

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**TESTE IMUNOENZIMÁTICO COM BASE EM
ANTICORPO MONOCLONAL PARA A DETECÇÃO
DE ANTICORPOS CONTRA HERPESVÍRUS BOVINO
TIPOS 1 E 5**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernando Viçosa Bauermann

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**TESTE IMUNOENZIMÁTICO COM BASE EM ANTICORPO
MONOCLONAL PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA
HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1 E 5**

Por

Fernando Viçosa Bauermann

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores

**Santa Maria, RS, Brasil.
2009**

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**TESTE IMUNOENZIMÁTICO COM BASE EM ANTICORPO
MONOCLONAL PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O
HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1 E 5**

Elaborada por
Fernando Viçosa Bauermann

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Eduardo Furtado Flores, PhD, UFSM
(Presidente/orientador)

Ivomar Oldoni, PhD, Brasil Foods

Luizinho Caron, Dr, Embrapa, CNPSA

Santa Maria, 11 de Setembro de 2009.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

**TESTE IMUNOENZIMÁTICO COM BASE EM ANTICORPO MONOCLONAL
PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS
1 E 5.**

AUTOR: FERNANDO VIÇOSA BAUERMANN
ORIENTADOR: EDUARDO FURTADO FLORES
Santa Maria, 11 de Setembro de 2009.

Essa dissertação relata a padronização de um teste imunoenzimático do tipo ELISA, com base em anticorpo monoclonal (AcM), para a detecção de anticorpos séricos que reagem contra herpesvírus bovino tipos 1 e/ou 5 (BoHV-1, BoHV-5). Inicialmente, determinou-se o AcM mais adequado para a sensibilização das placas, as diluições apropriadas do antígeno e dos soros-teste e o ponto de corte do ensaio. Após a padronização, o ensaio foi validado testando-se 506 amostras de soro bovino, previamente testadas para anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1 e/ou BoHV-5 pela técnica de soroneutralização (SN). Comparando-se com os resultados da SN frente ao BoHV-1, o teste de ELISA apresentou sensibilidade e especificidade de 96,6% e 98,3%, respectivamente. Os valores preditivos positivo e negativo foram de 97,6%, a concordância foi de 97,6% e o índice de correlação (*kappa*) entre os testes foi de 0,95, o que indica uma excelente concordância. Comparando-se com os resultados da SN frente ao BoHV-5, o ELISA apresentou 94,3% de sensibilidade; 97,9% de especificidade; 97,1% de valor preditivo positivo e 95,9% de valor preditivo negativo. Para o BoHV-5, a concordância entre os testes foi de 96,4% e o índice de correlação foi de 0,92, também excelente. Esses resultados demonstram que o teste padronizado apresenta sensibilidade e especificidade adequados para o diagnóstico sorológico das infecções pelo BoHV-1 e BoHV-5 em nível individual e de rebanho. Dessa forma, o ensaio pode se constituir em alternativa para o teste de SN e para os kits de ELISA importados.

Palavras-chave: ELISA, sorologia, herpesvírus bovino, BoHV-1, BoHV-5, diagnóstico.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

A MONOCLONAL ANTIBODY-BASED ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTION OF ANTIBODIES TO BOVINE HERPESVIRUSES 1 AND 5

AUTHOR: FERNANDO VIÇOSA BAUERMANN
ADVISER: EDUARDO FURTADO FLORES
Santa Maria, September, 11th, 2009.

This dissertation reports the standardization of a monoclonal antibody (MAb)-based immunoenzymatic test (ELISA) for detection of antibodies to bovine herpesvirus types 1 and/or 5 (BoHV-1 and BoHV-5). The initial steps involved the determination of the most suitable MAb, the appropriate dilutions of viral antigen and test sera; and the cut-off value of the assay. After standardization, the ELISA was validated by testing 506 cattle serum samples previously tested for neutralizing antibodies to BoHV-1 and BoHV-5 by virus neutralizing (VN) assay. Comparing to the VN for BoHV-1 antibodies, the ELISA presented sensitivity and specificity of 96.6% and 98.3%, respectively. Positive and negative predictive values were 97.6%, the concordance between the tests was 97.6% and the coefficient of correlation k ($kappa$) was 0.95, demonstrating an excellent correlation. Comparing to the VN for BoHV-5 antibodies, the ELISA presented 94.3% of sensitivity, 97.9% of specificity, 97.1% of positive predictive value, 95.9% negative predictive value, concordance of 96.4% and $kappa$ coefficient of 0.92. These results demonstrate that the ELISA presents suitable specificity and sensitivity to be used for individual and herd serological diagnosis of BoHV-1 and BoHV-5, thus, representing an alternative for VN assays and imported ELISA kits.

Key words: ELISA, serology, bovine herpesvirus, BoHV-1, BoHV-5, diagnostic.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1. Média da densidade óptica (XDO) das diluições dos AcMs testados (2F9, 4E4, 3D6) para a sensibilização das placas de ELISA..... 33
- FIGURA 2. Média da densidade óptica (XDO) de amostras de soro positivas (A) e negativas (B) para anticorpos contra os herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e/ou tipo 5 (BoHV-5), diluídas 1:20 e 1:40 frente a diferentes diluições do antígeno..... 34

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1. Resultados dos testes de ELISA e soroneutralização (SN) para a detecção de anticorpos contra o BoHV-1 em amostras de soro bovino.....	35
TABELA 2. Resultados dos testes de ELISA e soroneutralização (SN) para a detecção de anticorpos contra o BoHV-5 em amostras de soro bovino.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 CAPÍTULO 1. Teste imunoenzimático com base em anticorpo monoclonal para a detecção de anticorpos contra herpesvírus bovino tipos 1 e 5.....	13
Resumo.....	14
Abstract.....	15
Introdução.....	16
Material e métodos.....	19
Resultados.....	22
Discussão.....	24
Referências bibliográficas.....	28
3 REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Os vírus desta subfamília caracterizam-se por um ciclo de replicação curto, número relativamente grande de hospedeiros e pela capacidade de estabelecer infecções latentes em neurônios (ROIZMAN et al. 1992; MUYLKENS et al. 2007). Possuem vírions envelopados, pleomórficos com diâmetro variando entre 120-200nm e capsídeo com simetria icosaédrica. O genoma é composto por uma molécula de DNA fita dupla linear, sendo de aproximadamente 137kpb no BoHV-1, e em torno de 138kpb no BoHV-5. (ROIZMAN et al. 1992; DELHON et al. 2003). A infecção pelo BoHV-1 possui importância econômica para a pecuária mundial, exceto para alguns países europeus que erradicaram a infecção, como a Suíça e Dinamarca (NYLIN et al. 2000; KAHRS, 2001). Por sua vez, o BoHV-5 também causa prejuízos a pecuária, porém a sua distribuição se restringe principalmente a países do Hemisfério Sul, com vários relatos de surtos no Brasil e na Argentina (SALVADOR et al. 1998; SANCHES et al. 2000; RIET-CORREA et al. 2006).

O BoHV-1 é um dos agentes etiológicos do complexo respiratório bovino, em que parece ter envolvimento nas lesões iniciais do epitélio respiratório, diminuição da atividade de macrófagos alveolares e neutrófilos, permitindo assim a ação de agentes secundários, o que frequentemente culmina em broncopneumonia severa (MUYLKENS et al. 2007). Isoladamente, este agente tem sido associado com diferentes manifestações clínicas, que incluem a rinotraqueíte infecciosa (IBR), vulvovaginite pustular/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB), abortos e em raros casos, meningoencefalite (MUYLKENS et al. 2007; SILVA et al. 2007). O BoHV-1 é subdividido em três subtipos, com base em características genômicas e antigênicas: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b. O primeiro geralmente está associado com doença respiratória e abortos. O BoHV-1.2a é o subtipo mais frequentemente encontrado nas amostras diagnosticadas no Brasil, sendo identificado em diversas manifestações clínicas, incluindo quadros respiratórios, doença do trato reprodutivo (IPV e IPB), além de abortos. O BoHV-1.2b parece ser o menos patogênico dos subtipos, sendo

relacionado apenas com doença do trato genital e doença respiratória branda (MILLER; VAN DER MAATEN, 1984; METZLER et al. 1985; SPILKI et al. 2004).

O genoma do BoHV-5 possui similaridade de nucleotídeos de aproximadamente 85 a 90% com o BoHV-1, sendo no passado considerado um subtipo deste (ROIZMAN et al. 1992; DELHON et al. 2003). O BoHV-5 possui tropismo por células do sistema nervoso central (SNC), causando doença neurológica aguda, com alta mortalidade, afetando principalmente bovinos jovens (SANCHES et al. 2000). A doença é caracterizada por sinais neurológicos associados com meningoencefalite, que incluem bruxismo, salivação, opistótono, cegueira, ataxia, decúbito e convulsões (RISSI et al. 2006).

A infecção por esses agentes ocorre por contato direto ou indireto com animais ou com secreções contaminadas. O vírus penetra e replica na mucosa do trato respiratório superior, fase em que geralmente ocorrem os sinais clínicos respiratórios como descarga nasal serosa, rinite e dispnéia. A infecção por via genital leva ao desenvolvimento de vulvovaginite e balanopostite (MUYLKENS et al. 2007). Após a replicação primária, o vírus invade as terminações nervosas de neurônios sensoriais, sendo transportado ao longo dos axônios pelo fluxo axoplasmático retrógrado até os corpos dos neurônios nos gânglios regionais, estabelecendo a latência principalmente nos gânglios sacrais e trigêmeo, dependendo do local de penetração (VOGEL et al. 2004; RISSI et al. 2006; JONES; CHOWDHURY, 2007).

O estabelecimento da infecção latente é uma característica fundamental para a epidemiologia dos alfa herpesvírus. Durante essa fase apenas um transcrito é detectado nos neurônios, o LAT (transcrito associado à latência), sendo que os mecanismos completos envolvidos na latência ainda não foram totalmente elucidados (JONES; CHOWDHURY, 2007). Durante períodos de estresse, uso prolongado de corticóides e diminuição da imunidade por diferentes fatores, pode ocorrer a reativação viral, quando ocorre replicação viral nos neurônios e excreção aos sítios de infecção primária, seguido de replicação e excreção viral. Geralmente na reativação, quando ocorre o aparecimento de sinais clínicos, são de intensidade branda (CARON et al. 2002; VOGEL et al. 2004).

O diagnóstico da infecção pelo BoHV-1 e 5 pode ser realizado por métodos diretos ou indiretos. O diagnóstico sorológico tem grande importância devido a capacidade que esses agentes possuem em estabelecer a infecção latente. Isso implica que animais não vacinados, com sorologia positiva, são portadores da infecção. As técnicas sorológicas utilizadas para o

diagnóstico do BoHV-1 e 5 se constituem em estratégia para demonstrar a presença do vírus no rebanho e quantificar o número de animais infectados. Também possuem importância para a definição de medidas de controle e quanto para a erradicação da infecção. As técnicas mais utilizadas com essa finalidade são a soroneutralização (SN) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA-*enzyme-linked immunosorbent assay*) (MÉDICI et al. 2000).

A SN é considerada a técnica sorológica padrão, em que é possível fazer a detecção e quantificação de anticorpos neutralizantes no soro ou em secreções. A técnica, porém, é laboriosa, demorada e requer condições laboratoriais que possibilitem a manutenção de cultivos celulares (VAN OIRSCHOT et al. 1997; MÉDICI et al. 2000). É sugerido que a técnica de SN em alguns animais que apresentem a infecção viral em estado de latência prolongada ou naqueles recentemente infectados tenha menor sensibilidade com relação à técnica de ELISA. Nestes casos, os anticorpos neutralizantes nestes animais podem apresentar níveis basais, que não são detectáveis por meio deste procedimento sorológico, podendo originar resultados falsos-negativos (WYLER et al. 1989).

A técnica de ELISA é amplamente utilizada em diversos países, principalmente devido as vantagens em relação à SN, como a facilidade do teste de um grande número de amostras e obtenção rápida dos resultados. Ao contrário da SN, o ELISA também detecta anticorpos não neutralizantes, podendo tornar a técnica mais sensível (WYLER et al. 1989).

No Brasil já foram padronizados ensaios imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos contra o BoHV-1. FERRERA et al. (2005) desenvolveram um ELISA indireto, com base em antígeno concentrado e não purificado produzido em cultivo celular. Já TEIXEIRA et al. (2001) relataram a padronização do teste de ELISA de bloqueio monoclonal. Ambos os trabalhos apresentam valores de sensibilidade e especificidade aceitáveis, porém, nenhum deles encontra-se disponível comercialmente. Isto se deve provavelmente a metodologia empregada, o que dificulta a produção em grande escala. No trabalho de FERRERA et al. (2005), o processo de tratamento do antígeno foi trabalhoso, determinadas frações do antígeno sofrem diferentes processos. No ensaio de TEIXEIRA et al. (2001) utilizou-se leite em pó na solução de bloqueio, o qual pode conter anticorpos específicos ou não para o BoHV-1, possibilitando a ocorrência de resultados falsos-positivos. Esses aspectos podem ter impedido o uso comercial desses kits. Além disso, nenhum desses ensaios padronizados testou a sua eficiência na detecção de anticorpos contra BoHV-5.

O objetivo deste trabalho foi padronizar um teste de ELISA para detectar anticorpos contra o BoHV-1 e BoHV-5. Para tal, utilizaram-se metodologias de fácil execução e baixo custo, podendo assim ser produzido em larga escala e ser implementado na rotina dos laboratórios de diagnóstico.

2. CAPÍTULO 1

Teste imunoenzimático com base em anticorpo monoclonal para a detecção de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 e 5

A monoclonal antibody-based enzyme-linked immnosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus type 1 and 5

Fernando Viçosa Bauermann¹ Mário Celso Sperotto Brum² Eduardo Furtado Flores^{3*}

(Artigo a ser submetido à revista Ciência Rural).

¹ Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de ciências Rurais (CCR) e Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

² Setor de Virologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS, Brasil.

^{3*} DMVP/CCR/UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com. Autor para correspondência.

RESUMO

Os herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são agentes antigenicamente relacionados que estão associados com diversas manifestações clínicas em bovinos, incluindo doença respiratória, genital, neurológica e abortos. Estudos sorológicos indicam que esses vírus estão amplamente disseminados no rebanho bovino brasileiro. O diagnóstico sorológico, que permite identificar animais portadores da infecção latente, se constitui em importante ferramenta para monitoramento individual e de rebanho. O presente artigo relata a padronização de um teste imunoenzimático do tipo ELISA, com base em anticorpo monoclonal (AcM), para a detecção de anticorpos séricos que reagem contra o BoHV-1 e/ou BoHV-5. Inicialmente, determinou-se o AcM mais adequado para a sensibilização das placas, as diluições apropriadas do antígeno e dos soros-teste e o ponto de corte do ensaio. Após a padronização, o ensaio foi validado testando-se 506 amostras de soro bovino, previamente testadas para anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1 e/ou BoHV-5 pela técnica de soroneutralização (SN). Comparando-se com os resultados da SN frente ao BoHV-1, o teste de ELISA apresentou sensibilidade e especificidade de 96,6% e 98,3%, respectivamente. Os valores preditivos positivo e negativo foram de 97,6%, a concordância foi de 97,6% e o índice de correlação (*kappa*) entre os testes foi de 0,95, o que indica uma excelente concordância. Comparando-se com os resultados da SN frente ao BoHV-5, o ELISA apresentou 94,3% de sensibilidade; 97,9% de especificidade; 97,1% de valor preditivo positivo e 95,9% de valor preditivo negativo. Para o BoHV-5, a concordância entre os testes foi de 96,4% e o índice de correlação foi de 0,92, também excelente. Esses resultados demonstram que o teste

padronizado apresenta sensibilidade e especificidade adequados para o diagnóstico sorológico das infecções pelo BoHV-1 e BoHV-5 em nível individual e de rebanho. Dessa forma, o ensaio pode se constituir em alternativa para o teste de SN e para os kits de ELISA importados.

Palavras-chave: ELISA, sorologia, herpesvírus bovino, BoHV-1, BoHV-5, diagnóstico.

ABSTRACT

Bovine herpesviruses 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) are antigenically related agents associated with different clinical syndromes in cattle, including respiratory, reproductive, neurological disease and abortion. Serological studies indicate that both viruses are widespread among Brazilian cattle. Serological diagnosis, that allows the identification of latently infected animals, represents an important tool for individual and herd monitoring. The present article describes the standardization of a monoclonal antibody (MAb)-based immunoenzymatic test (ELISA) for detection of antibodies to BoHV-1 and/or BoHV-5. The initial steps involved the determination of the most suitable MAb, the appropriate dilutions of viral antigen and test sera; and the cut-off value of the assay. After standardization, the ELISA was validated by testing 506 cattle serum samples previously tested for neutralizing antibodies to BoHV-1 and BoHV-5 by virus neutralizing (VN) assay. Comparing to the VN for BoHV-1 antibodies, the ELISA presented sensitivity and specificity of 96.6% and 98.3%, respectively. Positive and negative predictive values were 97.6%, the concordance between the tests was 97.6% and the coefficient of correlation k (*kappa*) was 0.95, demonstrating an excellent correlation. Comparing to the VN for BoHV-5 antibodies, the ELISA presented 94.3% of sensitivity, 97.9% of specificity, 97.1% of positive predictive value, 95.9% negative predictive value, concordance of 96.4% and *kappa* coefficient of 0.92. These results demonstrate that the

ELISA presents suitable specificity and sensitivity to be used for individual and herd serological diagnosis of BoHV-1 and BoHV-5, thus, representing an alternative for VN assays and imported ELISA kits.

Key words: ELISA, serology, bovine herpesvirus, BoHV-1, BoHV-5, diagnosis.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um patógeno de distribuição mundial, com exceção de alguns países europeus que erradicaram a infecção (ACKERMANN & ENGELS, 2006). A infecção de bovinos pelo BoHV-1 está associada com doença respiratória (rinotraqueíte infecciosa, IBR), genital (vulvovaginite/balanopostite pustular, IPV/IPB), infecção multissistêmica de neonatos e abortos (KAHRS, 2001). Esporadicamente, o BoHV-1 também tem sido isolado de casos de doença neurológica (SILVA et al., 2007). O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o agente da meningo-encefalite herpética bovina, doença que possui grande importância no Brasil e na Argentina, onde dezenas de surtos são relatados a cada ano (SALVADOR et al., 1998; RISSI et al., 2007; SILVA et al., 2007). O BoHV-1 e BoHV-5 são membros do gênero *Varicellovirus*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, família *Herpesviridae* (ROIZMAN et al., 1992) e são estreitamente relacionados entre si em aspectos genéticos/moleculares, biológicos e antigênicos (BRATANICH et al., 1991; DELHON et al., 2003). Esta similaridade antigênica impossibilita a diferenciação entre esses vírus pelos testes sorológicos de rotina (BRATANICH et al., 1991; TEIXEIRA et al., 1998; VOGEL et al., 2002). Assim, em populações bovinas onde os dois vírus estão presentes, os testes sorológicos não permitem distinguir a resposta sorológica contra cada um deles e, como consequência, não é possível conhecer a prevalência de cada agente (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2006) Tanto o

BoHV-1 quanto o BoHV-5 estabelecem infecções latentes nos seus hospedeiros, cuja reativação periódica seguida de transmissão a animais susceptíveis representa o principal meio de perpetuação desses vírus nos rebanhos (ROCK, 1994; VOGEL et al., 2003). Vários relatos têm demonstrado que as infecções pelo BoHV-1 e BoHV-5 estão amplamente disseminadas no rebanho bovino brasileiro (SALVADOR et al., 1998; RISSI et al., 2007; SILVA et al., 2007; HOLZ et al., in press).

O controle e erradicação da infecção pelos herpesvírus bovino baseiam-se na identificação e remoção dos animais soropositivos (portadores da infecção latente), associados ou não ao uso de vacinas (VAN OIRSCHOT, 1999; ACKERMANN & ENGELS, 2006). O teste sorológico de referência para o diagnóstico da infecção por esses vírus é a soroneutralização (SN) (OIE). A técnica de SN apresenta boa especificidade e sensibilidade, além de ser o teste sorológico cujo princípio melhor se assemelha à neutralização viral por anticorpos que ocorre *in vivo* (FLORES, 2007). A necessidade de estrutura laboratorial para a manutenção de cultivos celulares, a demora na obtenção dos resultados (até 96h) e a impossibilidade de automação, no entanto, se constituem em importantes restrições ao uso da SN na rotina de muitos laboratórios, sobretudo para o teste de um grande número de amostras (FLORES, 2007). Testes imunoenzimáticos do tipo ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) também são internacionalmente aceitos e muito utilizados no diagnóstico sorológico da infecção pelo BoHV-1 e apresentam como grande vantagem a possibilidade de automação e, assim, a viabilidade para diagnóstico em nível populacional (NYLIN et al., 2000; FLORES, 2007). No entanto, os testes de ELISA anti-BoHV-1 disponíveis no Brasil são importados, e a sua utilização depende dos trâmites inerentes à importação de produtos biológicos, além do alto custo que, por vezes, inviabiliza o seu uso na rotina diagnóstica.

As restrições ao uso da SN na rotina laboratorial, sobretudo para o teste de grande número de amostras, têm motivado iniciativas para avaliar o desempenho de kits de ELISA importados e também para desenvolver testes nacionais. MÉDICI et al. (2000) compararam a sensibilidade e especificidade de um ELISA comercial, tendo como padrão a técnica de SN, verificando 100% de sensibilidade e 94,8% de especificidade do ensaio imunoenzimático. TEIXEIRA et al. (2001) descreveram a padronização de um ELISA monoclonal para o BoHV-1, cuja sensibilidade e especificidade em relação a SN foram de 94,7% e 89,4%, respectivamente. FERRERA et al. (2005) padronizaram um teste de ELISA indireto para o BoHV-1, utilizando antígeno não purificado para a sensibilização das placas, obtendo sensibilidade de 98,3% e especificidade de 95,3%, quando comparado ao teste de SN. Estes testes nacionais, apesar de apresentarem sensibilidade e especificidade geralmente satisfatórias, envolvem etapas que dificultam a produção dos kits em grande escala. Não obstante a descrição desses testes, a grande maioria dos laboratórios de diagnóstico veterinário no país segue utilizando a SN ou, ocasionalmente, kits de ELISA importados para o diagnóstico sorológico do BoHV-1. Além disso, nenhum destes trabalhos investigou a validade dos testes desenvolvidos para o diagnóstico sorológico da infecção pelo BoHV-5.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e padronizar um teste de ELISA, com base em anticorpos monoclonais (AcMs), para a detecção de anticorpos contra o BoHV-1 e/ou BoHV-5. Priorizou-se a utilização de metodologia e reagentes acessíveis e de baixo custo para, assim, o teste poder ser incorporado a rotina de laboratórios de diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

A padronização e validação do teste incluíram as seguintes etapas: 1. Determinação do AcM adequado para sensibilizar as placas; 2. Produção do antígeno; 3. Determinação das diluições do antígeno e dos soros-teste; 4. Determinação do ponto de corte; 5. Validação do ELISA testando-se amostras de soro previamente testadas pela SN; 6. Cálculo da sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e concordância do teste de ELISA em comparação com a SN.

Determinação do AcM para a sensibilização das placas

Foram avaliados três AcMs produzidos no Setor de Virologia da UFSM contra antígenos do BoHV-5 (2F9, 4E4, 3D6), mas que reagem também com antígenos do BoHV-1 (OLDONI et al., 2004). Para tal, placas de poliestireno de 96 cavidades^a foram incubadas a 4°C durante 18h com diluições de 1:500 a 1:32.000 de fluido ascítico de cada AcM em solução de carbonato/bicarbonato de sódio 50mM, pH9,6 (100µl/cavidade). A seguir foi realizada uma lavagem com solução de PBS Tween 0,05% pH 7,2 e 1% de soro equino. Incubaram-se então as placas (300uL/cavidade) a 37°C por 2h com solução de bloqueio (PBS pH 7,2 + 5% de soro equino). O anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com a enzima *horseradish peroxidase*^a (HRP) (100µl/cavidade, diluído 1:8.000 em solução de lavagem) foi adicionado e incubado por 1h a 37°C, seguido de 3 lavagens e adição do substrato cromógeno *tetramethylbenzidine* TMB^a (100µl/cavidade). Após 15min, a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 405nm (KPL, 2005). O AcM que apresentou o valor de DO mais adequado (4E4) foi utilizado nas demais etapas de padronização do teste.

Produção do antígeno

Uma suspensão de proteínas solúveis de células de linhagem de rim bovino CRIB (FLORES & DONIS, 1995) inoculadas com a cepa *Cooper* do BoHV-1 foi utilizada como antígeno. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) adicionado de 2% de soro fetal bovino, 10.000UI/L de penicilina, 0,2g/L de estreptomicina e 2,5mg/L de fungizona. Frascos de 75cm² contendo tapetes celulares confluentes foram inoculados com título viral de 10^{7,5} doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀) e quando o efeito citopático (ECP) atingiu cerca de 90% das células, o conteúdo total dos frascos foi coletado. A infectividade foi inativada com solução de BEI (2-bromoetilamina) seguindo protocolo adaptado de SILVA et al. (2004). Após neutralização da BEI com tiosulfato de sódio 1M pH 7,5 (0,32ml para 100ml de antígeno), a solução foi centrifugada durante 10min a 2000 x g e o sobrenadante foi coletado e utilizado como antígeno. O antígeno negativo foi produzido da mesma forma, utilizando-se células CRIB não infectadas.

Determinação das diluições do antígeno e dos soros-teste

Para determinar-se a concentração mais adequada do antígeno, diluições na base 2 (1:5 a 1:40) em solução de lavagem foram adicionadas às cavidades (100µl/cavidade), previamente sensibilizadas com o AcM e incubadas por 1h a 37°C, seguido de três lavagens. As amostras-teste (soros bovinos positivos e negativos para o BoHV-1 e BoHV-5 pela SN) diluídas 1:20 e 1:40 foram adicionadas (100µl/cavidade) às cavidades previamente incubadas com as diferentes diluições do antígeno, seguido de incubação de 1h a 37°C e de três lavagens. A seguir, as placas foram incubadas por 1h a 37°C com um anticorpo anti-IgG bovina (diluído 1:60.000) conjugado com a enzima fosfatase alcalina^a. Após cinco lavagens com solução de Tris 0,01M, pH 9,6 adicionou-se o substrato nitrofenilfosfato (pNPP^a) na concentração de 1mg/ml. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 405nm a intervalos de 10, 20 e 30min após a adição do substrato, utilizando-se NaOH 3M para interromper a reação. Nesta etapa

determinou-se a diluição do antígeno e das amostras-teste, além do tempo ótimo para a leitura (KPL, 2005).

Determinação do ponto de corte

Para o cálculo do ponto de corte, foram utilizadas 11 amostras de soro de animais provenientes de rebanhos livres do BoHV-1. Essas amostras foram testadas pelo ELISA de acordo com as condições estabelecidas nas etapas anteriores. Resumidamente, as placas de poliestireno foram incubadas com o AcM 4E4 (100µl/cavidade diluído 1:16.000) a 4°C em câmara úmida por 18h, seguido de bloqueio durante 2h a 37°C. A metade das cavidades das placas foi adicionada de antígeno positivo (diluído 1:5, 100µl/cavidade) e o restante adicionado com o antígeno negativo, seguido de incubação a 37°C por 1h; três lavagens e incubação com as amostras-teste (100ul/cavidade, diluídas 1:20). Assim, cada amostra de soro foi testada em duplicata, com antígeno positivo e negativo. A seguir, foram realizadas três lavagens seguidas da incubação com o anticorpo secundário anti-IgG bovina conjugado com a enzima fosfatase alcalina^a por 1h a 37°C. As placas foram lavadas e adicionadas do cromógeno pNPP^a. Após 15min realizou-se a leitura da DO a 405nm. O valor da DO obtido de cada amostra nas cavidades pré-incubadas com o antígeno negativo foi subtraído do valor de DO obtido nas cavidades pré-incubadas com o antígeno positivo. O ponto de corte estabelecido foi a média das DOs das amostra-teste (após a subtração do valor da DO das cavidades incubadas com o antígeno negativo), acrescida de três vezes o valor de desvio-padrão, o que confere um nível de confiança de 99% (FREY et al., 1998).

Validação do teste

O ELISA foi validado pelo teste de 506 amostras de soro bovino pertencentes ao banco de soro do Setor de Virologia da UFSM. As amostras foram testadas também por SN, frente

ao BoHV-1 e BoHV-5. A técnica de SN foi realizada de acordo com protocolos-padrão, testando-se as amostras de soro diluídas 1:2 em duplicata frente a 100-200 DICC₅₀ das cepas *Cooper* (BoHV-1) e SV-507/99 (BoHV-5). Após incubação da mistura soro + vírus por 2h a 37°C, adicionou-se uma suspensão de células CRIB e incubaram-se as placas a 37°C em estufa de CO₂. A leitura foi realizada após 72h de incubação. Amostras negativas e positivas para anticorpos contra o BoHV-1 e 5 foram utilizadas como controles. Considerando-se os resultados da SN (para os respectivos vírus) como referência, foram calculadas a especificidade, sensibilidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) do ELISA e o índice de concordância entre as duas técnicas (TOMA et al., 1999).

RESULTADOS

Como primeira etapa de padronização do teste foram testados três AcMs para a sensibilização das placas. O AcM que apresentou os maiores valores de DO foi o 4E4 (Figura 1), sendo então utilizado nas etapas seguintes. A diferença de DO observada entre os AcMs pode ser atribuída a vários fatores, incluindo concentrações diferentes das imunoglobulinas nos fluídos ascíticos e diferentes níveis de pureza, uma vez que foi utilizado fluído ascítico não purificado. Outro fator que pode estar envolvido com as diferentes DOs de cada AcM é a possível diferença de afinidade química dos anticorpos com a superfície da placa (KPL, 2005). A diluição selecionada para uso foi de 1:16.000, diluição imediatamente posterior ao platô de reação (KPL, 2005).

Após a seleção do AcM, testaram-se as diluições do antígeno e das amostra-teste, utilizando-se várias combinações entre essas variáveis (Figura 2). Verificou-se uma pequena variação entre os resultados, mas os valores mais elevados da DO para amostras positivas

foram obtidos com a combinação da diluição de 1:5 do antígeno com a diluição de 1:20 das amostras teste. Nessa combinação não verificaram-se reações inespecíficas em níveis mais elevados do que as observadas em diluições maiores.

Após a padronização das etapas mencionadas partiu-se para a validação do teste. Para tal, 506 amostras de soro bovino foram testadas pela SN frente ao BoHV-1 e frente ao BoHV-5, e pelo ELISA, comparando-se então os resultados (Tabelas 1 e 2).

Quando os resultados do ELISA foram comparados com a SN realizada frente ao BoHV-1 cepa *Cooper* (Tabela 1) verificou-se que 204 amostras (40,3%) apresentaram resultados positivos nos dois testes; enquanto 290 amostras (57,3%) foram negativas em ambos. No total, 494/506 (98,0%) resultados foram concordantes nos dois testes. Doze amostras (2,4%) apresentaram resultados discordantes, sendo cinco delas (0,98%) positivas apenas no ELISA; e sete positivas apenas na SN (1,4%). Ou seja, o ELISA falhou em detectar 1,4% das amostras que possuíam anticorpos neutralizantes (potencialmente falsos negativos) e detectou como positivas menos de 1% (0,98%) de amostras negativas na SN (potencialmente falsos positivos). Comparando-se com os resultados da SN frente ao BoHV-1, o ELISA apresentou sensibilidade de 96,6% e especificidade de 98,3%. O VPP e VPN foram de 97,6%. A concordância entre as técnicas foi de 97,6% e índice de correlação *kappa* foi de 0,95, o que demonstra um alto grau de excelência do teste (TOMA, 1999).

Ao comparar-se os resultados do ELISA com a SN realizada frente ao BoHV-5, cepa SV-507/99 (Tabela 2), verificou-se que 202 amostras (39,9%) foram positivas nos dois testes e 286 (56,5%) resultaram negativas em ambos. Os resultados dos dois testes concordaram em 96,4% (488/506) das amostras. Verificou-se que 12 amostras (2,4%) foram positivas apenas na SN e seis (1,2%) foram positivas apenas no ELISA. Ou seja, o ELISA resultou em 2,4% de supostos falsos negativos e em 1,2% de possíveis falsos positivos em relação a SN. Na

comparação com a SN para o BoHV-5, o ELISA apresentou sensibilidade de 94,3%, especificidade de 97,9%, VPP de 97,1% e VPN de 95,9%. O índice de correlação de 0,92 observado demonstra um alto grau de excelência do teste (TOMA, 1999).

Dentre as 12 amostras que foram negativas no ELISA e positivas na SN para o BoHV-5, seis (50%) também foram positivas para o BoHV-1 apenas na SN. Esses resultados sugerem que estas amostras realmente são positivas para anticorpos contra um destes vírus, porém, provavelmente apresentam títulos baixos de anticorpos, e devido ao elevado ponto de corte não foram identificadas como positivas no ELISA. O número de amostras positivas para o BoHV-5 apenas no ELISA foi de seis (1,18% do total). Dentre estas, três (50%) foram também positivas apenas no ELISA quando comparado com a SN para o BoHV-1. Como a SN detecta apenas anticorpos com atividade neutralizante, é possível que estas amostras contivessem níveis baixos de anticorpos com atividade neutralizante, indetectáveis na SN e apenas detectadas no ELISA.

DISCUSSÃO

O presente artigo relata a padronização e validação de um ELISA com base em AcM para a detecção de anticorpos séricos que reagem com o BoHV-1 e BoHV-5. O ensaio desenvolvido apresenta como principais propriedades: facilidade e simplicidade de padronização e execução; custo baixo; baixa frequência de falsos positivos e falsos negativos; alta sensibilidade e especificidade; aplicabilidade para a detecção de anticorpos que reagem contra o BoHV-1 e/ou BoHV-5. Essas propriedades o credenciam a ser utilizado na rotina de diagnóstico sorológico desses dois vírus, podendo representar uma alternativa para a SN e também em substituição a kits de ELISA importados.

Testes imunoenzimáticos do tipo ELISA, em diversas variações e configurações, são amplamente utilizados na Europa e nos Estados Unidos para a identificação de animais soropositivos para o BoHV-1, e também na vigilância em países que erradicaram o agente (WELLENBERG et al., 2001; ACKERMANN & ENGELS, 2006). Um número de artigos relata a avaliação da sensibilidade e especificidade destes testes, entre si, e em comparação com a SN (BRATANICH et al., 1990; KRAMPS et al., 1993; PERRIN et al., 1993). Em geral, testes de ELISA apresentam sensibilidade levemente superior a SN, mas o inverso também tem sido relatado (KRAMPS et al., 2004).

No Brasil, a utilização do ELISA no diagnóstico sorológico do BoHV-1 ainda é restrita devido a necessidade de importação dos kits, o que torna o seu custo elevado. Por outro lado, no país já foram padronizados alguns testes de ELISA para a detecção de anticorpos contra o BoHV-1 (TEIXEIRA et al., 2001; FERRERA et al., 2005). No entanto, esses testes não estão disponíveis comercialmente nem são disponibilizados a outros laboratórios. Além disso, os resultados desses ensaios não foram validados para verificar se detectam anticorpos que reagem com o BoHV-5 na SN, vírus que também apresenta uma ampla disseminação no rebanho bovino do país e que reage sorologicamente com o BoHV-1 (BRATANICH et al., 1991; TEIXEIRA et al., 1998; VOGEL et al., 2002). Dessa forma, a grande maioria dos laboratórios de diagnóstico virológico no país segue utilizando a SN como teste sorológico para esses vírus, não obstante as dificuldades e restrições que o teste apresenta, sobretudo a dificuldade de teste de um grande número de amostras (FLORES, 2007).

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um teste prático, de custo acessível de fácil produção e execução. Além disso, priorizou-se a necessidade de detectar-se amostras que possuíssem anticorpos reagentes contra o BoHV-5 com especificidade e sensibilidade semelhantes ao BoHV-1. Pela dificuldade de obtenção de antígenos virais e AcMs com alto

grau de pureza, optou-se por desenvolver um ELISA sanduíche, de acordo com recomendações técnicas (KPL, 2005). Uma etapa da padronização do ensaio envolveu o teste de amostras de soro frente a cavidades sensibilizadas com proteínas de células infectadas (antígeno positivo) e não-infectadas (antígenos negativo), para obter-se o valor basal de reação com as proteínas celulares. Dessa forma, excluiu-se do cálculo o valor de DO referente ao *background* de reações não-específicas. Essa estratégia mostrou-se eficiente, pelo alto nível de concordância observado entre o ELISA e a SN.

O teste de ELISA de bloqueio desenvolvido por TEIXEIRA et al. (2001) utilizou antígeno não purificado para a sensibilização das placas, e não realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas. Isso provavelmente contribuiu para o número considerável de reações inespecíficas, o que reduziu a especificidade do teste para aproximadamente 89%. O valor de sensibilidade (94,7%) também ficou abaixo daquele obtido no presente trabalho (96,6% para o BoHV-1). Este ensaio também não foi comparado com a SN frente ao BoHV-5.

No trabalho de FERRERA et al. (2005), obtiveram-se valores elevados de sensibilidade (98,3%) e especificidade (95,2%) quando comparou-se com a SN frente ao BoHV-1, com intervalo de confiança de 95%. A sensibilidade foi levemente superior ao do presente trabalho (96,6%), porém a especificidade foi inferior (98,3%). A maior especificidade no presente ELISA pode ser parcialmente devida à subtração do *background* de reação das amostras frente à antígeno negativo. Além disso, a metodologia utilizada para a purificação do antígeno naquele trabalho foi bastante complexa, envolvendo separação em frações e tratamento separado para cada fração. Esta complexidade dificulta a produção e execução do teste em grande escala. No ensaio desenvolvido por FERRERA et al. (2005) também não foi comparado com a SN frente ao BoHV-5.

No presente trabalho, o ELISA padronizado apresentou correlação de 97,6% com a SN para o BoHV-1 e de 96,4% com a SN para o BoHV-5. A diferença de correlação com a SN para os dois vírus pode ser, em parte, devida à utilização de antígenos da cepa *Cooper* (BoHV-1) no teste. Isso poderia levar a detecção de um número maior de animais com anticorpos contra o BoHV-1. Animais previamente infectados pelo BoHV-1 e que possuíam títulos neutralizantes baixos, poderiam ser negativos na SN frente ao BoHV-5, mas seriam detectados no ELISA.

Dentre o total de 506 amostras, 485 (95,8%) tiveram resultados iguais no ELISA e SN frente ao BoHV-1 e BoHV-5. Isso demonstra que mesmo com a utilização de uma cepa de BoHV-1 (*Cooper*) como antígeno, a semelhança antigênica entre o BoHV-1 e BoHV-5 possibilita uma identificação, com alta sensibilidade, de animais soropositivos para cada um destes agentes.

As pequenas diferenças antigênicas existentes entre o BoHV-1 e BoHV-5 podem resultar em títulos diferentes na SN, que são detectáveis quando amostras de soro de animais infectados por um destes vírus são testadas em paralelo frente aos dois (HOLZ et al., in press). Por isso, às vezes é possível inferir a especificidade da atividade neutralizante detectada no soro, com base na comparação dos títulos frente aos dois agentes (TEIXEIRA et al., 1998; VOGEL et al., 2002). No entanto, essa diferenciação nem sempre é possível, e uma parcela considerável de amostras com anticorpos neutralizantes reage em diluições equivalentes tanto com o BoHV-1 quanto com o BoHV-5 (FLORES, comunicação pessoal). Como o teste aqui desenvolvido produz resultados apenas qualitativos (positivo/negativo), não permite a diferenciação entre os dois agentes. Ou seja, resultados positivos no ELISA indicam a presença de anticorpos contra um destes vírus (e que reagem também com o outro) ou, ocasionalmente, contra os dois vírus, em casos de coinfeção.

As pequenas diferenças de sensibilidade e especificidade observadas quando compararam-se os resultados do ELISA com a SN frente ao BoHV-1 e BoHV-5 *a priori*, não comprometem a utilização do ensaio, pois mesmo a SN quando realizada frente aos dois vírus (e mesmo frente a diferentes isolados do mesmo vírus) apresenta um percentual significativamente maior de resultados discordantes (ROEHE et al., 1997; HOLZ et al., in press).

Do ponto de vista epidemiológico, a dificuldade de distinção sorológica entre o BoHV-1 e BoHV-5 impossibilita o conhecimento acerca da prevalência e distribuição de cada um destes agentes, sobretudo em rebanhos onde os dois vírus circulam, como é o caso do Brasil. Do ponto de vista de controle, no entanto, a impossibilidade de diferenciação sorológica não possui uma repercussão tão relevante, pois as medidas de combate recomendadas para os dois agentes são semelhantes, devido às suas semelhanças biológicas e epidemiológicas (FLORES, 2007).

Dessa forma, o teste padronizado apresenta as propriedades desejáveis em um teste sorológico e pode, assim, ser utilizado em substituição a SN e aos *kits* de ELISA importados na rotina laboratorial. Dentre os usos potenciais do teste destacam-se estudos soro-epidemiológicos, monitoramento de rebanhos e diagnóstico individual. Eventualmente, este ensaio pode ser utilizado em programas de combate às infecções pelo BoHV-1 e BoHV-5, seja em nível de rebanho ou em nível regional ou nacional.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^a Sigma, Inc. Saint Louis, MO, USA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, M. & ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v.113, n.3-4, p.293-302, 2006.

BRATANICH, A.C. et al. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. **Journal of Veterinary Medicine**. v.38, p. 41-48, 1991.

BRATANICH, A. et al. Comparison of three serological techniques for the diagnosis of bovine herpesvirus type 1: serum neutralization, enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence. **Revista Argentina de Microbiología**, v.22, n.8, p.192-198, 1990.

DEL MÉDICO ZAJAC, M.P. et al. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, v.81, n.3, p.327-334, 2006.

DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus type 5. **Journal of Virology**, v.77, p.10339-10347, 2003.

FERRERA, C. et al. Desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico sorológico da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1. **Semina**, v.26, n.3, p.363-372, 2005.

FLORES, E.F.; DONIS, R.O. Isolation of a mutant MDKB cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. **Virology**, v.218, p.565-575, 1995.

FLORES, E.F. Diagnóstico Laboratorial das Infecções Víricas. p.295-326. In: FLORES, E.F. (org) **Virologia Veterinária**. Santa Maria, Editora da UFSM, 2007, 888p.

FREY, A. et al. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v.221, n.1-2, p.35-41, 1998.

HOLZ, C.L. et al. Prevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: _____. **Viral disease of cattle**. 2.ed. Ames : Iowa State University, 2001. p.159-170.

KPL. **Technical guide for ELISA**. 2005. Acessado em 23 abr. Online. Disponível em: <http://www.kpl.com/docs/techdocs/KPLELISATEchnicalGuide.pdf>

KRAMPS, J.A. et al. Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.35, n.1-2, p.11-21, 1993.

KRAMPS, J.A. et al. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. **Veterinary Microbiology**, v.102, n.3-4, p.169-181, 2004.

MÉDICI, K.C. et al. Ensaio imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico das infecções por herpesvírus bovino 1. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.343-346, 2000.

NYLIN, B. et al. A retrospective evaluation of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) antibody ELISA on bulk-tank milk samples for classification of the BHV-1 status of Danish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 47, n. 4, p.91-05, 2000.

OLDONI, I. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.2, p.213-21, 2004.

PERRIN, B. et al. An European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. **Revue Scientifique et Technique**, v. 12, n.3, p.969-984, 1993.

RISSI, D.R. et al. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.7, p.261-268, 2007.

ROCK, D. L. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. **Seminars in Virology**, v.5, n.3, p.233-240, 1994.

ROIZMAN, B. et al. The family *Herpesviridae*: an update. The Herpesvírus Study Group of the Internacional Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v.123, n.3-4, p.425-49, 1992.

ROEHE, P.M. et al. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte bovina infecciosa (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.1 p. 41-44, 1997.

SALVADOR, S.C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, p.76-83, 1998.

SILVA, L.C. et al. Avaliação da capacidade adjuvante do cloreto de dimetildioctadecilamônio associado ao hidróxido de alumínio na indução da resposta imune humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarreia viral bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.201-206, 2004.

SILVA, M.S. et al. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987- 2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.403-408, 2007.

TEIXEIRA, M.F.B. et al. Diferenças em níveis de anticorpos contra herpesvírus bovinos tipos 1 e 5. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.4, n.1, p.61-65, 1998.

TEIXEIRA, M.F.B. et al. ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n.1, p.33-37, 2001.

TOMA, B. et al. **Dictionary of Veterinary Epidemiology**. Ames : Iowa State University Press, 1999. 284p.

VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine viral vaccines, diagnostics, and eradication: past, present, and future. **Advances in Veterinary Medicine**, v.41, p.197-216, 1999.

VOGEL, F.S.F. et al. Atividade neutralizante anti-herpesvírus bovino tipos 1 e 5 no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.881-883, 2002.

VOGEL, F.S.F. et al. Distribution of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) DNA in the central nervous system of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.1, n.10, p.4512-4520, 2003.

WELLENBERG, G.J. et al. Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. **Veterinary Microbiology**, v.78, n.1, p.79-84, 2001.

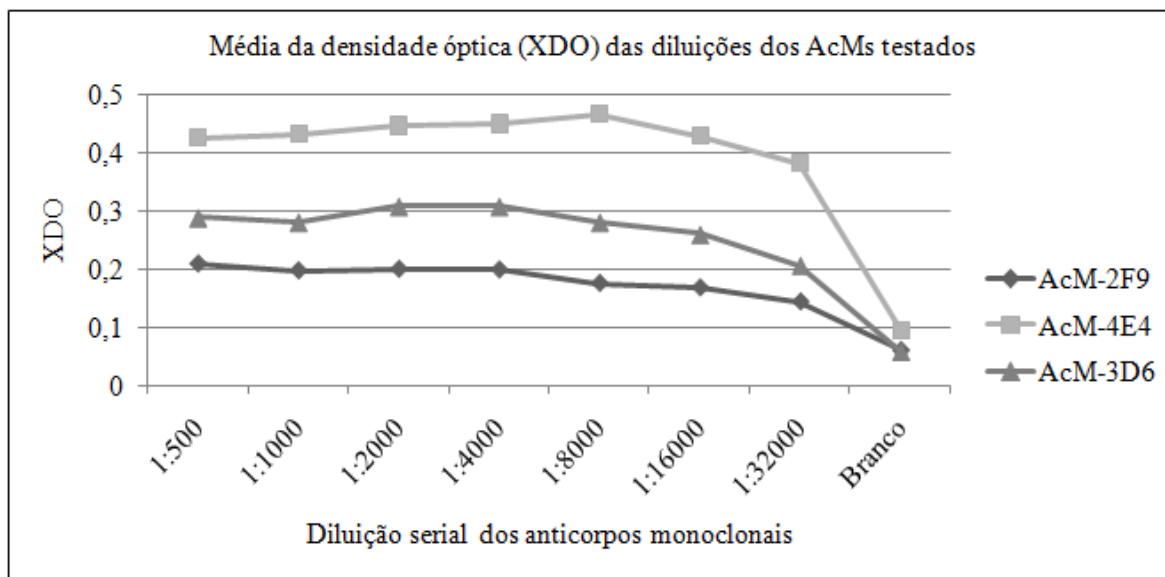


Figura 1- Média da densidade óptica (XDO) das diluições dos AcMs testados (2F9, 4E4, 3D6) para a sensibilização das placas de ELISA.

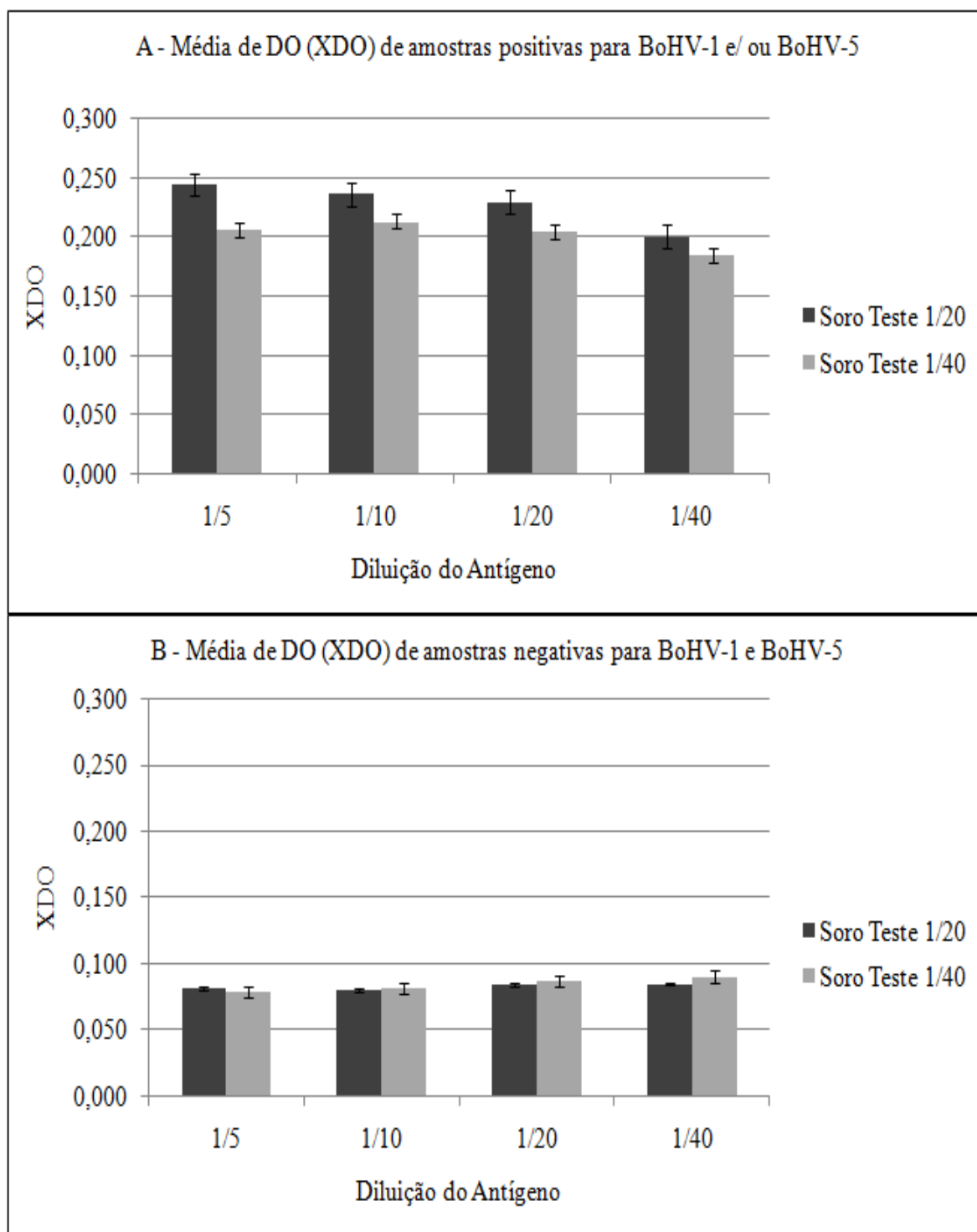


Figura 2- Média da densidade óptica (XDO) de amostras de soro positivas (A) e negativas (B) para anticorpos contra os herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e/ou tipo 5 (BoHV-5), diluídas 1:20 e 1:40 frente a diferentes diluições do antígeno.

TABELA 1 - Resultados dos testes de ELISA e soroneutralização (SN) para a detecção de anticorpos contra o BoHV-1 em amostras de soro bovino.

ELISA	SN BHV-1		Total
	Positivo (%)	Negativo (%)	
Positivo (%)	204 ^a (40,3)	5 ^b (0,98)	209 ^{a+b} (41,3)
Negativo (%)	7 ^c (1,38)	290 ^d (57,3)	297 ^{c+d} (58,7)
Total	211 ^{a+c} (41,7)	295 ^{b+d} (58,3)	506 ^{a+b+c+d} (100)

Sensibilidade relativa: $(a) / (a+c) \times 100 = 204/211 \times 100 = 96,6\%$

Especificidade relativa: $(d) / (b+d) \times 100 = 290/295 \times 100 = 98,3\%$

Valor preditivo positivo: $(a) / (a+b) \times 100 = 204/209 \times 100 = 97,6\%$

Valor preditivo negativo: $(d) / (c+d) \times 100 = 290/297 \times 100 = 97,6\%$

Concordância: $(a+d) / (a+b+c+d) \times 100 = 494/506 \times 100 = 97,6\%$

$Kappa = \text{Precisão observada (PO)} - \text{precisão esperada (PE)} / 1 - \text{PE} = 0,456 / 0,477 = 0,95$

TABELA 2 - Resultados dos testes de ELISA e soroneutralização (SN) para a detecção de anticorpos contra o BoHV-5 em amostras de soro bovino.

ELISA	SN BHV-5		Total
	Positivo (%)	Negativo (%)	
Positivo (%)	202 ^a (39,9)	6 ^b (1,1)	208 ^{a+b} (41,1)
Negativo (%)	12 ^c (3,3)	286 ^d (56,5)	298 ^{c+d} (58,9)
Total	214 ^{a+c} (42,3)	292 ^{b+d} (57,7)	506 ^{a+b+c+d} (100)

Sensibilidade relativa: $(a) / (a+c) \times 100 = 202/214 \times 100 = 94,3\%$

Especificidade relativa: $(d) / (b+d) \times 100 = 286/292 \times 100 = 97,9\%$

Valor preditivo positivo: $(a) / (a+b) \times 100 = 202/208 \times 100 = 97,1\%$

Valor preditivo negativo: $(d) / (c+d) \times 100 = 286/298 \times 100 = 95,9\%$

Concordância: $(a+d) / (a+b+c+d) \times 100 = 488/506 \times 100 = 96,4\%$

$Kappa = \text{Precisão observada (PO)} - \text{precisão esperada (PE)} / 1 - \text{PE} = 0,451 / 0,487 = 0,92$

3. REFERÊNCIAS

- CARON, L. et al. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 4, p. 285-95, Feb. 2002.
- DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus type 5. **Journal of Virology**, Washington, v.77, n. 19, p.10339-10347, Oct. 2003.
- FERRERA, C. et al. Desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico sorológico da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1. **Semina**, Londrina, v. 26, n. 3, p. 363-372, jul./set. 2005.
- JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and the development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 8, n. 2 p. 187-205, Dez. 2007.
- KAHRS, R. F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: _____. **Viral disease of cattle**. 2nd ed. Ames : Iowa State University Press. 2001. Cap. 18, p. 159-170.
- MÉDICI, K. C. et al. Ensaio imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico das infecções por herpesvírus bovino 1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 343-346, mar./abr. 2000.
- METZLER, A. E. et al. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonucleases sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, Wien, v. 85, n. 1-2, p. 57-69, Mar. 1985.
- MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis vírus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 4, p. 790-794, 1984.
- MUYLKENS, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, Paris, v. 38, n. 2, p. 181-209, Mar. 2007.
- NYLIN, B. et al. A retrospective evaluation of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) antibody ELISA on bulk-tank milk samples for classification of the BHV-1 status of Danish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam v. 47, n. 4, p.91-05, Dec. 2000.
- RIET-CORREA, G. et al. Meningoencefalite e polioencefalomalacia causadas por herpesvírus bovino-5 no estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 44-46, jan./mar. 2006.
- RISSI, D. R. et al. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.26, n. 2, p.123-132, abr./jun. 2006.

ROIZMAN, B. et al. The family *Herpesviridae*: an update. The Herpesvírus Study Group of the Internacional Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, Wien, v. 123, n. 3-4, p.425-49, Sept. 1992.

SALVADOR, S. C. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 76-83, abr./jun. 1998.

SANCHES, A. W. D. et al. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3 p. 113-118, jul./set. 2000.

SILVA, M. S. et al. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987- 2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 10, p. 403-408, out. 2007.

SPILKI, F. R. et al. Field evaluation of safety during gestation and horizontal spread of a recombinant differential bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 54-58, jan./mar. 2004.

TEIXEIRA, M. F. B. et al. ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 33-37, jan./mar. 2001.

VAN OIRSCHOT, J. J. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. **Journal of Virological Methods**, Londres, v. 67, n. 1, p. 23-24, Aug. 1997.

VOGEL, F. S. F. et al. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissue 50 days after experimental reactivation. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n.3-4, p. 185-196, Mar. 2004.

WYLER, R. et al. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. **Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs**. Boston: Kluwer Academic, 1989. p.1-72.