

**Giovanna Ivo Andrade**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Herpesvirus bovino 1* E 5: PROTEÍNAS VIRAIS,  
RECOMBINANTES E PEPTÍDEOS SINTÉTICOS EM SUPORTES SÓLIDOS  
COMERCIAIS E MODIFICADOS POR ENGENHARIA DE SUPERFÍCIE.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientador: Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2006

A553d Andrade, Giovanna Ivo, 1969-

Diagnóstico sorológico de *Herpesvirus bovino 1 e 5*: proteínas virais, recombinantes e peptídeos sintéticos em suportes sólidos comerciais e modificados por engenharia de superfície / Giovanna Ivo Andrade. – 2006. 134p. :il.

Orientadora: Edel Figueiredo Barbosa Stancioli  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Herpesvirus em animais – Diagnóstico-  
Teses. 3. Nanotecnologia – Teses. I. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa.  
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 969 2

Assinaturas



À,  
Maria Amália Ivo Andrade,  
pelo seu enorme carinho e amizade.  
“Bau, não tenho palavras para te  
agradecer. Te amo muito!”

Ao meu pai,  
Mirabeau Araújo Andrade,  
por tudo, principalmente,  
pela oportunidade de  
chegar até aqui.

Aos amigos, pois, sem eles  
não somos ninguém!

“...e ele já tinha adquirido a experiência de que a fé e a dúvida são inseparáveis, que uma determina a outra como o inspirar e o expirar...” (Herman Hesse, O Jogo das Contas de Vidro).



## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Edel. Figueiredo Barbosa Stancioli pela orientação e dedicação, pelo aprendizado e pela amizade sincera durante todo esse período. “Edel muito obrigada de todo coração! Você é muito especial para mim!”.

Agradeço especialmente ao Dr. Erma Sander Mansur do Laboratório de Análise e Caracterização de Superfícies e Materiais – Escola de Engenharia – UFMG pela co-orientação e colaboração preciosas.

À professora Zélia Inês Portela Lobato pela cooperação fundamental para a realização desse trabalho e pela amizade e carinho. “Valeu, querida Zélia!”.

Aos professores do Laboratório de Virologia – ICB/UFMG pelo uso de equipamentos.

Aos alunos do Laboratório de Virologia – ICB/UFMG pela ajuda em vários momentos e, em especial, ao João pela ajuda com as proteínas recombinantes.

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite, sempre disposto a nos ajudar.

Ao Prof. Chico Lobato e ao aluno Hélio pela coleta dos soros do rebanho de Cruzília – MG.

Agradeço especialmente ao aluno de Iniciação Científica Rafael Melo pela colaboração fundamental nesse trabalho.

Agradeço especialmente à Renata Tomich (Hija II) pelo enorme auxílio com as análises estatísticas dos ELISAs. Valeu Hija!

Agradeço especialmente à Fábria do DMVP/EV pela ajuda essencial na técnica de soroneutralização, secagem dos géis, entre outros e pela sua amizade preciosa. “Fábria, muito obrigada!”

Agradeço especialmente à D. Sônia pela amizade e apoio em todo o período em que estive na Escola de Veterinária.

À funcionária Nádia do setor de informática do DMVP/EV pela formatação da tese.

Às funcionárias do DMVP/EV, Doris e Grazielle pela amizade e ajuda em vários momentos.

Ao funcionário Eduardo do DMVP/EV pela ajuda e disponibilidade.

À Eliane e Nilda da secretaria de Pós-Graduação da EV pela simpatia e disponibilidade de sempre.

Aos amigos do Laboratório de Microrganismos Intracelulares pelo apoio e amizade.

A todos àqueles que de alguma forma participaram de mais uma etapa importante da minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante 48 meses do Curso de Doutorado.

Às agências de fomento à pesquisa CNPq, FAPEMIG, SEBRAE pelo apoio financeiro.





---

## SUMÁRIO

---

	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	13
	<b>RESUMO</b> .....	15
	<b>ABSTRACT</b> .....	15
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2.</b>	<b>LITERATURA CONSULTADA</b> .....	18
2.1	Aspectos Gerais .....	18
2.1.1	<i>Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1)</i> .....	18
2.1.2	<i>Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5)</i> .....	20
2.2	Replicação Viral .....	21
2.3	Glicoproteínas Virais .....	22
2.3.1	Glicoproteína C .....	23
2.3.2	Glicoproteína G .....	24
2.4	Métodos de Diagnóstico.....	25
2.4.1	Programas de Controle e Erradicação.....	27
2.5	Produção de Proteínas Recombinantes em <i>Escherichia coli</i> .....	28
2.6	Peptídeos Sintéticos .....	28
2.7	Biomateriais .....	29
2.8	Suportes Sólidos Comerciais.....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
3.1	Etapas Experimentais .....	31
3.2	Células e Vírus.....	32
3.2.1	Produção e Purificação das Proteínas Virais.....	32
3.2.2	SDS-PAGE das Amostras Virais Purificadas .....	33
3.2.3	Verificação da Especificidade das Partículas Virais Purificadas .....	33
3.2.3.1	Ensaio de Dot.....	33
3.3	Soroneutralização Viral .....	33
3.3.1	Soroteca .....	33
3.3.2	Teste de Neutralização Viral .....	35
3.4	Padronização do ELISA Indireto .....	35
3.4.1	Determinação do Ponto de Corte do ELISA Indireto .....	39
3.5	Proteínas Recombinantes.....	39
3.5.1	Estudo Teórico da Glicoproteína G de BoHV-1 e BoHV-5 .....	39
3.5.2	Extração do DNA das Amostras Virais .....	40
3.5.3	PCR dos DNA's Extraídos e Purificação dos Produtos Amplificados .....	40
3.5.4	Clonagem Utilizando o Vetor pGEM-T easy.....	40
3.5.4.1	Ligação.....	40
3.5.4.2	Transformação .....	40
3.5.4.3	Subclonagem em Vetor de Expressão pQE-30.....	41

3.5.4.4	Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes .....	41
3.5.5	ELISA Indireto - Proteínas Recombinantes .....	42
3.6	Peptídeos Sintéticos .....	42
3.6.1	Estudo Teórico da Glicoproteína C de BoHV-1 e BoHV-5 .....	42
3.6.2	Síntese dos Peptídeos .....	42
3.6.3	ELISA Indireto - Peptídeos Sintéticos .....	43
3.7	Biomateriais .....	43
3.7.1	Reagentes .....	43
3.7.2	Hidrogéis e Síntese Híbrida .....	43
3.7.3	Caracterização Química dos Híbridos PVA/GA/Silanes por Espectroscopia FTIR .....	44
3.7.4	ELISA Indireto - Biomateriais .....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
4.1	Células e Vírus .....	44
4.1.1	Produção e Purificação das Proteínas Virais .....	44
4.1.2	SDS-PAGE das Amostras Virais Purificadas .....	44
4.1.3	Verificação da Especificidade das Partículas Virais Purificadas .....	45
4.2	Soroneutralização Viral .....	49
4.3	ELISA Indireto .....	50
4.4	Proteínas Recombinantes .....	59
4.4.1	Estudo Teórico da Glicoproteína G de BoHV-1 e BoHV-5 .....	59
4.4.2	Experimentos de Clonagem e Subclonagem .....	63
4.4.3	Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes .....	63
4.4.4	ELISA Indireto - Proteínas Recombinantes .....	73
4.5	Peptídeos Sintéticos .....	74
4.5.1	Estudo Teórico da Glicoproteína C de BoHV-1 e BoHV-5 .....	74
4.5.2	ELISA Indireto - Peptídeos Sintéticos .....	74
4.6	Biomateriais .....	77
4.6.1	Caracterização das Matrizes Híbridas .....	77
4.6.2	Caracterização das Matrizes Híbridas por Espectroscopia FTIR .....	77
4.6.3	ELISA Indireto - Biomateriais .....	85
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>ANEXO I .....</b>	<b>127</b>

---

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1	Sorotecas utilizadas nos experimentos de Soroneutralização Viral (SN) e na padronização do ELISA Indireto.....	34
Tabela 2	Tamanho do amplicon esperado, seqüência, orientação e localização dos iniciadores.....	40
Tabela 3	Seqüência de aminoácidos dos peptídeos sintetizados .....	43
Tabela 4	Resultado da soroneutralização viral (SN) com os antígenos de BoHV-1 e BoHV-5 utilizando as sorotecas A, B, C e D. ....	49
Tabela 5	Comparação entre o ELISA padronizado com os antígenos virais e os testes de soroneutralização viral (SN) e ELISA comercial (p< 0,05) .....	54
Tabela 6	Dados comparativos do ELISA indireto padronizado com as proteínas recombinantes e os testes de soroneutralização viral (SN) e ELISA comercial. ....	73
Tabela 7	Análise de aminoácidos/cargas iônicas do total de glicoproteínas de BoHV-5 e BoHV-1 (glicoproteínas K, N, C, B, H, M, L, G, D, I e E), parte da glicoproteína G produzida em E. coli durante este trabalho e peptídeos sintetizados (gC de BoHV-1 e BoHV-5) .....	86

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1	Localização dos rebanhos que compõem as sorotecas A, B, C e D (e seus respectivos efetivos bovinos - IBGE, 2003), com destaque para o estado de Minas Gerais. Representados em vermelho estão os municípios de Minas Gerais e, em marrom, no mapa do Brasil, as demais localidades.....	37
Figura 2	Perfil protéico das amostras virais de BoHV-1 e BoHV-5 purificadas em colchão de sacarose e resolvidas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Coloração por azul de Commassie. Canaleta 1: controle celular; canaleta 2: Colorado 1 (BoHV-1); canaleta 3: EVI-88 (BoHV-5); PM: padrão de peso molecular (Bench-Mark™ Ladder - INVITROGEN).....	45
Figura 3	Reatividade dos antígenos virais purificados, em ensaio de dot, com sobrenadante de hibridomas (3A) e soros policlonais provenientes de infecção experimental em bovinos (3B). ....	47
Figura 4	Triagem de soros policlonais provenientes de infecção experimental ou natural em ensaio de ELISA indireto.....	51
Figura 5	Desempenho do ELISA indireto padronizado em quatro diferentes suportes sólidos comerciais e concentrações de antígenos de 250 (5A) e 500 ng/poço (5B).....	55
Figura 6	Especificidade calculada para os diferentes suportes sólidos em concentrações de antígenos de 250 (6A) e 500ng/poço (6B) .....	57
Figura 7	Resultado do ELISA indireto padronizado com antígenos virais purificados por ultracentrifugação em colchão de sacarose (ELISA LABMIC), utilizando soroteca previamente testada pelo ELISA IDEXX - BoHV-1.....	59
Figura 8	Alinhamento de parte da glicoproteína G de BoHV-1 e BoHV-5 (8A) e perfil de hidrofobicidade da região analisada (8B), segundo Kyte & Doolittle (1982).....	61
Figura 9	Estratégia de clonagem em vetor pGEM-T easy e subclonagem em vetor pQE-30 para expressão das proteínas recombinantes recgG/BoHV-1 e recgG/BoHV-5 .....	65
Figura 10	Alinhamento das seqüências parciais de nucleotídeos da glicoproteína G dos clones de BoHV-5 (10A) e BoHV-1 (10B) em vetor pGEM-T easy. Diferenças entre as amostras trabalhadas e seqüências-padrão previamente depositadas no GenBank estão em destaque .....	67

Figura 11	Alinhamento predito das seqüências de aminoácidos de BoHV-5 (11A) e BoHV-1 (11B) clonadas em vetor de expressão pQE-30. Diferenças entre as amostras trabalhadas e seqüências-padrão previamente depositadas no GenBank estão em destaque, bem como a cauda fusionada de histidina no início da seqüência. ....	69
Figura 12	Expressão das proteínas recombinantes gG de BoHV-1 e BoHV-5 fusionadas à cauda de histidina. A purificação foi feita em coluna de quelato de níquel e a eluição efetuada em diferentes pHs conforme apontado na figura. Para os clones dos dois vírus o melhor pH de eluição foi entre 5 e 6, sendo que houve purificação parcial também no pH 2,7, porém com menor rendimento total .....	71
Figura 13	Estratégia de estudo e síntese dos peptídeos. ....	75
Figura 14	A Representação esquemática do processo de reticulação química e formação dos híbridos com os agentes silane modificadores. B Híbridos resultantes do PVA 107 modificado pelo grupo glicidil (PVA 107/GPTMS - filme) e reticulado com GA (PVA 107/GA/GPTMS - disco) .....	79
Figura 15	Espectro FTIR do polímero de PVA Celvol 107 puro usado como referência. Estrutura química do PVA mostrando os principais picos de vibração do polímero, representados pelos grupos álcool e acetato .....	81
Figura 16	Espectro FTIR do híbrido de PVA modificado pelo grupo mercapto, e, em seguida, reticulado quimicamente com glutaraldeído (PVA/MPTMS/GA). O inserto mostra a representação esquemática da matriz híbrida baseada em PVA, silane e reticulação. ....	81
Figura 17	Espectro FTIR mostrando a incorporação do BoHV-1 na matriz híbrida (PVA/MPTMS/GA/BoHV-1-1) .....	83
Figura 18	A Antígeno de BoHV-1 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5. .... B Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial. ....	87 89
Figura 19	A Antígeno de BoHV-5 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5. .... B Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial. ....	91 93
Figura 20	A Antígeno recombinante gG-BoHV-1 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5. .... B Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial. ....	97 99
Figura 21	A Antígeno gG-BoHV-5 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5. .... B Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial. ....	101 103
Figura 22	A Peptídeo gC-BoHV-1 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5. .... B Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial. ....	107 109
Figura 23	A Peptídeo gC-BoHV-5 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5. .... B Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial. ....	111 113

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila (Acetonitrile)	HHV-3 - <i>Human herpesvirus 3</i> - Varicella-zoster vírus
APTES - 3-aminopropyltriethoxysilane	HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
ATCC - <i>American Type Culture Collection</i>	HRPO – Peroxidase de Raiz Forte (Horseradish Peroxidase)
BoHV-1 - <i>Bovine herpesvirus 1 - Infectious bovine rhinotracheitis virus</i>	HS - Heparan-sulfato
BoHV-5 - <i>Bovine herpesvirus 5 - Bovine encephalitis virus</i>	IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
BRD - Doença respiratória de bovinos	IBR - Rinotraqueíte infecciosa bovina
BSA – Soroalbumina bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )	ICB - Instituto de Ciências Biológicas
CapHV-1 - <i>Caprine herpesvirus 1</i>	ICTV - Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses)
CerHV-1 - <i>Cervine herpesvirus 1</i>	IgG – Imunoglobulina G
D.O. - Densidade óptica	IPB - Balanopostite pustular infecciosa
DAB - 3,3-Diaminobenzidina	IPTG - Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
DMSO - Dimetilsulfóxido	IPV - Vulvovaginite pustular infecciosa
DNA - Ácido desoxirribonucléico	ISOCYPTES - 3-isocyanatopropyl triethoxysilane
ECP - Efeito citopático	IV - Isolamento Viral
EHV-1 - <i>Equid herpesvirus 1</i> - vírus do aborto equino	LA – Los Angeles
EHV-3 - <i>Equid herpesvirus 3</i> - vírus do exantema coital de eqüinos	LABMIC - Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares
EHV-4 - <i>Equid herpesvirus 4</i> - vírus da rinopneumonite eqüina	LB – Meio Luria-Bertani
ELISA – Ensaio de adsorção imunoenzimático ( <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )	LPD - Leite em pó desnatado
EtBr- Brometo de etídio	m.o.i - multiplicidade de infecção
F-moc - 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl	Mab – Anticorpos Monoclonais ( <i>Monoclonal antibodies</i> )
FTIR – Espectroscopia infravermelha (Fourier Transform Infrared Radiation)	MAPTMS - 3-methacryloxypropyl-trimethoxysilane
GA - Glutaraldeído	MDBK – Célula de Rim Bovino ( <i>Madin-Darby Bovine Kidney</i> )
gB - Glicoproteína B	MEM-Eagle – Meio Mínimo de Eagle ( <i>Minimum Essential Medium Eagle</i> )
gC - Glicoproteína C	
gD - Glicoproteína D	
GPTMS - Glycidoxypropyltrimethoxysilane	
HHV-1 - <i>Human herpesvirus 1</i>	
HHV-2 - <i>Human herpesvirus 2</i>	

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

MPTMS - 3-Mercaptopropiltrimetoxisilane

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal (*World organisation for animal health*)

OPD - ortofenilenodiamina (*orthophenylenediamine*)

ORF - Janela Aberta de Leitura (*Open Reading Frame*)

PBS – Tampão de salina fostada (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PS – Poliestireno

PVA - Álcool Polivinílico

PVC – Cloreto de Polivinila

PEG – Polietilenoglicol

REA - Restriction Endonucleases Analysis

RanHV-1 - *Rangiferine herpesvirus 1*

RK13 – célula de Rim de Coelho (*Rabbit Kidney 13*)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida-Dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SFB - Soro Fetal Bovino

SN - Soroneutralização Viral

SNC - Sistema Nervoso Central

SOC – Meio super ótimo para crescimento (*Super Optimal broth with Catabolite repression*)

SuHV-1 - *Suid herpesvirus 1 - Pseudorabies virus*

TBE - Tris-Borato-EDTA

TBS – Tris - Saline Tamponada

TEOS – Tetraethoxysilane

TFA – Ácido Trifluoro Acético

TNE - Tris-NaCl-EDTA

UL - região Única Longa (*Unique Long*)

US - região Única Curta (*Unique Short*)

VC – Cloreto de Vinila

## RESUMO

O *Herpesvírus bovino 1* (BoHV-1) e o *Herpesvírus bovino 5* (BoHV-5) encontram-se amplamente difundidos no Brasil e no mundo, tendo o seu controle dificultado pela grande similaridade em nível genômico e antigênico que os mesmos apresentam. Não há, até o momento, um teste de diagnóstico que diferencie sorologicamente esses dois vírus. Esse trabalho teve como objetivo padronizar sistemas indiretos de ELISA para a diferenciação sorológica desses agentes, utilizando vírus purificados, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos incorporados em biomateriais modificados por engenharia de superfície, em comparação com sua incorporação em suporte sólido comercial. As análises in silico para o estudo das proteínas recombinantes e dos peptídeos sintéticos foram baseadas nas regiões codificadoras das glicoproteínas gG e gC, respectivamente. As proteínas virais foram produzidas em células MDBK, as recombinantes foram produzidas em sistema procaríoto, fusionadas a caudas de histidina e os peptídeos sintéticos foram produzidos pela síntese F-moc. Vários biomateriais melhoraram a especificidade de reconhecimento das distintas moléculas, com valores variando de 10 a 60% acima daqueles obtidos com o suporte sólido comercial. Os materiais modificados por engenharia de superfície se mostraram uma potente e promissora ferramenta para o desenvolvimento dos testes diferenciais propostos neste trabalho.

Palavras-chave: BoHV-1, BoHV-5, ELISA, nanotecnologia.

## ABSTRACT

*Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) and *Bovine herpesvirus 5* (BoHV-5) are distributed around the world and causes great economic impact, needing hard disease control programs. These viruses share a high homology at nucleotide and aminoacide level. Due to this great similarity few serological methodologies to carry out differential diagnosis that can distinguish both viruses are available. The aim of this work was to develop indirect ELISA assays based on total virus proteins (produced in MDBK cells), glycoprotein G recombinant histidin fused produced in prokaryote system and gC-synthetic peptides produced by F-moc synthesis, for both viruses. Organic-inorganic hybrid material has been developed to improve conventional methods to immobilize biomolecules, enhancing specificity during chemical interactions. The molecules produced were attached to solid commercial support and biomaterials modified by engineering surface. Many hybrid materials showed great improvement with enhanced specificity varying from 10 to 60% for bovine herpesvirus serological diagnosis, showing to be a promising tool to be used in control programs.

Key-words: BoHV-1, BoHV-5, ELISA, nanotechnology

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior efetivo bovino das Américas e o segundo do mundo, com cerca de 205 milhões de cabeças (IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2004). A bovinocultura brasileira avançou muito nas últimas décadas, porém, ainda mantém baixos índices de produção devido a inúmeros fatores, com destaque para as doenças da reprodução. Neste contexto, os herpesvírus bovinos são apontados como um dos principais agentes de redução da eficiência produtiva e reprodutiva de bovinos no Brasil e no mundo, o que demanda um alto investimento em campanhas de controle e erradicação desses vírus, além do comprometimento na comercialização de animais, sêmen e embriões.

O *Herpesvírus bovino 1* (*Bovine herpesvirus 1* - Infectious bovine rhinotracheitis virus - BoHV-1) é o agente etiológico de importantes síndromes clínicas que incluem a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite pustular infecciosa (IPB) (Meyer *et al.*, 2001), além de outras manifestações comuns como a conjuntivite e ceratoconjuntivite, mamilite, enterite e desordens reprodutivas caracterizadas por morte embrionária, fetal, aborto e mortalidade neonatal (Gibbs e Rweyemamu, 1977; Wyler *et al.*, 1989; Takiuchi *et al.*, 2005). O *Herpesvírus bovino 5* (*Bovine herpesvirus 5* - Bovine encephalitis vírus - BoHV-5) é o agente responsável pela meningoencefalite não supurativa de bovinos, de curso freqüentemente fatal, ocorrendo principalmente em animais jovens, entre 2 a 10 meses de idade (Roizman *et al.*, 1992). Atualmente, quando um maior número de estudos sobre este agente já foi efetuado, tem sido relatado que o acometimento de animais adultos tem ocorrência similar ao de animais jovens (Botelho, 2000; Gomes *et al.*, 2002). Embora, alguns surtos de encefalite também possam ocorrer devido à infecção pelo BoHV-1, somente o BoHV-5 é capaz de alcançar o SNC (Studdert, 1989; Meyer *et al.*, 2001).

A infecção pelo BoHV-1 possui distribuição mundial, enquanto a prevalência e a infecção pelo BoHV-5 são pouco conhecidas. Isso é devido, em parte, à ampla distribuição do BoHV-1 e esquemas intensivos de vacinação contra esse agente, aliados à inabilidade das técnicas tradicionais para diferenciar entre o BoHV-1 e 5 (Metzler *et al.*, 1986; d'Offay *et al.*, 1995; Oldoni *et al.*, 2004). No Brasil, vários estudos indicam a presença dos dois vírus na população bovina (Weiblen *et al.*, 1989; Roehe *et al.*, 1998; Teixeira., 1998). Em outros estudos feitos no Brasil, pesquisadores (D'Arce *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002; Esteves *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2003) isolaram o BoHV-5 a partir de sêmen de touros assintomáticos, apontando mais uma via provável de transmissão para esse vírus, classicamente descrita para BoHV-1. Estes dados sugerem que o BoHV-5 poderia estar envolvido em outras entidades clínicas além da neurológica, evidenciando, assim, a necessidade de um teste seguro para triagem sorológica que possa verificar a real prevalência desse patógeno nos rebanhos brasileiros, facilitando seu controle e prevenção.

Devido à grande homologia genômica e aos vários antígenos partilhados pelos BoHV-1 e BoHV-5 e outros alphaherpesvirus de ruminantes, os programas de controle e erradicação das infecções causadas pelo BoHV-1 tornam-se comprometidos (Roehe *et al.*, 1997; Keuser *et al.*, 2004). Reações sorológicas cruzadas são demonstradas com anticorpos policlonais e mesmo com anticorpos monoclonais, o que dificulta a distinção entre o BoHV-1 e BoHV-5 com o uso de testes clássicos como o isolamento viral (IV), a soroneutralização (SN), vários tipos de ELISA's, imunofluorescência ou imunoperoxidase (Giavedoni *et al.*, 1988).

Alguns estudos já demonstraram métodos que diferenciam o BoHV-1 do BoHV-5. Técnicas como a PCR, geralmente seguidas de análise por restrição enzimática (REA) e análise com anticorpos monoclonais contra epitopos específicos de cada agente viral foram empregadas com sucesso para o diagnóstico diferencial entre esses agentes



virais (Ros *et al.*, 1999; Alegre *et al.*, 2001; D'arce *et al.*, 2002; Oldoni *et al.*, 2004; Claus *et al.*, 2005). Entretanto, esses métodos são trabalhosos, demorados e tornam-se economicamente inviáveis para a triagem em larga escala.

O genoma dos herpesvírus bovinos 1 e 5 codifica pelo menos 10–11 glicoproteínas virais (Fitzpatrick *et al.*, 1989; Liang *et al.*, 1993; Tikoo *et al.*, 1995; Baranowski *et al.*, 1996). Dentre elas, as glicoproteínas B (gB), C (gC) e D (gD), são abundantes no envelope viral e são requeridas para os passos iniciais da infecção: adesão, fusão e penetração nas células hospedeiras. Vários estudos verificaram importantes diferenças antigênicas entre essas glicoproteínas de BoHV-1 e BoHV-5 (Collins *et al.*, 1993; Chowdhury, 1995, 1997) e as diferenças mais significativas foram observadas na glicoproteína C (gC), com grandes variações nas seqüências de aminoácidos situadas em sua região amino-terminal (Chowdhury, 1995; Delhon *et al.*, 2003). Alguns relatos na literatura sugerem que o gene codificador da gC é um importante alvo para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico diferencial entre esses dois agentes (Chowdhury, 1995, 1997; Claus *et al.*, 2005).

A glicoproteína G, codificada pela região única curta 4 (US4), ainda não tem o seu papel precisamente elucidado no ciclo replicativo dos alphaherpesvírus (Nakamichi *et al.*, 2000; 2002; Bryant *et al.*, 2003). Como para HHV-1 (*Herpesvirus humano 1*) e SuHV-1 (*Suid herpesvirus 1* - Pseudorabies virus), gG de BoHV-1 não é essencial para o crescimento viral em cultivo de células. Foi demonstrado que a gG de BoHV-1 também não é requerida para os passos de adesão e penetração viral em células MDBK, mas está envolvida na disseminação da infecção célula-célula e também é requerida para a prevenção da apoptose nessas células (Nakamichi *et al.*, 2000, 2001). A comparação das seqüências de nucleotídeos de US4 desses dois agentes revelou 82% de homologia, mostrando que a divergência entre esses dois genes ocorreu por mutações de ponto, inserções e áreas importantes de deleções

(Engelhardt e Keil, 1996), induzindo recentemente ao aparecimento de ensaios diagnósticos baseados nesta região gênica (Gomes *et al.*, 2003).

Atualmente, uma das áreas mais atraentes da engenharia de superfícies é aquela envolvida com os processos de bioimobilização, através da modificação da superfície dos materiais para torná-los compatíveis às moléculas biológicas. Os biomateriais poliméricos têm aplicação na área biomédica, farmacêutica e odontológica (Wang *et al.*, 2004). Uma nova classe de materiais, os híbridos orgânico-inorgânicos, juntamente com os hidrogéis, desperta especial interesse na ciência contemporânea dos materiais, devido à sua aplicação potencial em implantes biomédicos, matrizes para sistemas de liberação de drogas, carreadores para moléculas de sinalização e membranas de bioseparação (Mansur *et al.*, 2004). Esses novos materiais podem interagir com os sistemas biológicos com alto desempenho e já têm demonstrado o seu potencial em ensaios de imunodeteção (Lima-Barros *et al.*, 2002). A facilidade na síntese, com propriedades físicas e mecânicas desejáveis, aliadas ao baixo custo desses materiais são vantagens adicionais para sua aplicação comercial (Wang *et al.*, 2004), especialmente no que se refere ao desenvolvimento de testes de diagnóstico (Reis *et al.*, 2006).

Nesse estudo experimental pretendeu-se obter um método de diagnóstico sorológico diferencial entre o BoHV-1 e o BoHV-5. Para isso, foram desenvolvidas três metodologias de trabalho: a síntese de peptídeos baseados na região amino-terminal da glicoproteína C (gC), a expressão de proteína recombinante baseada na região codificadora da glicoproteína G (gG) e a modificação da superfície de materiais para adesão dessas biomoléculas e sua verificação em ensaio de ELISA indireto. Estas moléculas foram analisadas comparativamente ao antígeno viral sonificado (partículas virais purificadas por ultracentrifugação).

## 2. LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 Aspectos Gerais

O nome herpes, do Latim *herpes*, tem origem na palavra grega *herpein* que significa arrastar-se, referindo-se à natureza de disseminação das lesões na pele causadas por muitos tipos de herpesvírus. Os herpesvírus são considerados uns dos principais agentes causadores de doenças virais em humanos e animais (Hunt, 2005).

Os herpesvírus estão altamente disseminados na natureza e cerca de 130 herpesvírus foram descritos até agora. Cada um deles infecta, em particular, uma espécie de animal vertebrado para a qual é, usualmente, bastante seletivo. Atualmente, já foram descritos nove herpesvírus que infectam humanos, sendo os *Herpesvirus humanos 1 e 2* (HHV -1 e 2), os primeiros herpesvírus humanos descobertos, situando-se entre os mais intensamente investigados de todos os vírus (Fields *et al.*, 2001). Alguns herpesvírus causam doenças econômicas importantes em animais domésticos (Hunt, 2005), com destaque para os ruminantes.

Os herpesvírus partilham quatro propriedades biológicas principais: 1. todos os herpesvírus produzem enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico, na síntese de DNA e no processamento de proteínas; 2. a síntese do DNA viral e a montagem do capsídeo ocorrem no núcleo; 3. a produção da progênie viral é sempre acompanhada pela destruição irreversível da célula infectada; 4. todos os herpesvírus são capazes de estabelecer latência em seus hospedeiros naturais (Fields *et al.*, 2001).

A inclusão de membros na família *Herpesviridae* baseia-se na arquitetura do virion. Um herpesvirus típico possui como características estruturais um cerne contendo DNA linear de fita dupla, capsídeo icosaédrico, com 100 a 110 nm de diâmetro e 162 capsômeros, divididos em 12 pentâmeros e 150 hexâmeros. Em recente tese desenvolvida no Laboratório de Biologia de Microrganismos – ICB – UFMG,

Afonso (2005) demonstrou em ensaios de microscopia eletrônica um tamanho aproximado de 171nm de diâmetro para o BoHV-1 (amostra Colorado – ATCC 864) e de 136nm de diâmetro para as partículas de BoHV-5 (amostra EVI-88). Os herpesvirus possuem também, um envelope viral recoberto por espículas glicoprotéicas e um material amorfo, situado entre o capsídeo e o envelope viral, denominado tegumento (Fields *et al.*, 2001) que contém proteínas e enzimas codificadas pelo vírus envolvidas no início da replicação (ICTV - Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus, 2002; Hunt, 2005).

Segundo seu comportamento biológico, a família *Herpesviridae* é classificada em três subfamílias: *Alpha-*, *Beta-* e *Gamma-herpesvirinae*. Os herpesvírus de ruminantes pertencem às subfamílias *Alpha-* e *Gamma-herpesvirinae*. Já a divisão em gêneros baseia-se na homologia das seqüências de DNA, na similitude dos arranjos do genoma e na correlação entre as proteínas virais (Engels *et al.*, 1986).

Os herpesvírus bovinos 1 e 5 pertencem à subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, juntamente com outros importantes alphaherpesvírus de importância veterinária (Carter *et al.*, 2005). Os alphaherpesvírus caracterizam-se por um ciclo reprodutivo curto com lise das células infectadas, uma gama variável de hospedeiros e tipos celulares, e capacidade de estabelecer infecção latente, principalmente, em neurônios dos gânglios sensoriais (Engels *et al.*, 1986; Fields *et al.*, 2001; ICTV - Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus, 2002).

#### 2.1.1 *Herpesvírus bovino 1 (BoHV-1)*

O *Herpesvirus bovino 1* é um dos patógenos mais importantes dos bovinos e causa grandes perdas econômicas na pecuária mundial. O BoHV-1 está associado a uma variedade de manifestações clínicas, tais como, a rinotraqueíte (IBR), vulvovaginite (IPV), balanopostite (IPB), conjuntivite e ceratoconjuntivite, ocasionalmente encefalite e várias formas de problemas reprodutivos (Gibbs e Rweyemamu, 1977;

Wyler *et al.*, 1989). Um dos efeitos mais graves relacionados aos problemas reprodutivos causados pelo BoHV-1 pode ser observado em animais prenhes. Quando a infecção torna-se sistêmica, o vírus pode passar pelo epitélio uterino e causar a morte embrionária ou fetal, levando ao aborto (Canant, 1984). Como há sincronização de cio na reprodução dos bovinos, o BoHV-1 poderia, então, causar surtos de abortos em rebanhos inteiros (Wyler *et al.*, 1989).

Em adultos, o BoHV-1 poderia causar somente sinais clínicos brandos, mas em animais jovens, incluindo os recém-nascidos, poderia ser o responsável por problemas mais graves como, por exemplo, dar início à doença respiratória de bovinos (BRD), pela sua habilidade em modificar o ambiente do trato respiratório superior e causar imunossupressão (Yates, 1982). Os rebanhos com alta incidência da infecção pelo BoHV-1, geralmente, apresentam altas taxas de morbidade e baixas taxas de mortalidade (D'Arce *et al.*, 2002).

O BoHV-1 pode ser classificado em dois grupos, segundo o seu perfil de restrição e propriedades patogênicas: o grupo respiratório/abortogênico e o grupo genital, não abortogênico (Chowdhury, 1995). O BoHV-1.1 refere-se aos isolados com tropismo pelo trato respiratório, causando a rinotraqueíte infecciosa dos bovinos (IBR) e o BoHV-1.2 inclui as amostras virais relacionadas à infecção genital, causando a vulvovaginite e balanopostite. Entretanto, tal associação não é absoluta, desde que ambos subtipos poderiam infectar os tratos genital e respiratório (Edwards *et al.*, 1991; Rijsewijk *et al.*, 1999; D'Arce *et al.*, 2002) e alguns isolados de BoHV-1.2 poderiam causar doença respiratória grave sob condições experimentais (Spilki *et al.*, 2004a). A infecção pelo BoHV-1 tem distribuição mundial e sua prevalência em rebanhos bovinos atinge coeficientes variados em diferentes regiões (Straub, 2001). No Brasil, grande parte das propriedades apresentam animais sorologicamente positivos para o BoHV-1 (Ravazzolo *et al.*, 1989; Lovato *et al.*, 1995; Vidor *et al.*, 1995), com índices de soropositividade variando de 10,6% a 96%

(Lovato *et al.*, 1995; Lage *et al.*, 1996; Vieira *et al.*, 2003). Essa grande variação deve-se ao uso de diferentes técnicas de coleta, número e estratificação de amostras, englobando poucos municípios ou, muitas vezes, deve-se a estudos em populações específicas, ou ambas as situações (Barbosa *et al.*, 2005).

O BoHV-1 foi isolado pela primeira vez em 1950, nos Estados Unidos (EUA), mas somente na década de 60, os aspectos respiratórios graves da infecção por esse agente tornaram-se proeminentes naquele país. Na Europa, a forma de IBR mais grave foi relatada em princípios de 1972 (Edwards, 1988; Ackermann *et al.*, 1990). No Brasil, o primeiro isolamento desse patógeno ocorreu em 1978, no estado da Bahia, a partir de pústulas vaginais (Alice, 1978; Mueller *et al.*, 1978). Nesse mesmo ano, em São Paulo, o BoHV-1 foi isolado de um rim de feto bovino proveniente de matadouro (Mueller *et al.*, 1978) e, mais tarde, de casos de aborto (Nogueira *et al.*, 1986).

O *Herpesvírus bovino 1* foi o primeiro herpesvírus de ruminante a ter seu genoma completamente seqüenciado. A análise do genoma de BoHV-1 teve início em 1983, com a geração de seu mapa genômico a partir de fragmentos clonados em Hind III. Posteriormente, de 1987 a 1990, os primeiros genes foram identificados e seqüenciados; entre 1993 e 1995, à partir de uma cooperação internacional, cientistas do mundo inteiro determinaram a seqüência total do genoma do *Herpesvírus bovino 1*, formada pela inclusão de seqüências de cinco diferentes amostras virais (*GenBank* número de acesso AJ004801) (Schwyzer e Ackermann, 1996).

O BoHV-1 possui um arranjo de genoma do tipo D, com uma região única longa (UL) com 104 kb e uma região única curta (US) com 10 kb, flanqueadas por duas regiões de repetição, uma interna e uma terminal, com 11 kb cada, somando um total de 136 kb. A seqüência compreende 67 genes únicos e dois genes duplicados nas regiões de repetição (Schwyzer e Ackermann, 1996) e codifica pelo menos 73 proteínas, dentre elas 10 a 11 glicoproteínas (Fitzpatrick *et al.*,

1989; Meyer *et al.*, 1991; Liang *et al.*, 1993, Leung-Tack *et al.*, 1994, Tikoo *et al.*, 1995; Vlcek *et al.*, 1995; Schwyzer e Ackermann, 1996).

### 2.1.2 Herpesvírus bovino 5 (BoHV-5)

O *Herpesvírus bovino 5* (BoHV-5) causa a meningoencefalite não supurativa de bovinos que afeta, principalmente, animais jovens entre 2 a 10 meses de idade (Eugster *et al.*, 1974, Bulach e Studdert, 1990; Roizman *et al.*, 1992), com surtos apresentando baixas taxas de morbidade e altas taxas de mortalidade (D'Arce *et al.*, 2002).

O BoHV-5 foi previamente classificado como um subtipo de BoHV-1 (BoHV-1.3) com potencial neuropatogênico específico (Roizman *et al.*, 1992). Apesar de ter sido associado, primariamente, aos casos de encefalite não supurativa de bovinos, o BoHV-5 é um vírus respiratório com potencial para causar doença respiratória em bovinos (Schudel *et al.*, 1986; Ely *et al.*, 1996). Esse agente também já foi isolado do fígado e medula óssea de animais infectados e de vários tecidos de um feto abortado (Schudel *et al.*, 1986). Há também relatos da presença do BoHV-5 no sêmen de touros assintomáticos (D'Arce *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002; Esteves *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2003). Juntos, esses dados sugerem que o BoHV-5 não está restrito apenas à infecção do sistema nervoso central (SNC) e, sim, que ele poderia atuar por outras vias de disseminação. No ano de 2005 no município de Caeté – MG, um rebanho leiteiro apresentou um quadro de doença respiratória aguda. Durante o surto foi observado em torno de 30% de morbidade, atingindo fêmeas primíparas e pluríparas. Co-infecção pelos vírus BoHV-5 e Vírus Respiratório Sincicial Bovino foi detectada em “swab” nasal de três animais do rebanho (Oliveira *et al.*, 2006)<sup>1</sup>.

Os sintomas clínicos observados nessa enfermidade têm início com o aumento da temperatura corporal, dificuldade respiratória, depressão profunda com períodos de excitação, anorexia e fraqueza em geral. Outros sintomas como descargas ocular e/ou nasal e discreto a moderado ptialismo podem ocorrer. Após essa fase inicial, surgem os sintomas neurológicos, caracterizados por cegueira, tremores musculares, inabilidade na apreensão de alimentos ou ingestão de água, marcha para trás ou em círculos, sialorréia, bruxismo, paralisia da língua, nistagmo, deficiência proprioceptiva acentuada, movimentos de propulsão, convulsões, decúbito lateral permanente e, finalmente, morte (Johnston *et al.*, 1962; Hill *et al.*, 1984; Schudel *et al.*, 1986; Riet-Correa *et al.*, 1989).

A distribuição geográfica do BoHV-5 é ainda pouco conhecida. Vários estudos indicam que surtos de meningoencefalite associados ao BoHV-5 têm alta incidência em países da América do Sul, principalmente, Argentina e Brasil, enquanto em países Europeus e da América do Norte, há baixa ocorrência dessa enfermidade. Entretanto, alguns autores discutem que esses dados podem estar sendo mascarados ou pela ampla distribuição do BoHV-1 e/ou pelo uso de vacinação em larga escala contra esse agente. Corroborando com essa hipótese, os surtos dessa doença têm sido verificados, principalmente, em países em que, ou a prevalência do BoHV-1 é relativamente baixa e/ou que não utilizam vacinação em grande escala (Metzler *et al.*, 1986; d'Offay *et al.*, 1995; Ely *et al.*, 1996).

O *Herpesvírus bovino 5* foi primeiro isolado na Austrália (Johnston *et al.*, 1962; Hill *et al.*, 1984) e Argentina (Carillo *et al.*, 1983; Schudel *et al.*, 1986) e mais tarde no Canadá, Hungria, Itália, Estados Unidos, Escócia, Brasil e Uruguai (Bartha *et al.*, 1969; Eugster *et al.*, 1974; Beck, 1975; Watt *et al.*, 1981; Dias *et al.*, 1982; Weiblen *et al.*, 1989). No ano de 2005, esse agente foi demonstrado pela primeira vez na Colômbia, tendo sido o diagnóstico feito por PCR, a partir de material parafinado de SNC de bovinos, no Laboratório de Microrganismos Intracelulares (LABMIC) do

<sup>1</sup> OLIVEIRA, G. D. R. Comunicação pessoal, 2006. (Escola de Veterinária, UFMG).

Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

No Brasil, surtos da doença foram descritos nos estados do Mato Grosso do Sul (Salvador *et al.*, 1997) e Rio Grande do Sul (Weiblen *et al.*, 1989). Isolamentos do patógeno foram realizados no Paraná (Halfen e Vidor, 2000) e Rio de Janeiro, enquanto que em Minas Gerais e Espírito Santo testes de PCR detectaram o vírus em amostras do sistema nervoso central (SNC) e sêmen de touros assintomáticos (Botelho, 2000; Gomes *et al.*, 2002, 2003). Recentemente, detectou-se casos de meningoencefalite causada por BoHV-5 também no Pará, em bovinos de 1 a 2 anos de idade criados extensivamente (Riet-Correa *et al.*, 2006).

O genoma do BoHV-5 possui 138 kb, com 2,518 pares de bases a mais do que o genoma do BoHV-1 e contém um conteúdo de GC de 75%. Como ocorre com o BoHV-1, possui um arranjo de genoma do tipo D, com a região US podendo inverter-se em relação a UL durante a replicação, criando dois isômeros. O genoma do BoHV-5 contém 72 genes, dos quais 68 genes estão presentes como cópias únicas nas regiões UL e US e dois genes estão duplicados e localizam-se especificamente nas regiões de repetição. Todas as janelas abertas de leitura (ORFs) de BoHV-1 estão presentes em BoHV-5, com exceção de um homólogo para UL 0.5 que está ausente neste último. Seu genoma também codifica pelo menos 73 proteínas e, dentre elas, 10 a 11 glicoproteínas (Delhon *et al.*, 2003).

## 2.2 Replicação Viral

Na literatura, as informações mais detalhadas sobre o processo de replicação viral dos herpesvírus referem-se ao protótipo da subfamília *Alphaherpesvirinae*, o *Herpesvírus humano 1*. O padrão geral de replicação para HHV-1 ocorre também para BoHV-1 e BoHV-5. Entretanto, algumas diferenças foram relatadas por Wild *et al.* (1998), indicando uma nova forma de entrada desses vírus nas células hospedeiras.

Para os alphaherpesvírus, a infecção inicia-se por meio de interações específicas entre as proteínas de adesão viral e seus receptores na superfície de células permissivas. O glicosaminoglicano heparan-sulfato (HS) é o principal receptor celular no processo de adesão dos virions às células (Liang *et al.*, 1993; Campadanelli-Fiume *et al.*, 2000; Spear e Longnecker, 2003). Para HHV-1, foi demonstrado que células defectivas na biossíntese desse receptor, mas, capazes de sintetizar condroitina-sulfato, outro glicosaminoglicano, podem ainda ser infectadas (Campadanelli-Fiume *et al.*, 2000). A glicoproteína C (gC) é a principal proteína de adesão viral aos receptores do tipo heparan na superfície das células. A glicoproteína B (gB) também participa desse processo, ligando-se a HS e a receptores do tipo não HS (Li *et al.*, 1995; Campadanelli-Fiume *et al.*, 2000; Spear e Longnecker, 2003).

Após o processo de adesão, a camada externa do envelope viral funde-se à camada externa da membrana plasmática e, em seguida, à camada interna da membrana plasmática e vice-versa. Essa fusão resulta na formação de um entrelaçamento ("crossing") de membranas, com a inserção parcial do envelope viral na membrana plasmática. As glicoproteínas B (gB), D (gD), H (gH) e L (gL) são essenciais para e atuam em conjunto na indução da fusão do envelope viral dos alphaherpesvírus com a membrana celular. Entretanto, estudos mostram que, para disparar essa fusão, os receptores celulares de entrada dos virions na célula precisam ser ativados e o ligante viral para todos os receptores de entrada conhecidos para HHV-1 é a glicoproteína D. Esses requerimentos de entrada da partícula viral na célula aplicam-se não só para HHV-1, mas também para os alphaherpesvírus de animais, incluindo SuHV-1 e BoHV-1 (Spear e Longnecker, 2003).

Nessa etapa, os vírus têm acesso ao citoplasma da célula a partir de uma invaginação que se desenvolve próxima à área de fusão e direciona a partícula viral para o citoplasma. Wild *et al.* (1998) sugerem que esse processo de fusão de

membranas é único para BoHV-1 e BoHV-5 e é seguido pela invaginação e perfuração da membrana plasmática, findando com a entrada da partícula viral envelopada no citoplasma das células.

Estudos anteriores relataram que, para os herpesvírus, após a fusão do envelope viral com a membrana plasmática, ocorre a liberação do nucleocapsídeo e tegumento para o citoplasma e não a entrada da partícula viral completa. Esse padrão foi observado para HHV-1, SuHV-1 e Citomegalovirus (HHV-5 - *Human herpesvirus 5*) (Wild *et al.*, 1998).

Segundo Wild *et al.* (1998), após a entrada dos virions no citoplasma das células, o envelope viral desliga-se rapidamente da membrana plasmática e ocorre o transporte dos vírus envelopados para os poros nucleares. No núcleo, ocorre a transcrição dos genes virais que é regulada temporalmente, em forma de cascata. Proteínas do tegumento, como  $\alpha$ -Tif e VP8, juntamente com proteínas celulares regulatórias, iniciam a transcrição e tradução de genes virais selecionados ou genes imediatamente precoces (genes  $\alpha$ ), dando origem às proteínas imediatamente precoces. As proteínas  $\alpha$  induzem a transcrição e tradução dos genes precoces ou  $\beta$ , e.g, os genes da timidina kinase e da DNA polimerase. As proteínas  $\beta$  estão envolvidas, principalmente, na replicação do genoma e na indução da síntese de proteínas tardias ou  $\delta$ , que formam as proteínas estruturais do virion (Tikoo *et al.*, 1995).

A replicação do genoma e a montagem dos nucleocapsídeos ocorrem no núcleo das células infectadas. O envelopamento se dá por brotamento dos nucleocapsídeos na membrana nuclear, com liberação das partículas virais maduras pela lise das células infectadas ou disseminação pelo contato célula a célula (Tikoo *et al.*, 1995; Fields *et al.*, 2001)

### 2.3 Glicoproteínas Virais

Os envelopes dos alphaherpesvírus, incluindo HHV-1 e HHV-2 (*Herpesvirus*

*humano 2*), SuHV-1, BoHV-1 e BoHV-5, contém um número de glicoproteínas homólogas em sua estrutura e função. As glicoproteínas dos herpesvírus estão envolvidas em vários passos da multiplicação viral. Estas proteínas são responsáveis pela adesão inicial do vírus aos receptores celulares e à subsequente penetração nas células hospedeiras, influenciando, assim, o tropismo celular e tecidual (Baranowski *et al.*, 1996; Schwyzer e Ackermann, 1996; Bryant *et al.*, 2003). Também participam do processo de envelopamento do capsídeo, egresso viral e transmissão da infecção pelo processo de disseminação célula a célula. Devido à sua localização no envelope dos virions e na superfície de células infectadas, são consideradas os principais antígenos reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro (Little *et al.*, 1981; Baranowski *et al.*, 1996; Schwyzer e Ackermann, 1996).

Algumas glicoproteínas dos herpesvírus funcionam como receptores para a fração Fc da imunoglobulina G ou para o fator C3b do complemento, interferindo, dessa forma, com a resposta imune do hospedeiro contra a infecção (Baranowski *et al.*, 1996; Schwyzer e Ackermann, 1996). Recentemente, foi comprovado que homólogos da gG de EHV-1 (*Equid herpesvirus 1* – vírus do aborto equino), EHV-3 (*Equid herpesvirus 3* - vírus do exantema coital de eqüinos), BoHV-1, BoHV-5, RanHV-1 (*Rangiferine herpesvirus 1*), CapHV-1 (*Caprine herpesvirus 1*) e CerHV-1 (*Cervine herpesvirus 1*) têm atividade de ligação à quimiocinas, com inibição de sua atividade biológica (Bryant *et al.*, 2003). Além disso, Favoreel (2006) relatou que algumas glicoproteínas dos alphaherpesvírus, como HHV, SuHV-1 e HHV-3 (*Human herpesvirus 3* - Varicella-zoster vírus), exibem motivos específicos baseados em tirosina que possuem funções importantes durante diferentes aspectos do ciclo viral. Dentre estas se incluem o transporte das proteínas do envelope para os sítios de formação dos virions, supressão do reconhecimento de células infectadas pelo sistema imune e o aumento da disseminação viral entre células.

O processamento das glicoproteínas dos herpesvírus resulta na adição de motivos de carboidratos à cadeia do polipeptídeo que pode ser acompanhada por clivagem, fosforilação, adição de grupos sulfato e acilação de gorduras (Spear, 1985). Várias glicoproteínas também formam associações homo e heterodiméricas que são essenciais para a sua maturação ou que podem atuar como unidades funcionais (Baranowski *et al.*, 1996).

As glicoproteínas de membrana de todos os alphaherpesvírus são divididas em duas classes operacionalmente definidas: aquelas requeridas para a infecção bem sucedida em cultivo de células e aquelas dispensáveis para infecção eficiente das células em cultivo (Knapp *et al.*, 1997). O BoHV-1 codifica as seguintes glicoproteínas: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM e gN (Fitzpatrick *et al.*, 1989; Meyer *et al.*, 1991; Liang *et al.*, 1993; Leung-Tack *et al.*, 1994; Tikoo *et al.*, 1995; Vlcek *et al.*, 1995; Schwyzer e Ackermann, 1996). Dentre elas, gB, gD e gH são consideradas proteínas essenciais, enquanto gC, gG, gE e gI são não essenciais, porém, possuem papel importante na patogênese e disseminação da infecção viral para vários tipos celulares em diferentes tecidos (Baranowski *et al.*, 1996; Schwyzer e Ackermann, 1996; Kaashoek *et al.*, 1998). As glicoproteínas gB, gC e gD são abundantes no envelope viral e na superfície de células infectadas, sendo consideradas os principais imunógenos reconhecidos pelo soro de animais infectados (Marshall *et al.*, 1986). Essas características fazem dessas glicoproteínas importantes candidatas para a vacinação contra BoHV-1 (Gupta *et al.*, 2001). As demais glicoproteínas virais são menos abundantes no envelope dos virions, mas também já têm provado seu potencial para o uso em programas de vacinação contra BoHV-1 (Kaashoek *et al.*, 1998).

### 2.3.1 Glicoproteína C

A glicoproteína C de BoHV-1 e BoHV-5 é uma das principais glicoproteínas virais expressada em altos níveis na superfície de células infectadas e no envelope dos virions (Liang *et al.*, 1992). Embora não seja

considerada essencial para a propagação do vírus *in vitro*, gC é importante para a manutenção da eficiência da replicação do vírus *in vivo* (Liang *et al.*, 1991, 1992). É uma molécula contendo oligossacarídeos N- e O-ligados e é processada em homodímeros (Fitzpatrick *et al.*, 1989). Seu gene encontra-se na região UL do genoma e codifica uma proteína de 521 aminoácidos para BoHV-1 e 486 aminoácidos para BoHV-5 (Delhon *et al.*, 2003). A gC de BoHV-1 é sintetizada como um precursor parcialmente glicosilado de 69 KDa que leva à formação de uma proteína madura de 91KDa (Van Drunen Little-van den Hurk e Babiuk, 1986).

A glicoproteína C dos alphaherpesvírus funciona como a principal proteína de adesão dos vírus às células, ligando-se ao glicosaminoglicano heparan-sulfato, presente na superfície das células (Okazaki *et al.*, 1994; Spear e Longnecker, 2003). Segundo Liman *et al.* (2000), a gC de BoHV-5 e de BoHV-1 diferem em sua habilidade de ligar-se ao heparan-sulfato e os vírus que expressam gC de BoHV-5 apresentam-se muito menos sensíveis ao bloqueio com heparina solúvel. Fitzpatrick *et al.* (1989) mapearam os sítios de ligação a heparan nas regiões de projeção hidrofílica do domínio 4 (resíduos 261-370) da gC de BoHV-1.

A glicoproteína C é imunodominante e representa o principal alvo para a resposta imune, tanto em nível humoral quanto celular (Fitzpatrick *et al.*, 1989, 1990; Denis *et al.*, 1996; Abdelmagid *et al.*, 1998). É capaz de se ligar ao componente C3b da cascata do complemento, interferindo assim com a resposta imune do hospedeiro (Okazaki *et al.*, 1994). A gC de BoHV-1 e seus homólogos em outros alphaherpesvírus pertencem à superfamília de imunoglobulinas (Fitzpatrick *et al.*, 1989). Seu domínio 3 (resíduos 151-260) possui homologia com os domínios variáveis da superfamília de IgG, enquanto o domínio 4 (resíduos 261-370) tem homologia significativa aos antígenos dos domínios constantes do MHC de classe II e, finalmente, o domínio 5 é homólogo aos domínios C2 da superfamília de imunoglobulinas (Fitzpatrick *et al.*, 1989).

A homologia entre as seqüências totais de gC de BoHV-1 e gC de BoHV-5 é 87% em nível de nucleotídeos e 80% em nível de aminoácidos. No terço amino-terminal da molécula essa relação diminui para 45% de homologia entre nucleotídeos (Hecht *et al.*, 1995) e 23,5% de homologia entre aminoácidos (Chowdhury, 1995). Segundo Chowdhury (1995), análises dessa região mostraram que há mais resíduos carregados negativamente nos primeiros 149 aminoácidos de BoHV-1 do que na região correspondente da gC de BoHV-5, que contém mais aminoácidos carregados positivamente. Esse terço amino-terminal da molécula de gC é altamente antigênico e provavelmente imunodominante, pois, a maioria dos epitopos específicos para a gC de BoHV-1 foram mapeados entre os resíduos de aminoácidos 22 ao 150, com proeminente hidrofília e extensas modificações de carboidratos (Fitzpatrick *et al.*, 1989). Chowdhury (1997) identificou dois epitopos específicos para a gC de BoHV-1 nessa região que induzem uma resposta de anticorpos neutralizantes, mediada pelo complemento e sugere que esses epitopos possuem significância biológica, uma vez que eles estão localizados em uma região de significativa diferença entre as seqüências de BoHV-1 e 5 e apresentam antigenicidade e hidrofília proeminentes. Esses achados indicam, portanto, que o terço amino-terminal de gC é de importância diagnóstica e epidemiológica, pois, esta região possibilita diferenciar especificamente o BoHV-1 e o BoHV-5.

### 2.3.2 Glicoproteína G

A glicoproteína G é uma proteína encontrada no envelope viral e, em alguns vírus, é também secretada após processamento proteolítico (Bryant *et al.*, 2003). Esta proteína é codificada pela ORF4 (*Open Reading Frame* – Janela Aberta de Leitura 4) situada na região US (*Unique Short* – Única Curta) do genoma viral de BoHV-1 e BoHV-5 (Delhon *et al.*, 2003), e genes homólogos já foram identificados para a maioria dos alphaherpesvírus (Nakamichi *et al.*, 2000).

A glicoproteína G de BoHV-1 e BoHV-5, como para outros alphaherpesvírus, é secretada, após processamento proteolítico, no sobrenadante de células infectadas como uma glicoproteína de 65 KDa. É também secretada como um glicoproteoglicano com padrão difuso de migração em SDS-PAGE, de 90 a 240 KDa, característica única para gG de herpesvirus bovinos (Keil *et al.*, 1996).

A ORF US4 de BoHV-1 e BoHV-5 codifica uma proteína com 433 e 430 aa, respectivamente, com pesos moleculares de 46,713 KDa para BoHV-1 e 46,354 KDa para BoHV-5. Suas seqüências de aminoácidos exibem 75% de identidade e 85% de homologia, sendo que as regiões de maior homologia estão localizadas em domínios com importância estrutural, tais como, a suposta seqüência sinal e a seqüência âncora transmembrana, além dos sítios de N-glicosilação (Engelhardt e Keil, 1996). Keil *et al.* (1996) em estudo comparativo entre as seqüências de aminoácidos das gG's de herpesvirus bovinos com as gGs de HHV-2, EHV-1, EHV-4 (*Equid herpesvirus 4* – Vírus da Rhinopneumonite eqüina) e SuHV-1, mostraram que a maior homologia é observada nas metades amino-terminal das respectivas glicoproteínas, com uma notável conservação das posições que compreendem os resíduos de cisteína.

O papel preciso da gG dos alphaherpesvírus no ciclo replicativo viral ainda não é bem compreendido (Nakamichi *et al.*, 2000; Nakamichi *et al.*, 2002; Bryant *et al.*, 2003). Como para HHV-1 e SuHV-1, a gG de BoHV-1 não é essencial para o crescimento viral em cultivo de células. Nakamichi *et al.* (2000) demonstraram que a gG de BoHV-1 também não é requerida para os passos de adesão e penetração viral em células MDBK, mas está envolvida na disseminação da infecção célula-célula, prejudicando o crescimento viral quando ausente, como demonstrado em ensaios de tamanho de placa e na verificação do número de ciclos de replicação dos mutantes BoHV-1/gG. Além disso, para a disseminação célula a célula, os virions utilizam a gE ou o complexo gE/gI,



juntamente com a gG. Nesse caso, a gG atua na manutenção da adesão juncional célula a célula e precisa estar presente para gE ou o complexo gE/gI co-localizarem-se com as moléculas de junção aderente, permitindo, assim, a disseminação viral célula-célula de modo eficiente (Nakamichi *et al.*, 2002). Esses mesmos autores relataram que há indução de apoptose em células RK13 infectadas com um mutante BoHV-1/gG<sup>-</sup>, indicando que gG é requerida para a prevenção da apoptose nessas células (Nakamichi *et al.*, 2001). Ainda, Bryant *et al.* (2003) relataram que as formas secretadas das gGs codificadas por vários alfa herpesvírus possuem atividade de ligação a quimiocinas e inibem sua atividade biológica *in vitro*, sugerindo uma nova estratégia para a modulação da resposta imune do hospedeiro. Em um estudo feito por Kaashoek *et al.* (1998), a deleção do gene que codifica a gG de BoHV-1 causou atenuação viral, mas os vírus mutantes apresentaram-se mais imunogênicos. Bryant *et al.* (2003) correlacionam esse fenótipo observado *in vivo* com a ausência da atividade de ligação a quimiocinas exibida pelo mutante gG<sup>-</sup>.

Outras glicoproteínas também estão envolvidas em vários passos do ciclo replicativo viral. A gH é uma glicoproteína essencial para a entrada dos virions dos alfa herpesvírus nas células infectadas (Peeters *et al.*, 1992; van Drunen Little-van den Hurk *et al.*, 1996; Schröder e Keil, 1999). A gH forma um complexo com gL que é essencial para o processamento e transporte adequados de ambas glicoproteínas (Baranowski *et al.*, 1996). A glicoproteína E também forma um complexo com a glicoproteína I, requerido para a disseminação célula a célula (Baranowski *et al.*, 1996; Kaashoek *et al.*, 1998) e que está envolvido na neuroinvasividade e neurovirulência de alguns alfa herpesvírus como HHV-1, SuHV-1 e BoHV-5 (Baranowski *et al.*, 1996; Chowdhury *et al.*, 2000). Por reduzirem a gravidade da doença, excreção viral e circulação do vírus na população bovina, as vacinas deletadas em gE são empregadas no mercado internacional para auxiliar no controle e erradicação das infecções pelo BoHV-1 (van

Oirschot *et al.*, 1996). As demais glicoproteínas, como a gK, gM e gN, possuem funções desconhecidas para BoHV-1 e BoHV-5, com poucos papéis atribuídos para seus homólogos em HHV-1 e SuHV-1 (Hutchinson e Johnson, 1995; Mettenleiter, 2002).

## 2.4 Métodos de Diagnóstico

O controle bem sucedido das infecções pelo BoHV-1 baseia-se em métodos de diagnóstico eficientes, específicos e sensíveis. Entretanto, esta eficiência torna-se comprometida pela ocorrência de reações cruzadas nos ensaios de ELISA e soroneutralização viral entre o BoHV-1 e o BoHV-5, além de outros alfa herpesvírus de ruminantes, estreitamente relacionados. Assim, as principais técnicas sorológicas disponíveis são incapazes de distinguir entre esses dois vírus (Keuser *et al.*, 2004; Kunrath *et al.*, 2004; Oldoni *et al.*, 2004).

Os métodos baseados no isolamento viral, seguidos de análise com anticorpos monoclonais ou detecção do DNA viral, poderiam evitar o problema da reatividade cruzada, mas são procedimentos trabalhosos, demorados e caros para uso de rotina em laboratórios de diagnóstico (Keuser *et al.*, 2004).

A diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 por ácidos nucleicos baseia-se principalmente na utilização de mapeamento por técnicas de restrição enzimática (D'Arce *et al.*, 2002) ou, por PCR seguida de restrição enzimática. Alguns métodos baseados na amplificação do DNA viral já foram descritos e se mostraram eficientes para discriminação entre o BoHV-1 e BoHV-5 (Alegre *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2003; Claus *et al.*, 2005) e outros alfa herpesvírus relacionados (Engels e Ackermann, 1996; Ros e Belák, 1999, 2002), mas sua aplicação para triagem de rebanhos os torna economicamente inviáveis.

Assim como para testes sorológicos, a glicoproteína C e sua região codificadora têm sido amplamente utilizadas para o desenvolvimento de ensaios com ácidos

nucléicos (Ashbaugh *et al.*, 1997). Esta é das regiões pontuais do genoma onde se agrupa parte da pequena diferença entre os dois vírus.

Em 2000, Botelho padronizou um sistema de PCR *nested* com base na região codificadora da gG (outra região que concentra parte das diferenças entre os dois vírus, apresentando algumas regiões de deleção de até 6 a 12 bases). Na padronização do teste foram utilizadas as amostras EVI-88 (isolado brasileiro) e A663 (isolado argentino); o autor avaliou, ainda, a especificidade do ensaio com o uso de herpesvírus humanos e animais. Esse sistema de PCR *nested* apresentou-se como uma alternativa rápida, sensível e específica para a detecção do BoHV-5 em amostras clínicas.

Todos estes testes são ainda inadequados para a utilização em programas de controle e erradicação, que necessitam prioritariamente de testes sorológicos rápidos e com alto desempenho. A ampla distribuição da infecção e vacinação do BoHV-1, associados à dificuldade de diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5 dificultam o estudo da real prevalência e distribuição geográfica da infecção pelo BoHV-5 em bovinos. Muitas tentativas têm sido feitas no sentido da padronização de novos testes sorológicos, porém, até mesmo a caracterização de monoclonais que diferencie os dois vírus não tem se mostrado uma tarefa fácil. Oldoni e colaboradores (2004) produziram e caracterizaram onze anticorpos monoclonais contra o isolado brasileiro de BoHV-5/SV-507 (única amostra de BoHV-5 completamente seqüenciada até o momento). Destes, somente dois (18,2%) foram capazes de diferenciar o BoHV-1 do BoHV-5. Os testes relatados até o momento mostram reação cruzada entre estes dois agentes virais, gerando diagnósticos imprecisos que dificultam, inclusive a testagem de novas vacinas que também incluem antígenos de BoHV-5.

Somente um ensaio de ELISA de bloqueio utilizando a glicoproteína E como antígeno foi capaz, até o momento, de diferenciar

sorologicamente, o *Herpesvírus bovino 1* do *Herpesvírus bovino 5*. Neste estudo, porém, foram utilizadas poucas amostras de soros, as quais eram provenientes de animais infectados experimentalmente e uma amostra única de BoHV-5 – N569 como antígeno viral (Wellenberg *et al.*, 2001).

Teixeira e colaboradores (2001) relataram um ELISA de bloqueio monoclonal onde foram testadas 266 amostras de soro bovino previamente testados em ensaio de soroneutralização. O teste foi desenvolvido com antígeno de BoHV-1 (amostra LA) e, mesmo utilizando anticorpos monoclonais na revelação, os autores descrevem reatividade cruzada para animais infectados com BoHV-5.

A tecnologia do DNA recombinante já tem demonstrado sua importância na avaliação de respostas imunes contra diversos agentes virais. Vários estudos têm sido conduzidos com as glicoproteínas do envelope viral dos herpesvírus bovinos 1 e 5 e sua expressão em vetores procariotos e eucariotos, comprovando a eficácia desse método para fins de diagnóstico sorológico diferencial, no reconhecimento de importantes regiões antigênicas, na produção de vacinas de subunidades e vacinas marcadoras (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1992; Chowdhury, 1995; Abdelmagid *et al.*, 1998; Rijsewijk *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2001; Okazaki *et al.*, 2006).

Alternativamente, têm sido desenvolvidos testes de triagem baseados em peptídeos desenvolvidos a partir de bibliotecas de fagos (apresentação antigênica em superfície de fagos filamentosos – “phage display technology”). Desde 1970, os bacteriófagos têm sido amplamente utilizados para ensaios de clonagem e seqüenciamento de fragmentos de DNA. O grande salto dessa nova técnica foi dado por Smith, em meados de 1980, que converteu essas partículas virais em “bibliotecas” de informação genética (Smothers *et al.*, 2002), onde cada fago dentro dessa “biblioteca” irá expressar um peptídeo ou proteína diferentes, ligados fisicamente a uma de suas proteínas de

superfície, mais comumente, a pIII ou a pVIII. Lehmann e colaboradores (2004) produziram peptídeos sintéticos com base em biblioteca de fagos e na gE de BoHV-1. Os “mimotopos” triados mostraram identidade com a região rica em prolinas encontrada na gE e foram utilizados com sucesso em sistema de ELISA.

Anteriormente, Chowdhury (1997) já havia mostrado a importância de ensaios baseados em peptídeos. Este autor utilizou anticorpos monoclonais para mapear a gC de BoHV-1, tendo especificamente localizado epitopos que reagiram com anticorpos monoclonais neutralizantes, testados com sucesso em ELISA competitivo. Durante estes ensaios, foi descoberta uma importante região antigênica da gC, que estende-se do aminoácido 47 ao 119.

#### **2.4.1 Programas de Controle e Erradicação**

Os programas de controle e erradicação do BoHV-1 têm utilizado vacinas com deleção da gE e testes sorológicos para diferenciar a resposta de vacinação versus infecção. Embora a vacinação venha mostrando sucesso na indução de resposta, Lehmann et al. (2004) discutem que os ensaios de ELISA utilizados para estas campanhas são testes de bloqueio, utilizando anticorpos monoclonais e, usualmente a fonte de antígeno é o lisado viral cru (extrato de glicoproteínas do envelope viral). Segundo os autores, mesmo utilizando monoclonais, a especificidade é baixa, já tendo sido provada que não está relacionada à reatividade cruzada com outros patógenos e sim, é inerente à baixa performance dos testes. Esta ausência de uma ferramenta adequada poderia prejudicar a manutenção destes programas.

Muito tem sido discutido sobre a proteção das vacinas de BoHV-1 para as prováveis infecções por BoHV-5. Ultimamente esta proteção tem sido questionada. Segundo Vogel e colaboradores (2002) há proteção cruzada entre os vírus, mas não suficiente para proteger os animais vacinados da doença neurológica causada pelo BoHV-5.

Apesar da similaridade antigênica e reatividade sorológica cruzada entre estes vírus, uma solução para os programas de controle do BoHV-1 e BoHV-5 poderia ser a inclusão de antígenos do BoHV-5 em vacinas contra BoHV-1 a serem utilizadas em regiões onde os dois vírus circulam, visando a ampliação do grau e espectro da resposta imunológica contra esse vírus.

Analisando a capacidade da vacina deletada em gE de BoHV-1 em proteger bovinos da infecção com BoHV-5, pesquisadores concluíram que a vacina recombinante de BoHV-1 não foi capaz de conferir total proteção no desafio com o BoHV-5 (Spilki *et al.*, 2004b; Silva *et al.*, 2006), corroborando os dados discutidos acima. Novas vacinas com inclusão dos dois antígenos virais devem ser desenvolvidas, bem como testes mais específicos e sensíveis que possam mensurar a resposta específica para cada um deles.

Alguns países europeus já conseguiram ou encontram-se em vias de erradicar esse agente de seus rebanhos (Karhs, 2001, Teixeira *et al.*, 2001; Ackermann e Engels, 2005; van Drunen Littel-van den Hurk, 2005). Um ponto que deve ser sempre destacado nos programas de controle é que os herpesvírus, não importando a extensa resposta do hospedeiro à infecção, infectam permanentemente os hospedeiros estabelecendo latência, que é reativada a intervalos mais ou menos regulares.

Ackermann e Engels (2005) discutem o programa europeu de erradicação. Estes pesquisadores discutem as razões para se implantar e manter ou não um programa de erradicação para o BoHV-1. Apontam, por exemplo, a necessidade constante de vigilância e detecção de portadores saudáveis, os grandes custos e riscos e a qualidade insatisfatória de todas as ferramentas diagnósticas disponíveis. Não somente mostram a necessidade de melhores vacinas e testes diagnósticos, como também a necessidade de caracterização dos isolados mundiais circulantes, com ações cooperativas entre os países.

## 2.5 Produção de Proteínas Recombinantes em *Escherichia coli*

A produção de proteínas recombinantes, mais especificamente de glicoproteínas do BoHV-1 e 5 com potencial antigênico pode ser realizada em ambos os sistemas, procaríoto e eucarioto. A produção e a atividade biológica de proteínas recombinantes variam grandemente e dependem de uma série de fatores (como a estabilidade protéica, solubilidade, tamanho, modificações pós-traducionais e etc.) que diferem entre os sistemas de expressão. Em geral, a imunogenicidade e antigenicidade de polipeptídeos recombinantes são menos dependentes do hospedeiro e do sistema de expressão e por esta razão, a grande variedade de vetores de expressão disponíveis para uso em *Escherichia coli* tem feito deste sistema a escolha mais usual para produção de proteínas recombinantes com propósitos imunológicos (Williams *et al.*, 1995).

Muitas glicoproteínas expressas em *E. coli*, como por exemplo, a interleucina 5, são secretadas formando corpos de inclusão e devem ser purificadas de forma desnaturante. Protocolos de renaturação têm recuperado satisfatoriamente a conformação protéica e estudos posteriores de cristalografia de raios-X reforçam que a integridade estrutural e conformacional da proteína não são alteradas pela ausência da glicosilação. Algumas estratégias são utilizadas para se obter uma maior estabilidade da proteína recombinante. Uma delas é a construção de proteínas de fusão que consistem em proteínas de interesse com extensões N-terminal ou C-terminal de domínios protéicos conhecidos ou seqüências peptídicas curtas. Dentre as vantagens tem-se a manutenção da solubilidade de proteínas que são normalmente expressas na forma insolúvel. Além disso, a fusão pode proporcionar afinidade em sistemas de purificação e pode ser útil em carrear peptídeos pequenos que são normalmente degradados proteoliticamente (Wingfield, 1995).

## 2.6 Peptídeos sintéticos

Devido às propriedades vantajosas das moléculas sintéticas comparadas às moléculas biológicas, estas últimas vem sendo progressivamente substituídas pelas primeiras, usualmente peptídeos sintéticos ou moléculas relacionadas (Meloan *et al.*, 2003). Os peptídeos sintéticos deram acesso a um novo campo e a novas perspectivas para o diagnóstico de inúmeras doenças que afetam homens e animais. Ao contrário dos extratos crus ou purificados de antígenos usados para a detecção de anticorpos nos testes sorológicos, como o ELISA, os peptídeos representam uma fonte de epitopos e moléculas puras. Seu potencial para o imunodiagnóstico já foi demonstrado para doenças parasitárias como a malária, doença de Chagas, leishmaniose, cisticercose (Noya *et al.*, 2003); doenças bacterianas como a tuberculose bovina e humana (Vordermeier *et al.*, 2001) e herpesvíroses bovinas (Chowdhury, 1997), além de servir para o diagnóstico entre animais vacinados versus infectados (Vordermeier *et al.*, 2001). Essa estratégia é mais barata, simples, útil para teste em larga escala e, na maioria dos casos, específica e sensível (Vordermeier *et al.*, 2001; Noya *et al.*, 2003).

Especificamente para os herpesvírus, Lehmann e colaboradores (2004) relatam que a idéia de se trabalhar com mimotopos se estabeleceu quando os programas de erradicação de BoHV-1 se iniciaram e não houve sucesso em produzir a recombinante gE. Estes autores trabalharam com a produção de vários peptídeos baseados em gE e ricos em prolina para uso diretamente em sistemas de ELISA. Os autores discutem que a avaliação de peptídeos em diferentes sistemas tem sido realizado por alguns grupos, mas, somente utilizando anticorpos monoclonais e em condições laboratoriais, não tendo sido testadas amostras de campo. Os autores pontuam que especial cuidado deve ser tomado na análise e extrapolação destes dados, uma vez que o sistema imune de bovinos é bem diferente do sistema imune de camundongos e pode reconhecer outros motivos antigênicos, especialmente levando-se em consideração

soros de animais de campo, os quais têm uma exposição contínua a um grande número de antígenos.

## 2.7 Biomateriais

Há décadas, os polímeros sintéticos desempenham papel importante na terapia médica, com aplicação em áreas, tais como: implantes e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, odontologia, reparo de ossos, cicatrização de feridas e sistemas de liberação de drogas (Wang *et al.*, 2004). A primeira geração de biomateriais sistematicamente aplicados foi desenvolvida após 1940 e seu sucesso baseava-se no conceito de biocompatibilidade (Park, 1995).

Recentemente, os hidrogéis, já amplamente utilizados, e uma nova classe de materiais denominados híbridos orgânico-inorgânicos passaram a fazer parte da ciência contemporânea dos materiais devido à sua potencial aplicação nas áreas biomédica e farmacêutica (Mansur *et al.*, 2000; Kickelbick, 2003; Yano *et al.*, 2003; Matejka *et al.*, 2004). Esses materiais apresentam propriedades que os compósitos tradicionais e os materiais convencionais não possuem (Mansur *et al.*, 2004).

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais, hidrofílicas capazes de absorver e reter diferentes quantidades de água ou fluidos biológicos. Assemelham-se aos tecidos vivos em suas propriedades físicas devido ao seu alto conteúdo de água e maleabilidade, que também contribuem para sua biocompatibilidade. Os hidrogéis mais comumente usados em aplicações biomédicas e farmacêuticas são o álcool poli-vinílico (PVA) e o poli-etilenoglicol (PEG) (Sahlin e Peppas, 1997; Roberts *et al.*, 2002)

Os híbridos combinam características de substâncias orgânicas e inorgânicas que podem ser misturadas em, virtualmente, qualquer razão, chegando a escalas nanométricas. Eles são também chamados de silicatos modificados organicamente ("Ceramers" e "Ormosils") ou cerâmicas modificadas organicamente ("Ormocers") (Mansur *et al.*, 2000). Estes biocompósitos

são preparados pelo processo sol-gel onde a formação do material inicia-se pela hidrólise parcial ou completa de um precursor apropriado para formar um sol aquoso. O precursor poderia ser representado por tetraalkoxysilanes, mono-, di- ou tri-alkyl alkoxy silanes ou por grupos funcionais como amino, carboxila, tiol, mercapto, glicidil, entre outros. Após hidrólise, o sol poderia ser usado imediatamente ou estocado por semanas para permitir a evolução continuada das partículas do sol. Durante esse período, reações de hidrólise e condensação ocorrem, o que resulta em uma ampla série de poli-silicatos lineares, ramificados e coloidais. A adição de agentes reticuladores ao precursor hidrolisado promove uma reação de polimerização em grande escala, resultando na gelação do sol. A fabricação dos materiais derivados desse processo pode ser planejada de modo a controlar algumas de suas características físicas e químicas. Assim, eles podem ser rígidos, semi-rígidos ou flexíveis, com propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas balanceadas, tamanhos de poros amplamente ajustáveis e com algum controle sobre suas propriedades óticas e eletroquímicas (Jin e Brennan, 2002).

As matrizes híbridas têm sido desenvolvidas como suportes para a imobilização de proteínas com o intuito de melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico, além de oferecer diversas alternativas de superfícies modificadas especificamente. A grande variação na composição desses biocompósitos pode ser utilizada para a captura de um grande número de diferentes moléculas. Esta versatilidade não é encontrada em outros métodos de imobilização e favorece o controle de ambos: biomolécula e comportamento do material imobilizante, maximizando as análises dos compostos fixados à matriz.

Vários estudos já demonstraram que uma gama de espécies biológicas, como enzimas, anticorpos, proteínas regulatórias, ácidos nucleicos e até células inteiras foram imobilizadas em diversos tipos de materiais compósitos derivados do processo sol-gel,

com retenção de sua atividade biológica (Avnir et al., 1994; Livage, 1996; Hench, 1997; Gill e Ballesteros, 2000). As principais vantagens dos nanocompósitos para o processo de bioimobilização são sua possível transparência ótica, tornando-os ideais para o desenvolvimento de sensores químicos e bioquímicos; diversas modificações químicas podem ser feitas durante o processo de sua formação, resultando em materiais eletricamente condutores; eles podem ter tamanho e distribuição de poros ajustáveis, o que permite que pequenas moléculas e íons se difundam pela matriz enquanto grandes biomoléculas permanecem presas nos poros. Ainda, os biomateriais possuem facilidade de fabricação e manipulação, possibilitam a adsorção de uma maior quantidade de proteína, melhorando os limites de detecção e apresentam boa capacidade de retenção tanto nas fases iniciais de ligação, quanto após longo tempo de estocagem, levando, em alguns casos, a um aumento da estabilidade de biomoléculas lábeis (Jin e Brennan, 2002). Todas estas características fazem destes biocompósitos materiais extremamente atraentes para o desenvolvimento de métodos imunológicos, como por exemplo, os ensaios de ELISA (Eckert et al., 2000).

## 2.8 Suportes Sólidos Comerciais

A alta eficiência apresentada pelas macromoléculas biológicas na seleção de diferentes espécies químicas tem motivado o desenvolvimento de dispositivos que promovem a interação de materiais sintéticos com moléculas biológicas (Mansur et al., 2000). As proteínas possuem configurações de cadeias e conformação que promovem altos níveis de especificidade durante estas interações químicas. Quando se considera a capacidade de adsorção das biomoléculas às superfícies plásticas, levam-se ainda em consideração a quantidade total das mesmas que se liga à superfície do material e a quantidade que se liga e ainda permanece biologicamente ativa. Estas concentrações são dependentes tanto da natureza das moléculas quanto do caráter da superfície encontrado na fase sólida, um

elemento crítico do teste de ELISA (Shekarchi et al., 1984; Wheeler et al., 1988).

As forças de interação entre biomolécula e fase sólida podem ser hidrofílicas (ligadas por pontes de hidrogênio) ou hidrofóbicas (mediadas por polaridades alternantes). Nos ensaios de ELISA, realizados em meio aquoso, moléculas hidrofílicas irão interagir prontamente com a água por fortes pontes de hidrogênio, enquanto moléculas hidrofóbicas necessitam estar mais próximas e por mais tempo em contato com as superfícies ligantes para estabelecer as pontes hidrofóbicas ou de polaridades alternantes. Então, conhecendo-se a natureza das biomoléculas é feita a escolha do suporte sólido e suas modificações, além do tempo e temperatura de incubação, concentração dos reagentes e pH dos agentes tamponantes. No caso de moléculas muito pequenas, como os peptídeos (especialmente os de tamanho menor que 10 aminoácidos), são requeridas fortes pontes químicas para melhorar a eficiência de ligação e apresentação da biomolécula. Para moléculas de caráter mais hidrofóbico, como os antígenos virais totais, por exemplo, as superfícies mais adequadas para a ligação são as de caráter apolar (Esser, 1988).

Estão disponibilizadas no mercado mundial, diferentes microplacas para ensaios de ELISA. Os componentes químicos mais utilizados para a confecção destas microplacas são o poliestireno (PS) e o cloreto de polivinila (PVC) que podem ser modificados física ou quimicamente para a ligação dos mais diversos compostos: lípides, lipoproteínas, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, poliglicanos, dentre outros. Estas ligações baseiam-se na polaridade das moléculas, principalmente em seu caráter hidrofílico ou hidrofóbico.

O poliestireno é uma longa cadeia de carbonos com anéis de benzeno distribuídos por toda a molécula, ligados a cada átomo de carbono. Possui caráter hidrofóbico e mantém essa hidrofobicidade quando moldado em microplacas de 96 poços. O poliestireno pode ser facilmente

modificado por radiação e agentes químicos que alteram a estrutura química de sua superfície. Assim, uma variedade de grupos reativos como grupos amina e carboxila podem ser adicionados à sua superfície para subseqüente imobilização de biomoléculas (Gibbs, 2001).

O cloreto de vinila (VC) foi descoberto em 1835, mas, somente em 1872 foi relatada a polimerização deste monômero, que resultou no produto conhecido como cloreto de polivinila (PVC). Desde então, a tecnologia de polimerização do VC tem progredido significativamente, principalmente, na Alemanha e Estados Unidos da América. A produção comercial do PVC teve início em princípios de 1930, na Alemanha, mas ocorriam grandes problemas durante o processamento e polimerização do monômero. Somente em 1932, foi dado o primeiro passo para solucionar os problemas relativos ao processamento e estabilidade térmica do PVC. Nesta mesma época, foram descobertas outras substâncias, como o tricresil fosfato ou dibutil ftalato (hoje conhecidos como plastificantes) que tornaram o PVC mais macio, flexível e com maior facilidade de processamento (Endo, 2002; Rodolfo Jr. *et al.*, 2002).

O PVC é o segundo termoplástico mais consumido em todo o mundo, com uma demanda mundial superior a 27 milhões de toneladas só no ano de 2001. É também um dos plásticos mais versáteis devido à superioridade de suas propriedades físicas e mecânicas (Endo, 2002; Rodolfo Jr. *et al.*, 2002). Entretanto, sua plasticidade e estabilidade térmica são inferiores àquelas encontradas em outros plásticos, tais como o polietileno e o poliestireno (Endo, 2002). O alto teor de cloro presente em sua estrutura

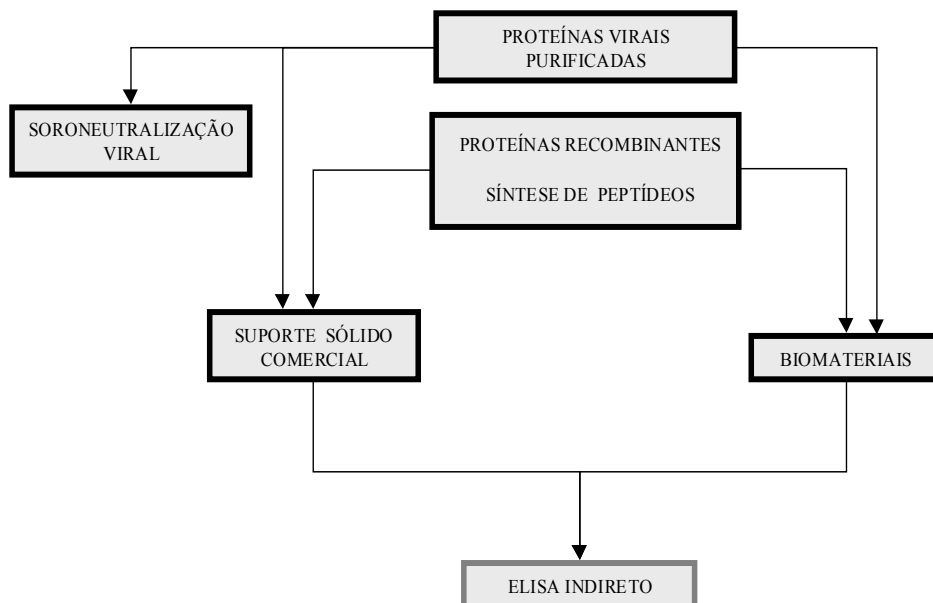
molecular torna o PVC um polímero polar, o que aumenta sua afinidade e permite sua mistura com uma gama de aditivos, possibilitando o preparo de materiais com propriedades e características adequadas nas mais diversas aplicações (Rodolfo Jr. *et al.*, 2002).

Sua aplicação comercial vai desde tubos e perfis rígidos para uso na construção civil até brinquedos e laminados flexíveis para acondicionamento de sangue e plasma (Rodolfo Jr. *et al.*, 2002). Outros usos para esse polímero incluem a fabricação dos discos de vinil, encanamentos, oleodutos, cabos elétricos, vestimentas, estofamentos, pisos, tetos, entre outros.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Etapas Experimentais**

Para cumprir as metas propostas neste trabalho foram seguidas várias linhas de pesquisa que são apresentadas no fluxograma a seguir. A seqüência de passos para produção e purificação das partículas virais e soroneutralização viral foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG. As etapas relativas à expressão e purificação das proteínas recombinantes, desenho dos peptídeos e padronização do ELISA Indireto foram feitas no Laboratório de Microrganismos Intracelulares (LABMIC) do Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG e a síntese e caracterização dos biomateriais foi feita no Laboratório de Laboratório de Análise e Caracterização de Superfícies e Materiais, Departamento de Metalurgia e Engenharia dos Materiais, Escola de Engenharia, UFMG.



### 3.2 Células e Vírus

As células de linhagem contínua de rim bovino, MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney, ATCC CCL22) foram utilizadas em todos os procedimentos de multiplicação e quantificação viral, produção de antígenos e soroneutralização viral. As amostras virais utilizadas foram BoHV-1.1 (amostra Colorado 1, ATCC VR 864) na 9ª passagem ( $10^{5,67}$  Dose Infectante em Cultivo de Células -  $DICC_{50}/50\mu l$ ) e BoHV-5 (amostra EVI-88, isolado brasileiro)<sup>2</sup> na 15ª passagem ( $10^{6,8}$   $DICC_{50}/50\mu l$ ).

#### 3.2.1 Produção e Purificação das Proteínas Virais

Células MDBK foram semeadas em garrafas rolantes de  $1700\text{ cm}^2$ <sup>3</sup> contendo meio de cultivo MEM-Eagle<sup>4</sup>, suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB)<sup>5</sup> e antibióticos (2U/ml de Penicilina,  $2\mu g/ml$  de Estreptomicina,  $10\mu g/ml$  de Fungizona). As células foram mantidas em incubadora de

$CO_2$  a  $37^\circ C$ , em tambor rolante, até atingirem confluência de 70 a 80%, quando foram inoculadas com as amostras virais na multiplicidade de infecção (m.o.i) de 0,1.

Após efeito citopático (ECP) de 90 a 100%, as garrafas foram congeladas e descongeladas três vezes e os vírus foram purificados em colchão de sacarose (Metzler *et al.*, 1986). Brevemente, a suspensão de vírus e células foi centrifugada a 4.000 rpm ( $3000 \times g$ )<sup>6</sup> por 20 minutos a  $4^\circ C$  para a retirada dos debris celulares. O sobrenadante foi transferido para tubos de 250 ml e centrifugado a 8.000 rpm ( $23.600 \times g$ )<sup>7</sup> por 5h a  $4^\circ C$  para concentrar as partículas virais.

Os sedimentos virais foram ressuspensos em 4 ml do sobrenadante resultante da segunda centrifugação e foram transferidos para tubos de ultracentrifuga, onde foram adicionados, vagarosamente, 5 ml de sacarose a 30% em TNE (Tris 5 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1mM). TNE foi adicionado para um volume final de 20 ml. Esses tubos foram centrifugados a 26.000 rpm ( $98.200 \times g$ )<sup>8</sup> por 2h a  $4^\circ C$ . Os sedimentos foram

<sup>2</sup> Gentilmente cedido pelo Dr. Paulo Roehle, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Brasil.

<sup>3</sup> CORNING

<sup>4</sup> SIGMA

<sup>5</sup> GIBCO

<sup>6</sup> Centrífuga Jouan BR4i, rotor S40

<sup>7</sup> Centrífuga Sorvall RC2-B, rotor GS-3

<sup>8</sup> Ultracentrifuga Sorvall Ultra Pro™ 80, rotor AH-629



recolhidos e um passo de lavagem final foi feito com TNE. Nova ultracentrifugação foi feita a 20.000 rpm (58.100 x g)<sup>7</sup> por 1h a 4°C. Os sedimentos finais foram ressuspendidos em 1 ml de TNE. As partículas virais purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford (Ausubel *et al.*, 1995). Como o material, após ressusensão, apresentou-se bastante granuloso (devido ao acúmulo de agregados virais), foi feita a sonicação das partículas virais com três pulsos de 10 segundos e potência entre 30 e 40 W<sup>9</sup>, com intervalo de 2 minutos entre os pulsos. Foram feitos três novos pulsos com os parâmetros anteriores e intervalo de 30 segundos entre os pulsos. Os vírus purificados foram mantidos a -70°C até o uso. Um antígeno celular (MDBK) foi purificado seguindo o mesmo protocolo, para ser utilizado como controle.

### 3.2.2 SDS-PAGE das Amostras Virais Purificadas

Para verificar o perfil protéico e a integridade das amostras virais foram feitos dois géis de poliacrilamida em condições desnaturantes, com coloração pela prata (0,2M) e azul de Comassie (0,1%) (Ausubel *et al.*, 1995). O padrão de peso molecular utilizado foi o Bench-Mark<sup>TM</sup> protein ladder (10 – 220 KDa)<sup>10</sup>. O antígeno celular purificado foi adicionado como controle.

### 3.2.3 Verificação da Especificidade dos Vírus Purificados

#### 3.2.3.1 Ensaio de Dot

Os vírus purificados foram testados em imunoensaio enzimático (Bio-Dot) com os sobrenadantes de hibridoma<sup>11</sup> Mab 2915 (anti-gC de BoHV-5), Mab 147 (anti-gC de BoHV-1) e Mab 1240 (anti-gB de BoHV-1 e 5) e soros policlonais mono-específicos provenientes de bovinos experimentalmente

infectados<sup>12</sup> anti-BoHV-1 (Pab1) e anti-BoHV-5 (Baia 3 e Dálmata). Como anticorpos secundários foram utilizados um anti-IgG de camundongo<sup>13</sup> e um anti-IgG de bovino marcados com peroxidase<sup>14</sup>. Como substrato foi utilizado o DAB (3,3 - Diaminobenzidina)<sup>15</sup>. Brevemente, o aparelho de Bio-Dot foi montado com membrana de nitrocelulose<sup>16</sup> e 200µl/pocinho dos antígenos diluídos em tampão Tris/Salina (TBS) pH 7,5 (Tris-HCl 20 mM e NaCl 500 mM) foram adsorvidos à membrana e filtrados por gravidade à temperatura ambiente. Foram adicionados 200µl/pocinho da solução de bloqueio (BSA a 1% em TBS) e a filtração ocorreu por gravidade, à temperatura ambiente. Após, foram feitas duas lavagens com 400µl/pocinho de TBS-Tween 20 0,05% (TTBS), usando vácuo. O anticorpo secundário foi, então, adicionado com 100µl/pocinho e passou pela membrana por filtração passiva, à temperatura ambiente. Foram feitas mais duas lavagens. A membrana foi retirada do aparelho e transferida para cuba plástica, onde foi lavada por duas vezes com TBS para retirar o excesso de Tween 20. A revelação foi feita com o substrato 3,3 - diaminobenzidina (DAB) e ocorreu em, aproximadamente, 5 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionada H<sub>2</sub>O bi-destilada para parar a reação.

### 3.3 Soroneutralização Viral

#### 3.3.1. Soroteca

Os soros de animais de campo utilizados nos ensaios de soroneutralização viral e em todos os ELISAs subsequentes foram obtidos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os soros foram divididos em quatro sorotecas denominadas A, B, C e D (Tabela 1), com um total de 157 soros.

<sup>9</sup> 50 Sonic Dismembrator, Fisher

<sup>10</sup> INVITROGEN

<sup>11</sup> Gentilmente cedidos pela Dr<sup>a</sup> M. Engels, Universität Zürich, Vetsuisse-Fakultät, Virologisches Institut, Switzerland.

<sup>12</sup> Gentilmente cedidos pelo Dr. Paulo Roehe, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Brasil.

<sup>13</sup> A-9044, SIGMA

<sup>14</sup> A-5295, SIGMA

<sup>15</sup> DAKO

<sup>16</sup> Nitrocellulose Membrane, 0,45 µm pore size, 20 X 20 cm, SIGMA

Tabela 1. Sorotecas utilizadas nos experimentos de Soroneutralização Viral (SN) e na padronização do ELISA Indireto.

Soroteca	Amostras Coletadas	Rebanhos	Testes Realizados Anteriormente	Locais de Coleta	Ano de Coleta
A	65	Animais vacinados e não vacinados contra a IBR	SN, ELISA IDEXX	Minas Gerais Salvador (BA)	2000
B	26	Animais não vacinados contra a IBR e mantidos em sistema fechado (rebanho da Embrapa)	SN	Corumbá (MS)	2001
C	36	Animais não vacinados contra a IBR; surto de doença neurológica, diagnosticado o BoHV-5 como agente etiológico	SN, IV, PCR	Cruzília (MG)	2003
D	30	Animais vacinados e não vacinados contra a IBR	SN	Minas Gerais Luziânia (GO) Vila Vela (ES)	2004

Na soroteca A (65 soros) foram incluídos os soros provenientes de rebanhos vacinados e não vacinados contra a IBR, localizados, em sua maioria, no Estado de Minas Gerais e um rebanho localizado em Salvador (BA). Estes soros foram coletados durante o ano de 2000. Estas amostras chegam à EV-UFMG para a testes de rotina, tanto para avaliação vacinal, quanto para checagem de sorologia de rebanhos, quando da ocorrência de surtos. Todos os soros desta soroteca A foram testados por um ELISA comercial<sup>17</sup>, distribuído mundialmente, tendo sido utilizado durante esta tese como um “ensaio controle”. Assim, a soroteca A foi testada por SN para BoHV-1 e BoHV-5 e pelo ELISA IDEXX, e foi utilizada para os ensaios de validação de todos os testes aqui produzidos (ELISAs de antígenos virais, recombinantes e peptídeos sintéticos).

A soroteca B (26 soros), coletada no ano de 2001, foi representada por soros de animais de um rebanho não vacinado para IBR, onde o gado é mantido em sistema fechado e localizado na região não alagadiça do Pantanal, em Corumbá (MS), tendo os soros sido disponibilizados pela Dra. Aiesca Oliveira Pellegrin (EMBRAPA Pantanal). A

soroteca C (36 soros) foi composta de soros provenientes de um rebanho não vacinado, onde ocorreu um surto de doença neurológica no ano de 2003, tendo sido diagnosticado o BoHV-5 como o agente etiológico responsável pela infecção (LABMIC – ICB – UFMG), com exclusão da raiva. Esse rebanho localiza-se na região de Cruzília (MG). A soroteca D (30 soros) foi composta também por soros de rotina da EV-UFMG, porém foi separada da soroteca A por não ter sido testada pelo ELISA IDEXX. Estes soros foram coletados no ano de 2004 e, além de soros do estado de Minas Gerais, esta soroteca incluiu também amostras de Luziânia (GO) e Vila Velha (ES). Na Figura 1 são mostrados os municípios que compuseram o local de coleta das sorotecas, bem como o efetivo bovino em cada um deles.

Os soros policlonais monoespecíficos Pab 1 (anti-BoHV-1), Dálmata (anti-BoHV-5) e Baia 3 (anti-BoHV-5), provenientes de bovinos infectados experimentalmente, também foram incluídos no ensaio de neutralização viral.

<sup>17</sup> IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, USA.

### 3.3.2 Teste de Neutralização Viral

Para o teste de soroneutralização viral foram utilizadas as amostras padrão BoHV-1.1 (amostra Colorado 1, ATCC VR 864) na 9ª passagem ( $10^{5,67}$  Dose Infectante em Cultivo de Células - DICC<sub>50</sub>/50µl) e BoHV-5 (amostra EVI-88, isolado brasileiro)<sup>18</sup> na 15ª passagem ( $10^{6,8}$  DICC<sub>50</sub>/50µl). Estas amostras foram multiplicadas em células renais de bovino - MDBK. O cultivo celular foi realizado em meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM) suplementado com antibióticos (penicilina e estreptomicina) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado e livre de vírus e anticorpos para IBR. As amostras virais tiveram seus títulos calculados segundo Reed e Muench (1938) e expressos em dose infectante para 50% do cultivo tecidual (TCID<sub>50</sub>) por 50 µl. Para a inoculação viral, foi utilizada uma confluência celular mínima de 80%. O teste de neutralização viral foi realizado de acordo com Soares e Pereira (1980). Resumidamente, a técnica foi realizada com a diluição dos soros a serem testados, os quais foram incubados com 100 TCID<sub>50</sub>/50µl das amostras padrão (em cada diluição dos soros) por um período de 24h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após, foram adicionados 50µl de células MDBK ( $3,2 \times 10^5$  células/ml) e a leitura foi feita a cada 24 horas, com leitura final em 72h após o início do teste, sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram título igual ou maior que dois. Todos os soros foram testados em duplicata e em cada placa foram adicionados controles celulares e virais.

### 3.4 Padronização do ELISA Indireto

Foi feita uma triagem inicial das sorotecas A, B e C e de soros policlonais Pab 1 (anti-BoHV-1), Dálmata (anti-BoHV-5) e Baia 3 (anti-BoHV-5) provenientes de bovinos infectados experimentalmente. Essa triagem inicial foi feita em sistema de ELISA indireto com os antígenos de BoHV-1, BoHV-5 e um antígeno celular (MDBK). A partir dos resultados obtidos, foram agrupados soros

<sup>18</sup> Gentilmente cedidos pelo Dr. Paulo Roehle, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Brasil.

com maior reconhecimento para o antígeno de BoHV-5 e menor reconhecimento para o antígeno de BoHV-1 e vice-versa. Esses agrupamentos (*pool*) de soros foram denominados mix anti-BoHV-5 (mix5) e mix anti-BoHV-1(mix1). Foi feita nova triagem dos soros policlonais juntamente com as misturas de soros agrupados. Dessa triagem, foram escolhidos os mix5 e mix1 para os passos subseqüentes da padronização.

Os demais parâmetros analisados para a padronização do ELISA indireto incluíram diferentes concentrações de antígenos virais (50 – 500ng/poço), dois tampões para a diluição dos antígenos virais (tampão fosfato-salina - PBS e tampão carbonato-bicarbonato), diluição de 1:40 a 1:1600 dos mix anti-BoHV-5 e anti-BoHV-1, diluição do anticorpo secundário (1:5000 e 1:10.000), tempo (1h, 1:30h e 12h), temperatura (4°C e 37°C) e tipos de bloqueio (Soro Fetal Bovino - SFB a 3% em PBS e Leite em pó desnatado – LPD a 5% em PBS), além de diferentes suportes sólidos<sup>19</sup>. Em todos os testes foram incluídos duplicatas de controle de conjugado e de bloqueio.

Os antígenos virais de BoHV-1 e BoHV-5 foram diluídos em tampão carbonato/bicarbonato (16ml de NaCO<sub>3</sub>, 0,5 M e 184ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,5M em 1 litro de H<sub>2</sub>O q.s.p.) pH 9,6 ou tampão fosfato-salina (PBS) (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,009M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,001M, NaCl 0,145M) pH 7,2 – 7,4 nas concentrações de 50, 100, 250 e 500ng/pocinho. Então, foram distribuídos em placas de 96 pocinhos (100µl/pocinho) e incubados a 4°C durante 14 – 16h. Os poços foram lavados três vezes com tampão PBS/T/LPD (PBS 1X, Tween 20 0,05%, 0,1% de Leite em Pó Desnatado), bloqueados com tampão de bloqueio (SFB a 3% e LPD a 5% em PBS) por 1h a 37°C, 1:30h a 37°C ou 12h a 4°C.

<sup>19</sup> Falcon-PVC, Flexible Plate 96 well, U Bottom, Cat: 353911, Lote: 007910, Becton Dickinson, USA; F96 Maxi-Sorp Nunc - Immuno Plate, Lote: 051101, Nalge Nunc; U96 Poly-Sorp Nunc - Immuno Plate, Lote: 037108, Nalge Nunc; Costar High Binding, EIA/RIA Plate 96 well Flat Bottom, Polystyrene, Lote: 9018, Corning Costar, USA.



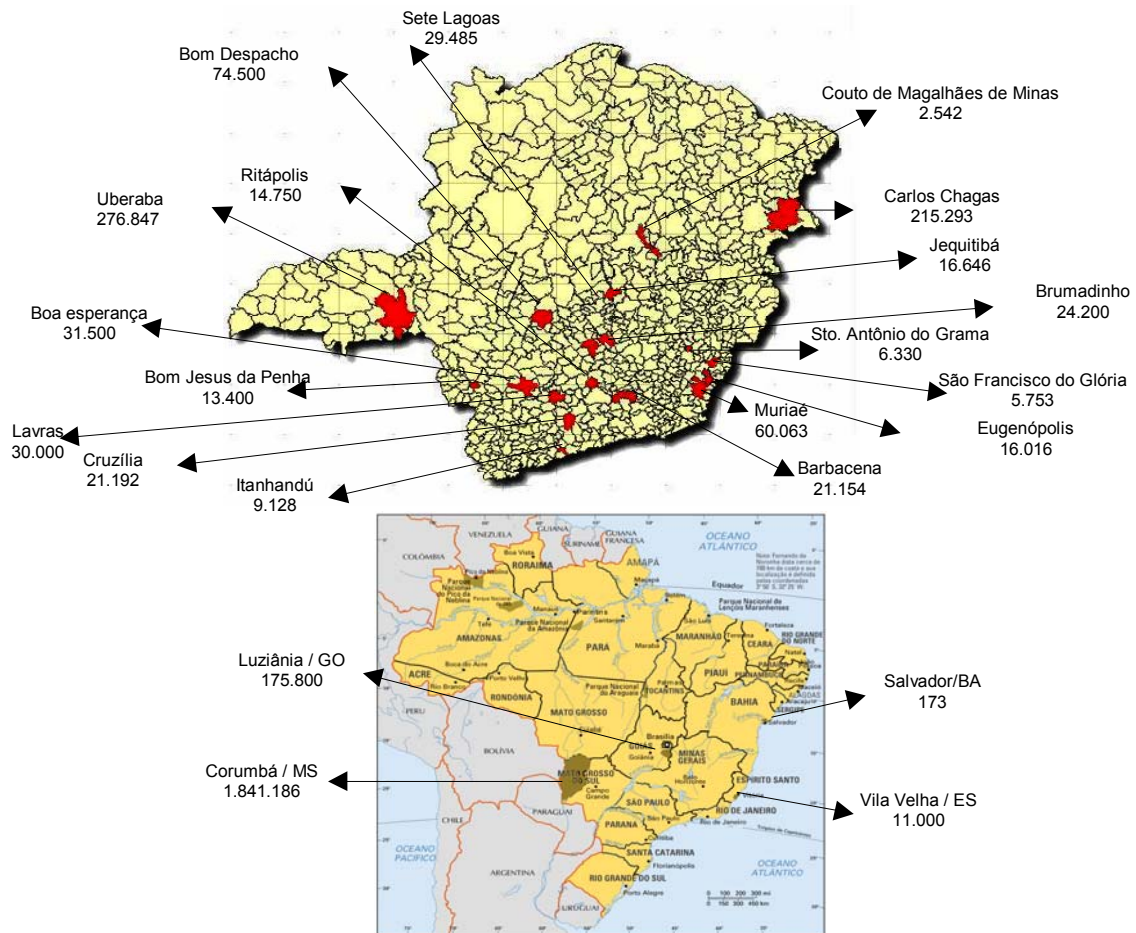


Figura 1 Localização dos rebanhos que compõem as sorotecas A, B, C e D (e seus respectivos efetivos bovinos – IBGE 2003 – acessado em 2006), com destaque para o estado de Minas Gerais. Representados em vermelho estão os municípios de Minas Gerais e, em marrom, no mapa do Brasil as demais localidades.



Após uma etapa de lavagem foram adicionados os soros de animais de campo, diluídos de 1:40 a 1:1600 em tampão PBS/T/LPD. Os soros foram adicionados às placas (100µl/pocinho) e incubados por 1h a 37°C em câmara úmida. As placas foram, então, lavadas por 5 vezes com a solução de lavagem e o anticorpo secundário anti-IgG de Bovino - HPRO<sup>20</sup>, na diluição de 1:5.000 ou 1:10.000 em tampão PBS/T/LPD, foi adicionado às placas que foram incubadas por 1h a 37°C em câmara úmida. Nova etapa de lavagem (5 vezes) foi feita e aos pocinhos foi adicionada a solução de substrato O-fenilenodiamina (OPD) (1 pastilha para cada 10 ml de Tampão Citrato 0,15M) (100µl/pocinho) com incubação por 8 -15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação da peroxidase com o substrato foi parada pela adição de ácido sulfúrico P.A. 2N (20µl/pocinho). A absorbância foi lida a 492nm em leitor de ELISA<sup>21</sup>.

#### 3.4.1 Determinação do Ponto de Corte do ELISA Indireto Desenvolvido

Após essa etapa de padronização, as sorotecas A, B, C e D foram triadas pelo ensaio de ELISA. Destas, a soroteca A já havia sido triada por um ELISA comercial para IBR e pela SN (utilizando tanto o antígeno de BoHV-1 quanto o de BoHV-5) e, portanto, foi usada para validar os parâmetros de sensibilidade e especificidade do teste de ELISA indireto.

A determinação do ponto de corte ótimo para distinguir os resultados positivos e negativos (ELISA indireto – antígenos virais) foi baseada na construção da curva “Receiver Operator Characteristic” (curva de ROC), que foi realizada usando o programa Win Episcopy 2,0 ([http://www.vetschools.co.uk/EpiVetNet/ROC\\_analysis\\_software.htm](http://www.vetschools.co.uk/EpiVetNet/ROC_analysis_software.htm)). Para isso foi feita a distribuição de frequências dos valores de D.O. obtidos para as amostras negativas e positivas. Diferentes valores de D.O. foram estabelecidos como ponto de corte. Para cada um deles, o teste  $\chi^2$  (Sampaio, 1998)

foi calculado para estabelecer a significância dos valores de sensibilidade e especificidade dos testes de ELISA em relação ao testes-padrão (SN ou ELISA comercial IDEXX). O valor de D.O. que resultou no maior valor de acurácia do teste, bem como maior valor de soma de sensibilidade e especificidade foi estabelecido como o ponto de corte (Surujoballi e Mallory, 2004). Os cálculos dos intervalos de confiança (IC) foram baseados em índice de 95% de probabilidade. A área sob a curva de ROC, que fornece a acurácia global do teste diagnóstico, foi calculada.

### 3.5 Proteínas Recombinantes

#### 3.5.1 Estudo Teórico da Glicoproteína G de BoHV-1 e BoHV-5

Análises *in silico* das seqüências de nucleotídeos da glicoproteína G das amostras CGEN de BoHV-1.1 (acesso no *GenBank* AJ004801) e SV 507/99 de BoHV-5 (acesso no *GenBank* AY261359), foram feitas com o auxílio do programa Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

O alinhamento das seqüências protéicas foi feito com o auxílio dos programas Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) e Clustalw (<http://clustalw.genome.jp/>). Análises *in silico* das seqüências de aminoácidos da gG de BoHV-1 e 5 foram feitas com o auxílio do programa EXPASY (<http://us.expasy.org/tools/>) para a verificação dos perfis hidrofóbicos (Kyte e Doolittle, 1982) e estabilidade das proteínas recombinantes. Para o estudo da expressão em procaríoto, foram evitadas as seqüências sinal e transmembrana.

Após os estudos teóricos das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos, foi feito o desenho dos iniciadores com base na região codificadora da glicoproteína G. Ao iniciador senso, foi adicionado um sítio de restrição para a enzima Bam HI e ao iniciador anti-senso, um sítio de restrição da enzima Hind III (Tabela 2).

<sup>20</sup> SIGMA

<sup>21</sup> Expert Plus microplate Reader – G020 150 - ASYS HITECH – AUSTRIA

Tabela 2. Tamanho do amplicon esperado, seqüência, orientação e localização dos iniciadores.

Iniciadores	Vírus – acesso no GenBank	Localização dos Iniciadores	Amplicon
Senso 5'-gcgaggatcctaccctcgccggctggacc	BoHV-1.1 (AJ004801) (117910-117928) BoHV-5 (AY261359) (120131-120149)		620pb/BoHV-1.1
Anti-senso 3'-gcagaagcttgcgatcgcgaggccgatgag	BoHV-1.1 (AJ004801) (118529-118510) BoHV-5 (AY261359) (120732-120713)		602pb/BoHV-5

Em destaque nas seqüências os sítios de restrição das enzimas Bam HI (senso) e Hind III (anti-senso)

Como estratégia de trabalho, clonou-se inicialmente o amplicon em vetor plasmidial pGEM T-easy<sup>22</sup> e, após a restrição dos amplicons com Bam HI e Hind III, a subclonagem foi efetuada em vetor de expressão pQE-30<sup>23</sup>. Os amplicons resultantes seriam de 620 pb para BoHV-1 e 602 pb para BoHV-5, gerando uma proteína com aproximadamente 200 aminoácidos. Como a clonagem foi feita em vetor pQE, que possui a estratégia de produção da proteína estudo fusionada a uma cauda de histidina, a proteína final teria os tamanhos aproximados preditos de 23 KDa para BoHV-1 e 22 KDa para BoHV-5.

### 3.5.2 Extração do DNA das Amostras Virais

O DNA das amostras de BoHV-5 (amostra EVI-88, isolado brasileiro) e BoHV-1.1 (amostra Colorado 1, ATCC VR 864), utilizado para a produção e expressão da proteína recombinante, foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.5.3 PCR dos DNA's Extraídos e Purificação dos Produtos Amplificados

A reação de PCR foi feita a partir de 5µl de cada DNA extraído e 45µl da solução mix, contendo 10 pmol de cada iniciador (senso/Bam HI e anti-senso/Hind III), 0,2mM de dNTP mix, 1,25u de Taq DNA polimerase Platinum<sup>24</sup>, tampão Taq 1X, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1% de DMSO, 1% de Glicerol e água estéril ultra-pura para um volume final de 45µl. A reação de amplificação foi feita em termociclador e consistiu de 1 passo de 3 min./95°C seguido por 35 ciclos de

1min./94°C, 2 min./68°C; 1 passo final de extensão de 7 min./72°C.

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo (10mg/ml) em tampão TBE pH 8,4 (Tris base 0,89M, Ácido Bórico 0,45M, EDTA 1mM) e visualizados sob luz UV. As bandas de tamanho esperado foram recortadas do gel e purificadas com o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System<sup>25</sup>.

### 3.5.4 Clonagem Utilizando o Vetor pGEM-T easy

#### 3.5.4.1 Ligação

Após quantificação dos produtos purificados da PCR, foi feito o cálculo da quantidade de inserto e vetor de clonagem pGEM-T easy utilizada na reação de ligação, segundo recomendações do fabricante<sup>24</sup> com modificações. A reação de ligação consistiu do tampão de ligação 1X, 50ng do vetor, aproximadamente 250ng do inserto e 3UI da enzima T<sub>4</sub> DNA ligase. Água estéril milliQ foi utilizada para um volume final de reação de 10µl.

#### 3.5.4.2 Transformação

Para a transformação foi utilizada a amostra bacteriana hospedeira DH5-α de *Escherichia coli* de acordo com o protocolo do fabricante<sup>24</sup>, com modificações. Brevemente, as bactérias DH5-α foram descongeladas em banho de gelo e adicionadas (100µl das células competentes) a tubos de poliestireno pré-resfriados. Aos tubos contendo as células competentes, foram adicionados os vetores

<sup>22</sup> PROMEGA

<sup>23</sup> QIAGEN

<sup>24</sup> INVITROGEN

<sup>25</sup> PROMEGA



contendo o gene recombinante. Os tubos foram agitados gentilmente e, em seguida, mantidos em banho de gelo por 30 minutos. Após, foram deixados por 45 segundos em banho-maria a 42°C e, imediatamente, mergulhados em banho de gelo por exatamente 2 minutos. Em capela de fluxo laminar, foram adicionados 900µl de meio SOC (Tryptona 2%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, Glicose 20mM) aos tubos que foram incubados por 1:30h a 37°C sob forte agitação (220 – 250 rpm). Em placas de LB ágar contendo ampicilina (100µg/ml) e X-Gal (50µg/ml), foram plaqueados 100µl das células transformadas, com incubação a 37°C, durante 14-16h. Controles da reação de transformação foram feitos com o plaqueamento das células competentes transformadas pelo pBlue (controle da seleção de colônias brancas e azuis) e com o plaqueamento da bactéria competente (controle negativo).

Os clones recombinantes foram selecionados e cada um foi inoculado em 1ml de meio SOC com ampicilina (100µg/ml). Os clones foram mantidos sob agitação a 195 rpm a 37°C por 2h. Após, foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente (apenas para concentrá-los no fundo do tubo) e 1µl desse material concentrado foi submetido à PCR descrita acima, com um passo inicial de 3 minutos a 95°C. A análise do produto de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose como descrito em 3.4.3. O plaqueamento dos clones selecionados foi feito conforme descrito em 3.4.4. As colônias recombinantes selecionadas foram adicionadas em 10ml de meio SOC com ampicilina (100µg/ml) e mantidas sob agitação a 195 rpm a 37°C, entre 14 - 16h para permitir seu crescimento. Após crescimento, foi feita a purificação do DNA plasmidial das colônias recombinantes com o Kit Wizard Plus Minipreps<sup>24</sup>, seguida pela restrição enzimática com Bam HI e Hind III e verificação dos insertos por eletroforese em gel de agarose como descrito em 3.2.3. Os insertos foram recortados do gel e purificados com o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System<sup>24</sup>. Após procedida a purificação, as amostras foram sequenciadas em sequenciador Megabace

do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

As sequências obtidas foram editadas fazendo-se uso do programa Chromas (versão gratuita 1.45) (Technelysium Pty, Ltd – <http://technelysium.com.au/chromas.htm>) e alinhadas com auxílio do programa ClustalW versão 1.8 DOS (<http://www.csc.fi/molbio/progs/clustalw>), para a obtenção de uma sequência consenso. As sequências editadas foram analisadas para a determinação da similaridade em relação aos nucleotídeos com amostras de BoHV-1.1 e BoHV-5, previamente depositadas, utilizando-se os programas Blastn e Blastx, utilizando-se os bancos de dados *nr* (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### 3.5.4.3 Subclonagem em Vetor de Expressão pQE-30

Os DNAs obtidos dos clones recombinantes produzidos em pGEM-T easy, propagados em DH5- $\alpha$  e purificados do gel de agarose, foram subclonados no vetor de expressão pQE-30<sup>26</sup> nos sítios de BamHI e HindIII. A bactéria utilizada em todos os experimentos de expressão foi a XL1-Blue de *E. coli*. Todos os passos para a obtenção dos clones em vetor de expressão seguiram os protocolos para clonagem em pGEM-T easy e modificações foram feitas quando necessário, segundo orientações do fabricante<sup>25</sup>. Os clones obtidos foram restringidos com BamHI e HindIII e analisados por eletroforese em gel de agarose, como já descrito. Os sequenciamentos e edição foram realizados como descrito no item anterior.

### 3.5.4.4 Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes

Inicialmente, foi feita uma pré-cultura das células transformadas com o vetor de expressão contendo o gene das recombinantes. Foram adicionados 500µl das células transformadas em 4,5ml de meio LB super 1X pH 7,4 (Bactotriptina 2,5%, Extrato de levedura 1,5%, NaCl

<sup>26</sup> QIAGEN

0,5%). As pré-culturas foram mantidas em agitador (shaker) a 250 rpm, a 37°C, entre 14 - 16h. Dessas, foram retirados 500µl que foram adicionados em 9,5ml de LB super 1X contendo ampicilina (100µg/ml). As culturas foram, então, mantidas em agitador (shaker) a 195 rpm, a 37°C, até atingir a D.O.<sub>600</sub> entre 0,5 – 0,7. A indução da expressão foi feita com a adição de IPTG, na concentração final de 1mM. A cada uma hora de indução, foi coletado 1ml de cada cultura para subsequente análise em SDS-PAGE. Uma alíquota da cultura não induzida foi utilizada como controle da expressão.

A purificação foi feita a partir da indução da expressão em 50ml de meio LB super 1X com a adição de 100µg/ml de ampicilina. Controles induzidos e não induzidos foram coletados para posterior análise em SDS-PAGE. As colônias induzidas foram centrifugadas a 4.300 rpm (3.300 x g)<sup>27</sup> por 20 minutos e aos sedimentos foram adicionados 5ml de tampão de lise Guanidina pH 8 (Guanidina 6M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M). Os tubos contendo os sedimentos e tampão de lise foram mantidos sob agitação lenta por 30 minutos e foram centrifugados a 8000 rpm (8000 x g) por 20 minutos. Aos sobrenadantes resultantes da centrifugação foram adicionados 500µl da resina Ni-NTA super flow<sup>25</sup> pré-equilibrada com o tampão de lise. Com a resina já aderida à coluna, foram feitas várias etapas de lavagem com o tampão Guanidina pH 8 (Guanidina 6M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M) e, em seguida, com o tampão Uréia pH 8 (Uréia 8M, Tris base 0,01M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M).

Para a eluição das proteínas, os pH's do tampão Uréia foram ajustados para 6, 5 e 4. Um último passo de eluição foi feito com o tampão Guanidina 6M, Ácido Acético 0,2M, pH 2,7. Todas as frações foram analisadas em SDS-PAGE e quantificadas pelo método de Bradford (Ausubel *et al.*, 1995), com leitura em espectrofotômetro<sup>28</sup>. Após, foram mantidas a -70°C até o uso. As frações eluídas em Tampão Guanidina/Ácido Acético pH 2,7 foram dialisadas em água

destilada para a retirada do excesso de guanidina.

### 3.5.5 ELISA Indireto – Proteína Recombinante

Com o ELISA indireto já padronizado para os antígenos virais purificados, o mesmo ensaio foi utilizado com as proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes de BoHV-1 e BoHV-5 foram diluídas nos tampões carbonato/bicarbonato (0,05M de NaCO<sub>3</sub>, 0,05M de NaHCO<sub>3</sub>) pH 9,6 e PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,009M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,001M, NaCl 0,145M) pH 7,2 – 7,4, nas concentrações de 250, 500 e 750ng/pocinho. Os soros mix anti-BoHV-1 e mix anti-BoHV-5 foram diluídos 1:50 e 1:100 e 1:150. Os passos subsequentes foram feitos conforme já descrito em 3.4.

### 3.6 Peptídeos Sintéticos

#### 3.6.1 Estudo Teórico da Glicoproteína C de BoHV-1 e BoHV-5

Para a escolha de uma região com potencial para diferenciar o BoHV-1 do BoHV-5, seqüências de aminoácidos da glicoproteína C dos dois vírus, já depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foram alinhadas com o auxílio do programa Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Os perfis hidrofóbicos (Kyte e Doolittle, 1982) de ambas glicoproteínas também foram avaliados. Essas análises, juntamente com suporte de artigos teóricos, levaram à escolha de uma região para a síntese dos peptídeos com potencial para o diagnóstico diferencial entre dois vírus objetos deste trabalho.

#### 3.6.2 Síntese dos Peptídeos

O fragmento escolhido para a gC de BoHV-1 compreendeu os resíduos de aminoácidos de 105 – 119 e para a gC de BoHV-5, os resíduos de 84 – 98, ambos na região N-terminal dessa glicoproteína. O desenho dos peptídeos é mostrado na Tabela 3. A síntese foi realizada pela Dra. Aparecida Juliano, do Departamento de Química da USP, em sintetizador automático (PSSM 8 system – Shimadzu, Japão).

<sup>27</sup> Centrifuga Jouan BR4i, rotor AB50.10A

<sup>28</sup> SHIMADZU, Japão.

Tabela 3. Seqüência de aminoácidos dos peptídeos sintetizados.

Peptídeo	Seqüência
gC1	[H] - RPPGAGNASRDGRPS – [OH]
gC5	[H] - TTDEPLGTPAPPPA – [OH]

Os peptídeos foram desprotegidos com o uso do ácido trifluoro acético (TFA) e purificados em HPLC utilizando colunas Econosil C-18 (10 µ, 22.5 x 250 mm) e um sistema duplo de solventes: (A) TFA/H<sub>2</sub>O (1:1000) and (B) TFA/acetonitrila (ACN)/H<sub>2</sub>O (1:900:100). As colunas foram eluídas a uma taxa de 5 ml/min. A análise de HPLC foi efetuada utilizando um sistema binário de HPLC (SHIMADZU, Japão). O peso molecular e pureza dos peptídeos sintetizados foram analisados por espectrometria de massa (MALDI-TOF mass spectrometry - TofSpec-E).

### 3.6.3 ELISA Indireto - Peptídeos Sintéticos

Com o ELISA indireto já padronizado, o mesmo ensaio foi utilizado com os peptídeos sintetizados adsorvidos às placas. As concentrações desses antígenos variaram de 250 a 5000ng/pocinho. Os tampões carbonato/bicarbonato e PBS também foram testados como diluentes. Os soros mix anti-BoHV-1 e mix anti-BoHV-5 foram diluídos 1:50 e 1:100. Os passos subseqüentes foram feitos conforme já descrito em 3.4.

## 3.7 Biomateriais

### 3.7.1 Reagentes

O álcool poli-vinílico 107 (Celvol – PVA 107)<sup>29</sup> foi obtido como um pó hidrolizado com 98.5% de pureza, com peso molecular de 31.000 – 50.000 g/mol. O álcool poli-vinílico KM 118 (PVA KM 118), foi obtido como um pó hidrolizado com 95,5 a 98,5% de pureza<sup>30</sup>, com peso molecular aproximado de 30.000 a 60.000 g/mol. O glutaraldeído (GA) ou 1,5-pentanadiol<sup>31</sup> foi

obtido como uma solução aquosa a 25% (p/p). Os silanes utilizados foram o tetraethoxysilane (TEOS >98%), 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTMS), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) e 3-iso-cyanatopropyltriethoxysilane (ISOCYPTES)<sup>32</sup>, glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS)<sup>32</sup> e 3-metacryloxypropyltrimethoxysilane (MAPTMS)<sup>33</sup>. Microplacas de poliestireno, de fundo plano de 24 e 96 pocinhos<sup>34</sup> foram usadas como moldes.

### 3.7.2 Hidrogéis e Síntese Híbrida

Os hidrogéis PVA 107 e PVA KM 118 foram preparados como soluções a 5% em água milli-Q, sob agitação magnética e a uma temperatura de 80 ± 2°C. Após chegar à temperatura ambiente (25°C), o pH das soluções foi corrigido para 2,0 ± 0.1 com HCl 1M.

Os híbridos derivados dos PVAs (107 e KM 118) e organotrialkoxisilanes (PVA/TEOS, PVA/MPTMS, PVA/GPTMS, PVA/APTES, PVA/ISOCYPTES e PVA/ MAPTMS) foram sintetizados via rota aquosa. Por 5 minutos à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 1,86 ml de cada silane específico foram gentilmente adicionados a 100ml das soluções de PVAs previamente preparadas, resultando em uma concentração de 10% de cada silane em relação às soluções de PVAs. As placas de 24 e 96 pocinhos receberam, respectivamente, 2ml/pocinho e 200µl/pocinho de cada híbrido e foram mantidas por 24 – 72h à temperatura ambiente (25°C) para ocorrer a solidificação do material.

A reticulação química dos híbridos PVA/SiO<sub>2</sub> com glutaraldeído (GA) foi feita com a adição de 20 ml de glutaraldeído a 100 ml de cada solução de PVA/Silanes, sob agitação magnética por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as soluções híbridas foram distribuídas em microplacas de 24 e 96 poços com 2ml/pocinho e 200µl/pocinho, respectivamente. A gelação e solidificação

<sup>29</sup> Gentilmente cedido pela Celanese Chemicals, USA.

<sup>30</sup> KURARAY CO., LTD, Tokyo, Japan.

<sup>31</sup> SIGMA-ALDRICH

<sup>32</sup> MERCK

<sup>33</sup> POLYSCIENCES

<sup>34</sup> SARSTEDT

dos híbridos reticulados ocorreu em 24 – 72h à temperatura ambiente (25°C).

As placas foram mantidas em dessecador por, aproximadamente, 5 dias quando, então, foram adicionados 2,5 µg/ml das proteínas virais purificadas e 5 µg/ml das proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos de BoHV-1 e BoHV-5 (diluídos em PBS, pH 7,2) às placas de 96 pocinhos, com 100 µl/pocinho, totalizando 250ng/ pocinho das proteínas virais purificadas e 500 ng/pocinho das proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos. As placas foram mantidas por 12h à temperatura ambiente (25°C) e, então, foram levadas à estufa a 37°C por 24h. Após, foram mantidas à temperatura ambiente para posterior uso no ensaio de ELISA.

### **3.7.3 Caracterização Química dos Híbridos PVA/GA/Silanes por Espectroscopia FTIR**

A espectroscopia FTIR foi usada para caracterizar a presença de grupos químicos específicos nas matrizes híbridas formadas, comprovando a produção de diferentes materiais nanoestruturados. Os espectros de infra-vermelho foram obtidos dentro de uma variação de 4000 cm<sup>-1</sup> e 400 cm<sup>-1</sup><sup>35</sup>, usando o método de espectroscopia de reflectância difusa. As amostras híbridas foram moídas e misturadas com brometo de potássio em pó (KBr), quando foram feitas 64 varreduras com uma resolução de 2 cm<sup>-1</sup>, com a subtração dos valores de leituras do KBr. Análises espectroscópicas também foram feitas para os filmes de PVA usados como referência. A incorporação das proteínas virais purificadas nas matrizes híbridas também foi avaliada pela espectroscopia FTIR, como uma medida qualitativa das proteínas adsorvidas à matriz.

### **3.7.4 ELISA Indireto – Biomateriais**

O ensaio de ELISA para todos os antígenos incorporados aos biomateriais foi realizado conforme o protocolo descrito em 3.4.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Células e Vírus**

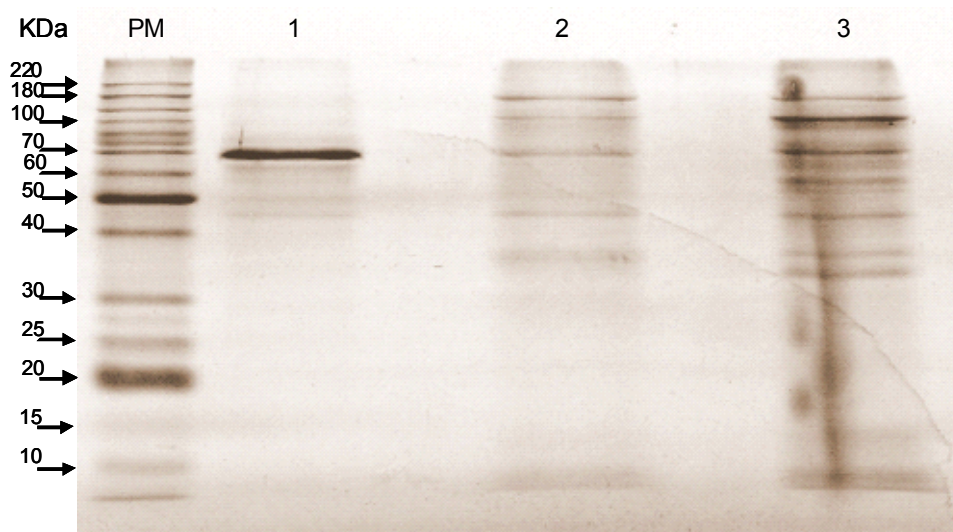
#### **4.1.1 Produção e Purificação das Proteínas Virais**

A multiplicação dos vírus em células de linhagem contínua MDBK e sua posterior purificação em colchão de sacarose resultou na obtenção de 1,26 mg/ml para a amostra EVI-88 (BoHV-5) e 1,48 mg/ml para a amostra Colorado 1 (BoHV-1). Entretanto, após sonicação, a quantificação das proteínas virais para a amostra EVI-88 variou significativamente, de 1,26 mg/ml para 0,7 mg/ml. Para a amostra Colorado 1, entretanto, a concentração do antígeno permaneceu praticamente a mesma (1,3 mg/ml). Essa queda na quantificação do antígeno viral para BoHV-5 provavelmente ocorreu devido à formação de agregados de proteínas virais após ressuspensão do sedimento, no final do processo de purificação viral. Segundo Teixeira *et al.* (2001), a sonicação serve para diminuir esses acúmulos de massas de antígenos após seu preparo, sendo importante para padronizar as suspensões virais obtidas.

#### **4.1.2 SDS-PAGE das Amostras Virais Purificadas**

O perfil protéico das amostras virais, analisado em gel de poliacrilamida, corado pela prata e azul de Coomassie, revelou proteínas com massas moleculares entre 14 a 145 KDa (Figura 2) e é consistente com aqueles descritos na literatura (Marshall *et al.*, 1986; Trépanier *et al.*, 1986). Ainda que tenham sido adicionadas quantidades iguais (pela leitura de Bradford) em cada uma das canaletas, parecem haver quantidades diferentes de proteínas coradas. Mas, mesmo assim, observa-se que o perfil dos vírus BoHV-5 e BoHV-1 guarda peculiaridades de tamanho e peso protéicos, evidenciando pequenas diferenças entre os mesmos.

<sup>35</sup> Perkin-Elmer, Paragon 1000



Perfil protéico das amostras virais de BoHV-1 e BoHV-5 purificadas em colchão de sacarose e resolvidas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Coloração por azul de Commassie. Canaleta 1: controle celular; canaleta 2: Colorado 1 (BoHV-1); canaleta 3: EVI-88 (BoHV-5); PM: padrão de peso molecular (Bench-Mark™ Ladder - INVITROGEN)

#### 4.1.3 Verificação da Especificidade dos Vírus Purificados

Como pode ser observado no ensaio de dot (Figura 3A), em todas as concentrações de antígenos utilizadas, o sobrenadante de hibridoma Mab 2915 (anti-gC5) reage especificamente com o antígeno de BoHV-5. Entretanto, o sobrenadante de hibridoma Mab 147 (anti-gC1) não reagiu com o antígeno de BoHV-1 (Colorado 1) em nenhuma das concentrações de antígeno usadas no experimento.

Como a especificidade do antígeno de BoHV-1 não foi confirmada com o Mab 147, novo ensaio de dot foi feito, usando soros policlonais de bovinos provenientes de infecção experimental (Figura 3B). Os

resultados desse experimento mostraram que o soro policlonal anti-BoHV-1 (Pab 1), em várias diluições, reagiu com o antígeno de BoHV-1, mas também contra o antígeno de BoHV-5. Da mesma forma, os demais soros (anti-BoHV-5: Baía 3 e Dálmata), reagiram com os dois antígenos virais.

A ocorrência de reatividade cruzada dos soros policlonais frente aos dois antígenos virais já era esperada, uma vez que os herpesvírus bovinos dos tipos 1 e 5 são estreitamente relacionados antigenicamente. Entretanto, a resposta do Mab 1240 (anti-gB de BoHV-1 e BoHV-5), foi reforçada pela reatividade do antígeno de BoHV-1 com o soro policlonal anti-BoHV-1, confirmando a especificidade do antígeno purificado de BoHV-1.



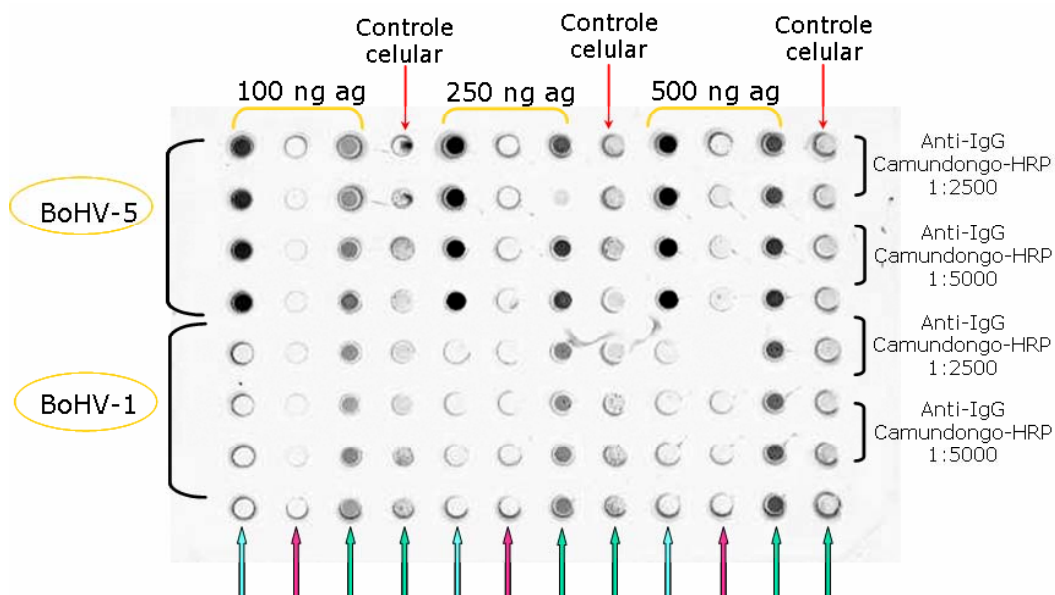


Figura 3A. Reatividade dos antígenos virais purificados com sobrenadantes de hibridomas em ensaio de dot. Legenda: ● Mab 2915 (anti-gC de BoHV-5); ● Mab 147 (anti-gC de BoHV-1); ● Mab 1240 (anti-gB de BoHV-1 e 5).

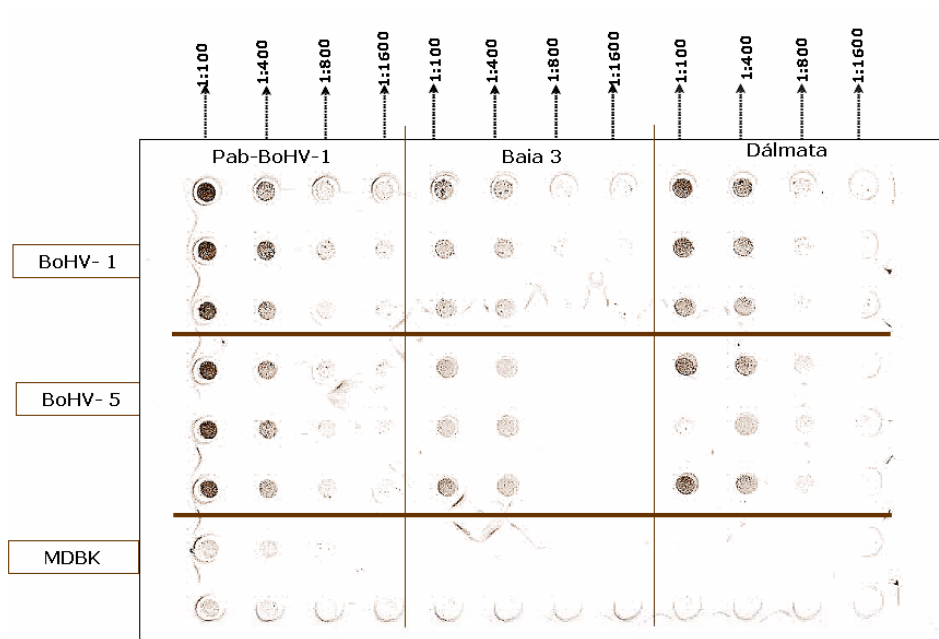


Figura 3B. Reatividade dos antígenos virais purificados com soros policlonais provenientes de infecção experimental em bovinos em ensaio de dot.





## 4.2 Soroneutralização Viral

Os resultados da soroneutralização (SN) com os antígenos de BoHV-1 e BoHV-5 são apresentados na Tabela 4.

A **soroteca A** (soros de rotina da EV-UFMG) apresentou 49,2% dos soros (32 soros em 65 amostras) com anticorpos neutralizantes para ambos os vírus e 47,7% de soros (12 soros em 65 amostras) com resultado negativo na SN para os dois antígenos virais. Baixos títulos foram obtidos

em 18,5% de soros (12 soros em 65 amostras) positivos somente para BoHV-1 e 13,8% de soros (9 soros em 65 amostras), positivos somente para BoHV-5. Dentre as 65 amostras testadas, 21 amostras (32,3%) apresentaram altos títulos de anticorpos neutralizantes frente ao BoHV-1 e BoHV-5 (títulos variando de 128 a  $\geq 256$ ). Nessa amostragem, 8 soros (12,3%) vieram de um rebanho localizado na cidade de Salvador (BA), enquanto 57 amostras (87,7%) foram obtidas em rebanhos de diversas localidades de Minas Gerais (Figura 1).

Tabela 4: Resultado da Soroneutralização Viral (SN) com os antígenos de BoHV-1 e BoHV-5 utilizando as sorotecas A, B, C e D.

Sorotecas	Positivos BoHV-1	Positivos BoHV-5	Positivo para ambos	Negativo para ambos	Total de amostras
A	12	9	32	12	65
B	1	—	24	1	26
C	4	6	24	2	36
D	—	—	30	—	30
Total	17	15	110	15	157

A **soroteca B**, representada pelo rebanho da Embrapa-Pantanal (rebanho fechado e não vacinado), apresentou altos títulos de anticorpos neutralizantes para os dois antígenos virais em 23 das 26 amostras de soros analisadas (88,5%), com apenas uma amostra negativa para ambos os vírus.

Os soros que constituem a **soroteca C**, representada por um rebanho com surto de doença neurológica (animais não vacinados), apresentaram os resultados mais diversificados. De um total de 36 amostras, 24 (66,7%) foram positivas para ambos os vírus, 14 (38,9%) apresentaram altos títulos de anticorpos frente ao BoHV-1 e BoHV-5 e 10 amostras (27,8%) tiveram títulos variando de 16 a  $\geq 256$  para ambos antígenos virais. Apenas dois soros foram negativos para ambos os vírus, enquanto 6 soros (17%) foram positivos para o BoHV-5 com altos títulos de anticorpos neutralizantes (128 a  $\geq 256$ ) e quatro soros (11,1%) foram positivos apenas para o BoHV-1.

Na **soroteca D** (soros de rotina da EV-UFMG) todas as amostras foram positivas na SN, com 96,67% das amostras

apresentando altos títulos de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1 e o BoHV-5 (títulos variando de 128 a  $\geq 256$ ). Apenas uma amostra reagiu com baixo título (1:8) na SN com ambos os antígenos virais.

Os soros policlonais Pab1 (anti-BoHV-1), Dálmata (anti-BoHV-5) e Baia 3 (anti-BoHV-5) apresentaram títulos de 128, 512 e 256 com o antígeno de BoHV-1 e 256, 512 e 64 com o antígeno de BoHV-5, respectivamente.

Os testes de soroneutralização viral (SN) e vários formatos de ELISAs são comumente utilizados para a detecção de anticorpos no soro contra BoHV-1. A SN é considerada o padrão-ouro para a detecção de anticorpos anti-BoHV-1 (House e Baker, 1971; Cho e Bohac, 1985; Teixeira., 1998) e é um método confiável e específico (Gibbs e Rweyemamu, 1977). Esses métodos sorológicos podem ser empregados para a detecção de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-5 (Riet-Correa *et al.*, 1996). Devido à capacidade de latência dos herpesvírus, a identificação de animais positivos pela sorologia fornece dados importantes sobre o “status” da infecção,

embora em estudo conduzido em centrais brasileiras de inseminação artificial (Gomes *et al.*, 2003), não houve correlação entre sorologia e excreção viral, sendo que alguns touros sorologicamente negativos estavam excretando vírus no momento da coleta. Os testes sorológicos podem ser usados para inúmeras propostas: 1. para o diagnóstico de infecção aguda; 2. para demonstrar a ausência de infecção (no caso de propostas comerciais); 3. para determinar a prevalência da infecção; 4. para dar suporte aos programas de erradicação e vigilância e 5. em pesquisas laboratoriais (OIE, 2005).

No presente estudo, os soros foram avaliados na SN com um período de incubação de 24h. Vários fatores podem interferir na sensibilidade do teste de SN. Um dos principais refere-se ao tempo de incubação entre o vírus e o soro antes da adição das células (Cho e Bohac, 1985; OIE, 2005). Previamente, foi demonstrado por Bitsch (1978) que 24h produz títulos mais altos do que com 1h de incubação. Vieira *et al.* (2003) também obtiveram uma maior sensibilidade no teste de SN quando aumentaram o tempo de incubação para 24h.

De acordo com os resultados obtidos na SN, verificou-se a extensa reatividade cruzada entre os dois agentes virais, conforme já demonstrado por estudos anteriores (Teixeira, 1998; Wellemberg *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 2002). Esse fato deve-se à estreita relação antigênica entre o BoHV-1 e BoHV-5, com vários sítios antigênicos comuns presentes nas glicoproteínas do envelope viral.

No rebanho de Cruzília, onde o surto de doença neurológica foi confirmado para BoHV-5, bem como nos demais rebanhos triados, foram observados altos títulos de anticorpos na SN para esse agente viral, demonstrando que os herpesvírus bovinos 1 e 5 estão presentes nos rebanhos brasileiros, como já comentado na literatura (Weiblen *et al.*, 1989; Roehe *et al.*, 1998; Teixeira, 1998). Entretanto, esse é o primeiro estudo que relata a SN para o BoHV-5 com o intuito de demonstrar sua presença, juntamente com o BoHV-1, em diversos rebanhos distribuídos em estados com importância na pecuária brasileira. Pode ser observado na Figura 1, que se

trabalhou nesta tese com rebanhos que variaram de 2.542 cabeças de efetivo bovino, como em Couto Magalhães de Minas, até municípios com destacada produção de corte e leite, onde se encontra uma pecuária mais tecnificada, como os municípios de Carlos Chagas (efetivo bovino – 215.293 cabeças) e Uberaba (efetivo bovino – 276.847 cabeças). Observou-se que quaisquer deles não diferiram na reatividade aos dois vírus, mostrando que os mesmos circulam nestas diferentes criações, as quais certamente possuem grandes diferenças em manejo e genética, dentre outros fatores. É também importante ressaltar que o rebanho da soroteca B, vive em sistema fechado, o que também não impediu a disseminação dos dois agentes virais nessas circunstâncias. Também para os estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás e Mato Grosso do Sul evidenciou-se ampla reatividade aos dois agentes virais. Alguns estudos de SN para o BoHV-5 já foram feitos, entretanto, ou avaliavam a possibilidade de proteção cruzada com vacinas anti-BoHV-1 (Vogel *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2006) ou utilizavam a SN como teste comparativo para um novo método de diagnóstico (Kunrath *et al.*, 2004).

### 4.3 ELISA Indireto

Para a padronização do ELISA foi feita uma triagem inicial das sorotecas A e C. A partir dos resultados obtidos, foram agrupados soros com maior reconhecimento do antígeno de BoHV-5 e baixa resposta contra o antígeno de BoHV-1 e vice-versa. Esses agrupamentos de soros foram denominados mix anti-BoHV-5 (mix5) e mix anti-BoHV-1 (mix1). Os soros policlonais provenientes de bovinos infectados experimentalmente foram também empregados na padronização do ELISA. A Figura 4 mostra o resultado da triagem dos mix anti-BoHV-5 e BoHV-1 e dos soros supra citados com os dois antígenos virais e um controle de antígeno celular. Observou-se que houve uma diferença mais pronunciada no reconhecimento específico dos antígenos com o mix anti-BoHV-5 e o mix anti-BoHV-1 do que com os outros soros testados (Pab1, Dalmata e Baia3 - antisoros provenientes de infecções experimentais). Dessa forma, os mix anti-BoHV-1 e BoHV-5 foram escolhidos para padronizar as etapas subsequentes do ELISA.

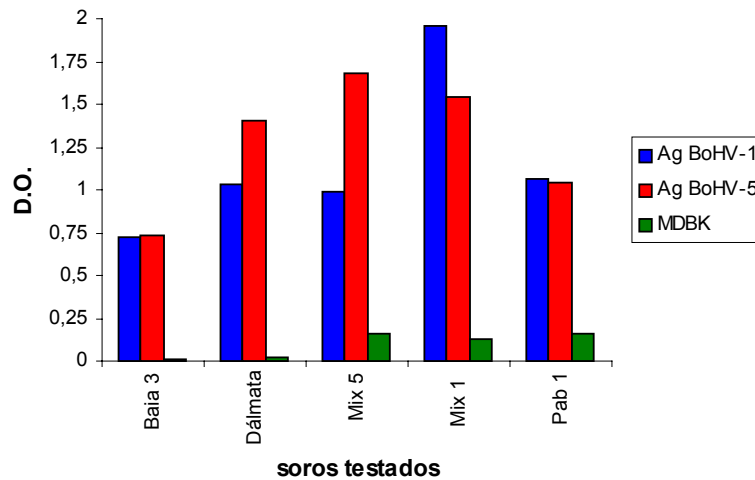


Figura 4. Triagem de soros policlonais provenientes de infecção experimental ou natural em ELISA indireto.

Os resultados de vários ensaios de ELISA com os mix anti-BoHV-5 e anti-BoHV-1 (utilizando placa comercial Falcon-PVC) mostraram que a maior diferença no reconhecimento específico para os antígenos virais foi verificada na concentração de 250ng de antígeno viral/pocinho em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, diluição 1:100 dos soros, diluição do anticorpo secundário 1:5.000, bloqueio com leite em pó desnatado a 5% em PBS por 1:30h a 37°C. O valor obtido para o controle de conjugado (média dos valores de D.O.= 0,100) foi subtraído dos valores de D.O. obtidos para os soros triados em todos os testes ELISA realizados.

Em uma análise subsequente, trabalhou-se com as quatro placas comerciais mais utilizadas no mercado (Figuras 5 A e B). Ao se calcular a especificidade (Figura 6A e 6B), observa-se que tanto para 250ng quanto para 500ng, a ligação dos antígenos variou entre as placas, tendo as placas Polysorp e Falcon-PVC favorecido as ligações para o antígeno BoHV-5 e as placas Maxisorp, Polysorp e Falcon-PVC favorecido as ligações para o antígeno BoHV-1, nesta ordem citada. Analisando-se simultaneamente os dois antígenos, o melhor favorecimento foi das placas

Polysorp e Falcon-PVC. A partir deste momento, escolhemos trabalhar em placa única (pois haveria muitas variáveis em biomateriais a serem testadas, dificultando o trabalho de padronização) e, a escolha ficou com a Falcon-PVC, uma vez que a mesma não apresenta modificação de superfície, favorecendo as análises futuras de melhoria de reatividade nos diferentes biomateriais.

O uso dos tampões carbonato/bicarbonato e fosfato-salina (PBS) para a diluição de moléculas que irão interagir com a fase sólida é uma prática comum nos ensaios de ELISA. Nesse experimento, quando comparados, estes tampões praticamente não revelaram diferenças no reconhecimento específico dos mix1 e mix5 com seus respectivos antígenos.

Os métodos e os reagentes de bloqueio são tipicamente escolhidos de modo empírico. O bloqueio de superfícies nos ensaios de ELISA serve para reduzir a ligação inespecífica das diversas moléculas e reagentes presentes nos passos subsequentes à sensibilização do suporte sólido. O bloqueio, portanto, é uma etapa que conduz a baixo número de reações inespecíficas, melhorando sensibilidade e especificidade (Gibbs, 2001).



Nesse ensaio, foram comparados dois reagentes de bloqueio, a BSA a 3% em PBS e o LPD a 5% em PBS. O segundo se mostrou mais eficiente, minimizando a ocorrência de ligações inespecíficas dos reagentes utilizados após sensibilização das placas. Na ausência do reagente de bloqueio, os valores de D.O. aumentaram cerca de 1 a 1,5 vezes.

Nos ensaios de ELISA, a fase sólida é um elemento crítico inerente ao sistema desde que o antígeno precisa ligar-se a sua superfície para o ensaio ser realizado (Shekarchi *et al.*, 1984; Gibbs, 2001). Ligações ineficazes diminuem a sensibilidade do teste e, com frequência, possibilitam o aumento do número de ligações inespecíficas, diminuindo a reprodutibilidade e confiabilidade do teste (Shekarchi *et al.*, 1984; Wheeler *et al.*, 1988). Placas feitas de diferentes materiais também variam em sua habilidade de adsorver antígenos, uma vez que sua capacidade de ligação é dirigida por suas propriedades físicas e químicas (Shekarchi *et al.*, 1984; Gibbs, 2001).

Shekarchi *et al.* (1984) avaliaram diferentes microplacas em ensaio de ELISA utilizando como antígeno o vírus do sarampo (gênero *Morbillivirus*, família *Paramyxoviridae* - vírus envelopado), o protozoário toxoplasma e uma fração da  $\delta$ -globulina humana. Os autores concluíram que as placas de poliestireno e PVC são geralmente satisfatórias nos ensaios de ELISA para a maioria dos antígenos protéicos. Entretanto, deve-se fazer a seleção das placas com base em cada antígeno utilizado.

Em outro estudo, Weber e colaboradores (1985) mostraram que placas de PVC (Dynatech) com fundo chato apresentaram a maior razão entre soros positivos e negativos e também o menor desvio-padrão quando repetidas análises das mesmas amostras de soro testadas em várias placas. Esses autores também comprovaram que as placas de PVC mostraram os menores valores de absorvância inespecífica, indicando que as ligações inespecíficas de anticorpos primários e conjugados foram minimizadas nessa superfície.

Apesar de não terem sido avaliados nesse experimento, outros fatores como o efeito de borda ou variações de pocinho para pocinho podem afetar negativamente os resultados dos ensaios de ELISA (Shekarchi *et al.*, 1984; Wheeler *et al.*, 1988). Segundo Shekarchi *et al.* (1984), após sensibilização com os antígenos, as placas devem ser incubadas com os demais reagentes em câmara úmida, como foi feito neste experimento. Esse procedimento reduz, mas não elimina o problema do efeito de borda.

O ensaio de ELISA indireto desenvolvido nesse trabalho foi validado a partir da comparação dos seus resultados com aqueles obtidos pela SN e pelo ELISA comercial IDEXX, triados pela soroteca A. Na Tabela 5 estão representados os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do ELISA comercial comparado à SN frente ao BoHV-1, ELISA indireto versus SN e ELISA comercial frente aos antígenos de BoHV-1 e BoHV-5. No anexo I são mostrados os cálculos efetuados em cada teste comparativo, os quais estão compilados na Tabela 5. O valor de  $\chi^2$  calculado para todas as comparações feitas apresentou significância estatística ( $p < 0,05$ ). Para as análises seguiu-se metodologia descrita por Surujballi e Mallory (2004), onde, após os cálculos, o ponto de corte é escolhido quando a soma dos percentuais de especificidade e sensibilidade fornecerem o valor mais alto.

Na comparação do teste ELISA comercial IDEXX (mundialmente utilizado na triagem de rebanhos) e do ELISA indireto LABMIC com a soroneutralização (preconizada como padrão-ouro pela OIE para a avaliação sorológica de IBR), o teste desenvolvido nesta tese apresentou melhores valores de especificidade, valores preditivo positivo e negativo, e, acurácia. O ELISA LABMIC - BoHV-5 em comparação à SN mostrou menor valor de sensibilidade (78,1%), mas, apresentou bons valores de especificidade, e, conseqüentemente VPP. Observa-se na Tabela 5 que a sua acurácia foi de 86,2%, e, o teste IDEXX quando da comparação com a SN, apresentou acurácia de 87,7%, valor não tão mais alto que o ELISA LABMIC BoHV-5.

Tabela 5. Dados comparativos do ELISA padronizado com os antígenos virais e os testes de soroneutralização viral (SN) e ELISA comercial ( $p < 0,05$ ).

Testes	Valores (%)				
	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	VPP	VPN
ELISA IDEXX / SN					
BoHV-1	88,2	87,1	87,7	88,2	87,1
ELISA LABMIC / SN					
BoHV-1	88,2	96,8	92,3	96,8	88,2
BoHV-5	78,1	93,9	86,2	92,6	81,6
ELISA LABMIC / IDEXX					
BoHV-1	97,1	96,8	96,9	97,1	96,8
BoHV-5	94,1	100	96,9	100	93,9

VPP= valor preditivo positivo; VPN= valor preditivo negativo

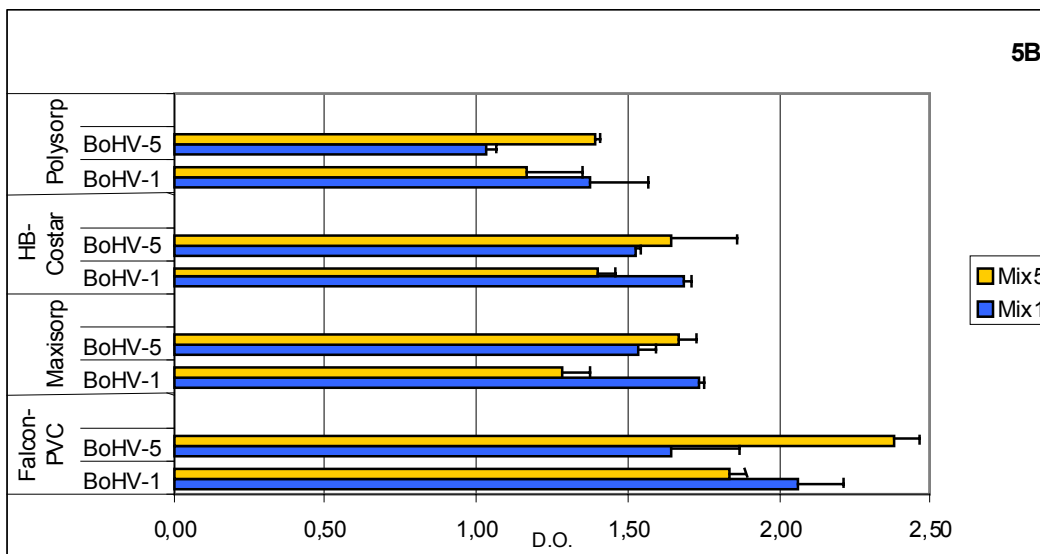
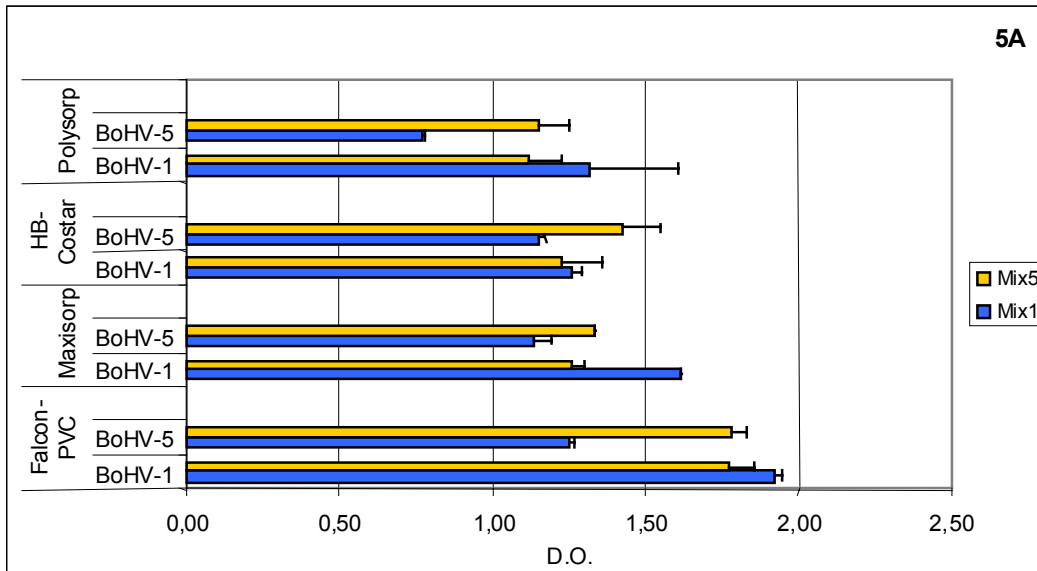


Figura 5. Desempenho do ELISA indireto padronizado em quatro diferentes suportes sólidos comerciais e concentrações de antígenos de 250 (5A) e 500ng/poço (5B).





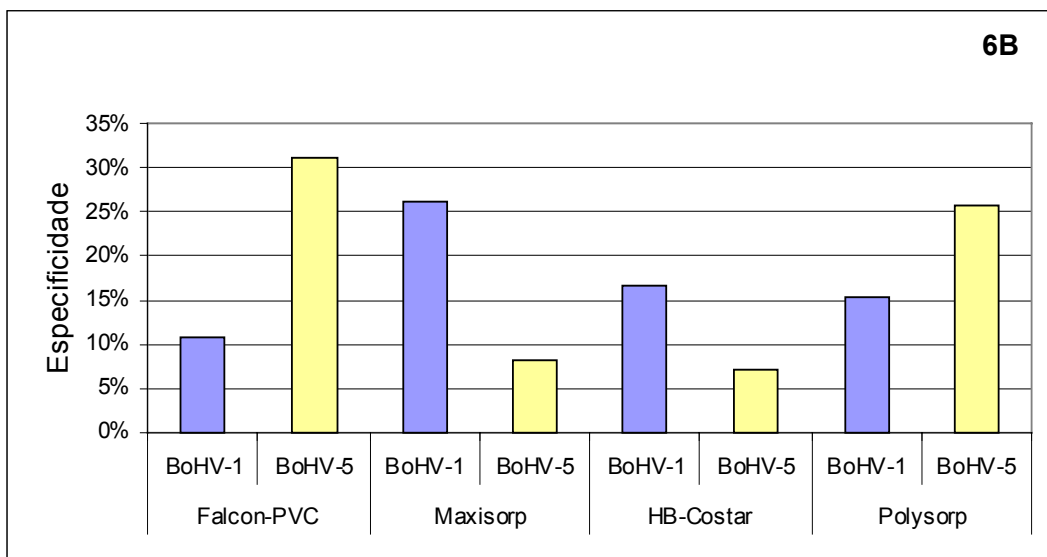
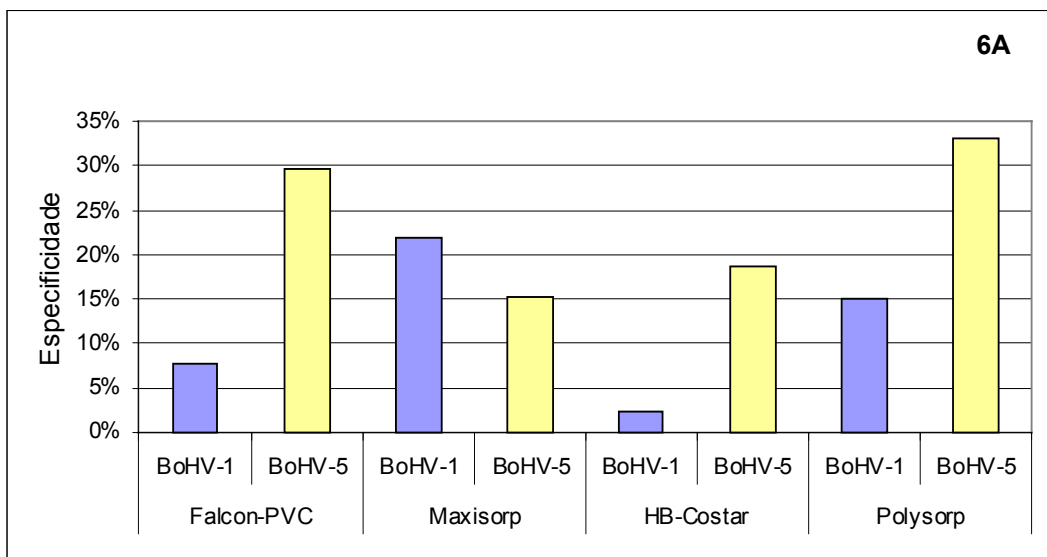


Figura 6. Especificidade calculada para os diferentes suportes sólidos em concentrações de antígenos de 250 (6A) e 500 ng/poço (6B)



A Figura 7 mostra o desempenho comparativo entre o ELISA indireto padronizado e o ELISA comercial, onde todos os soros com resultados positivos e negativos no ELISA comercial, o foram também no ELISA padronizado. Esses resultados mostram que o ensaio de ELISA desenvolvido nesse trabalho pode, seguramente, ser usado para a triagem de anticorpos contra o vírus da IBR, substituindo o kit comercial com tecnologia importada, que tornam as triagens em larga escala bastante onerosas. Considerando

que cada soro animal deve ser testado em duplicata e que, cada teste único custa aproximadamente R\$ 14,00 (€ 4,80 - sem contabilizar custo de importação), o desenvolvimento do ELISA LABMIC-BoHV-1 já constitui por si só um grande avanço. Em relação ao ELISA BoHV-5, um dado importante é que, embora este teste possa necessitar mais ajustes, mostra-se já como uma ferramenta importante para a triagem sorológica de rebanhos. Ressalta-se aqui que o mesmo foi desenvolvido com uma amostra isolada no Brasil (EVI-88).

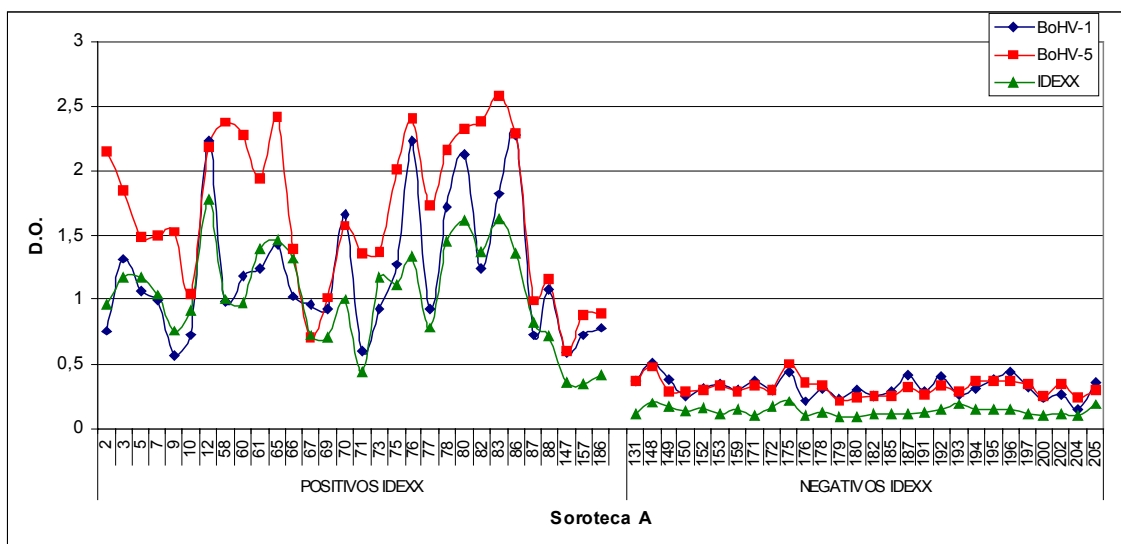


Figura 7. Resultado do ELISA indireto padronizado com antígenos virais purificados por ultracentrifugação em colchão de sacarose (ELISA LABMIC) utilizando soroteca previamente testada pelo ELISA IDEXX – BoHV-1

#### 4.4 Proteínas Recombinantes

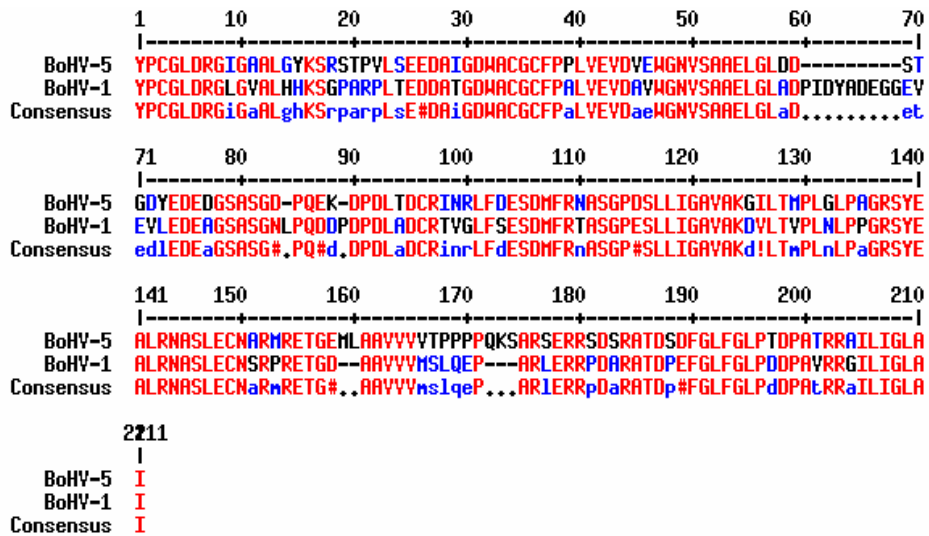
##### 4.4.1 Estudo Teórico da Glicoproteína G de BoHV-1 e BoHV-5

As análises *in silico* forneceram a base para a construção de uma proteína recombinante otimizada para a expressão em vetor procaríoto. O alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas recombinantes preditas pelo estudo teórico é apresentado na Figura 8A. Observa-se, a

partir do alinhamento, que há entre as duas seqüências regiões de variabilidade na forma de deleções e substituições, o que sugere a existência de prováveis sítios antigênicos específicos para a recombinante gG de BoHV-1 e BoHV-5. Os perfis hidrofóbicos, já retiradas as seqüências sinal e transmembrana, das recombinantes de BoHV-1 e BoHV-5 são mostrados na Figura 8B. Observa-se que ao longo de suas seqüências de aminoácidos há vários picos hidrofílicos proeminentes.



8A



8B

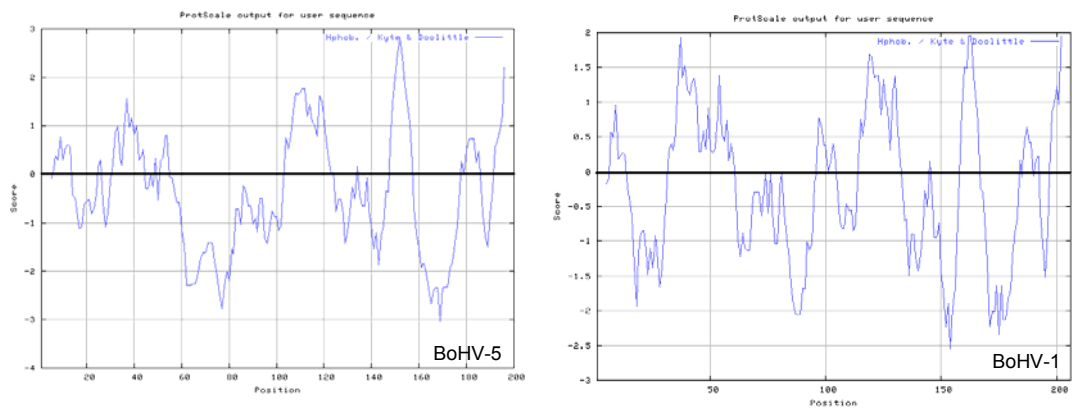


Figura 8. Alinhamento de parte da glicoproteína G de BoHV-1 e BoHV-5 (8A) e perfil de hidrofobicidade da região analisada (8B), segundo Kyte e Doolittle (1982).



#### **4.4.2 Experimentos de Clonagem e Subclonagem**

A figura 9 resume os experimentos utilizados na estratégia de clonagem, desde a obtenção dos amplicons das amostras EVI-88 (BoHV-5) e Colorado-1 (BoHV-1) até a subclonagem em vetor de expressão.

Nas figuras 10A e B são mostrados os resultados do alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos dos clones de EVI-88 e Colorado-1 em pGEM-T easy enviados para seqüenciamento e amostras de BoHV-1.1 e BoHV-5, previamente depositadas no GenBank. Comparação feita entre a seqüência de nucleotídeos consenso obtida para os clones de BoHV-5 e a amostra SV 507/99 (Figura 10A) revelou uma única deleção (em destaque) para o isolado brasileiro EVI-88. A seqüência consenso de Colorado-1 mostrou substituições de nucleotídeos em alguns pontos de sua seqüência quando comparada à amostra CGEN (Figura 10B).

Após seqüenciamento dos clones em pQE-30, foi feito o alinhamento entre as seqüências das proteínas recombinantes obtidas com as seqüências de aminoácidos das amostras previamente depositadas no GenBank. Para a proteína recombinante de EVI-88 houve grande variação em sua seqüência de aminoácidos quando comparada à mesma região da proteína de SV 507/99. Essas modificações tiveram início no aminoácido 173 e continuaram até o final da seqüência obtida, com apenas a conservação de três aminoácidos nesse fragmento (Figura 11A).

Houve grande homologia entre a seqüência de aminoácidos da amostra de Colorado-1 com a amostra CGEN (Figura 11B), com apenas três substituições de aminoácidos.

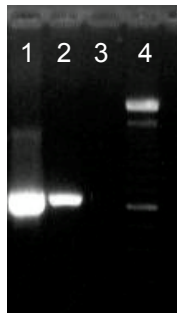
#### **4.4.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes**

Após subclonagem em vetor de expressão, as células foram induzidas e as proteínas fracionadas em SDS-PAGE. A Figura 12 mostra o perfil polipeptídico dos clones analisados, com as proteínas recombinantes de cada vírus visualizadas em posição acima de 30KDa, para os tamanhos preditos de 23 e 22 KDa para BoHV-1 e BoHV-5, respectivamente.

As proteínas recombinantes de BoHV-1.1 e BoHV-5, foram expressadas na forma de corpos de inclusão citoplasmáticos e, portanto, purificadas sob condições desnaturantes. Suas frações eluídas em tampão Uréia pH 5 e pH 6 foram visualizadas em SDS-PAGE (Figura 12). No tampão Uréia pH 4 era esperado um perfil de eluição mais puro do que o obtido para esse tampão em pH 5 e 6. Entretanto, algumas bandas de proteínas contaminantes foram visualizadas em SDS-PAGE das frações purificadas em pH 4. Em pH 2,7 foram obtidas as frações mais puras das proteínas recombinantes. Como o resultado da purificação das recombinantes obtidas em pH 5 e 6 foram similares em grau de pureza, essas frações foram misturadas e quantificadas, resultando em 0,466 $\mu$ g/ $\mu$ l para Colorado-1 e 0,376 $\mu$ g/ $\mu$ l para EVI-88. Em pH 2,7 foram obtidas as menores quantidades, com 0,074 $\mu$ g/ $\mu$ l para Colorado-1 e 0,116 $\mu$ g/ $\mu$ l para EVI-88.



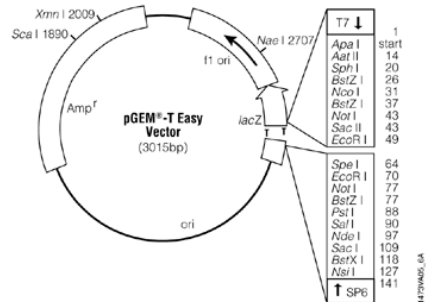




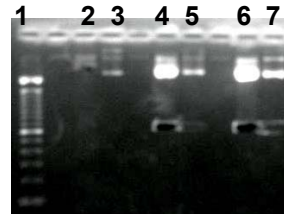
Amplificação parcial do gene codificador da glicoproteína G. Agarose 1,2%, gel corado com brometo de Etídeo

Canaletas:

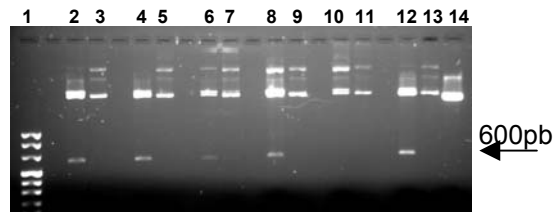
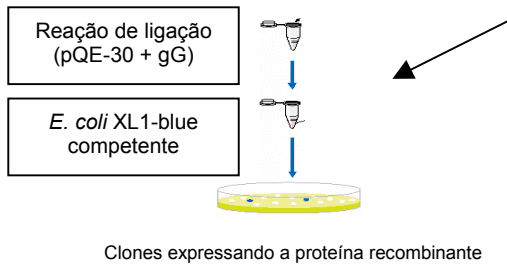
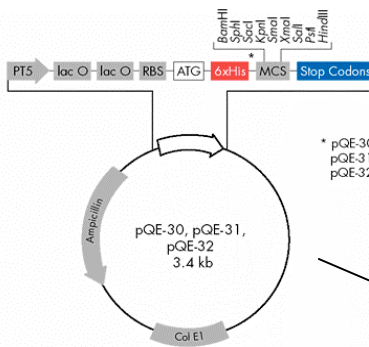
- 1- EVI-88/BoHV-5
- 2- Colorado/BoHV-1
- 3- Controle de mix
- 4- Padrão de tamanho molecular 100 bp ladder (INVITROGEN)



Clonagem "blunt-end" em pGEM-T easy (PROMEGA)



Restrição do vetor pQE-30 e dos clones positivos de gG/BoHV-5 e gG/BoHV-1 (pGEM-T) para subclonagem. Canaletas: 1- 100bp ladder (INVITROGEN); 2 e 3- pQE-30; 4 e 5- Clone de BoHV-1; 6 e 7- Clone de BoHV-5. Canaletas pares – restringido; Canaletas ímpares – não restringido. Restrição dupla com BamHI e Hind III. Inseto liberado recortado para subclonagem.



Restrição dos clones de pQE30 contendo os insertos da região codificadora parcial da gG de BoHV-1 e BoHV-5. Canaletas apresentado aos pares clone digerido e não digerido. Visualiza-se para a maioria dos clones a liberação do inserto de ~600pb após digestão com as enzimas BamHI e HindIII. Primeira e última canaletas: padrão de tamanho molecular (Phi/HindIII – INVITROGEN) e restrição do pBlue (controle da reação), respectivamente. Agarose 1,5% corada com brometo de etídeo.

Figura 9. Estratégia de clonagem em vetor pGEM T easy e subclonagem em vetor pQE-30, para expressão das proteínas recombinantes gG-BoHV-1 e gG-BoHV-5.



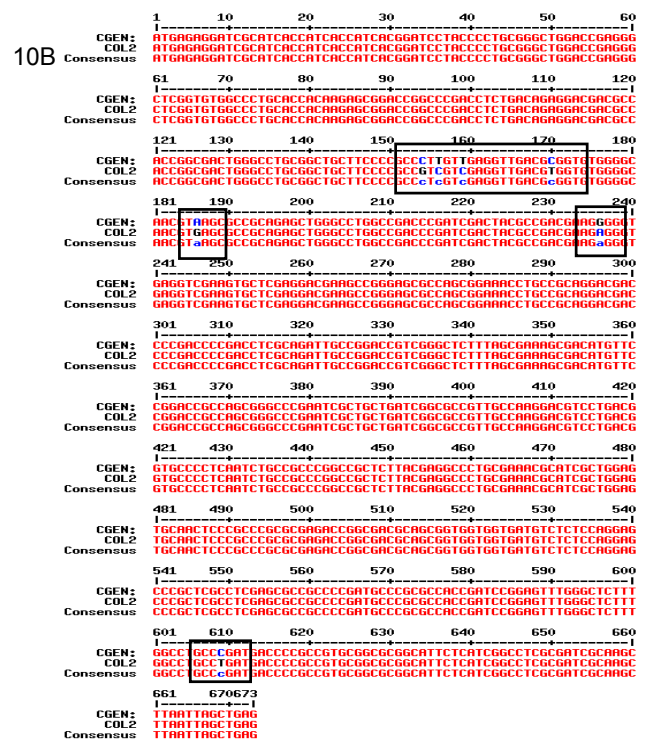
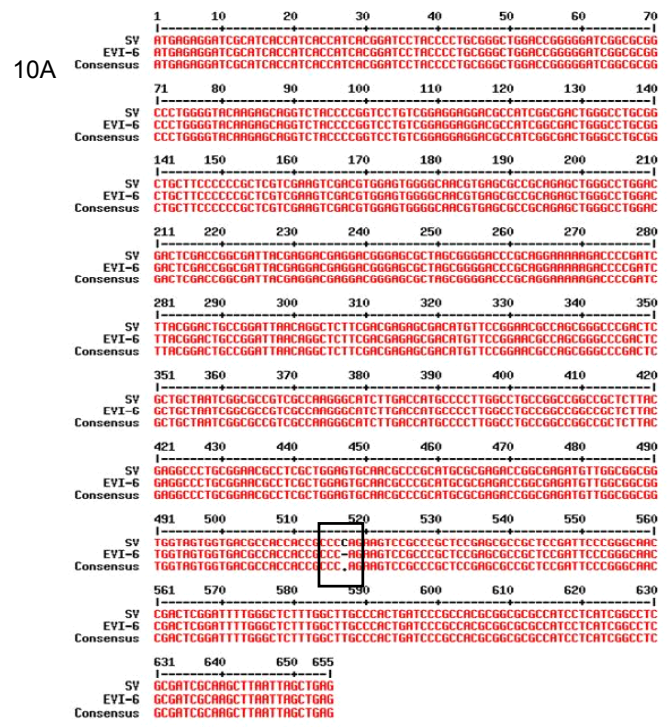


Figura 10. Alinhamento das seqüências parciais de nucleotídeos da glicoproteína G dos clones de BoHV-5 (10A) e BoHV-1 (10B) em vetor pGEM-T easy. Diferenças entre as amostras trabalhadas e seqüências-padrão previamente depositadas no GenBank estão em destaque.



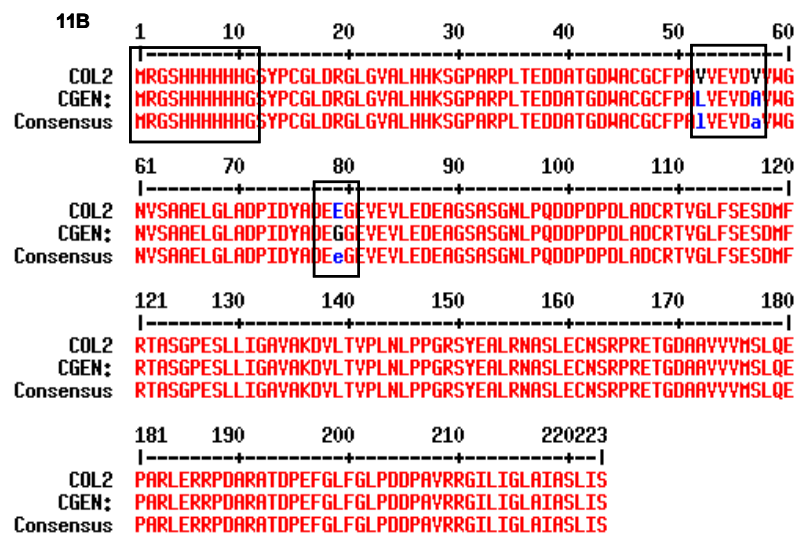
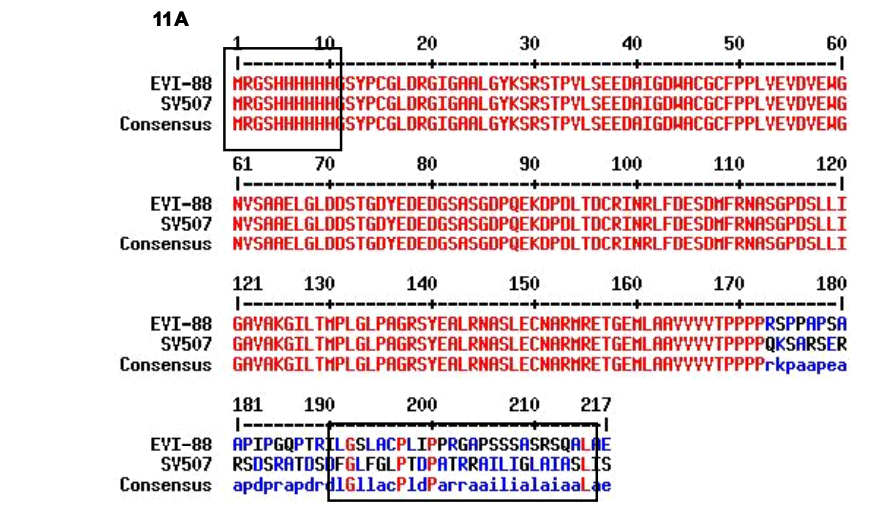
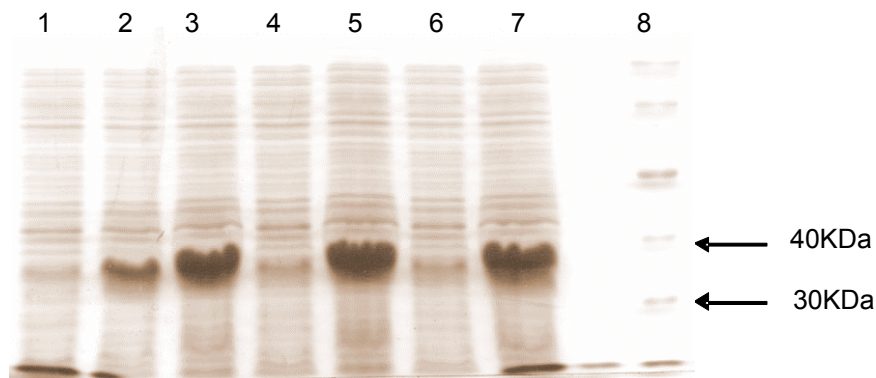
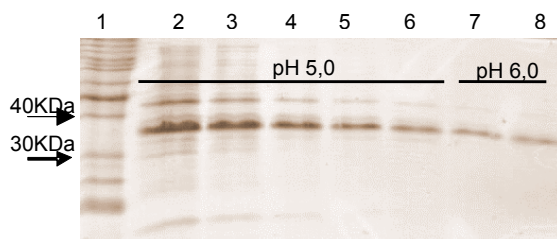


Figura 11. Alinhamento predito das seqüências de aminoácidos de BoHV-5 (11A) e BoHV-1 (11B) clonadas em vetor de expressão pQE-30. Diferenças entre as amostras trabalhadas e seqüências-padrão previamente depositadas no GenBank estão em destaque, bem como a cauda fusionada de histidina no início da seqüência.

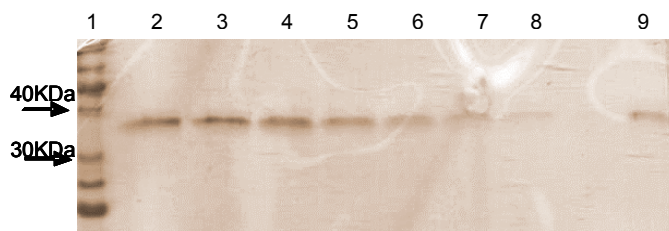




SDS-PAGE corado com comassie. Clones de BoHV-1 e BoHV-5 expressando a proteína esperada, antes da purificação. Canaletas 1, 4 e 6: bactéria antes da indução com IPTG. Canaleta 2: após 2 horas de indução. Canaletas 3, 5 e 7: após 4 horas de indução. Canaleta 8: Padrão de peso molecular (BenchMark™ Ladder - INVITROGEN).



Clone pQE30 /gG Colorado – BoHV-1. Purificação em colunas de quelato de níquel. Canaleta 1: Padrão de peso molecular (BenchMark™ Ladder - INVITROGEN). Canaletas 2 a 6: eluição em tampão Uréia 8M pH 5. Canaletas 7 e 8: eluição em tampão Uréia 8M pH 6.



Clone pQE30 /gG EVI-88 – BoHV-5. Purificação em colunas de quelato de níquel. Canaleta 1: Padrão de peso molecular (BenchMark™ Ladder - INVITROGEN). Canaletas 2 a 5: eluição em tampão Uréia 8M pH 5. Canaletas 6 a 8: eluição em tampão Uréia 8M pH 6. Canaleta 9: eluição em tampão Guanidina 6M/ Ácido Acético 0,2M pH 2,7.

Figura 12. Expressão das proteínas recombinantes gG de BoHV-1 e BoHV-5 fusionadas à cauda de histidina. A purificação foi feita em coluna de quelato de níquel e a eluição efetuada em diferentes pHs conforme apontado na figura. Para os clones analisados, o melhor pH de eluição foi entre 5 e 6, sendo que houve purificação parcial também no pH2,7, porém, com menor rendimento total.





#### 4.4.4 ELISA Indireto – Proteínas Recombinantes

O resultado do ensaio de ELISA indireto padronizado para as proteínas recombinantes em comparação com a SN e o ELISA comercial, frente aos antígenos de BoHV-1 e BoHV-5, é mostrado na Tabela 6. Os valores de acurácia desse teste foram

baixos tanto em comparação à SN quanto ao ELISA IDEXX. A especificidade verificada para a recombinante de BoHV-1 frente aos dois testes mostrou-se alta. O valor de  $\chi^2$  foi calculado e todas as análises foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), excetuando os resultados da recombinante de BoHV-5 versus ELISA comercial IDEXX.

Tabela 6 Dados comparativos do ELISA padronizado com os antígenos recombinante e os testes de soroneutralização viral (SN) e ELISA comercial ( $p < 0,05$ ).

Testes	IDEXX X SN	ELISA Indireto X SN		ELISA Indireto X IDEXX	
Valores (%) / Antígenos	BoHV-1	recgG/1	recgG/5	recgG/1	recgG/5*
Sensibilidade	88,2	50	43,8	47,1	
Especificidade	87,1	93,5	81,8	90,3	
Acurácia	87,7	70,8	63,1	67,7	
VPP	88,2	89,5	70	84,2	
VPN	87,1	63	60	60,8	

(\* $p > 0,05$ )

Um primeiro ponto a ser ressaltado é que um dos objetivos principais deste trabalho foi buscar o desenvolvimento de ferramentas sorológicas que conseguissem minimizar a resposta cruzada. Os dados acessados para os ELISAs preparados com os antígenos de vírus completo, bem como o ELISA comercial IDEXX, mostraram que os testes desenvolvidos são bons, mas, não diminuem significativamente a leitura da resposta cruzada. Para o ELISA recgG/BoHV-1 a especificidade foi bastante alta e a sensibilidade não. Pode ser especulado que alguns dos soros “reconhecidos” como sororeativos nos testes anteriores foram reconhecidos com maior eficácia neste último teste. Para o ELISA recgG/BoHV-5 os resultados não foram bons, sendo evidenciado pela ausência de significado estatístico quando da análise do ponto de corte pelo teste  $\chi^2$ .

Ambas as recombinantes foram produzidas em condições desnaturantes, e, este é o

protocolo realmente mais adequado quando a proteína é produzida na forma de corpúsculos de inclusão. Porém, mesmo com rendimento abaixo do esperado, será necessário, na continuação deste trabalho, produzi-las novamente em condições nativas, para averiguar se haverá melhora ou não de detecção e valores de especificidade e sensibilidade.

No caso da recgG/BoHV-5 um fato que chamou bastante a atenção após o seqüenciamento dos diferentes clones, foi a verificação da diferença entre a proteína teórica predita e a recombinante realmente produzida. Nesta última, à partir do aminoácido de número 172 (do total de 217 aa) a proteína produzida (predição via nucleotídeo) apenas guardou identidade com a amostra SV507 (padrão mundial de BoHV-5 – único genoma completo depositado no GenBank) em 4 aminoácidos, sendo 1 glicina, 2 prolínas e 1 leucina (Figura 11A). Durante o trabalho, vários

clones de BoHV-5 foram seqüenciados no sentido senso e antisenso, tendo a seqüência consenso sempre mostrado a deleção de uma base (Figura 10A). Durante o desenvolvimento desta tese, outros estudos de caracterização de amostras brasileiras de herpesvírus bovinos foram conduzidos no LABMIC, e, muitas seqüências geradas apresentaram a mesma deleção aqui mostrada em relação à amostra SV – 507, portanto, a não reatividade observada pode estar mais relacionada à necessidade de epitopo conformacional que à diferença entre as seqüências. Por isto, novos experimentos com a expressão em condições nativas poderão responder esta questão.

#### **4.5 Peptídeos Sintéticos**

##### **4.5.1 Estudo Teórico da Glicoproteína C de BoHV-1 e BoHV-5**

Na Figura 13 é mostrado o alinhamento das seqüências protéicas da glicoproteína C de BoHV-1 e BoHV-5, com sua região amino-terminal extremamente variável entre os dois herpesvírus bovinos. Em detalhe, a região escolhida para a síntese dos peptídeos (gC1 e gC5). Os perfis hidrofóbicos mostram, na mesma figura, os picos hidrofílicos proeminentes que representam a região escolhida para a síntese dos peptídeos gC1 e gC5. A análise dos peptídeos sintetizados foi feita em HPLC e espectrometria de massa. Os gráficos são mostrados na Figura 13.

##### **4.5.2 ELISA Indireto – Peptídeos**

Os peptídeos adsorvidos às placas comerciais, em todas as concentrações testadas, geraram resultados insatisfatórios no ELISA indireto, utilizando os mix anti-BoHV-1 e BoHV-5. Valores de D.O. entre 0,25 - 0,35 (próximos aos valores de D.O.

obtidos para o controle de conjugado - 0,100) foram obtidos para todas as concentrações de peptídeos usadas nos ensaios de ELISA. Por esse motivo, não foi dado prosseguimento ao experimento de validação do teste pela soroteca A. Entretanto, esses resultados serviram de comparação para os experimentos desenvolvidos com as matrizes híbridas como suporte sólido em ensaio de ELISA.

Alguns fatores poderiam ter contribuído para esses resultados: 1. os peptídeos sintéticos, ao adsorverem no suporte sólido, poderiam não ter adotado a mesma conformação do epitopo natural na glicoproteína C, não sendo, portanto, reconhecidos pelos soros-teste; 2. a ausência de uma molécula ligante para direcionar a ligação dos peptídeos ao suporte sólido também poderia refletir diretamente nos requisitos de conformação da molécula. Além disso, o peptídeo gC5 contém cinco resíduos do aminoácido prolina. Esses aminoácidos geralmente estão implicados na formação de folhas  $\beta$ , “loops” e “coils” aleatórios (Lehmann *et al.*, 2004). Portanto, peptídeos ricos em prolina podem adotar múltiplas conformações de dobramentos semi-estáveis (Shin *et al.*, 2002), reforçando o que foi dito anteriormente. Chowdhury (1997) verificou para a região entre os resíduos 108 a 118 da gC de BoHV-1 uma forte conformação de folhas  $\beta$ . Esse também foi o fragmento escolhido para a síntese dos peptídeos desse estudo. Esse autor obteve bons resultados em um ELISA competitivo por inibição entre o vírus purificado e um peptídeo sintético abrangendo essa região. Entretanto, todo o teste foi desenvolvido apenas com anticorpos monoclonais e não há informação no trabalho se houve a adição ou não de um agente ligante para orientar a ligação do peptídeo ao suporte sólido.





## 4.6 Biomateriais

### 4.6.1 Caracterização das Matrizes Híbridas

Os híbridos resultantes da modificação dos PVAs com os silanes e reticulados quimicamente com glutaraldeído formaram discos com diâmetro de aproximadamente 5mm e peso de  $10 \pm 2$ mg. Em sua grande maioria, apresentaram transparência ótica com coloração levemente amarelada. A Figura 14A mostra uma representação esquemática do processo de reticulação química e formação dos híbridos com os agentes silane modificadores. Os híbridos formados de PVAs e alcoxissilanes, sem a presença do agente reticulador, formaram filmes transparentes ou de coloração levemente esbranquiçada.

Nas Figuras 14B e 14C são mostrados os híbridos resultantes do PVA 107 e PVA KM118 modificados pelo grupo glicidil (PVA 107/GPTMS; PVA KM 118/GPTMS) e reticulados com GA (PVA 107/GA/GPTMS; PVA KM 118/GA/GPTMS).

### 4.6.2 Caracterização das Matrizes Híbridas por Espectroscopia FTIR

A espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR) pode ser usada para a identificação e caracterização de compostos orgânicos, inorgânicos e poliméricos (Evora *et al.*, 2002). A espectroscopia FTIR une a informação sobre as estruturas químicas específicas e sua orientação obtidas pelo infravermelho direcionada para a análise da superfície dos materiais, ou seja, ela aumenta a intensidade do sinal da superfície e reduz o sinal do restante do material ("bulk").

Neste estudo, o espectro gerado pela espectroscopia FTIR do PVA Celvol 107 puro e usado como referência é mostrado na Figura 15. Os principais picos associados ao álcool polivinílico são representados no espectro por uma ampla banda contendo grupos alkyl (C–H) ( $\nu = 2850 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ ), bandas típicas de grupos –OH livres ( $\nu = 3600 - 3650 \text{ cm}^{-1}$ ) e bandas representadas por pontes de hidrogênio ( $\nu = 3700 - 3570 \text{ cm}^{-1}$ ). Outra banda típica desse polímero foi

observada na faixa de absorção de  $\nu = 1142 \text{ cm}^{-1}$ , relacionada ao grupo carboxila (C–O). O mesmo espectro foi gerado para o PVA KM 118 (dados não mostrados).

A Figura 16 mostra o espectro obtido para o híbrido de PVA modificado pela funcionalização do tiol (MPTMS), após reticulação química com GA (PVA 107/GA/MPTMS). Observa-se que dois picos de vibração principais (Si–O–Si,  $\nu = 1080$  e  $450 \text{ cm}^{-1}$ ; Si–OH,  $\nu = 950 \text{ cm}^{-1}$ ) estão associados às reações de hidrólise e condensação do precursor polisiloxane, somadas à solução de PVA. Picos de absorção na região entre  $\nu = 1260$  a  $1200 \text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas às pontes de silane-alkyl, indicando alguma formação de estrutura híbrida orgânica-inorgânica. O pico característico dos grupos mercapto foi medido entre  $\nu = 2600 - 2550 \text{ cm}^{-1}$ . A frequência de absorção resultante da formação do híbrido (PVA/GA/MPTMS) na faixa de vibração dos grupos hidroxila do PVA puro foi medida como uma banda mais ampla, entre  $\nu = 3000$  e  $3650 \text{ cm}^{-1}$ . Esse resultado deve-se, provavelmente, às reações sol-gel do organotrialkoxysilane que alterou, portanto, a estrutura tridimensional das cadeias do PVA.

A reticulação química do PVA com glutaraldeído foi observada em dois picos principais medidos em  $\nu = 2860 \text{ cm}^{-1}$  e  $\nu = 2730 \text{ cm}^{-1}$  referentes à vibração do grupo C–H. Após reticulação com GA, o pico de absorção ( $\nu = 3330$  e  $3350 \text{ cm}^{-1}$ ) do grupo –OH foi relativamente diminuído quando comparado ao espectro do PVA puro. Isso é devido ao enfraquecimento das pontes de hidrogênio no PVA reticulado, uma vez que há uma diminuição no número de radicais –OH e formação de acetal (C=O). Isso comprova, portanto, que o glutaraldeído atuou como um agente reticulador entre as cadeias de PVA.

Portanto, a espectroscopia FTIR revelou que o procedimento experimental desenvolvido nesse trabalho foi bem sucedido, com a obtenção de estrutura orgânica-inorgânica do híbrido baseado em PVA. Espectros foram obtidos para os demais híbridos (dados não mostrados).



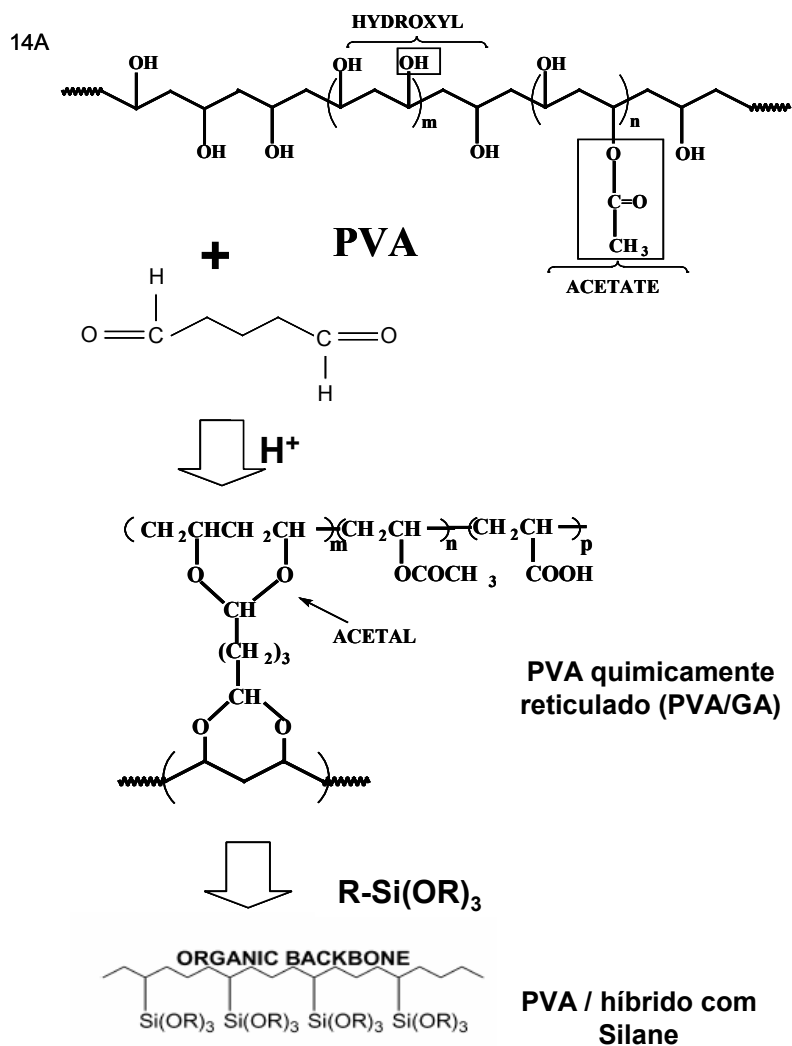


Figura 14. A. Representação esquemática do processo de reticulação química e formação dos híbridos com os agentes silane modificadores. B. Híbridos resultantes do PVA 107 modificado pelo grupo glicidil (PVA 107/GPTMS - filme) e reticulado com GA (PVA 107/GA/GPTMS - disco). C. Híbridos resultantes do PVA KM 118 modificado pelo grupo glicidil (PVA KM 118/GPTMS - filme) e reticulado com GA (PVA KM 118/GA/GPTMS - disco).





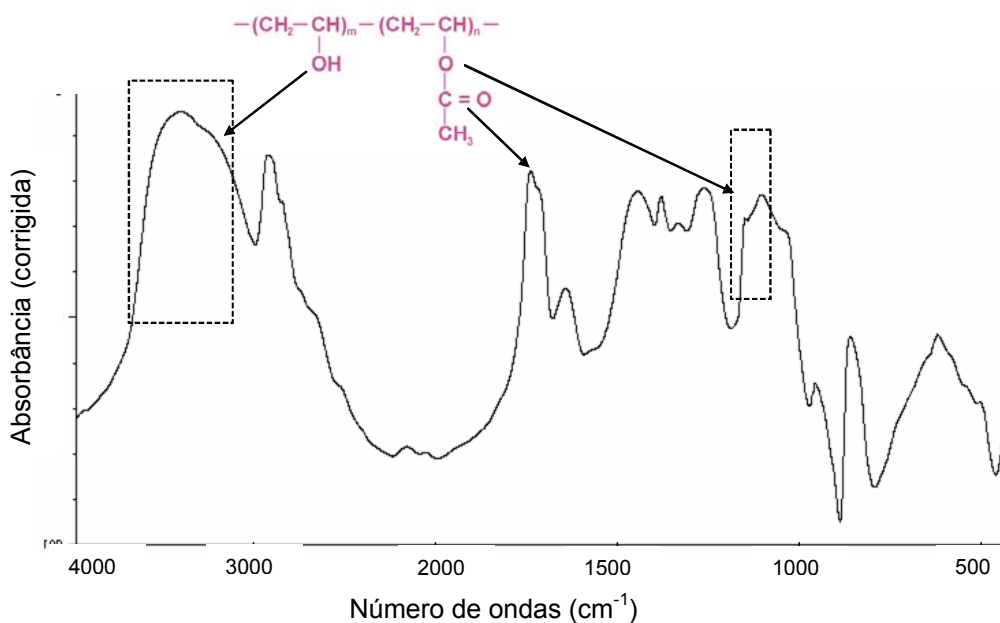


Figura 15. Espectro FTIR do polímero de PVA Celvol 107 puro usado como referência. Estrutura química do PVA mostrando os principais picos de vibração, representados pelos grupos álcool e acetato.

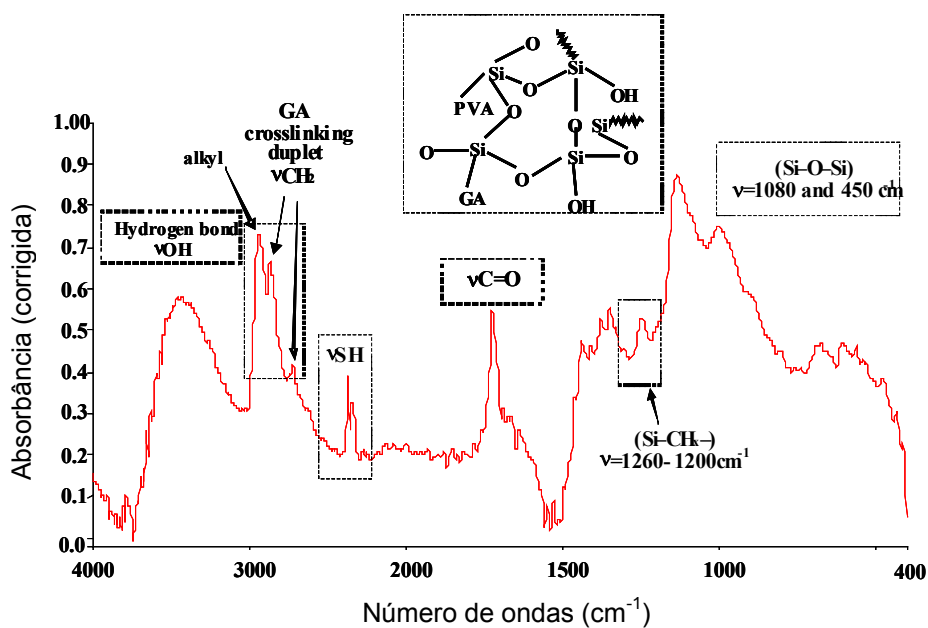


Figura 16. Espectro FTIR do híbrido de PVA modificado pelo grupo mercapto, seguido por reticulação química com glutaraldeído (PVA/MPTMS/GA). O inserto mostra a representação esquemática da matriz híbrida baseada em PVA, silane e reticulação química.



No espectro obtido para a amostra de BoHV-1.1 bioimobilizada na matriz híbrida, foram observadas as principais bandas de vibração da amida, com ligações protéicas típicas indicadas nas regiões de absorção das amidas I, II e III (Figura 17). Segundo Chittur (1998), as bandas de amidas I e II são as principais bandas relacionadas a proteínas no espectro do infravermelho. A banda de amida I ( $\nu = 1600$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$ ) está principalmente associada à faixa de vibração do grupo C=O (70 a 85%) e está diretamente relacionada à conformação da estrutura protéica. A amida II resulta da vibração do grupo N-H (40 a 60%) e do grupo C-N (18 a 40%). A banda de amida III

é usualmente fraca na espectroscopia FTIR mas pode ser encontrada na região de  $\nu = 1250$  a  $1350\text{ cm}^{-1}$ .

Um maior efeito observado na região de  $\nu = 2800$  a  $3500\text{ cm}^{-1}$ , provavelmente, está correlacionado à presença de glicoproteínas expostas do vírus, contribuindo fortemente para a vibração de grupos amina (-NH), além da presença de anéis orgânicos cíclicos e resíduos aromáticos. As mesmas análises foram feitas para o antígeno de BoHV-5 e confirmaram que ambos foram incorporados às redes híbridas baseadas em PVA.

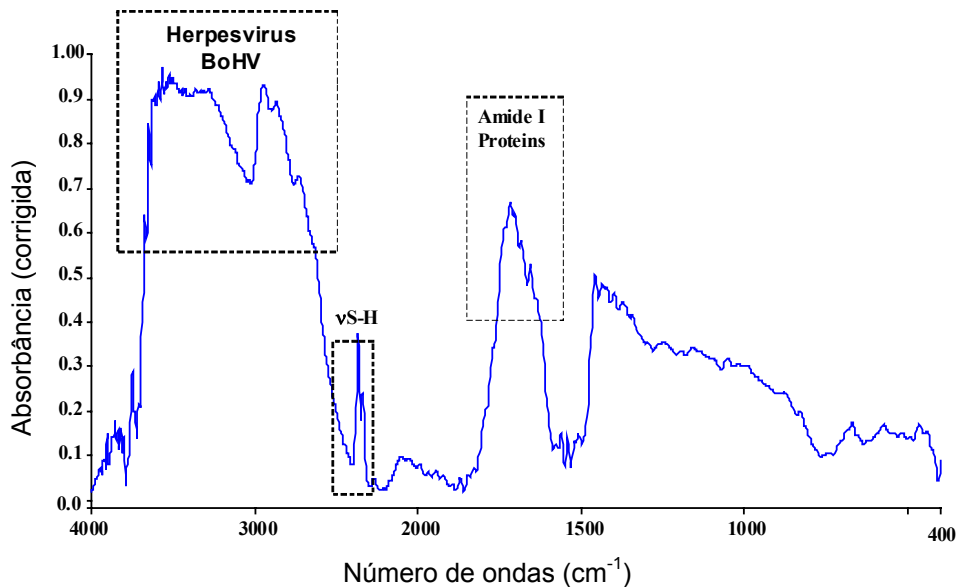


Figura 17. Espectro FTIR mostrando a incorporação do BoHV-1.1 na matriz híbrida (PVA/MPTMS/GA/BoHV-1.1)



#### 4.6.3 ELISA Indireto – Biomateriais

Um dos objetivos desse trabalho foi melhorar a sensibilidade e especificidade do ensaio de ELISA com os antígenos produzidos, incorporando-os em matrizes híbridas com grupos funcionais expostos em sua superfície versus sua adsorção em suporte sólido comercial.

Após sensibilização dos biomateriais e suporte sólido com os antígenos virais purificados foi feito o teste de ELISA indireto com os mix anti-BoHV-1 e BoHV-5. A Figura 18A mostra o antígeno de BoHV-1 incorporado em todos os biomateriais e suporte sólido versus as respostas obtidas pelos dois mix de anticorpos. Das 28

matrizes híbridas testadas, 10 (35,7%) apresentaram melhor seletividade e mecanismo de reconhecimento específico com o BoHV-1, comparada àquela obtida para o suporte sólido comercial. Destes 10 suportes híbridos, 7 (70%) são baseados no PVA KM 118 e 3 (30%), no PVA 107. Observa-se que, em comparação com a placa comercial (Falcon-PVC), as matrizes compostas principalmente pelo PVA KM 118/GA, KM 118/GA/APTES, KM 118/APTES e PVA 107/GA/APTES, 107/ISOCYPTES, elevaram de 18% a 30%, a resposta de reconhecimento específico do mix1 com o antígeno de BoHV-1. Esse aumento no reconhecimento específico foi transformado em porcentagem através da fórmula

$$E = \frac{\text{D.O. do soro homólogo} - \text{D.O. do soro}}{\text{D.O. do soro homólogo}}$$

onde, E = especificidade de reconhecimento. Na Figura 18B são mostrados os valores, em porcentagem, para o aumento na especificidade do teste obtidos com a bioimobilização do BoHV-1 às matrizes híbridas.

A análise anterior foi verificada para o antígeno de BoHV-5 (Figura 19A), onde 7 suportes híbridos dentre os 28 (25%), apresentaram melhor seletividade e especificidade com o antígeno de BoHV-5. Apenas 2 híbridos (14,3%) baseados nas matrizes PVA KM 118 favoreceram essa relação, enquanto 5 matrizes compostas por PVA 107 (35,7%) melhoraram a especificidade do teste quando comparados à placa comercial. Os híbridos formados pelo PVA KM 118/MPTMS e os PVAs 107/APTES e 107/GA/MPTMS aumentaram, aproximadamente, em 20% a especificidade de reconhecimento do BoHV-5 pelo mix5 quando comparado ao valor obtido para o

suporte sólido comercial (Figura 19B). Esses dados mostraram uma tendência clara de que para o antígeno de BoHV-1, os híbridos baseados em PVA KM 118 geraram os melhores resultados, enquanto que para BoHV-5 o ganho em especificidade de reconhecimento foi devida, principalmente, aos híbridos baseados no PVA 107.

Para tentar explicar essa tendência foram computados o número de aminoácidos que favorecem a ocorrência de interações iônicas (aminoácidos polares com cargas negativas e positivas) e aqueles que favorecem ligações hidrofílicas e hidrofóbicas, gerando um balanço total do caráter hidrofílico e hidrofóbico apresentado pelas glicoproteínas do envelope viral de BoHV-1 e BoHV-5 (Tabela 7). Nessa tabela também são apresentados esses números para as proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos.

Tabela 7 Análise de aminoácidos / cargas iônicas do total de glicoproteínas de BoHV-5 e BoHV-1 (glicoproteínas K, N, C, B, H, M, L, G, D, I e E ), parte da glicoproteína G produzida em E.coli durante este trabalho e peptídeos sintetizados (gC de BoHV-1 e BoHV-5).

Aminoácidos	Antígenos		recgG/		Peptídeo	Peptídeo
	BoHV-5*	BoHV-1**	BoHV-5	BoHV-1	gC/ BoHV-5	gC/ BoHV-1
Aminoácidos polares carga negativa (favorecem força iônica – atração eletrostática entre cargas opostas)	506	491	30	38	2	1
Aminoácidos polares carga positiva (favorecem força iônica – atração eletrostática entre cargas opostas)	524	508	17	17	0	3
Número de Glicina + Glutamina (favorecem Força de Van Der Waals – ligações hidrofóbicas)	536	521	25	24	1	4
Número de Tirosina + Asparagina (favorecem Pontes de Hidrogênio – ligações hidrofílicas)	265	279	7	8	0	1

\* BoHV-5 genoma completo. *GenBank* Acesso AY261359.

\*\* BoHV-1 genoma completo. *GenBank* Acesso NC\_001847.

Observa-se que as partículas virais de BoHV-1 apresentam um caráter ligeiramente mais hidrofílico do que o BoHV-5, o que poderia explicar o maior número de matrizes híbridas baseadas no PVA KM 118 com maior seletividade e especificidade de reconhecimento para o BoHV-1. Esse polímero possui grupos carboxila entremeados em sua molécula, o que o torna mais hidrofílico do que o PVA 107. A presença do grupo carboxila favorece as ligações de grupos amina presentes nas

proteínas virais ou nas cadeias laterais de vários aminoácidos com caráter hidrofílico. Quando em solução o PVA KM 118 apresenta característica aniônica, o que é diferente do PVA 107 que possui poucas cargas distribuídas em sua molécula. Essas cargas resultantes da solubilização do polímero de PVA KM 118 poderiam, então, favorecer a ocorrência de ligações iônicas, por meio de atrações entre cargas opostas ou poderiam atuar como uma força de repulsão entre cargas iguais.

ELISA Biomateriais x PVC-Falcon - Antígeno BoHV-1 (250ng) e anticorpos diluídos 1/100

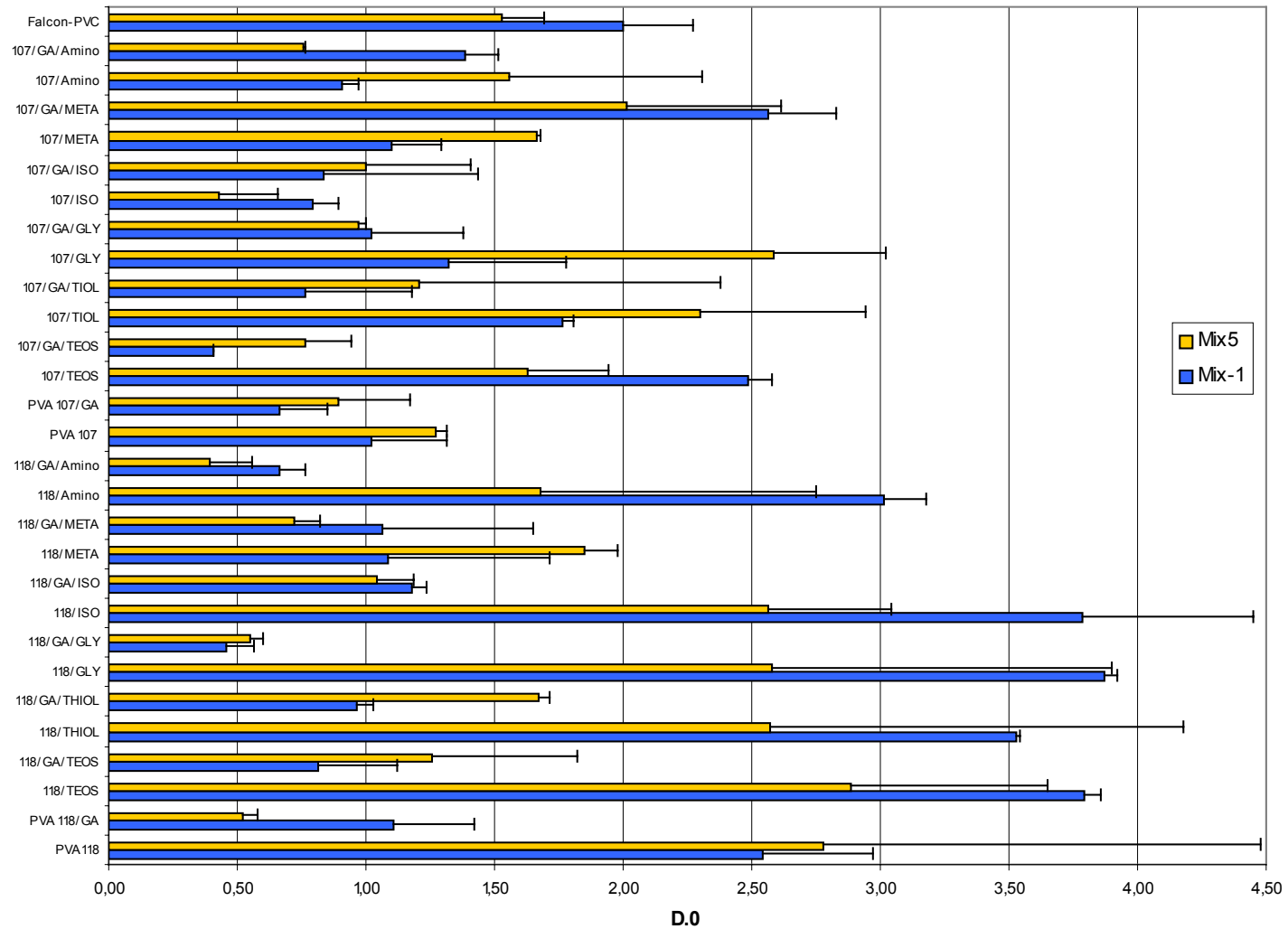


Figura 18A. Antígeno de BoHV-1 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5.





Aumento da especificidade de reconhecimento do antígeno viral de BoHV-1 pelos anti-soros mix 1 e mix 5 em diferentes biomateriais.

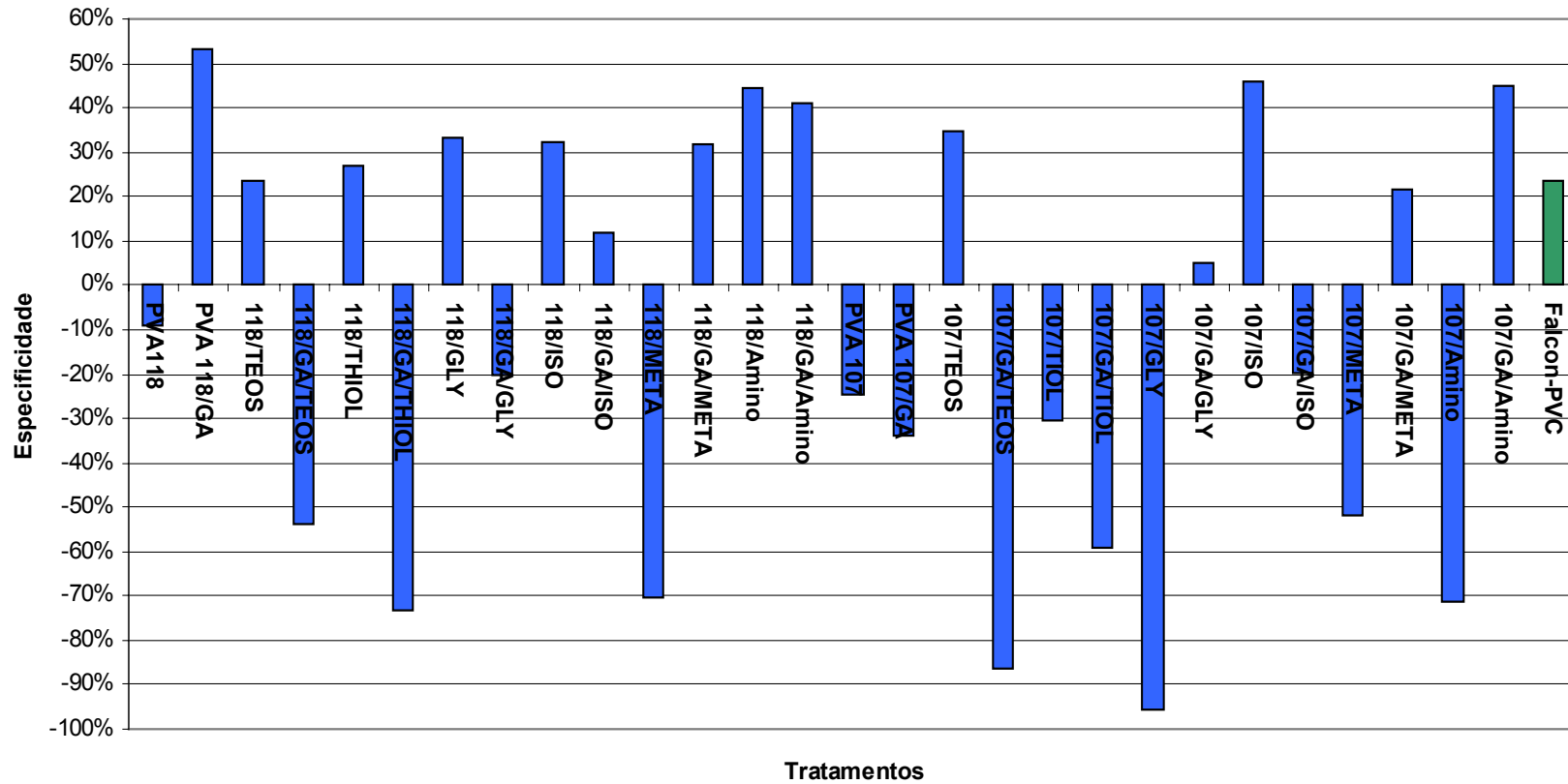


Figura 18B. Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial.



ELISA biomateriais x PVC-Falcon - Antígeno viral BoHV-5 (250ng) x soros diluídos 1/100.

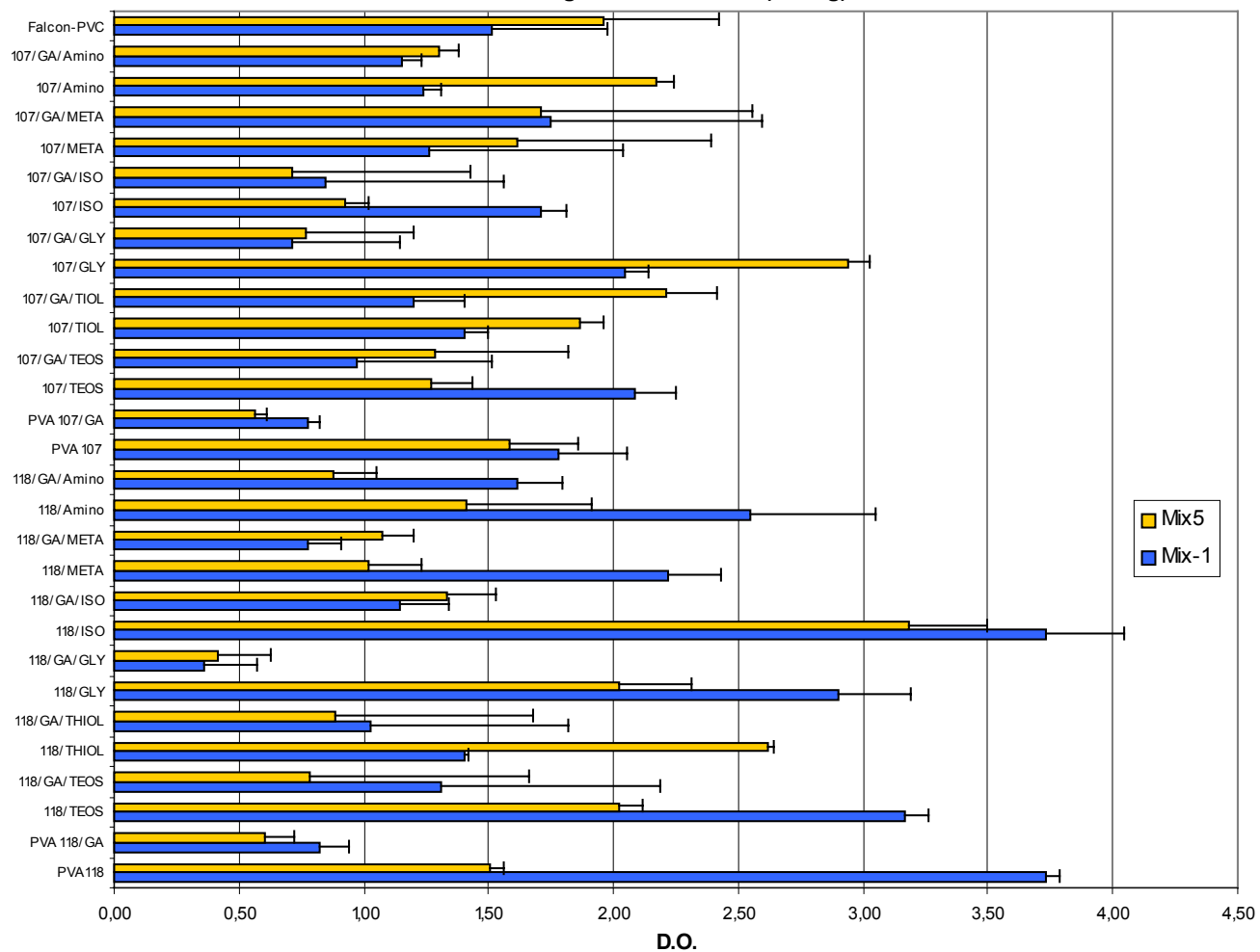


Figura 19 A. Antígeno de BoHV-5 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5.



Aumento da especificidade de reconhecimento do antígeno viral de BoHV-5 pelos anti-soros mix 1 e mix 5 em diferentes biomateriais.

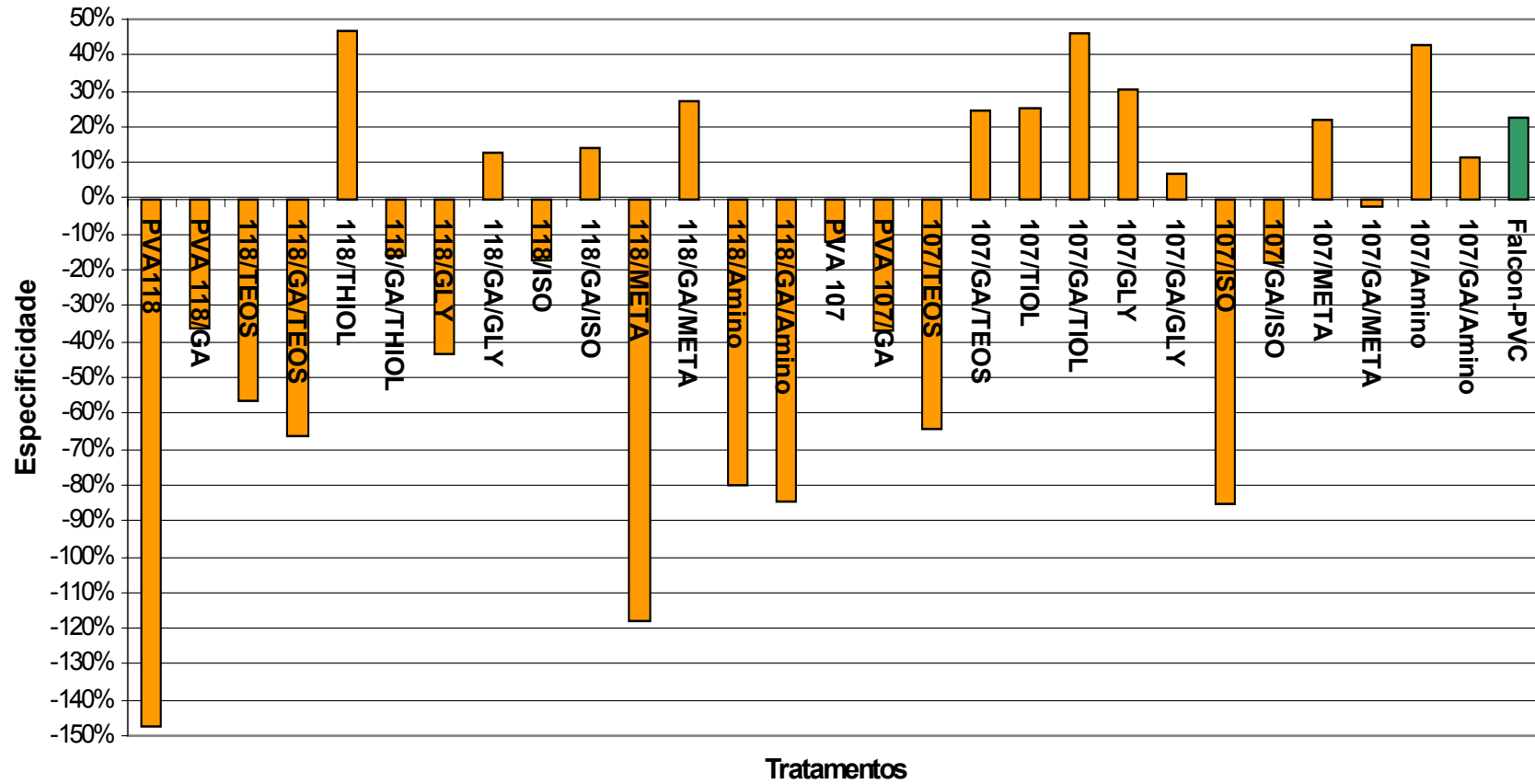


Figura 19 B. Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial.



Nesse ensaio, o PVA KM 118, reticulado com GA, apresentou o maior valor de reconhecimento específico para o antígeno de BoHV-1 quando triado pelo mix1 quando comparado à Falcon-PVC. Os outros dois híbridos com aumento desse valor para BoHV-1 foram modificados pelo grupo amino (APTES) que possui também caráter hidrofílico. Os híbridos baseados no PVA 107 foram representados apenas por três matrizes híbridas com maior especificidade de reconhecimento do mix1 pelo antígeno de BoHV-1. Entretanto, observa-se que todos os grupos químicos modificadores da superfície do PVA possuem características que favorecem ligações hidrofílicas.

Os antígenos de BoHV-5, por sua vez, possuem caráter ligeiramente mais hidrofóbico do que o BoHV-1 (Tabela 7). Como para BoHV-1, o número de aminoácidos com cargas positivas é também mais elevado do que o número de aminoácidos com cargas negativas, na mesma proporção para ambos os vírus. Uma inversão nítida do que ocorreu com o BoHV-1 foi verificada para esse antígeno. A melhor seletividade e especificidade de reconhecimento do antígeno de BoHV-5 com o mix5 foi devido, principalmente, aos híbridos baseados no PVA 107, modificados, em sua maioria, por grupos que favorecem interações hidrofóbicas. Os dois híbridos do PVA KM 118 que aumentaram significativamente essa relação de especificidade foram também

modificados por grupos com caráter hidrofóbico.

Os resultados comparativos entre a proteína recombinante de BoHV-1 imobilizada nos biomateriais e placa comercial são mostrados na Figura 20A (recgG/BoHV-1). O aumento no reconhecimento específico da recgG/BoHV-1 pelo mix1 foi observado somente para a matriz híbrida PVA 107/ISOCYPTES (grupo isocianato), com um aumento, em porcentagem, na especificidade de 20% comparada à placa comercial (Figura 20B). Para a recgG/BoHV-5 os dados do ELISA indireto são mostrados na Figura 21A. Vários materiais proporcionaram um aumento na especificidade do teste quando comparados à placa comercial (Figura 21B). Entre as 28 matrizes híbridas, 8 (28,6%) aumentaram a especificidade de reconhecimento, com 4 híbridos (28,6%) baseados no PVA KM 118 e 4 híbridos (28,6%) representados pelo PVA 107. Foi obtido um aumento de 25 a 50% na especificidade de reconhecimento, em comparação com o suporte sólido comercial, para o KM 118, reticulado com GA e funcionalizado por TEOS, MAPTMS e APTES. Um aumento de 20 a 40% na especificidade foi encontrada para o PVA 107 modificado por TEOS, MAPTMS e GPTMS. Entretanto, esse resultado deve ser considerado com cautela, uma vez que o ELISA indireto da recgG/BoHV-5 em suporte sólido comercial não apresentou dados estatisticamente significativos.





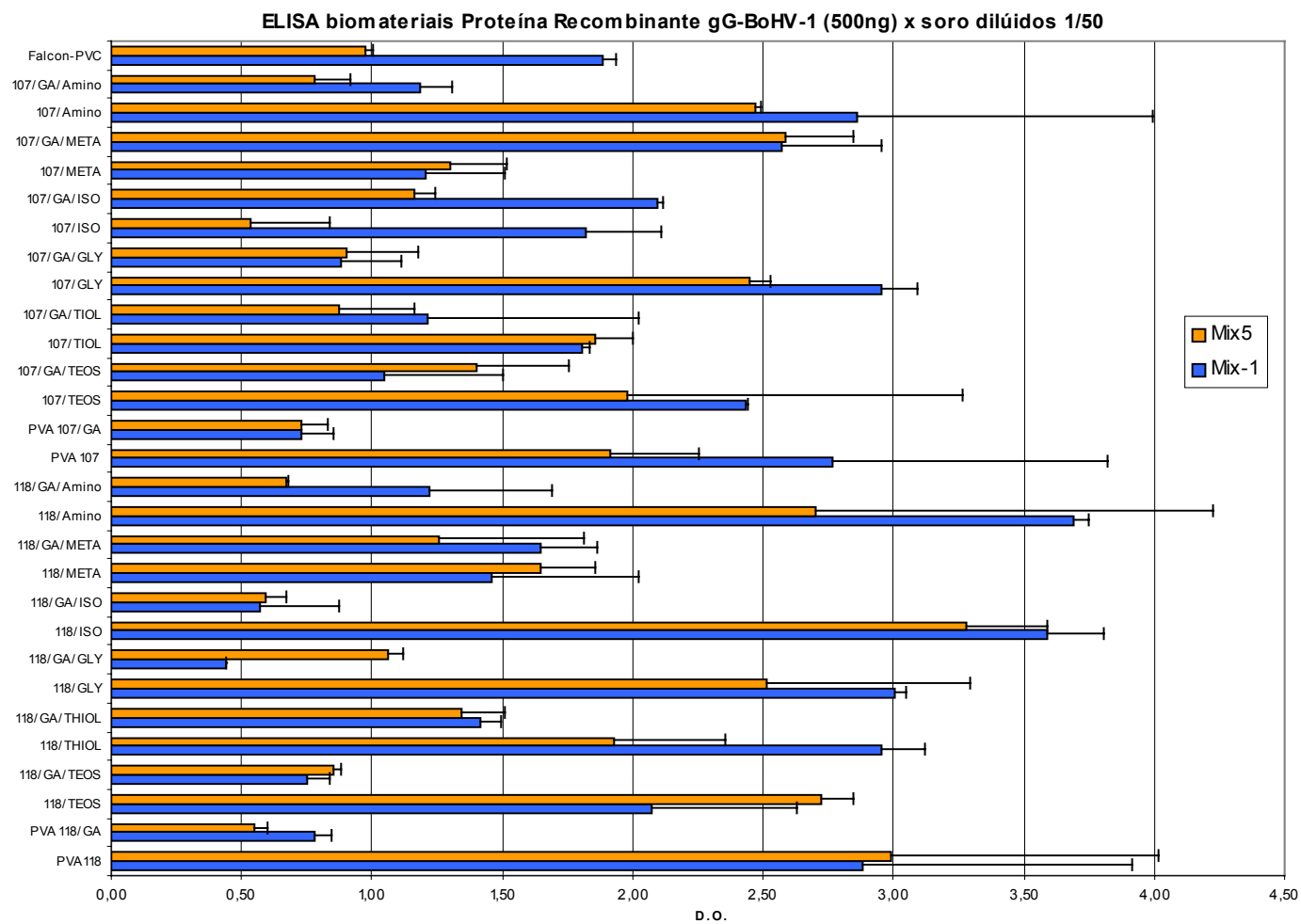


Figura 20A. Antígeno recombinante gG-BoHV-1 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5.



Aumento da especificidade de reconhecimento da proteína recombinante gG/BoHV-1 pelos anti-soros mix 1 e mix 5 em diferentes biomateriais.

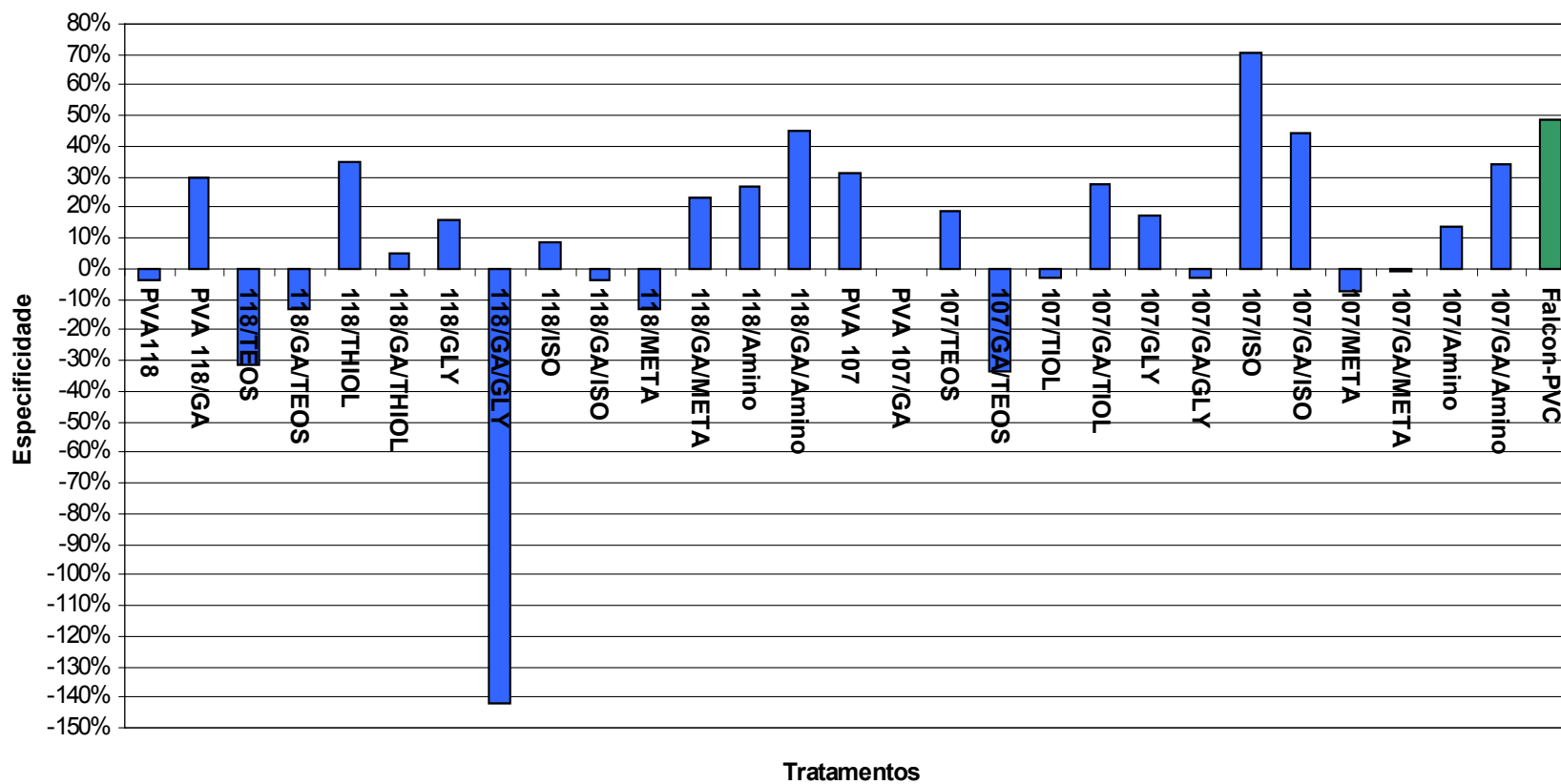


Figura 20B. Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial.



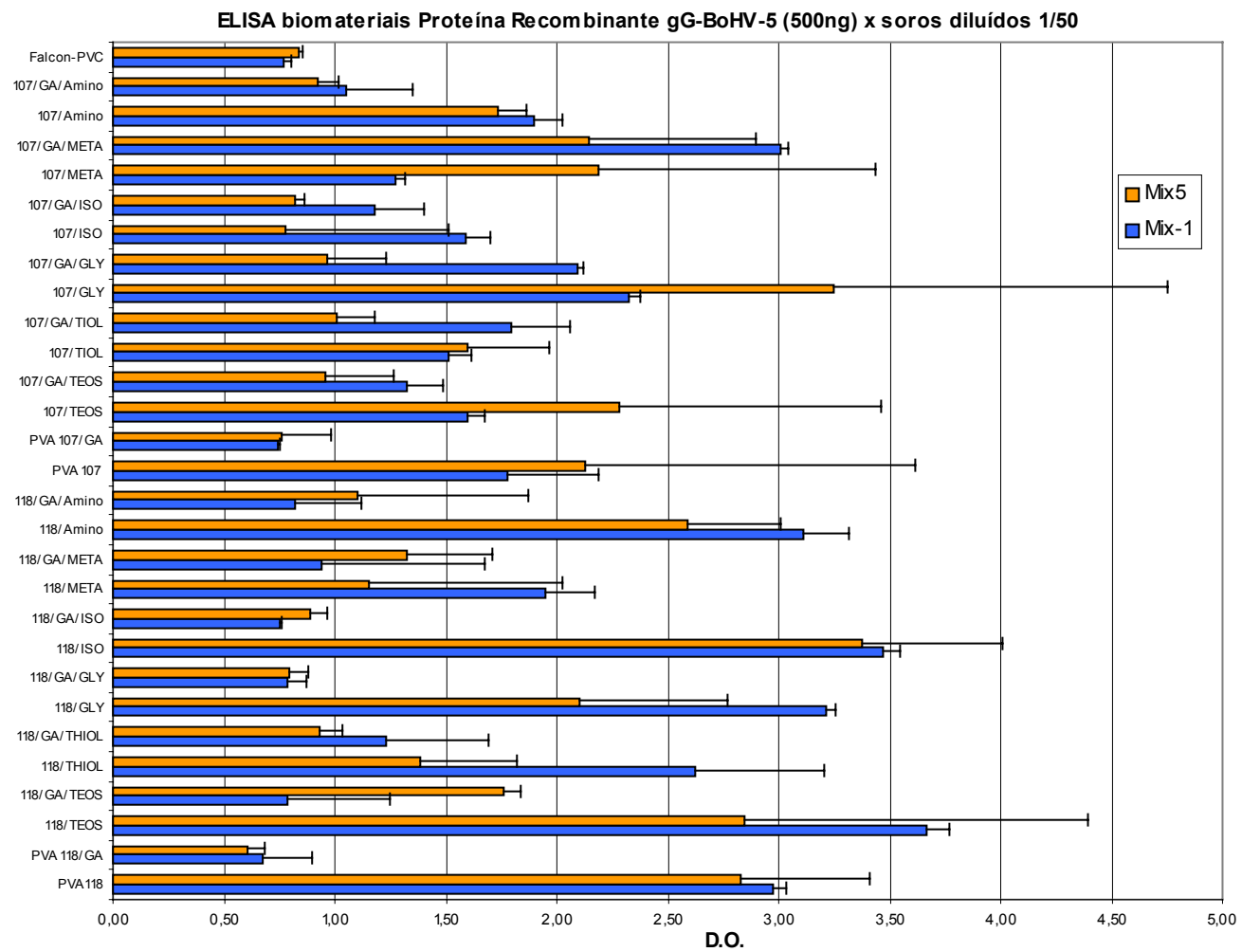
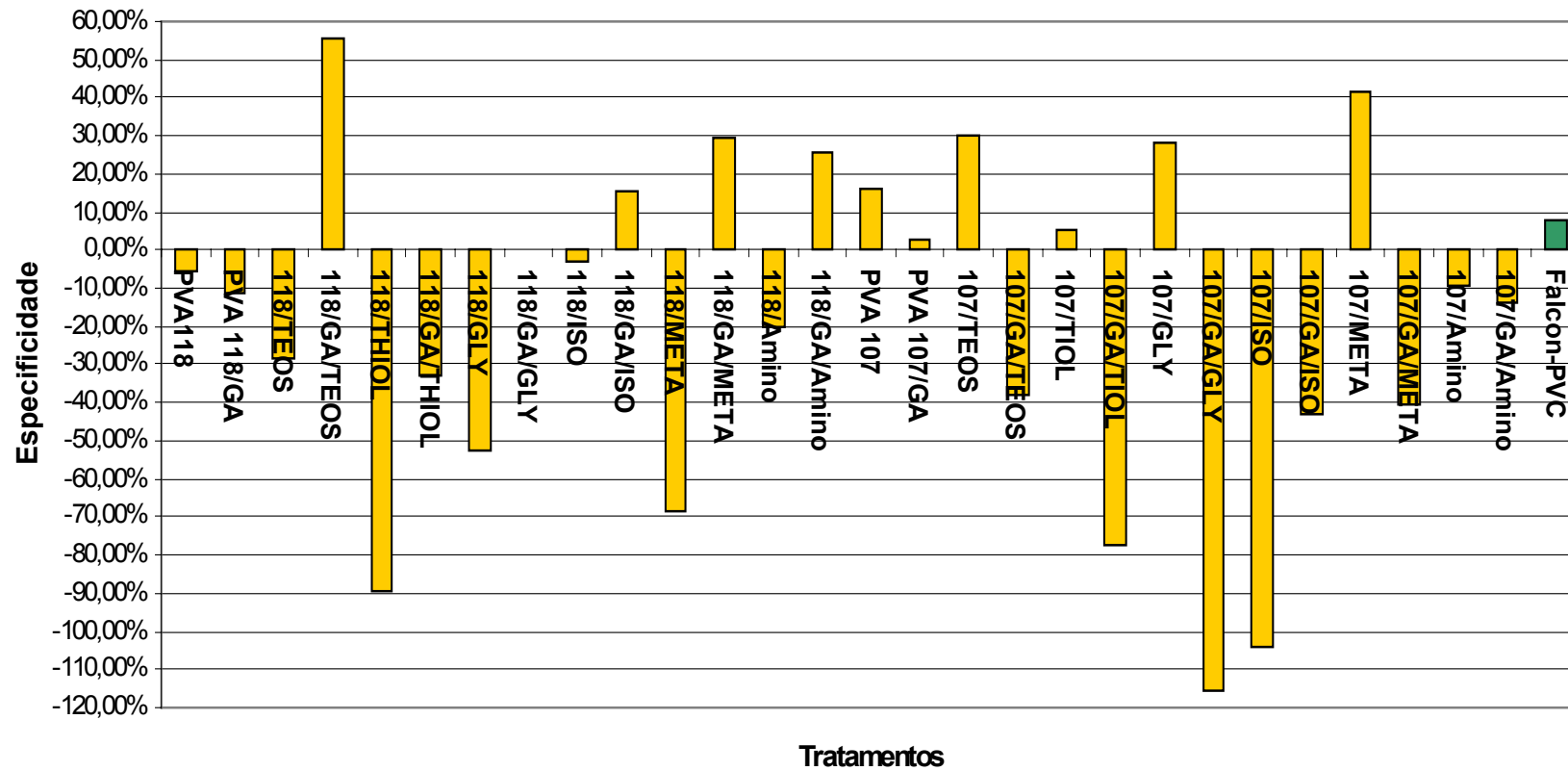


Figura 21A. Antígeno gG-BoHV-5 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5.



Aumento da especificidade de reconhecimento da proteína recombinante gG-BoHV-5 pelos anti-soros mix 1 e mix 5, em diferentes biomateriais



1B. Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial.





Em 28 híbridos, 15 (53,6%), representados pelos PVA's KM 118 e 107, reticulados ou não por GA e funcionalizados pelos grupos mercapto, isocianato, amino, glicidil e hidroxila, foram responsáveis pelo aumento no reconhecimento específico do peptídeo gC1 pelo mix anti-BoHV-1 (Figura 22A). Dentre as 15 matrizes híbridas, 9 (60%) eram baseadas no PVA KM 118, enquanto 6 (40%) eram representadas pelo PVA 107. A matriz de PVA KM 118 pura, reticulada quimicamente e todas as modificações químicas realizadas nesse polímero, na presença ou ausência de GA, aumentaram a especificidade de reconhecimento de 20% a 60% a mais do que o valor obtido no suporte sólido comercial. Para o PVA 107, apenas duas modificações foram relevantes: 107/GA/ISOCYPTES e 107/GA/APTES, com 60% e 30%, respectivamente, de aumento no reconhecimento específico do antígeno de BoHV-1 em comparação à placa comercial. Comparação entre o aumento de especificidade obtida pelos biomateriais e placa comercial é mostrada na Figura 22B.

A mesma análise foi feita para o peptídeo gC5, com 7 materiais (25%) que mostraram um aumento na especificidade de reconhecimento desse antígeno pelo mix5 (Figura 23A). Três matrizes (21,4%) foram representadas dentre os 14 materiais compostos por PVA 107 e 4 (28,6%), pelo PVA KM 118, com apenas o PVA KM 118 puro e o PVA KM 118/GA/APTES resultando em 60% e 40%, respectivamente, de aumento no valor da especificidade de reconhecimento de gC5, quando comparado à placa comercial (Figura 23B). Os híbridos baseados no PVA KM 118, reticulado ou não, e modificado pelo grupos glicidil e isocianato aumentaram em apenas 10% o valor de especificidade obtido para a placa comercial. Da mesma

forma, as matrizes de PVA 107 puro e modificado pelo grupo mercapto só aumentaram em 10% a especificidade obtida para o ensaio realizado na placa comercial.

Ocorreu uma grande diferença entre os resultados obtidos para o ensaio de ELISA com os peptídeos, usando a placa comercial e os biomateriais como suporte sólido. Essa diferença provavelmente deve-se ao fato de que os biomateriais, com seus grupos modificadores, serviram para direcionar e manter a estabilidade da ligação entre o peptídeo e a matriz híbrida. Moléculas pequenas, como os peptídeos, necessitam geralmente de um agente ligante para direcionar e estabelecer uma ligação estável com o suporte sólido. Somente fortes interações químicas, como as ligações covalentes, são capazes de manter essas moléculas ligadas ao suporte sólido de maneira estável, o que foi feito pelos biomateriais, com seus grupos modificadores da superfície.

Da comparação feita entre os resultados obtidos para todos os antígenos testados, observa-se que há grande diferença entre os desvios-padrão verificados para os experimentos realizados em suportes sólidos comerciais e aqueles obtidos para as matrizes híbridas. Este fato deve-se, principalmente, à forma obtida para os híbridos, ainda, em estágio de teste. Após melhoria de algumas propriedades físicas e químicas, como a transparência e flexibilidade, a moldagem desses materiais em placas de 96 poços permitirá um ajuste de parâmetros estatísticos. Reduzindo essas variações, o teste de ELISA indireto empregando as matrizes híbridas como suporte sólido, estará pronto para o repasse para a indústria nacional.



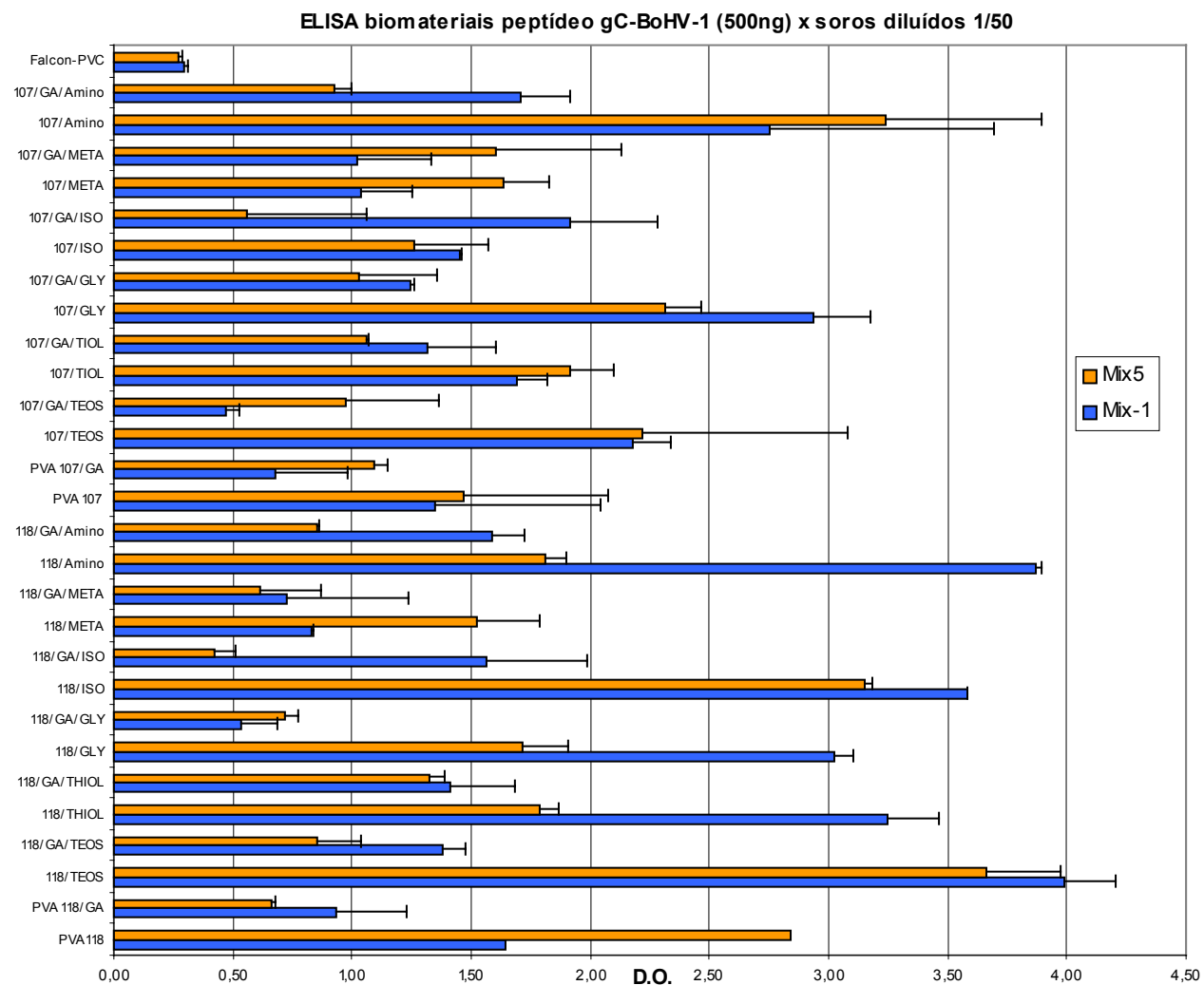


Figura 22A. Peptídeo gC-BoHV-1 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5.



Aumento da especificidade de reconhecimento do peptídeo gC de BoHV-1 pelos anti-soros mix 1 e mix 5 em diferentes biomateriais.

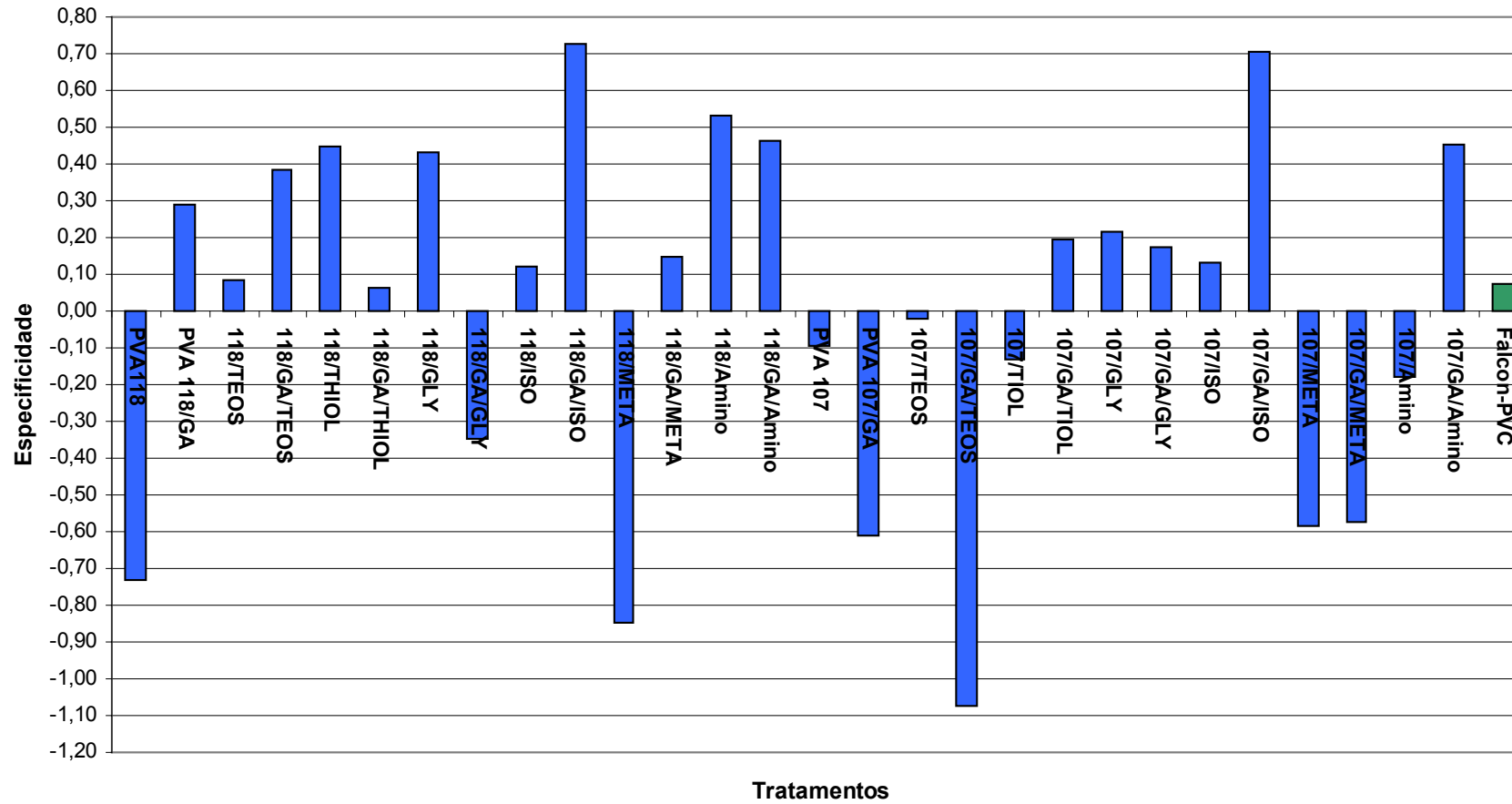


Figura 22B. Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial.



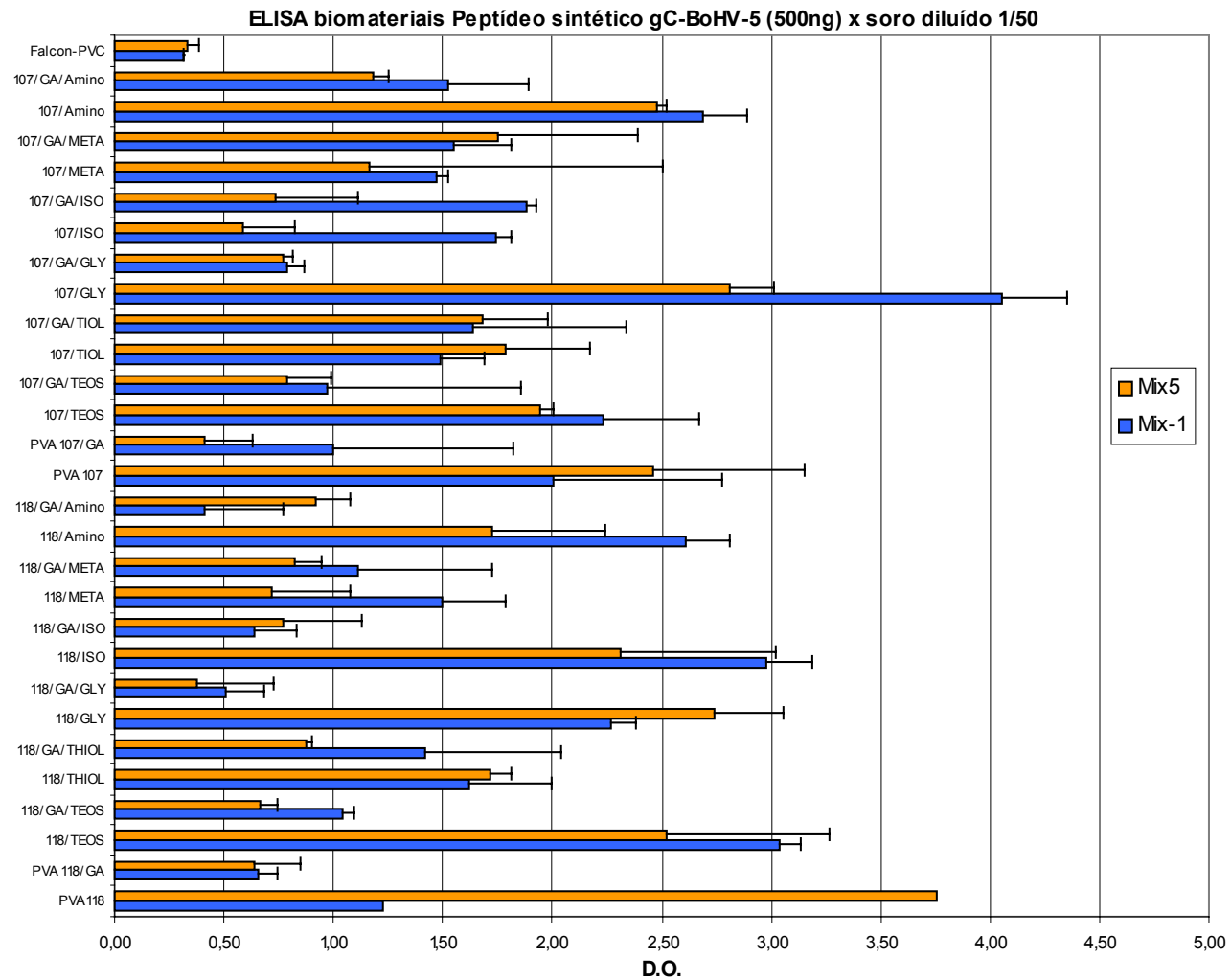


Figura 23A. Peptídeo gC-BoHV-5 incorporado aos biomateriais e suporte sólido. Triagem com anti-soros mix1 e mix5.





Aumento da especificidade de reconhecimento do peptídeo gC de BoHV-5 pelos anti-soros mix 1 e mix 5 em diferentes biomateriais.

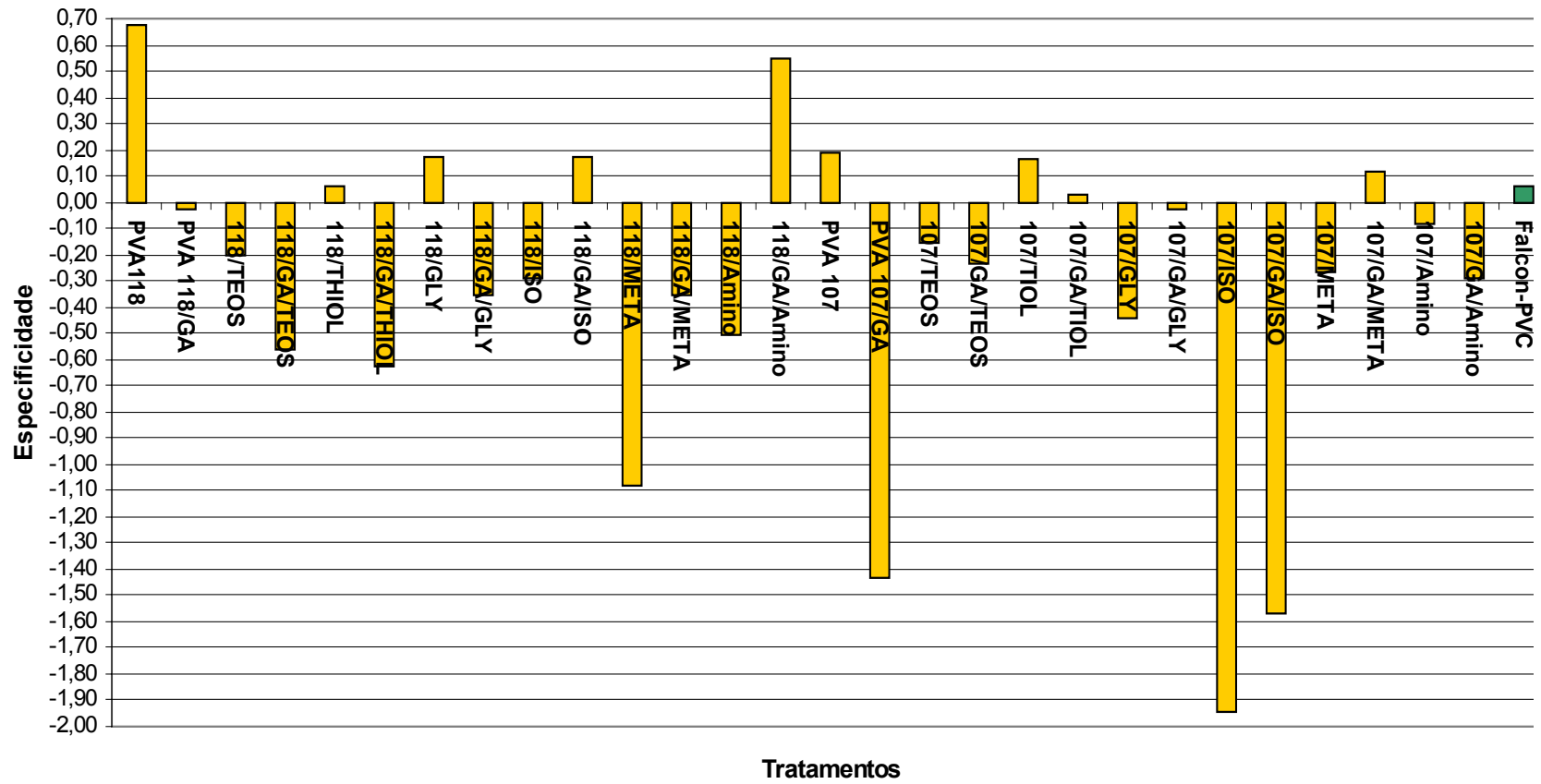


Figura 23B. Aumento da especificidade de reconhecimento nos diferentes biomateriais x ligação em placa PVC comercial.



## 5. CONCLUSÕES

- A técnica de soroneutralização com os vírus BoHV-1 e BoHV-5, confirmou a ampla disseminação desses agentes e sua co-circulação nos rebanhos brasileiros. O Brasil, com um efetivo bovino de 205 milhões de cabeças, necessita, portanto, da criação de um teste sorológico eficaz para a diferenciação desses herpesvírus e da implementação de programas eficientes de controle. 5.2. A soroneutralização, quando realizada com o BoHV-1 e os mesmos soros, evidenciou ampla reatividade a este agente, confirmando dados já mostrados na literatura. Estes dados mostram a co-circulação do BoHV-1 e BoHV-5, evidenciando a necessidade de reformulação dos programas de controle.
- ELISA indireto desenvolvido neste trabalho com os antígenos virais purificados mostrou bom desempenho quando comparado à SN e ELISA comercial. Como não há teste de ELISA disponibilizado no mercado para o BoHV-5, nosso ensaio já representa um grande avanço. O ELISA-BoHV-1, por sua vez, pode substituir seguramente o ELISA IDEXX comercial, reduzindo os altos custos de importação desse último.
- Foram produzidas com sucesso proteínas recombinantes da seqüência parcial de gG de BoHV-1 e BoHV-5. O ELISA desenvolvido com a recombinante de BoHV-1, mostrou especificidade de 93,5% quando comparado à SN e 90,3%, comparado ao ELISA comercial.
- Matrizes híbridas derivadas do processo sol-gel foram produzidas com o intuito de melhorar a especificidade e sensibilidade do teste de ELISA desenvolvido neste trabalho. Vários biomateriais favoreceram um aumento na especificidade de reconhecimento de todos os antígenos utilizados,

evidenciando que esses novos materiais representam uma alternativa potente e promissora para o desenvolvimento dos testes diferenciais propostos neste trabalho. Além disso, esses novos materiais são facilmente sintetizados e extremamente baratos (1.000 discos – US\$ 0,50), o que representa uma grande vantagem para aplicações comerciais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMAGID, O. Y.; MANSOUR, M.M.; MINOCHA, H. C. *et al.* Evaluation of baculovirus-expressed bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoproteins for detection and analysis of BHV-1-specific antibody responses. **Veterinary Microbiology**, v.61, p. 249 – 259, 1998.
- ACKERMANN, M.; MÜLLER, H. K.; BRUCKNER, L. *et al.* Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. **Veterinary Microbiology**, v. 23, 365 – 370, 1990.
- ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, 2005. (in press).
- AFONSO, D. A. F. **Caracterização de amostras brasileiras de herpesvírus bovino 5**. 2005. 114f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine Herpesvirus-1 and -5. **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, p.613-621, 2001.
- ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.38, n.4, p.919-920, 1978.

- ASBAUGH, S. E.; THOMPSON, K. E.; BELKNAP, E. B. et al. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using nested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 387 - 394, 1997.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley and Sons, 1995. v. 2.
- AVNIR, D.; BRAUN, S.; LEV, O et al. Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials. **Chemistry of Materials**, v. 6, p. 1605, 1994.
- BARANOWSKI, E.; KEIL, G.; LYAKU, J. et al. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 91 - 101, 1996.
- BARBOSA, A. C. V. 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**, Santa Maria, v. 35, p. 1368 - 1373, 2005.
- BARTHA, A.; HAJDU, G.; ALDASI, P. et al. Occurrence of encephalitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 19, p. 145 - 151, 1969.
- BECK, B. E. Infectious bovine rhinotracheitis encephalomyelitis in cattle and its differential diagnosis. **Canadian Veterinary Journal**. v. 16, p. 269 - 271, 1975.
- BITSCH, V. The P37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 19, p. 497 - 505, 1978.
- BLASTN E BLASTX - programa, bancos de dados *nr* (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences), disponível para consulta em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.
- BOTELHO, R. G. A. **Desenvolvimento de testes de PCR para BoHV-5 e sua aplicação no diagnóstico de casos clínicos**. 2000. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
- BRYANT, N. A.; DAVIS-POYNTER, N.; VANDERPLASSCHEN, A. et al. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. **The EMBO Journal**, v. 22, p. 833 - 846, 2003.
- BULACH, D. M.; STUDDERT, M. J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and bufallo herpesvirus. **Archives of Virology**, v. 113, p. 17 - 34, 1990.
- CAMPADANELLI-FIUME, G.; COCCHI, F.; MENOTTI, L. et al. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev. Med. Virol.*, v. 10, p. 305 - 319, 2000.
- CANANT, J. C. Diagnosis of the cause of bovine abortion. **Modern Veterinary Practice**, v. 65, p. 929 - 931, 1984.
- CARILLO, B. J.; AMBROGÍ, A.; SCHUDEL, A. A. et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt Für Veterinärmedizin Heihe B**, v. 30, p. 327 - 332, 1983.
- CARTER, G. R.; WISE, D. J.; FLORES, E. F. *Herpesviridae*. In: \_\_\_\_\_ **A Concise Review of Veterinary Virology**, International Veterinary Information Service, Ithaca, NY. Disponível para consulta em: <<http://www.ivis.org/advances/carter/Part2Chap11/chapter.a.sp?LA=1>>. Acesso em: dezembro de 2005.
- CENTRO NACIONAL DE INFORMAÇÃO BIOTECNOLÓGICA. Disponível para consulta em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>.

CHITTUR, K. K. FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. **Biomaterials**, v. 19, p. 357, -369, 1998.

CHO, H. J.; BOHAC, J. G. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bovine rhinotracheitis viral antibody in cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 49, p. 189 194, 1985.

CHOWDHURY, S. I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. **Virology**, v. 213, p. 558 - 568, 1995.

CHOWDHURY, S. I. Fine mapping of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein C neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and synthetic peptides. **Veterinary Microbiology**, v. 58, p. 309 - 314, 1997.

CHOWDHURY, S. I.; LEE, B.J.; OZKUL, A. *et al.* Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. **Journal of Virology**, v. 74, p. 2094 -2106, 2000.

CHROMAS – programa, versão gratuita 1.45 - Technelysium Pty, Ltd, disponível para consulta em: <http://technelysium.com.au/chromas.htm>

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V. *et al.* Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 128, p. 183-188, 2005.

CLUSTAL W – programa, versão 1.8 DOS, disponível para consulta em: <http://www.csc.fi/molbio/progs/clustalw>.

COLLINS, J. K.; AYERS, V. K.; WHETSTONE, C. A. *et al.* Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.1 and bovine encephalitis herpesvirus type 1.3. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 509 – 517, 1993.

D'ARCE, R. C. F.; ALMEIDA, R. S.; SILVA, T. C. *et al.* Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 315 - 324, 2002.

d'OFFAY, J. M.; ELY, R. W.; BALDWIN, C. W. *et al.* Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus tupe 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 247 – 251, 1995.

DELHON, G.; MORAES, M. P.; LU, Z. *et al.* Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, p.10339-10347, 2003.

DENIS, M.; HANON, E.; RIJSEWIJK, F. A. M. *et al.* The role of glycoproteins gC, gE, gI in the induction of cell mediated immune responses ti bovine herpesvirus 1. **Veterinary Microbiology**, v. 55, p. 121-132, 1996.

DIAS, L. E.; MAISONNAVE, J.; GUARINO, H. *et al.* Rinotracheitis infecciosa bovina (IBR). Descrição de um quadro clínico em terneros de tambo. In: III CONGRESSO NACIONAL DE VETERINÁRIA, 3., 1982, Montevideo, Anais... 1982, p. 521 – 527.

ECKERT, A. W.; GRÖBE, D.; ROTHE, U. Surface-modification of polystyrene-microtitre plates via grafting of glycidylmethacrylate and coating of poly-glycidylmethacrylate. **Biomaterials**, v. 21, p. 441 – 447, 2000.

- EDWARDS, S. Changing trends in infectious bovine rhinotracheitis in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 123, p. 614 – 618, 1988.
- EDWARDS, S.; NEWMAN, R. H., WHITE, H. The virulence of British isolates of bovine herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. **British Veterinary Journal**, v. 147, p. 216 – 231, 1991.
- ELY, R. W.; d'OFFAY, J. M.; RUEFER, A. H. et al. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 487 - 492, 1996.
- ENDO, K. Synthesis and structure of poly (vinyl chloride). **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 2021-2054, 2002.
- ENGELHARDT, T.; KEIL, G. M. Identification and characterization of the bovine herpesvirus 5 US4 gene and gene products. **Virology**, v. 225, p. 126 – 135, 1996.
- ENGELS, M.; GIULIANI, C.; WILD, P. et al. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenesis potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. **Virus Research**, v. 6, p. 57 - 73, 1986.
- ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 3 - 15, 1996.
- ESSER, P. Principles in Adsorption to Polystyrene. NUNC Bulletins, 1988. Disponível para consulta em: <<http://www.nuncbrand.com>>. Acesso em: fevereiro de 2006.
- ESTEVES, P. A.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C. et al. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. **Veterinary Record**, v. 152, p. 658 - 659, 2003.
- EUGSTER, A. K.; ANGULO, A. B.; JONES, L. P. Herpesvirus encephalitis in range calves. **Proceedings of The Annual Meeting of American Association of Veterinary Laboratory Diagnosis**, v. 17, p. 267 - 281, 1974.
- EVORA, M. C.; GONÇALVES, O. L.; DUTRA, R. C. L. et al. Comparação de técnicas FTIR de transmissão, reflexão e fotoacústica na análise de poliamida-6, reciclada e irradiada. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, p. 60 - 68, 2002.
- FAVOREEL, H. W. The why's of Y-based motifs in alphaherpesvirus envelope proteins. **Virus Research**, 2006. (in press).
- FIELDS, B.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M., et al. **Virology**. 4. ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap. 71.
- FITZPATRICK, D. R.; BABIUK, L. A.; ZAMB, T. J. Nucleotide sequence of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gIII, a structural model for gIII as a new member of the immunoglobulin superfamily, and implications for the homologous glycoproteins of other herpesviruses. **Virology**, v. 173, p. 46 – 57, 1989.
- FITZPATRICK, D. R.; REDMOND, M. J.; ATTAH-POKU, S. K. et al. Mapping 10 epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoproteins gI and gIII. **Virology**, v. 176, p. 145 – 157, 1990.
- GIAVEDONI, L. D.; RUIZ, M. FIJTMAN, N et al. Rapid diagnosis of bovine herpesvirus encephalitis: comparasion of nucleic acid hybridiztion and immunoperoxidase methods using clinical samples. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 35, p. 280-285, 1988.
- GIBBS, E. P. J.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesvirus. Part. I. Bovine herpesvirus I. **Veterinary Bulletin**, v. 47, p. 317 - 343, 1977.

- GIBBS, J. ELISA Technical Bulletin – Nº 1, 2 e 3. Corning Life Sciences, Kennebunk, ME, 2001. Disponível para consulta em: [http://www.corning.com/Lifesciences/technical\\_information/techDocs/elisa1.asp?region=1a&language=en](http://www.corning.com/Lifesciences/technical_information/techDocs/elisa1.asp?region=1a&language=en). Acesso em: janeiro de 2006.
- GILL, I.; BALLESTEROS, A. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 282 - 296, 2000.
- GOMES, L.I.; ROCHA, M. A.; COSTA, E. A. *et al.* Detecção de herpesvírus bovino (BoHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.2, p. 217-220, 2002.
- GOMES, L. I.; ROCHA, M. A.; SOUZA, J. G. *et al.* Bovine Herpesvirus 5 (BoHV-5) in Bull Semen: Amplification and Sequence Analysis of the US4 Gene. **Veterinary Research and Communications**, v. 27, p. 495 - 504, 2003.
- GUPTA, P. K.; SAINI, M.; GUPTA, L. K. *et al.* Induction of immune responses in cattle with a DNA vaccine encoding glycoprotein C of bovine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 293 – 305, 2001.
- HALFEN, D. C.; VIDOR, T. **Infecções por Herpesvírus bovino-1 e Herpesvírus bovino-5**, p.97-107. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Mendez M.C., Lemos R.R.A (eds.). *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. Vol.1., 2ª ed. Varela: São Paulo, 2000.
- HECHT, P.; ENGELS, M.; LOEPFE, E. *et al.* Comparison of the glycoprotein gC genes of bovine and caprine herpesviruses. In: M. SCHWYZER *et al.* (ed.), **Immunobiology of Viral Infections**. Proceedings of the 3rd Congress of the European Society of Veterinary Virology, pp. 147 – 152, 1995.
- HENCH, L. L. Sol-gel materials for bioceramic applications. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v. 2, p. 604 - 610, 1997.
- HILL, B. D.; HILL, M. W. M.; CHUNG, Y. S. *et al.* Meningoencephalitis in calves due to bovine herpesvirus type 1 infection. **Australian Veterinary Journal**, v. 61, p. 242 - 243, 1984.
- HOUSE, J. A.; BAKER, J. A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. **Cornell Veterinarian**, v. 61, p. 320 – 335, 1971.
- HUNT, R. Herpesviruses. In: R. Hunt (ed.). **Virology**, cap. 11., 2005. Disponível para consulta em: <http://www.med.sc.edu/85/virol/herpes.htm>. Acesso em: junho de 2006.
- HUTCHINSON, L.; JOHNSON, D. C. Herpes simplex virus glycoprotein K promotes egress of virus particles. **Journal of Virology**, v. 69, p. 5401 – 5413, 1995.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário; Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, 2004. Disponível para consulta em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp>. Acesso em: junho de 2006.
- ICTV - Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus, 2002. Disponível para consulta em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>. Acesso em junho de 2006.
- JIN, W.; BRENNAN, J. D. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. **Analytica Chimica Acta**, v. 461, p. 1 – 36, 2002.
- JOHNSTON, L. A. Y.; SIMMONS, G. C.; MCGAVIN, M. D. A viral meningoencephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, p. 207 - 215, 1962.
- KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.; RUULS, R.C. *et al.* Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE or in both the gI and gE gene. **Vaccine**. v.16, p. 802 - 809, 1998.

- KAHRS, R. F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious vulvovaginitis. In: KAHRS, R. F. (ed.), **Viral diseases of Cattle**, 2.ed. Iowa State University: Ames, 2001, pp. 159 – 170.
- KEIL, G. M. ENGELHARDT, T.; KARGER, A. *et al.* Bovine Herpesvirus 1 Us Open Reading Frame 4 Encodes a Glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 70, p. 3032 – 3038, 1996.
- KEUSER, V.; SCYNTS, F.; DETRY, B. *et al.* Improved Antigenic Methods for differential diagnosis of bovine, caprine, and cervine alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1228-1235. 2004.
- KICKELBICK, G. Concepts for the incorporation of inorganic building blocks into organic polymers on a nanoscale. **Progress in Polymer Science**, v. 28, p. 83 114, 2003.
- KNAPP, A. C.; HUSAK, P. J.; ENQUIST, L. W. The gE and gI homologs from two Alphaherpesviruses have conserved and divergent neuroinvasive properties. **Journal of Virology**, v. 71, p. 5820 – 5827, 1997.
- KUNRATH, C. F.; VOGEL, F. S. F.; OLDONI, I. *et al.* Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 1877 – 1883, 2004.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, p. 105 – 132, 1982.
- LAGE, A. P.; CASTRO, R. S.; MELO, M. I. *et al.* Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. **Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v. 49, p. 195 – 197, 1996.
- LEHMANN, D.; SODOYER, R.; LETERME, S. Characterization of BoHV-1 gE envelope glycoprotein mimotopes obtained by phage display. **Veterinary Microbiology**, v. 104, p. 1 – 17, 2004.
- LEUNG-TACK, P.; AUDONNET, J. C.; RIVIERE, M. The complete DNA sequence and the genetic organization of the short unique region (Us) of the bovine herpesvirus type 1 (ST strain). **Virology**, v. 199, p. 409 – 421, 1994.
- LI, Y.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, L. A. *et al.* Characterization of Cell-binding Properties of Bovine Herpesvirus 1 Glycoproteins B, C, and D: Identification of a Dual Cell-Binding Function of gB. **Journal of Virology**, v. 69, p. 4758 – 4768, 1995.
- LIANG, X.; BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. *et al.* Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII and gIV. **Journal of Virology**, v. 65, p. 1124 – 1132, 1991.
- LIANG, X.; BABIUK, L. A.; ZAMB, T. J. An in vivo study of a glycoprotein III-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. **Virology**, v. 189, p. 629 – 639, 1992.
- LIANG, X.; BABIUK, L. A.; ZAMB, T. J. Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesviruses 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. **Virology**, v. 194, p. 233 – 243, 1993.
- LIMA-BARROS, A. E.; ALMEIDA, A. M. P.; CARVALHO JR., L. B. *et al.* Polysiloxane/PVA -glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 459 – 463, 2002.



- LIMAN, A.; ENGELS, M.; MEYER, G. *et al.* Glycoprotein C of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BHV-1. **Archives of Virology**, v. 145, p. 2047 – 2059, 2000.
- LITTLE, S.P.; JOFRE, J. T.; COURTNEY, R. J. *et al.* A virion associated glycoprotein essential for infectivity of herpes simplex virus type-1, **Virology**, v. 115, p. 149 – 160, 1981.
- LIVAGE, J.; ROUX, C.; DA COSTA, L. *et al.* Immunoassays in sol-gel matrices. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 7, p. 45 - 51, 1996.
- LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F. L. *et al.* Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): inquérito soro-epidemiológico em rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, p. 425 – 430, 1995.
- MANSUR, H. S.; LOBATO, Z. I. P.; ORÉFICE, R. L. *et al.* Surface Functionalization of Porous Glass Networks: Effects on Bovine Serum Albumin and Porcine Insulin Immobilization. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 789 – 797, 2000.
- MANSUR, H. S.; ORÉFICE, R. L.; MANSUR, A. A. P. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly (ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. **Polymer**, v. 45, p. 7193 – 7202, 2004.
- MARSHALL, R. L.; RODRIGUEZ, L. L.; LETCHWORTH III, G. J. Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. **Journal of Virology**, v. 57, p. 745 – 753, 1986.
- MATEJKA, L.; DUKH, O.; MESSNER, B. *et al.* Block copolymer organic-inorganic networks: formation and structure ordering. **Macromolecules**, v. 36, p. 7977 – 7985, 2004.
- MELOEN, R. H.; PUIJK, W. C.; LANGEVELD, J. P. M. *et al.* Design of Synthetic Peptides for Diagnostics. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, p. 253 - 260, 2003.
- METTENLEITER, T. Herpesvirus Assembly and Egress. **Journal of Virology**, v. 76, p.1537 – 1547, 2002.
- METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v. 87, p. 205 – 217, 1986.
- MEYER, G.; PETROVSKIS, E. A.; DUFFUS, W. P. H. *et al.* Cloning and sequence of an infectious bovine rhinotracheitis virus (BHV-1) gene homologous to glycoprotein H of herpes simplex virus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1090, p. 267 - 269, 1991.
- MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C. *et al.* 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.
- MUELLER, S. B. K.; IKUNO, A. A.; TERESA, M. *et al.* Isolation and identification of the infectious bovine rhinotracheitis virus in a bovine fetus kidney (IBR/IPV). **Arquivo do Instituto Biológico** (São Paulo), v.45, p. 187-189, 1978.
- Multalin - software gratuito, disponível para consulta em: <<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>>. Acesso em janeiro de 2006.
- NAKAMICHI, K.; OHARA, K.; KUROKI, D. *et al.* Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for viral growth by cell-to cell infection. **Virus Research**, v.68, n.2, p. 175-181, 2000.

- NAKAMICHI, K.; KUROKI, D.; MATSUMOTO, Y. *et al.* Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for prevention of apoptosis and efficient viral growth in rabbit kidney cells. **Virology**, v. 279, p. 488-498, 2001.
- NAKAMICHI, K.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary to maintain cell-to-cell junctional adherence among infected cells. **Virology**, v. 294, p. 22 – 30, 2002.
- NOGUEIRA, F. R. C.; CAMARGO, A. J. R.; RESENDE, O. A. *et al.* Ocorrência de rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. Comunicado Técnico nº 167, Pesagro-Rio, p. 1 - 5, 1986.
- NOYA O, PATARROYO ME, GUZMAN F *et al.* Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, p. 299-308, 2003.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Part 2, Section 2.3, 2005. Disponível para consulta em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: janeiro de 2006.
- OKAZAKI, K.; HONDA, E.; KONO, Y. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIII by a recombinant baculovirus in insect cells. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 901 – 904, 1994.
- OKAZAKI, K.; FUJII, S.; TAKADA, A. *et al.* The amino-terminal residue of glycoprotein B is critical for neutralization of bovine herpesvirus 1. **Virus Research**, v. 115, p. 105 – 111, 2006.
- OLDONI, I.; WEIBLEN, R.; INKELMANN, M. A. *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.213-221, 2004.
- PARK, J. B. Biomaterials. In: J. D. Bronzino (ed.), **Biomedical Engineering Handbook**, CRC Press and IEEE Press, 1995, pp. 530 – 610.
- PEETERS, B., DE WIND, N.; BROER, R. *et al.* Glycoprotein H of pseudorabiesvirus is essential for entry and cell to cell spread of the virus. **Journal of Virology**, v. 66, p. 3888 – 3892, 1992.
- RAVAZZOLO, A. P.; DAL PIZZOL, M.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v. 17, p.95 – 98, 1989.
- REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene. Monographic Series**, v. 27, p. 493-497, 1938.
- REIS, E.F.; CAMPOS, F. S.; LAGE, A. P. *et al.* Synthesis and Characterization of Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogels and Hybrids for rMPB70 **Protein Adsorption. Materials Research**, v. 9, n. 2, 2006. (no prelo).
- RIET-CORREA, F. R.; VIDOR, T.; SCHILD, A. L. *et al.* Meningoencefalite e necrose do cortex cerebral em bovinos causadas por herpesvírus bovino 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 9, p.13-16, 1989.
- RIET-CORREA F.R., MOOJEN V., ROEHE P.; WEIBLEN, R. Víroses confundíveis com febre aftosa: revisão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, p. 323-332, 1996
- RIET-CORREA, G.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D. *et al.* Meningoencefalite e polioencefalomalacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 44 - 46, 2006.

- RIJSEWIJK, F. A. M.; KAASHOEK, M.J. , LANGEVELD, J. P. M. *et al.* Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1477 - 1483, 1999.
- ROBERTS, M. J.; BENTLY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 459 – 476, 2002.
- RODOLFO Jr., A.; NUNES, L. R.; ORMANJI, W. **Tecnologia do PVC**. São Paulo: ProEditores/Braskem, 2002. Disponível para consulta em: <<http://www.braskem.com.br>>. Acesso em: junho de 2006.
- ROEHE, P.M.; SILVA, T. C.; NARDI, N. B. *et al.* Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 41-44, 1997.
- ROEHE, P.M.; TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A. *et al.* Situação do BoHV-1 e BHV-5 no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HERPESVIRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria. Anais.... Santa Maria: UFSM, [s.n], 1998, p. 89-96.
- ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C. *et al.* Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **Veterinary Record**, v. 146, p. 586 - 588, 2000.
- ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B. *et al.* The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v. 123, p. 425 – 449, 1992.
- ROS, C.; RIQUELME, M.E.; FORSLUND, K. O. *et al.* Improved detections of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. **Journal of Virological Methods**, v.83, p.55-65, 1999.
- ROS, C.; BELÁK, S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1247-1253, 1999.
- ROS, C.; BELÁK, S. Characterization of the glycoprotein B genen from ruminant alphaherpesviruses. **Virus Genes**, v.24, p.99 - 105, 2002.
- SAHLIN, J. J.; PEPPAS, N. A. Near-field FTIR imaging: A technique for enhancing spatial resolution in FTIR microscopy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p. 103 – 110, 1997.
- SALVADOR, S. C.; LEMOS, R. A. A., ROEHE, P. M. Encefalite por HVB tipo 5. In: LEMOS, R. A. A. (ed.). **Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul**. Universidade do Mato Grosso do Sul: Campo Grande, 1997.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. Cap.6, p. 6.3 - 6.46.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998.
- SCHRÖDER, C.; KEIL, G. M. Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH<sub>w450</sub> and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. **Journal of General Virology**, v.80, p. 57–61, 1999.
- SCHUDEL, A. A.; CARRILLO, B. J.; WYLER, R. *et al.* Infection of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. **Journal of Veterinary Medicine**, v.33, p.303-310, 1986.

- SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesvirus. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.17-29, 1996.
- SHEKARCHI, I. C.; SEVER, J. L.; LEE, Y. J. *et al.* Evaluation of Various Plastic Microtiter Plates with Measles, Toxoplasma, and Gamma Globulin Antigens in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, p. 89 – 96, 1984.
- SHIN, J. S.; YU, J.; LIN, J. *et al.* Peptide mimotopes of pneumococcal capsular polysaccharide of 6B serotype: a peptide mimotope can bind to two unrelated antibodies. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 6273 - 6278, 2002.
- SILVA, A. D.; SPILKI, F. R.; FRANCO, A. C. *et al.* Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine**, 2006. (no prelo).
- SMOTHERS, J. F.; HENIKOFF, S.; CARTER, P. Affinity selection from biological libraries. **Science**. v.298, p. 621 - 622, 2002.
- SOARES, L. A.; PEREIRA, D. A. C. Neutralizing antibodies against bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD) in cattle sera from São Paulo state, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, p. 88 - 93, 1980.
- SOUZA, V. R.; MELO, S. V.; ESTEVES, P. A. *et al.* Monoclonal antibody characterization of bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.13–18, 2002.
- SPEAR, P. G. Glycoproteins specified by herpes simplex virus. In: Roizman B. (ed.), **The Herpesviruses**, v.3. New York: Plenum Press, 1985. p. 1795 – 1841.
- SPEAR, P. G.; LONGNECKER, R. Herpesvirus Entry: an update. **Journal of Virology**, v. 77, p. 10179 – 10185, 2003.
- SPILKI, F.R.; ESTEVES, P. A.; LIMA, M. *et al.* Comparativie pathogenicity of bovine herpesvirus (BHV-1) subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2a (BoHV-1.2a). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 43 - 49, 2004a.
- SPILKI, F.R.; SILVA, A.D.; HÜBNER, S.O. *et al.* Partial protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, USA, v. 1026, p. 247-250, 2004b.
- STRAUB, O. C. Advances in BHV1 (IBR) **Research Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 108, p. 419 – 422, 2001.
- STUDDERT, M. J. Bovine encephalitis herpesvirus. **Veterinary Record**, v. 125, p. 584, 1989.
- SURUJBALLI, O. P., MALLORY, M. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine anti-bodies to multiple Leptospira serovars. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 1 - 6, 2004.
- TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. *et al.* Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 85 – 88, 2005.
- TEIXEIRA, M. F. B. Um ensaio imunoenzimático com anticorpo monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). 1998. 56f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, 1998.
- TEIXEIRA, M. F. B.; ESTEVES, P. A.; SCHMIDT, C. S. *et al.* ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo I (BHV-1). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 33 – 37, 2001.
- TIKOO, S.K.; CAMPOS, M. & BABIUK, L.A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. **Advances in Virus Research**, v. 45, p. 191-223, 1995.

- TRÉPANIÉ, P.; MINOCHA, H. C.; BASTIEN, Y. Bovine Herpesvirus 1: Strain Comparison of Polypeptides and Identification of a Neutralization Epitope on the 90-Kilodalton Hemagglutinin. **Journal of Virology**, v. 60, p. 302-306, 1986.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, L. A. Synthesis and processing of bovine herpesvirus 1 glycoproteins. **Journal of Virology**, v. 59, p. 401 – 410, 1986.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, PARKER, M. D.; FITZPATRICK, D. R. et al. Structural, functional, and immunological characterization of bovine herpesvirus-1 glycoprotein gI expressed by recombinant baculovirus. **Virology**, v. 190, p. 378 – 392, 1992.
- VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S.; KHATTAR, S.; TIKOO, S. K. et al. Glycoprotein H (gH/gp108) and glycoprotein L form a functional complex which plays a role in penetration, but not in attachment, of bovine herpesvirus 1. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 1515 – 1520, 1996.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, 2005. (in press).
- VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, R. A. et al. The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. **Journal of Biotechnology**, v. 44, p. 75 – 81, 1996.
- VIDOR, T.; HALFEN, D. C.; LEITE, T. E. et al. Herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1): sorologia de rebanhos com problema reprodutivo. **Ciência Rural**, v. 25, p. 421 – 424, 1995.
- VIEIRA, S.; BRITO, W.M.E.D.; SOUZA, W.J. et al. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.4, n. 2, p. 131-137 2003.
- VLCEK, C.; BENES, V.; LU, Z. et al. Nucleotide sequence analysis of a 30-kb region of bovine herpesvirus 1 genome which exhibits a colinear gene arrangement with the UL21 to UL4 genes of herpes simplex virus. **Virology**, v. 210, p. 100 – 108, 1995.
- VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. et al. Atividade neutralizante anti-herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BoHV-1. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.881-883, 2002.
- VORDERMEIER, H. M.; WHELAN, A.; COCKLE, P. J. et al. Use of Synthetic Peptides Derived from the Antigens ESAT-6 and CFP-10 for Differential Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Cattle. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 571–578, 2001.
- WANG, Y.; ROBERTSON, J. L.; SPILLMAN JR., W. B. et al. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1362 – 1373, 2004.
- WATT, J. A.; JOHNSTON, W. S., MACLEOD, N. S. et al. Infectious bovine rhinotracheitis encephalitis. **Veterinary Record**, v. 108, p. 63 –64, 1981.
- WEBER, M.; KOHLER, H. MANNS, M. et al. Antiglomerular basement membrane antibodies in human sera: detection by a modified micro-ELISA. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 35, p. 285 – 294, 1985.
- WEIBLEN, R.; LOMBARDO de BARROS, C. S.; CANABARRO, T. F. et al. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **Veterinary Record**, v.124, p.666-667, 1989.
- WELLENBERG, G.J.; MARS, M.H.; VAN OIRSCHOT, J.T. Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 79-84, 2001.

WHEELER, J.; SIMPSON, J.; MORLEY, A. R. Routine and rapid enzyme linked immunosorbent assays for circulating anti-glomerular basement membrane antibodies. **Journal of Clinical Pathology**, v. 41, p. 163 – 170, 1988.

WILD, P.; SCHRANER, E. M.; PETER, J. *et al.* Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. **Journal of Virology**, v. 72, p. 9561 – 9566, 1998.

WILLIAMS, J. A., LANGELAND, J. A., THALLEY, B.S. *et al.* Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies. In: GLOVER, D. M., HAMES, B. D. (Ed.). **DNA cloning 2 a practical approach: Expression systems**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 1995, p. 15-57.

WINGFIELD, P. T. Overview of the purification of recombinant proteins produced in *E. coli*. In: COLIGAN, J.E., DUNN B.M., PLOEGH H.L., SPEICHER D.W E WINGFIELD, P.T. (ed.). **Current protocols in protein science**. New York: John Wiley and Sons, 1995. v.1, p. 6.1.1-6.1.22.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. (Ed.). **Herpesviruses Diseases of Cattle, Horse and Pigs**. Hingham MA: Kluwer Academic Publishers, 1989. p. 1 – 72.

YANO, S.; KURITA, K.; FURUKAWA, T. *et al.* Structure and properties of poly(vinyl alcohol)/tungsten trioxide hybrids. **Polymer**, v. 44, p. 3515 - 3522, 2003.

YATES, W. D. G. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, p. 225 – 263, 1982.

ANEXO IA – Cálculos relativos à comparação do ELISA comercial IDEXX com a Soroneutralização para o BoHV-1.

ELISA comercial IDEXX - BoHV-1x SN BoHV-1							
	SN						
ELISA Ide	Pos	Neg					
Pos	30	4	34				
Neg	4	27	31				
	34	31	65				
			%				
Sensibilidade =	0,882		88,2353				
Especificidade =	0,871		87,0968				
VPP =	0,882353						
VPN =	0,870968						
Acurácia =	0,876923						
<b>Teste qui-quadrado</b>							
	SN						
ELISA	Pos	Neg	Soma				
Pos	a	b	a+b				
Neg	c	d	c+d				
Soma	a+c	b+d	a+b+c+d				
<b>Observado</b>	<b>SN</b>			<b>Esperado</b>	<b>SN</b>		
ELISA Idexx	Pos	Neg	Soma	ELISA	Pos	Neg	Soma
Pos	30	4	34	Pos	17,78	16,22	34
Neg	4	27	31	Neg	16,22	14,78	31
Soma	34	31	65	Soma	34	31	65
Frequência esperada a =	17,78462	→	$\frac{(a+b) \cdot (a+c)}{(a+b+c+d)}$				
Frequência esperada b =	16,21538	→	$\frac{(a+b) \cdot (b+d)}{(a+b+c+d)}$				
Frequência esperada c =	14,78462	→	$\frac{(c+d) \cdot (b+d)}{(a+b+c+d)}$				
Frequência esperada d =	16,21538	→	$\frac{(c+d) \cdot (a+c)}{(a+b+c+d)}$				
<b>Teste qui-quadrado =</b>	$\frac{(ad-bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} = 36,89$						
	SN						
	Frequência de Positivo		Frequência de Negativo				
ELISA	Observada	Esperada	Observada Esperada				
pos	30	17,78	4,00 16,22				
neg	4	16,22	27,00 14,78				
<b>Qui-quadrado = 36,89</b>	→	$\frac{(A-a)^2}{a} + \frac{(B-b)^2}{b} + \frac{(C-c)^2}{c} + \frac{(D-d)^2}{d}$					
<b>Significativo p&lt;0,05</b>							

ANEXO IB - Cálculos relativos à comparação do ELISA LABMIC-BoHV-1 com a soroneutralização para o BoHV-1.

		SN						
ELISA	Pos	Neg						
Pos	30	1	31					
Neg	4	30	34					
	34	31	65					
				%				
<b>Sensibilidade = 0,882</b>				<b>88,2353</b>				
<b>Especificidade = 0,968</b>				<b>96,7742</b>				
<b>VPP = 0,967742</b>								
<b>VPN= 0,882353</b>								
<b>Acurácia= 0,923077</b>								
<b>Teste qui-quadrado</b>								
Observado				Esperado				
		SN						
ELISA	Pos	Neg	Soma	ELISA	Pos	Neg	Soma	
Pos	30	1	31	Pos	16,21538	14,78462	31	
Neg	4	30	34	Neg	17,78462	16,21538	34	
<b>Soma</b>	<b>34</b>	<b>31</b>	<b>65</b>	<b>Soma</b>	<b>34</b>	<b>31</b>	<b>65</b>	
Frequência esperada a = 16,215385				→	$\frac{(a+b)(a+c)}{(a+b+c+d)}$			
Frequência esperada b = 14,784615				→	$\frac{(a+b)(b+d)}{(a+b+c+d)}$			
Frequência esperada c = 16,215385				→	$\frac{(c+d)(b+d)}{(a+b+c+d)}$			
Frequência esperada d = 17,784615				→	$\frac{(c+d)(a+c)}{(a+b+c+d)}$			
<b>Teste qui-quadrado =</b>				$\frac{(ad-bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$	<b>= 46,97</b>			
		SN						
		Frequencia de Positivo		Frequencia de Negativo				
ELISA	Observada	Esperada	Observada	Esperada				
pos	30	16,215385	1	14,78461538				
neg	4	17,784615	30	16,21538462				
<b>Qui-quadrado = 46,97</b>				→	$\frac{(A-a)^2}{a} + \frac{(B-b)^2}{b} + \frac{(C-c)^2}{c} + \frac{(D-d)^2}{d}$			
<b>p&lt;0,05</b>					a	b	c	d





ANEXO ID - Cálculos relativos à comparação do ELISA comercial IDEXX com o ELISA LABMIC – BoHV-1.

		IDEXX							
ELISA	Pos	Neg							
Pos	33	1	34						
Neg	1	30	31						
	34	31	65						
			%						
<b>Sensibilidade = 0,971</b>			<b>97,0588</b>	<b>SOMA</b> <b>1,938</b>					
<b>Especificidade = 0,968</b>			<b>96,7742</b>						
<b>VPP = 0,970588</b>									
<b>VPN= 0,967742</b>									
<b>Acurácia= 0,969231</b>									
<b>Teste qui-quadrado</b>									
Observado		IDEXX		Soma	Esperado		IDEXX		Soma
ELISA	Pos	Neg	Soma	ELISA	Pos	Neg	Soma		
Pos	33	1	34	Pos	17,78462	16,21538	34		
Neg	1	30	31	Neg	16,21538	14,78462	31		
<b>Soma</b>	<b>34</b>	<b>31</b>	<b>65</b>	<b>Soma</b>	<b>34</b>	<b>31</b>	<b>65</b>		
Frequência esperada a =	17,784615	→	$\frac{(a+b)*(a+c)}{(a+b+c+d)}$						
Frequência esperada b =	16,215385	→	$\frac{(a+b)*(b+d)}{(a+b+c+d)}$						
Frequência esperada c =	14,784615	→	$\frac{(c+d)*b+d}{(a+b+c+d)}$						
Frequência esperada d =	16,215385	→	$\frac{(c+d)*(a+c)}{(a+b+c+d)}$						
<b>Teste qui-quadrado =</b>				$\frac{(ad-bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} = 57,23$					
		ELISA LabMic							
		Frequencia de Positivo		Frequencia de Negativo					
Idexx	Observada	Esperada	Observada	Esperada					
pos	33	17,784615	1	16,21538462					
neg	1	16,215385	30	14,78461538					
<b>Qui-quadrado = 57,23</b>		→	$\frac{(A-a)^2}{a} + \frac{(B-b)^2}{b} + \frac{(C-c)^2}{c} + \frac{(D-d)^2}{d}$						
<b>significativo p&lt;0,05</b>			a	b	c	d			

ANEXO IE - Cálculos relativos à comparação do ELISA comercial IDEXX com o ELISA LABMIC-BoHV-5.

		IDEXX					
ELISA	Pos	Neg					
Pos	32	0	32				
Neg	2	31	33				
	34	31	65				
			%				
	<b>Sensibilidade = 0,941</b>		<b>94,118</b>	<b>SOMA</b>			
				<b>1,941</b>			
	<b>Especificidade = 1,000</b>		<b>100,0000</b>				
	<b>VPP = 1</b>						
	<b>VPN= 0,939394</b>						
	<b>Acurácia= 0,969231</b>						
<b>Teste qui-quadrado</b>							
Observado				Esperado			
ELISA	IDEXX		Soma	ELISA	IDEXX		Soma
Pos	32	0	32	Pos	16,73846	15,26154	32
Neg	2	31	33	Neg	17,26154	15,73846	33
<b>Soma</b>	<b>34</b>	<b>31</b>	<b>65</b>	<b>Soma</b>	<b>34</b>	<b>31</b>	<b>65</b>
Frequência esperada a =	16,73846154	→	$\frac{(a+b) \cdot (a+c)}{(a+b+c+d)}$				
Frequência esperada b =	15,26153846	→	$\frac{(a+b) \cdot (b+d)}{(a+b+c+d)}$				
Frequência esperada c =	15,73846154	→	$\frac{(c+d) \cdot (b+d)}{(a+b+c+d)}$				
Frequência esperada d =	17,26153846	→	$\frac{(c+d) \cdot (a+c)}{(a+b+c+d)}$				
<b>Teste qui-quadrado =</b>	$\frac{(ad-bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$		<b>= 57,47</b>				
ELISA LabMic							
	Frequência de Positivo		Frequência de Negativo				
Idexx	Observada	Esperada	Observada	Esperada			
pos	32	16,73846154	0	15,26153846			
neg	2	17,26153846	31	15,73846154			
<b>Qui-quadrado = 57,47</b>	→	$\frac{(A-a)^2}{a} + \frac{(B-b)^2}{b} + \frac{(C-c)^2}{c} + \frac{(D-d)^2}{d}$					
<b>significativo p&lt;0,05</b>							



ANEXO IG - Cálculos relativos à comparação do ELISA recgG/BoHV-5 com a soroneutralização para o BoHV-5.

		SN					
	ELISA	Pos	Neg				
	Pos	14	6	20			
	Neg	18	27	45			
		32	33	65			
					%		
		Sensibilidade = 0,438		43,7500		<b>SOMA</b>	
		Especificidade = 0,818		81,8182		<b>1,256</b>	
		VPP =	0,7				
		VPN=	0,6				
		Acurácia=	0,630769				
	<b>Teste qui-quadrado</b>						
	<b>Observado</b>				<b>Esperado</b>		
	ELISA	SN		Soma	ELISA	SN	
		Pos	Neg			Pos	Neg
	Pos	14	6	20	Pos	9,846154	10,15385
	Neg	18	27	45	Neg	22,15385	22,84615
	<b>Soma</b>	32	33	65	<b>Soma</b>	32	33
		Frequência esperada a =	9,846154	→	$\frac{(a+b)(a+c)}{(a+b+c+d)}$		
		Frequência esperada b =	10,15385	→	$\frac{(a+b)(b+d)}{(a+b+c+d)}$		
		Frequência esperada c =	22,84615	→	$\frac{(c+d)(b+d)}{(a+b+c+d)}$		
		Frequência esperada d =	22,15385	→	$\frac{(c+d)(a+c)}{(a+b+c+d)}$		
		<b>Teste qui-quadrado =</b>		$\frac{(ad-bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$	<b>= 4,99</b>		
		SN					
		Frequência de Positiv		Frequência de Negativo			
	ELISA	Observada	Esperada	Observada	Esperada		
	pos	14	9,846154	6	10,15385		
	neg	18	22,15385	27	22,84615		
		<b>Qui-quadrado =</b>	<b>4,99</b>	→	$\frac{(A-a)^2}{a} + \frac{(B-b)^2}{b} + \frac{(C-c)^2}{c} + \frac{(D-d)^2}{d}$		
		<b>significativo p&lt;0,05</b>					

ANEXO IH - Cálculos relativos à comparação do ELISA recgG/BoHV-1 com o ELISA IDEXX.

		Idexx							
		ELISA	Pos	Neg					
Pos		16	3	19					
Neg		18	28	46					
		34	31	65					
							%		
		Sensibilidade = 0,471			47,0588		SOMA		
							1,374		
		Especificidade = 0,903			90,3226				
		VPP = 0,842105							
		VPN= 0,608696							
		Acurácia= 0,676923							
<b>Teste qui-quadrado</b>									
Observado				Esperado					
		Idexx					IDEXX		
		ELISA	Pos	Neg	Soma	ELISA	Pos	Neg	Soma
Pos		16	3	19		9,938462	9,061538	19	
Neg		18	28	46		24,06154	21,93846	46	
Soma		34	31	65		Soma	34	31	65
Frequência esperada a =		9,938462		→	$\frac{(a+b)*(a+c)}{(a+b+c+d)}$				
Frequência esperada b =		9,061538		→	$\frac{(a+b)*(b+d)}{(a+b+c+d)}$				
Frequência esperada c =		21,93846		→	$\frac{(c+d)*b+d}{(a+b+c+d)}$				
Frequência esperada d =		24,06154		→	$\frac{(c+d)*(a+c)}{(a+b+c+d)}$				
<b>Teste qui-quadrado =</b>		$\frac{(ad-bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$				<b>= 10,95</b>			
		IDEXX							
		Frequência de Positiv		Frequência de Negativo					
ELISA		Observada	Esperada	Observada	Esperada				
pos		16	9,94	3	9,06				
neg		18	24,06	28	21,94				
<b>Qui-quadrado = 10,95</b>		→		$\frac{(A-a)^2}{a} + \frac{(B-b)^2}{b} + \frac{(C-c)^2}{c} + \frac{(D-d)^2}{d}$					
<b>significativo p&lt;0,05</b>									