

PADRONIZAÇÃO DE TESTE ELISA (*ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*) *IN HOUSE* PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA HERPESVÍRUS EQUINO TIPO 1

FLÁVIA BARTZ NUNES¹; AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA²; GABRIEL DA SILVA ZANI³; WELLINGTON ROCHA DA SILVA⁴; MARINA STURBELLE GARCIA⁵; MARCELO DE LIMA⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – flaviabartznunes8@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – barbosa.oamanda@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – gzani27@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – wellingtondasilva.ws@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - sturbellemarina@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – mdelima.ufpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os herpesvírus são vírus da família *Herpesviridae* com, aproximadamente, 100 a 200 nm, envelopados e que possuem genoma DNA de fita dupla linear. Os vírus dessa família realizam infecções complexas no hospedeiro, modulando a resposta imune do organismo (GRINDE, 2013). Os herpesvírus possuem uma ampla diversidade de hospedeiros e atualmente estão subdivididos nas subfamílias *Alphaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae* e *Betaherpesvirinae*, que compartilham a capacidade de realizar infecções latentes no hospedeiro e causarem prejuízos econômicos em diferentes espécies animais (FILHO, 2021).

Os herpesvírus que infectam equídeos estão classificados na subfamília *Alphaherpesvirinae* e na subfamília *Gammaherpesvirinae* (AFIFY et al., 2024). O herpesvírus equino tipo 1 é um vírus pertencente da subfamília *Alphaherpesvirinae* que possui distribuição global e é comumente relacionado com doença respiratória primária, abortos e mieloencefalopatia (KANITZ et al., 2015). Os sinais clínicos causados pela infecção por EHV-1 muitas vezes podem ser confundidos com outros patógenos, o que torna de grande importância a detecção precisa e oportuna do vírus através de testes de diagnósticos. O diagnóstico do EHV-1 pode ser realizado por técnicas diretas, como o isolamento viral e PCR, e ensaios sorológicos, como a soroneutralização e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto (BALASURIYA, 2015). O ELISA é amplamente utilizado para diagnósticos de diversas enfermidades humanas e veterinárias, sendo um teste seguro, específico e sensível (FRANCO et al., 2021).

Diante da grande importância veterinária do herpesvírus equino tipo 1, o presente trabalho tem como objetivo padronizar um teste sorológico ELISA *in house* para a detecção de anticorpos contra EHV-1 em amostras de soro equino.

2. METODOLOGIA

O teste foi padronizado no Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária (LabVir) do Departamento de Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Os soros equinos utilizados na padronização do teste foram provenientes de equinos da Fazenda do Recado, localizada no 5º distrito de Pelotas, e de amostras de soro equino armazenadas no banco de soros do LabVir. O anticorpo secundário utilizado foi o *Anti-horse IgG (Whole molecule) - Peroxidase antibody produced in rabbit* (Sigma A69/7 - 1 mL). O antígeno utilizado para sensibilização das placas foi a cepa de EHV-1 Kentucky, amplificado em células de linhagem de rim de coelho (RK-13)

cultivadas em frascos de cultivo celular. Foram utilizadas placas de 96 poços do modelo CORNING Costar High Binding Low Evaporation (referência 3361).

O protocolo de padronização do teste incluiu diferentes diluições do antígeno (1:10, 1:50, 1:100 e 1:200), diluições dos soros (1:10, 1:50 e 1:100) e diluições do anticorpo secundário (1:1000, 1:10.000 e 1:20.000) pelo método de *checkerboard*. Além disso, as diluições foram testadas em placas bloqueadas e não bloqueadas com leite em pó desnatado (5%). Após os testes, foi determinado como padrão a diluição 1:10 para o EHV-1 e para os soros e a diluição 1:100 para o anticorpo secundário em placas não bloqueadas.

As placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 uL do antígeno EHV-1 (10⁶ TCID50 e concentração 323 ng/mL de proteína) nos 96 poços das placas, que foram colocadas em câmara úmida *overnight* a 4º C. Após o tempo de incubação, o conteúdo dos poços da placa foi desprezado e foram realizadas três lavagens das placas com solução de lavagem (PBS 1x + 0,5% Tween 80). Posteriormente, as placas foram colocadas abertas em contato com luz UV por 15 minutos para realizar a inativação do antígeno. Os soros utilizados foram diluídos com solução de diluição com leite em pó 1% nas diluições 1:10 e, posteriormente, foram pipetados 100 uL de cada diluição em duplicata nos poços correspondentes conforme o espelho feito anteriormente. A incubação das placas foi realizada em câmara úmida a 37 °C por uma hora. O anticorpo secundário foi diluído em solução de diluição (PBS 1X + 0,5% Tween 80 + 1% leite em pó semidesnatado) na diluição 1:1000 e, após a incubação e as três lavagens das placas, foi pipetado 100 uL de cada diluição do anticorpo secundário e, novamente, as placas foram incubadas a 37 °C por uma hora. Por fim, para a revelação do teste, as placas foram lavadas três vezes novamente e a solução de OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*) foi adicionada no volume de 50 uL em cada poço. Em seguida, as placas foram colocadas ao abrigo da luz por dez minutos e, adicionado 50 uL de solução de ácido sulfúrico para bloqueio da reação. A leitura das placas foi realizada no espectrofotômetro ELx800 com absorbância de 450 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 43 amostras de soro equino e o ponto de corte do teste de ELISA foi determinado pelo valor da média dos de absorbância das amostras sabidamente negativas pelo teste de soroneutralização previamente realizado + 2 vezes o desvio padrão (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2024) (Tabela 1). Valores acima do ponto de corte foram classificados como positivos e valores abaixo do ponto de corte foram classificados como negativos.

Tabela 1: Valores determinados nas análises estatísticas

Média dos negativos	0,195
Desvio padrão	0,017
Ponto de corte	0,230

Os resultados de soroneutralização foram utilizados como meio de comparação pois esta é uma técnica padrão-ouro para o diagnóstico sorológico de diversas enfermidades virais relevantes em medicina veterinária tais como as infecções pelos herpesvírus de bovinos conforme estudo de Holz *et al.* (2010) e os pestivírus, onde no estudo de Paredes *et al.* (1999) foi realizada a SN como um teste diferencial entre os pestivírus.

As amostras positivas e negativas, tanto para soroneutralização, quanto para o ELISA indireto, estão apresentadas na Tabela 2. Em seguida, para realizar a análise de concordância entre os dois testes foi construída uma tabela de contingência 2x2 (Tabela 3). A tabela de contingência foi elaborada considerando os resultados verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, e ausência de resultados falsos positivos devido a resultados negativos terem sido iguais nos dois testes.

Tabela 2: Nº de positivos e negativos para SN e ELISA

Amostras	SN	ELISA
Positivas	40 (93,02%)	37 (86,05%)
Negativas	3 (6,98%)	6 (13,95%)

Tabela 3: Contingência dos testes

	SN +	SN -	Total
ELISA +	37 (VP)	0 (FP)	37
ELISA -	3 (FN)	3 (VN)	6
Total	40	3	4

Legenda: VP: verdadeiro positivo; VN: verdadeiro negativo; FP: falso positivo; FN: verdadeiro negativo.

A partir dos valores calculados, foi realizado os cálculos de sensibilidade ($VP \div (VP + FN)$) e especificidade ($VN \div (VN + FP)$), com resultados de 92,5% e 100% respectivamente. Embora não seja possível realizar uma comparação, os resultados do presente estudo são similares a outros trabalhos envolvendo vírus de interesse veterinário, como o trabalho de Goolia *et al.* (2017), que apresentou uma validação de um teste de ELISA de competição e de soroneutralização para *Senecavirus A*, com especificidade de 98,2% e sensibilidade de 96,2%. Já Bauermann *et al.* (2010), foi proposto um teste de ELISA com anticorpo monoclonal para a detecção de anticorpos contra BoHV-1 e 5 com especificidade de 98,3% e sensibilidade de 96,6%. Estes resultados demonstram a viabilidade do teste de ELISA como uma alternativa a técnica de SN para o diagnóstico sorológico destas enfermidades com etiologia viral.

A padronização de testes de ELISA tem sido descrita em diversos trabalhos na literatura científica com aplicação em enfermidades virais de interesse veterinário como descrito por Resende (2020), onde foi realizado a padronização de um teste de ELISA indireto para diagnóstico da leucose enzoótica bovina (LEB), apresentando resultados satisfatórios e aplicáveis em testes de triagem sorológico. Um estudo semelhante foi realizado por Nascimento (2014), onde foi realizada a padronização de um teste de ELISA indireto para a detecção de anticorpos contra Lentivírus em pequenos ruminantes, onde o teste padronizado também apresentou resultados significativos. Entretanto, cabe ressaltar que estudos futuros deverão incluir um número maior de amostras de soro equino provenientes de diferentes regiões do estado ou país, para uma efetiva validação desta técnica de diagnóstico como uma ferramenta alternativa para o diagnóstico sorológico das infecções pelo herpesvírus equino tipo 1.

4. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram que a padronização do teste de ELISA indireto foi eficaz na detecção de anticorpos específicos contra o herpesvírus equino tipo 1. Adicionalmente, os resultados obtidos tiveram alto percentual de concordância com a técnica de soroneutralização (padrão ouro). Após a validação com um número maior de amostras sabidamente positivas e negativas, o teste poderá ser utilizado como uma alternativa para o diagnóstico sorológico das infecções pelo EHV-1.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFIFY, A et al. Unmasking the ongoing challenge of equid herpesvirus- 1 (EHV-1): A comprehensive review. **Microbial Pathogenesis**, Egito, v.193, 2024.
- BALASURIYA, U; CROSSLEY, B; TIMONEY, P. A review of traditional and contemporary assays for direct and indirect detection of Equid herpesvirus 1 in clinical samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, California, v. 25, n.6, p. 673-687, 2015.
- BAUERMANN, F et al. Teste imunoenzimático com base em anticorpo monoclonal para a detecção de anticorpos contra os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 411-417, 2010.
- FILHO, G. B. S. **Herpesvírus em equídeos no Brasil. 2021.** Dissertação (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) – Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2021.
- FRANCO V. L. M et al. A técnica de elisa e a sua importância para o diagnóstico clínico / The elisa technique and its importance for clinical diagnosis. **Brazilian Journal of Development**, [S. I.], v. 7, n. 9, p. 89877-89885, 2021.
- GOOLIA M et al. Validation of a competitive ELISA and a virus neutralization test for the detection and confirmation of antibodies to Senecavirus A in swine sera. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s.l.], v. 29, n. 2, p. 250-253, 2017.
- GRINDE, B. Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. **Journal of Oral Microbiology**. 2013.
- HOLZ, C. L et al. Serum neutralization with different types and subtypes of bovine herpesvirus 1 and 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Eldorado do Sul, v. 30, n.7, p. 515-522, 2010.
- KANITZ, F. et al. Respiratory and neurological disease in rabbits experimentally infected with equid herpesvirus 1. **Microbial Pathogenesis**, Santa Maria, [s.n.], v. 8, p. 45-50, 2015.
- NASCIMENTO, C. B. et al. Ferramentas diagnósticas de Lentivirose de Pequenos Ruminantes: padronização da técnica de ELISA indireto. **Arquivos do Instituto Biológico**, Teresina, v. 81, n. 1, p. 9-15, 2014.
- PAREDES, J.C.M et al. Soroneutralização como teste sorológico diferencial entre infecções pelo vírus da peste suína clássica e outros pestivírus. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, Eldorado do Sul, v.51, n.5, 1999.
- RESENDE, C. F et al. Indirect ELISA (iELISA) standardization for the diagnosis of bovine enzootic leukosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Minas Gerais, v. 40, n.12, p. 977-984, 2020.
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2023. Disponível em: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>. Acesso em: 19 ago. 2025.