DISCUSSÃO

Anticorpos policlonais específicos para seis importantes viroses de bovinos foram produzidos e a reatividade destes avaliada em imunoenaios. Para isto, coelhos foram imunizados com sobrenadante de cultivos celulares infectados com cepas ou isolados de BoHV-1, BoHV-5, BoHV-5 gEΔ, BoHV-2, BVDV, BRSV, BTV e VACV. A reatividade dos anticorpos policlonais foi demonstrada em testes de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*. Estes testes são rotineiramente utilizados em laboratórios de diagnóstico e pesquisa para identificar a presença de antígenos virais em amostras suspeitas (Chernesky & Mahony 1984, Storch 2000, Brum & Weiblen 2012). Os resultados obtidos indicam que antissoros foram facilmente produzidos, e podem ser usados em testes laboratoriais.

Os vírus selecionados para produção dos antissoros são responsáveis por infecções em bovinos no Brasil e no mundo (Botton et al. 1998a, Silva et al. 2007, Antoniassi et al. 2010). Diversos surtos destas enfermidades foram diagnosticados e caracterizados por meio de técnicas laboratoriais. Sendo que várias destas técnicas são imunoenaios (Botton et al. 1998a, Flores et al. 2000, Silva et al. 2007). No entanto, em algumas situações a demonstração da presença foi viral foi realizada somente por métodos moleculares (Silva et al. 2007, Antoniassi et al. 2010).

Foi obtido em média 15 mL de soro por animal imunizado, no entanto, em algumas situações foi possível coletar mais de 30 mL de um único animal (Quadro 1). Apesar de o volume de soro ser definitivo acredita-se que seja suficiente para a realização de inúmeros ensaios durante muitos anos, pois as diluições de trabalho foram de moderadas e elevadas. Um aspecto favorável aos antissoros é com relação custo e tempo de produção (Leenaars & Hendriksen 2005). Este foi consideravelmente inferior quando comparado com a aquisição comercial, sendo que muitas vezes necessitam ser importados e estão sujeitos a variações cambiais e trâmites alfandegários. O tempo e custo de produção de anticorpos monoclonais também são bastante superiores ao necessário para a produção dos antissoros (Lipman et al.

2005). As principais desvantagens dos antissoros são o volume limitado, a falta de homogeneidade entre os animais e inclusive, diferenças nas coletas de um mesmo animal (Kurstak 1985).

Os imunoenaios são utilizados para identificar e caracterizar a presença viral em amostras clínicas e de pesquisa (Chernesky 1989). No entanto, a execução destes ensaios requer anticorpos que reajam especificamente com antígenos virais (Kennedy 2005). A seleção do tipo de anticorpo a ser utilizado varia de acordo com disponibilidade do antígeno, especificidade, aplicação, volume de anticorpo desejado e infraestrutura disponível para produção (Lipman et al. 2005). Pela facilidade de manipulação, custo e volume de soro optou-se por coelhos para produção do soro hiperimune (Cann 1999, Lipman et al. 2005). Durante todo o procedimento de imunização não foram observadas reações adversas produzidas pelas imunizações. Somente o sobrenadante do cultivo infectado com VACV foi inativado, pois coelhos são susceptíveis à infecção (Cargnelutti et al. 2012).

Os anticorpos policlonais são amplamente usados para diagnóstico e caracterização de amostras virais (Botton et al. 1998b). A ampla diversidade de anticorpos presentes nos antissoros é uma vantagem que contrasta com a especificidade única dos anticorpos monoclonais. Esta característica é desejável para a detecção de epítomos conservados ou então para avaliar a variabilidade em testes de caracterização antigênica de diversos isolados (Roehe et al. 1997, Botton et al. 1998b, Kreutz et al. 2000). Esta ampla reatividade é comum nos soros policlonais, pois estes possuem anticorpos capazes de reagirem frente a antígenos conservados e variáveis de proteínas estruturais e não estruturais (Elahi et al. 1997, Botton et al. 1998b). Nos ensaios de IFI, IPMA, *slot blot* realizados não foi possível determinar a especificidade dos anticorpos presentes nos antissoros. No entanto, pelo fato do imunógeno utilizado ser constituído de sobrenadante de cultivo celular, acredita-se que os antissoros apresentem anticorpos contra diversas proteínas virais. A confirmação inequívoca da reatividade específica dos antissoros será possível com a realização de testes de *Western-blot* ou imunoprecipitação. Ainda, a utilização deste tipo de reagente tem aplicação em ensaios de sorologia cruzada para demonstrar a diversidade antigênica, como nos casos de BoHV-1, BoHV-5 e BVDV (Roehe et al. 1997, Botton et al. 1998b). A avaliação da capacidade neutralizante dos antissoros não foi realizada, porém pelo número de imunizações, tipo de inóculo e pelas diluições de trabalho determinadas nos ensaios, acredita-se que os antissoros possuam anticorpos neutralizantes.

Os anticorpos produzidos em coelhos apresentaram reatividade em três diferentes imunoenaios, demonstrando assim a ampla aplicabilidade em testes frente aos isolados

homólogos, e no caso dos antissoros do BoHV-1 e BoHV-5, BVDV e BRSV também com isolados heterólogos. Os protocolos dos imunoenaios usados neste estudo são descritos em outros estudos, inclusive sendo utilizado na rotina de laboratórios de diagnóstico (Harlow & Lane 1988, Afshar et al. 1991). Adicionalmente não pode ser descartado o emprego destes reagentes em testes de neutralização, ELISA, *Western-blot* entre outros. Recentemente amostras defectivas na glicoproteína E do BoHV-5 foram produzidas e avaliadas como candidatos a vacina diferencial (Brum et al. 2010). No entanto, ainda existe a carência de um teste de ELISA específico para a gE do BoHV-5 capaz de diferenciar animais vacinados e infectados. Assim sendo, os antissoros anti-BoHV-5 gE deletado (#18.1 e #18.2) possuem potencial para serem utilizados em um teste ELISA de bloqueio, ao exemplo do que ocorre como BoHV-1 (Brum et al. 2010).

A reatividade dos antissoros nos testes de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot* demonstraram que todos os antissoros reagiram de forma específica e satisfatória. No entanto, nas menores diluições observaram-se reações inespecíficas, mesmo nos controles de células não infectadas. Este tipo de reação é comum de ocorrer com anticorpos policlonais (Harlow & Lane 1988). Os antissoros anti-BTV e anti-VACV apresentaram as reações inespecíficas mais intensas. A origem destas reações pode ser atribuída à presença de antígenos celulares contaminando o imunógeno, ou ainda a reações cruzadas de outros anticorpos presentes no soro. A resolução destes problemas foi à diluição do antissoro. As alternativas para redução destas reações indesejáveis são a purificação do imunógeno, a adsorção dos antissoros com lisados celulares, ou então purificação dos anticorpos com colunas de afinidades (Harlow & Lane 1988).

Nos testes de imunofluorescência e imunoperoxidase os antígenos estavam presentes no interior das células infectadas e diferentes padrões de coloração foram detectados, especialmente no caso de imunofluorescência (Fig. 1 e Fig. 2). As células infectadas com os herpesvírus, BRSV e VACV apresentaram coloração verde difusa no citoplasma e nas células infectadas com BTV observaram-se regiões localizadas com coloração e outras áreas com ausência de marcação (Fig. 1). Nos casos das colorações com o BVDV a fixação com acetona ou acetona:metanol não demonstraram reações específicas. A alteração do agente fixador, tanto para IFI como para IPMA, possibilitou a identificação de reações específicas. Este mesmo efeito foi relatado por Elahi et al. (1997) utilizando monoclonais para o BVDV. A explicação para isto seria a alteração de epítomos dos antígenos causados pela acetona que os tornariam inacessíveis aos anticorpos. Devido à reatividade inespecífica observada na IFI e IPMA à fonte de antígeno para o *slot blot* do BTV e VACV foi o sobrenadante de cultivos

infectados. Com esta alteração as reações inespecíficas foram eliminadas. Deste modo, pode-se sugerir que uma das causas das reações inespecíficas na IFI e IPMA desses antissoros foi devido a proteínas celulares contaminantes do antígeno viral utilizado para imunizar os animais.

Assim sendo, os resultados demonstram a produção de anticorpos policlonais e a sua reatividade nos testes de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*. A diluição de trabalho de todos os antissoros foi considerada de moderada a elevada quando testados frente ao vírus homólogo. Os antissoros -BoHV-1, -BoHV-5, -BVDV e -BRSV reagiram positiva e especificamente frente às amostras heterólogas. Ainda, existe a possibilidade de utilização destes reagentes em outras metodologias. Com isto, conclui-se que foram produzidos importantes reagentes para o emprego em diferentes testes de diagnóstico e pesquisa de vírus bovinos.

### **AGRADECIMENTOS**

Aos bolsistas do Laboratório de Virologia da UNIPAMPA Campus Uruguaiana, pelo auxílio laboratorial. Aos técnicos agropecuários pelos cuidados com os animais. Ao Setor de Virologia da Universidade Federal Santa Maria pela cedência dos cultivos celulares e amostras virais. À empresa Hipra Saúde Animal. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro (ARD 010/0222-0).

### **REFERÊNCIAS**

- Antoniassi N.A., Pavarini S.P., Henzel A., Flores E.F. & Driemeier D. 2010. Aspiration pneumonia associated with oesophageal myonecrosis in sheep due to BTV infection in Brazil. *Vet. Rec.* 166:52-53.
- Assis-Brasil N.D., Marcolongo-Pereira C., Hinnah F.L., Ladeira S.R.L, Sallis E.S.V., Grecco F.B.V. & Schild A.L. 2013. Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 33:423-430.

- Afshar A., Dulac G.C., Dubuc C. & Howard T.H. 1991. Comparative evaluation of the fluorescent antibody test and microtiter immunoperoxidase assay for detection of bovine viral diarrhoea virus from bull semen. *Can. J. Vet. Res.* 55:91-93.
- Al-Mubarak A., Simon J., Coats C., Okemba J.D., Burton M.D. & Chowdhury S.I. 2007. Glycoprotein E (gE) specified by bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) enables *trans-neuronal* virus spread and neurovirulence without being a structural component of enveloped virions. *Virology* 365:398-409.
- Bethell D.R. & Howard G.C. 2000. Starting out, p. 1-4. In: *Ibid.* (Eds), Basic methods in antibody production and characterization. 1st. ed. Florida: CRC Press.
- Botton S.A., Silva A.M., Brum M.C.S. & Flores E.F. 1998b. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31:1429-1438.
- Botton S.A., Gil L.H.V.G., Silva A.M., Flores E.F., Weiblen R., Pituco M., Roehe P.M., Moojen V. & Wendelstein C. 1998a. Caracterização preliminar de amostras do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) isoladas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 18:83-90.
- Brum M.C.S. & Weiblen R. 2012. Detecção, identificação e quantificação de vírus, p. 53-82. In: Flores E.F. (Org.). *Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas*. 2a. ed. Editora UFSM.
- Cann A.J. 1999. *Virus culture: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 296 p.
- Cargnelutti J.F., Schmidt C., Masuda E.K., Brauma L.D., Weiblen R. & Flores E.F. 2012. Vaccinia viruses isolated from cutaneous disease in horses are highly virulent for rabbits. *Microb. Pathog.* 52:192-199.
- Chand K., Biswas S.K., De A., Sing B. & Mondal B. 2009. A polyclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of bluetongue virus in cell culture and blood of sheep infected experimentally. *J. Virol. Methods.* 160:189-192.
- Chernesky M.A. 1989. An evolutionary change in diagnostic virology. *Yal. J. Biol. Med.* 62:89-92.
- Chernesky M.A. & Mahony J.B. 1984. Detection of viral antigens, particles, and early antibodies in diagnosis. *Yal. J. Biol. Med.* 57:757-776.

- Darling A.J., Boose J.A. & Spaltro J. 1998. Virus assay methods: accuracy and validation. *Biologicals*. 26:105-110.
- Elahi S.M., Harpin S., Cornaglia E., Talbot B. & Elazhary Y. 1997. Antigenic variation among bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains and the role of different cell fixation methods in immunoassays. *Can. J. Vet. Res.* 61:34-38.
- Flores E.F., Weiblen R., Medeiros M., Botton S.A., Irigoyen L.F., Driemeier D., Schuch L.F. & Moraes M. 2000. A retrospective search for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antigens in histological specimens by immunofluorescence and immunohistochemistry. *Pesq. Vet. Bras.* 20:139-143.
- Flint S.J., Enquist L.W., Krug R.M., Racaniello V.R. & Skalka A.M. 2000. *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control*. Washington: ASM Press, 804 p.
- Harlow E. & Lane D. 1988. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: C.S.H.L. Press, 726 p.
- Kennedy M. 2005. Methodology in diagnostic virology. *Vet. Clin. Exot. Anim. Prac.* 8:7-26.
- Kennedy M. & Greenacre C.B. 2005. General concepts of virology. *Vet. Clin. Exot. Anim. Prac.* 8:1-6.
- Kreutz L.C., Donis R., Gil L.H., Lima M., Hoffman A.N., Garcez D.C., Flores E.F. & Weiblen R. 2000. Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33:1459-1466.
- Kurstak E. 1985. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. *Bull. World Health Organ.* 63:793-811.
- Leenaars M. & Hendriksen C.F.M. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J.* 46:269-279.
- Lipman N.S., Jackson L.R., Trudel L.J. & Weis-Garcia, F. 2005. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J.* 46:258-268.
- Lucena R.B., Pierezan F., Kommers G.D., Irigoyen L.F., Figuera R.A. & Barros C.S.L. 2010. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 30:428-434.

- MacLachlan N. & Dubovi E.J. 2011. Fenner's veterinary virology. 4th ed. London: Academic Press, 534 p.
- Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C. & Studdert M.J. 1999. Veterinary virology. 3th ed. San Diego: Academic Press, 629 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 (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.* 17:41-44.
- Silva M.S., Brum M.C.S., Weiblen R. & Flores, E.F. 2007. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). *Pesq. Vet. Bras.* 27:403-408.
- Storch G.A. 2000. Diagnostic virology. *Clin. Infect. Dis.* 31:739-751.
- Van Regenmortel M.H.V. 2005. The nature and classification of viruses, p. 24-37. In: Mahy B.W.J. & Meulen V.T. (Ed.). *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections: virology*. 10th ed. London: John Willen & Sons, Ltd.

**Quadro 1. Imunógenos utilizados para produção dos anticorpos policlonais em coelhos**

Imunógeno	Identificação	Linhagem celular	Título viral	Nº de animais imunizados	Volume total de soro
BoHV-1	Cooper	CRIB	$10^{7,3}$ TCID <sub>50</sub> /mL	2	18,5 mL
BoHV-5	SV 507 wt	CRIB	$10^{6,5}$ TCID <sub>50</sub> /mL	2*	37 mL
BoHV-5 gEΔ	SV 507 gEΔ	CRIB	$10^{6,8}$ TCID <sub>50</sub> /mL	2	39 mL
BoHV-2	Nebraska	CRIB	$10^{5,1}$ TCID <sub>50</sub> /mL	2	44,5 mL
BVDV	Singer	MDBK	$10^{6,8}$ TCID <sub>50</sub> /mL	2	38 mL
BRSV	BRSV	CRIB	$10^{5,3}$ TCID <sub>50</sub> /mL	1	12 mL
BTV	Sorotipo 4	BHK-21	$10^{5,1}$ TCID <sub>50</sub> /mL	1	18 mL
VACV	VACV – P1V	VERO	$10^{4,8}$ TCID <sub>50</sub> /mL	2	47 mL

\*Animal #7.2 morto no dia 50 dpv.

**Quadro 2. Diluições de trabalho dos antissoros produzidos frente aos vírus homólogos nos imunoenaios**

Imunógeno	Antissoro	Imunofluorescência	Imunoperoxidase	Slot blot
BoHV-1	2.1	1:1.600	1:12.800	1:8.000
	2.2	1:12.800	1:51.200	NT*
BoHV-5	7.1	1:1.600	1:800	1:2.000
BoHV-5 gEΔ	18.1	1:1.600	1:3.200	NT
	18.2	1:1.600	1:800	NT
BoHV-2	21.1	1:1.600	1:25.600	1:10.000
	21.2	1:1.600	1:25.600	NT
BVDV	4.1	1:1.600	1:12.800	1:10.000
	4.2	1:1.600	1:12.800	NT
BRSV	5.1	1:1.600	1:6.400	1:6.000
BTV	16.1	1:1.600	1:12.800	1:10.000
VACV	24.1	1:6.400	1:25.600	1:20.000
	24.2	1:6.400	1:12.800	NT

\*NT: não testados

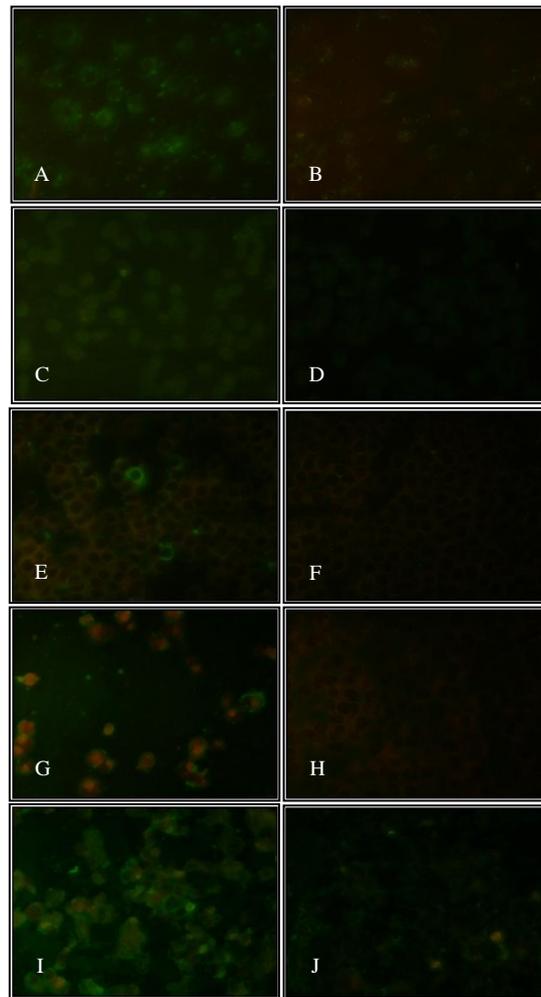


Fig. 1. Técnica de imunofluorescência. **A:** células infectadas com BoHV-1 x soro policlonal (2.1) na diluição 1:800. **B:** células controle x soro policlonal (2.1) na diluição 1:800. **C:** células infectadas com BoHV-2 x soro policlonal (21.1) na diluição 1:3.200. **D:** células controle x soro policlonal (21.1) na diluição 1:3.200. **E:** células infectadas com BRSV x soro policlonal (5.1) na diluição 1:800. **F:** células controle x soro policlonal (5.1) na diluição 1:800. **G:** células infectadas com BTV x soro policlonal (16.1) na diluição 1:1.600. **H:** células controle x soro policlonal (16.1) na diluição 1:1.600. **I:** células infectadas com VACV x soro policlonal (24.1) na diluição 1:3.200. **J:** células controle x soro policlonal (24.1) na diluição 1:3.200. Objetiva 40x.

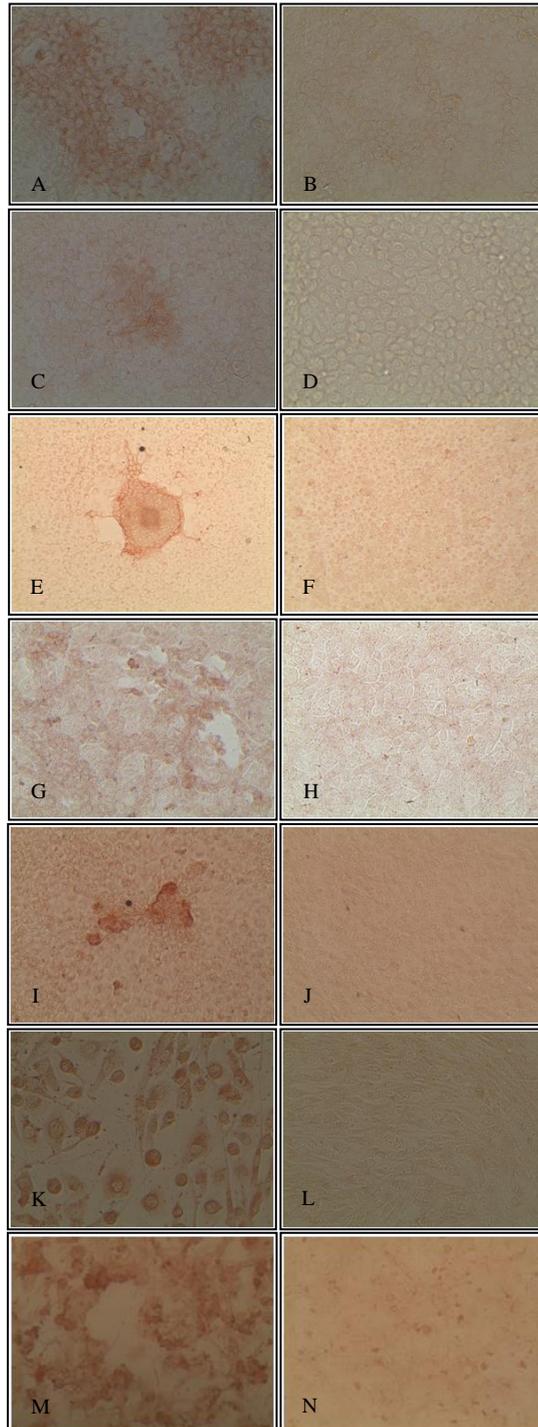


Fig. 2. Técnica de imunoperoxidase. **A:** células infectadas com BoHV-1 x soro policlonal (2.1) na diluição 1:12.800. **B:** células controle x soro policlonal (2.1) na diluição 1:12.800. **C:** células infectadas com BoHV-5 x soro policlonal (7.1) na diluição 1:800. **D:** células controle x soro policlonal (7.1) na diluição 1:800. **E:** células infectadas com BoHV-2 x soro policlonal (21.1) na diluição 1:6.400. **F:** células controle x soro policlonal (21.1) na diluição 1:6.400. **G:** células infectadas com BVDV x soro policlonal (4.1) na diluição 1:12.800. **H:** células controle x soro policlonal (4.1) na diluição 1:12.800. **I:** células infectadas com BRSV x soro policlonal (5.1) na diluição 1:1.600. **J:** células controle x soro policlonal (5.1) na diluição 1:1.600. **K:** células infectadas com BTV x soro policlonal (16.1) na diluição 1:12.800. **L:** células controle x soro policlonal (16.1) na diluição 1:12.800. **M:** células infectadas com VACV x soro policlonal (24.1) na diluição 1:12.800. **N:** células controle x soro policlonal (24.1) na diluição 1:12.800. Objetiva 40x.

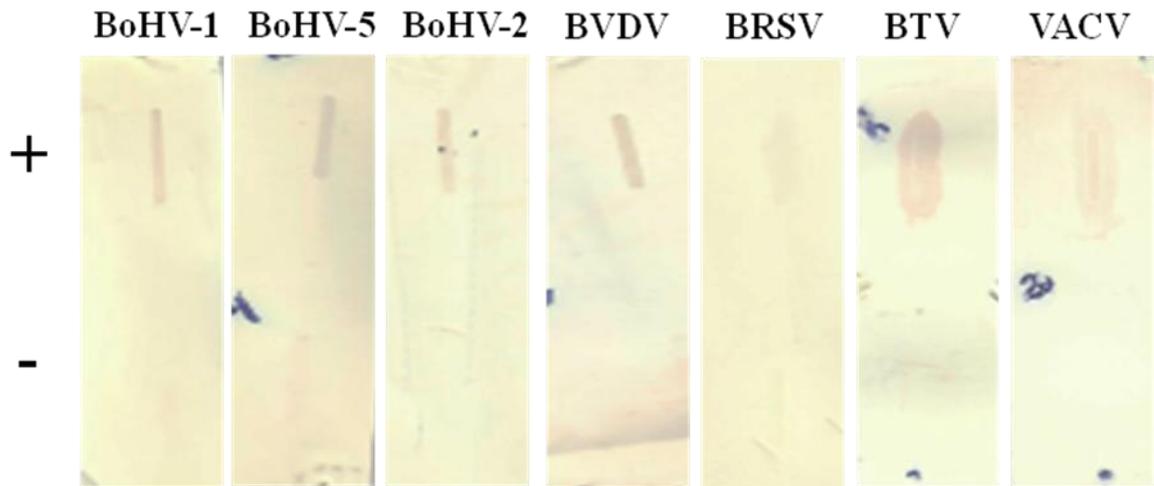


Fig. 3. Técnica de *slot blot*. Lisado de cultivo celular infectado com **BoHV-1** (+) e controle (-) x soro policlonal (2.1) na diluição 1:8.000. Lisado de cultivo celular infectado com **BoHV-5** (+) e controle (-) x soro policlonal (7.1) na diluição 1:2.000. Lisado de cultivo celular infectado com **BoHV-2** (+) e controle (-) x soro policlonal (21.1) na diluição 1:10.000. Lisado de cultivo celular infectado com **BVDV** (+) e controle (-) x soro policlonal (4.1) na diluição 1:10.000. Lisado de cultivo celular infectado com **BRSV** (+) e controle (-) x soro policlonal (5.1) na diluição 1:6.000. Sobrenadante de cultivo celular infectado com **BTV** (+) e controle (-) x soro policlonal (16.1) na diluição 1:10.000. Sobrenadante de cultivo celular infectado com **VACV** (+) e controle (-) x soro policlonal (24.1) na diluição 1:20.000.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os vírus são agentes patogênicos de diversas espécies, e importantes causadores de enfermidades no rebanho bovino brasileiro. A identificação do agente viral em amostras clínicas ou experimentais de forma rápida e precisa é um objetivo comum ao diagnóstico e estudo. As metodologias de detecção do agente podem variar conforme o tipo de amostra e quanto à disponibilidade de reagentes. Em técnicas que utilizam a reação antígeno-anticorpo, anticorpos monoclonais ou antissoros são utilizados para a detecção de antígenos. A qualidade e especificidade destes reagentes são indispensáveis para o bom desempenho destes ensaios.

O presente estudo teve como objetivo produzir soros policlonais contra alguns vírus bovinos. A reatividade destes reagentes foi avaliada em ensaios de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*. Para determinar a concentração de trabalho dos antissoros, várias diluições do soro foram efetuadas, e testadas contra vírus homólogos, e em alguns casos, com isolados heterólogos. A diluição de trabalho para cada antissoros, em cada técnica ficou definida pela maior diluição com reação específica positiva, e pouco ou nenhum *background* nas células não infectadas.

Os resultados demonstraram que os antissoros produzidos são capazes de reagir com antígenos homólogos e em alguns casos também reconheceram amostras heterólogas, em diferentes ensaios. Ficou evidenciado que os antissoros foram mais sensíveis na detecção do antígeno na técnica de imunoperoxidase, quando comparada com a imunofluorescência e *slot blot*. Esta característica foi comprovada pelas diluições de trabalho determinadas para as IPMAs, que foram maiores que as diluições estabelecidas para as outras técnicas com os mesmos soros.

Os antissoros produzidos e avaliados neste estudo podem ser aplicados à rotina laboratorial visando à detecção de vírus bovinos nos ensaios de imunofluorescência, imunoperoxidase e *slot blot*. Acredita-se ainda que estes anticorpos policlonais possam ser empregados em outros testes de rotina. Este estudo demonstrou que, a produção de antissoros para uso em imunoensaios de detecção viral é uma alternativa prática, rápida, econômica e eficiente, em relação a outras alternativas de obtenção de reagentes.

## REFERÊNCIAS

ALICE, F.J. Isolamento do vírus da mamilitite herpética bovina no Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 8, n. 1, p. 9–15, 1977.

ANTONIASSI, N.A.; PAVARINI, S.P.; HENZEL, A.; FLORES, E.F.; DRIEMEIER, D. Aspiration pneumonia associated with oesophageal myonecrosis in sheep due to BTV infection in Brazil. **The Veterinary record**, v. 166, n. 2, p. 52–53, 2010.

ASSIS-BRASIL, N.D.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; HINNAH, F.L.; LADEIRA, S.R.L.; SALLIS, E.S.V.; GRECCO, F.B.V.; SCHILD, A.L. Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 423–430, 2013.

BARBOSA, A.C.; BRITO, W.M.E.D.; ALFAIA, B.T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1368–1373, 2005.

BEAN, E.S. Polyclonal antibodies. In: HOWARD, G.C.; BETHELL, D.R. **Basic methods in antibody production and characterization**. 1. ed. Florida: CRC Press, 2000, p. 31–50.

BETHELL, D.R.; HOWARD, G.C. Starting Out. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). **Basic methods in antibody production and characterization**. 1. ed. Florida: CRC Press, 2000, p. 1–4.

BOTTON, S.A.; GIL, L.H.V.G.; SILVA, A.M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; PITUCO, M.; ROEHE, P.M.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, C. Caracterização preliminar de amostras do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 83–90, 1998.

BRITO, W.M.E.D.; MUNFORD, V.; VILLAÇA, A.M.; CARUZO, R.T.A.; RÁCZ, M.L. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 140–145, 2000.

BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E.F. (Org.). **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012, p. 53–82.

CANDEIAS, J.A.N. **Laboratório de virologia: manual técnico**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1996, 159 p.

CANN, A.J. **Virus culture: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1999, 296 p.

CARGNELUTTI, J.F.; FLORES, M.M.; TEIXEIRA, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. An outbreak of pseudocowpox in fattening calves in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 437–441, 2012.

CARTER, J.B.; SAUNDERS, V.A. **Virology: principles and applications**. 1. ed. Trento: John Wiley & Sons, Ltd, 2007, 382 p.

CARSTENS, E.B. Introduction to virus taxonomy. In: KING, A.M.Q.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B. (Ed.). **Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses**. 1. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012, 1338 p.

CHERNESKY, M.A. An evolutionary change in diagnostic virology. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 62, n. 2, p. 89–92, 1989.

CHERNESKY, M.A.; MAHONY, J.B. Detection of viral antigens, particles, and early antibodies in diagnosis. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 57, n. 5, p. 757–776, 1984.

CLAUS, M.P.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.A.; OTONEL, R.A.A.; SARTORI, D.; FUNGARO, M.H.P.; ALFIERI, A.F. Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in Brazilian cattle herds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. spe, p. 93–98, 2009.

CONDIT, R.A. Principles of virology. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 3280 p.

COSTA, E.A.; VASCONCELOS, A.C.; BOMFIM, M.R.Q.; AMORIM, H.B.; LIMA, G.B.L.; COELHO, F.M.; RESENDE, M. Neurological disorder in cattle associated with bovine herpesvirus 4. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 4, p. 828–835, 2011.

COSTA, J.R.R.; LOBATO, Z.I.P.; HERRMANN, G.P.; LEITE, R.C.; HADDAD, J.P.A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 273–275, 2006.

DAMASO, C.R.A.; ESPOSITO, J.J.; CONDIT, R.C.; MOUSSATCHÉ, N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro state: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 439–449, 2000.

DARLING, A.J.; BOOSE, J.A.; SPALTRO, J. Virus assay methods: accuracy and validation. **Biologicals**, v. 26, n. 2, p. 105–110, 1998.

DeFILIPPIS, V.R.; VILLARREAL, L.P. Virus evolution. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 3280 p.

DE STEFANO, E.; ARAÚJO, W.P.; PASSOS, E.C.; PITUCO, E.M. Pesquisa de anticorpos contra o vírus da estomatite vesicular em bovinos de corte criados na região de Araçatuba, estado de São Paulo, Brasil em 2000. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 1, p. 29–35, 2003.

DEWAR, V.; VOET, P.; DENAMUR, F.; SMAL, J. Industrial implementation of *in vitro* production of monoclonal antibodies. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 307–313, 2005.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. The origin and evolution of the viruses. In: MAHY, B.W.J.; MEULEN, V.T. (Org.). **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections: virology**. 10. ed. London: John Willen & Sons, Ltd, 2005, p. 11–23.

DRIEMEIER, D.; GOMES, M.J.P.; MOOJEN, V.; WEISS, A.C.; VOGG, G.; KESSLER, L.; COSTA, U.M. Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 77–81, 1997.

FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. **Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control**. Washington: ASM Press, 2000, 804 p.

FLORES, E.F.; CARGNELUTTI, J.F. Diagnóstico laboratorial de infecções víricas. In: FLORES, E.F. (Org.). **Virologia Veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012, p. 325–365.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 125–134, 2005.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: C.S.H.L. Press, 1988, 726 p.

HAU, J.; HENDRIKSEN, C.F.M. Refinement of polyclonal antibody production by combining oral immunization of chickens with harvest of antibodies from the egg yolk. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 294–299, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE. 2010, 65 p.

KAHRS, R.F. **Viral diseases of cattle**. 2. ed. Iowa State University Press, 2001, 321 p.

KENNEDY, M. Methodology in diagnostic virology. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, v. 8, n. 1, p. 7–26, 2005.

KENNEDY, M.; GREENACRE, C.B. General concepts of virology. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2005.

KURSTAK, E.; TIJSSEN, P.; KURSTAK, C.; MORISSET, R. Enzyme immunoassays and related procedures in diagnostic medical virology. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 64, n. 3, p. 465–479, 1986.

LANGOHR, I.M.; IRIGOYEN, L.F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 125–131, 2003.

LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C.F.M. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 269–279, 2005.

LEVINE, A.J. The origins of virology. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 3280 p.

LIPMAN, N.S.; JACKSON, L.R.; TRUDEL, L.J.; WEIS-GARCIA, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 258–268, 2005.

LOBATO, Z.I.P.; TRINDADE, G.S.; FROIS, M.C.M.; RIBEIRO, E.B.T.; DIAS, G.R.C.; TEIXEIRA, B.M.; LIMA, F.A.; ALMEIDA, G.M.F.; KROON, E.G. Surto de varíola bovina

causada pelo vírus vaccínia na região da zona da mata mineira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 423–429, 2005.

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**, v. 25, n. 3, p.425–430, 1995.

LUCENA, R.B.; PIEREZAN, F.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; FIGHERA, R.A.; BARROS, C.S.L. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 428–434, 2010.

LYRA, T.M.P.; SILVA, J.A. A febre aftosa no Brasil, 1960-2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 565–576, 2004.

MACLACHLAN, N.; DUBOVI, E.J. **Fenner's veterinary virology**. 4. ed. London: Academic Press, 2011, 534 p.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E.S.V.; GRECCO, F.B., RAFFI, M.B.; SOARES, M.P.; SCHILD, A.L. Raiva em bovinos na Região Sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico imuno-histoquímico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 331–335, 2011.

MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347–350, 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Manual de legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil**. Brasília: MAPA, 2009, 440 p.

MILSTEIN, C.; KÖHLER, J.F. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495–497, 1975.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary virology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999, 629 p.

PEIXOTO, P.V.; MOTA, R.A.; BRITO, M.F.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; SOUZA, M.I. Infecção natural pelo vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 171–175, 2000.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. **Veterinary microbiology and microbial disease**. 2. ed. London: Wiley-Blackwell, 2002, 928 p.

RISSI, D.R.; OLIVEIRA, F.N.; RECH, R.R.; PIEREZAN, F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvirus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 123–132, 2006.

SANT'ANA, F.J.; RABELO, R.E.; VULCANI, V.A.; CARGNELUTTI, J.F.; FLORES, E.F. Bovine papular stomatitis affecting dairy cows and milkers in Midwestern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 442–445, 2012.

STILLS, H.F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 280–293, 2005.

STORCH, G.A. Diagnostic virology. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 739–751, 2000.

TAKIUCHI, E.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; FILIPPSEN, P.; ALFIERI, A.A. An outbreak of winter dysentery caused by bovine coronavirus in a high-production dairy cattle herd from a tropical country. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. spe, p. 57–61, 2009.

TORRES, F.D.; BERNARDES, L.M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Prevalência de anticorpos contra o vírus da mamilite herpética em bovinos do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1901–1904, 2009.

UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION (USAHA). **Methods for production of monoclonal antibodies**, Washington: Agriculture Handbook, n. 630, 1984, 50 p.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. The nature and classification of viruses. In: MAHY, B.W.J.; MEULEN, V.T. (Ed.). **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections: virology**. 10. ed. London: John Willen & Sons, Ltd, 2005, p. 24–37.

WEIBLEN, R.; BARROS, C.S.; CANABARRO, T.F.; FLORES, E.F. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **The veterinary record**, v. 124, n. 25, p. 666–667, 1989.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Immediate notification and follow-up reports of a disease an infection or any other significant epidemiological event. In: OIE. **Terrestrial Animals Disease**. Paris: OIE, 2011. p. 1–40.