

INFLUÊNCIA DO CONGELAMENTO DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 EM PLACAS DE POLIESTIRENO PARA A REALIZAÇÃO DE ELISA INDIRETO

ROBERTA MARANINCHI SILVEIRA¹; BIANCA SICA SIEDLER²; LEONARDO GARCIA MONTE², SILVIA HUBNER³, FABRÍCIO SOUZA CAMPOS⁴, CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN⁵

¹Universidade Federal de Pelotas, Graduação em Biotecnologia – msilveira.roberta@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia

³Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Virologia e Imunologia

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Laboratório de Virologia

⁵Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico – hartlebenclaudia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5), pertencentes à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, são patógenos que afetam os sistemas respiratório/genital de bovinos e que conseqüentemente causam graves prejuízos econômicos à bovinocultura (DAVISON et al., 2009). Os animais infectados, mesmo aqueles com infecção subclínica, tornam-se portadores, uma vez que o vírus permanece latente no hospedeiro, instalando-se em gânglios nervosos, olfatório, trigêmeo ou sacral, não sendo detectados pelos exames tradicionais (MEYER et al., 2001). Uma vez estabelecida a latência, o animal pode, periodicamente, re-excretar o vírus através das secreções, disseminando-o para bovinos suscetíveis, o que faz com que os surtos sejam imprevisíveis, especialmente em áreas endêmicas (VOGEL et al., 2003). No que se refere à geografia, o BoHV-5 apresenta maior prevalência na América do Sul, especialmente no Brasil e Argentina (DEL MEDICO ZAJAC et al., 2010).

O diagnóstico da infecção por BoHV-1 e BoHV-5 é realizado principalmente através de testes sorológicos (padrão ouro - soroneutralização). No entanto, para a realização da maioria dos ensaios é necessária a utilização de cultivos celulares viáveis. Por este motivo, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência do congelamento do BoHV-5 em placas de poliestireno para a realização de ELISA indireto.

2. METODOLOGIA

Soros bovinos positivos (12) e negativos (1), previamente testados por soroneutralização, foram cedidos pelo Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, UFPel. O protocolo utilizado para realização do teste foi adaptado de PARREÑO et al. (2010). Resumidamente, 8 placas de poliestireno foram sensibilizadas com 50 ng/poço de antígeno positivo (extrato viral bruto semi purificado e concentrado, resultante da infecção de células de rim bovino - MDBK - com a cepa EVI de BoHV-5) e antígeno negativo (MDBK não infectadas), em

colunas alternadas, *overnight* à 4 °C. Após, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e metade das placas (4) foi congelada à -20 °C. Paralelamente, o restante das placas (4) foi bloqueado com PBS-T 1 % de soro fetal bovino (PBS-T SFB), lavadas e congeladas à -20 °C. Após 15, 30 e 45 dias de congelamento as placas foram descongeladas para a realização do ELISA indireto. As placas congeladas após a sensibilização foram bloqueadas, como descrito anteriormente, e os soros positivos (1:400) e negativos (1:400) adicionados em triplicata e incubados à 37 °C durante 1 h. Após este período, as placas foram novamente lavadas e anticorpos anti IgG bovina conjugado à peroxidase (Sigma) foram adicionados. A reação foi revelada com solução substrato/cromógeno contendo *o-phenylenediamine* (0,4 mg/mL em 0,1 M tampão citrato, pH 5,0) e 0,03% de peróxido de hidrogênio. As densidades óticas (DO) foram mensuradas à 450 nm usando VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA). A média dos 12 soros positivos de cada período foi utilizada para a avaliação dos resultados. O ponto de corte do ensaio foi calculado conforme descrito por PARREÑO et al. (2010), sendo considerado 20% da DO do soro controle positivo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os soros positivos e negativos, testados previamente na soroneutralização, mantiveram seu status quando analisados individualmente por ELISA indireto. Após a concordância entre os ensaios, as médias das DOs obtidas no ELISA indireto, referentes a cada período de congelamento (0, 15, 30 e 45 dias), foram utilizadas para avaliar a influência do congelamento na obtenção dos resultados. Baseado nisso, foi possível identificar que após 15 dias de congelamento houve uma diferença significativa na viabilidade do antígeno BoHV-5, quando comparado com os períodos de 30 e 45 dias (Figura 1). Estes resultados indicam a possibilidade da sensibilização de lotes de placas de poliestireno e posterior utilização em até 15 dias pós armazenamento a -20 °C. O processo de bloqueio realizado com PBS-T SFB, antes ou depois do congelamento do antígeno, não apresentou diferenças significativas (Figura 1).

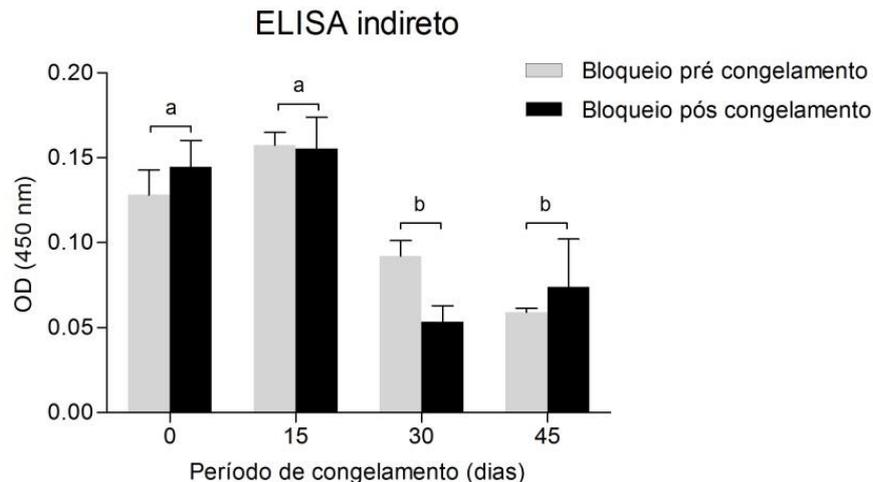


Figura 1: ELISA indireto utilizando soros bovinos e o Herpesvírus bovino tipo 5 como antígeno para a sensibilização das placas. Colunas cinzas e pretas representam as médias das DOs após cada período de congelamento e forma de bloqueio. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

O período de 15 dias de congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do Herpesvírus bovino tipo 5 em placas de poliestireno não influencia os resultados do ELISA indireto. Entretanto, novos ensaios utilizando a temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ serão realizados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAVISON, A. J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G. S.; MCGEOCH, D. J.; MINSON, A. C.; PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M. J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v.154, n.1, p.171-177, 2009.

DEL MEDICO ZAJAC, M. P.; LADELFA, M. F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S. A. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v.184, n.2, p.138-145, 2010.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v.146, p.633-652, 2001.

PARREÑO, V.; ROMERA, S. A.; MAKEK, L.; RODRIGUEZ, D.; MALACARI, D.; MAIDANA, S.; COMPAIRD, D.; CAMBESSIES, G.; VENA, M. M.; GARICOECHEA, L.; WIGDOROVITZ, A.; MARANGUNICH, L.; FERNANDEZ, F. Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards. **Journal of Virological Methods**, v.169, p.143-153, 2010.

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