

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Ciências Biológicas – Bacharelado



Trabalho de conclusão de curso

Padronização da técnica de ELISA Indireto utilizando a glicoproteína D recombinante (rgD) expressa em *Pichia pastoris* como antígeno para o diagnóstico de Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5

Itauá Leston Araujo

Pelotas, 2011

Itauá Leston Araujo

Padronização da técnica de ELISA Indireto utilizando a glicoproteína D recombinante (rgD) expressa em *Pichia pastoris* como antígeno para o diagnóstico de Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Orientador (a): Fábio Pereira Leivas Leite

Co-Orientador (a): Luana Alves Dummer

Pelotas, 2011

Banca examinadora:

Ms. Fabrício Souza Campos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Geferson Fischer, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, Universidade Federal de Pelotas.

Ms. Luana Alves Dummer, Universidade Federal de Pelotas. (suplente)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Tibiriçá Almada Araújo e Rosa Meri Leston Araújo, pelo amor e pela paciência, neste e em outros momentos importantes da minha formação. Aos meus irmãos Tibiriçá, Mahinã e Barthira pelo companheirismo, pelo exemplo e amizade.

A minha colega e namorada Mônica Silveira Wagner, pelo amor, amizade, preocupação e enorme paciência.

Ao meu orientador professor Fábio Pereira Leivas Leite pela orientação e dedicação, pelo aprendizado e confiança nos momentos em que precisava e pela amizade durante todo esse período.

Agradeço especialmente a minha amiga e co-orientadora Luana Alves Dummer pela orientação, dedicação, paciência, pelo entusiasmo e alegria com o seu trabalho, pela disponibilidade de sempre e amizade sincera de muitas noites de fermentações.

À professora Patrícia Diaz de Oliveira pela cooperação para a realização desse trabalho e pela amizade e carinho.

Agradeço à professora Ana Claudia Franco e ao Dr. Fabrício S. Campos, do laboratório de Virologia – UFRGS, pela ajuda essencial ao cederem os soros para a padronização dos ELISAs e também por toda atenção em responder meus e-mails.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia, Renan, Fernanda, Liana, Alceu, Michele, Paula Telmo e Paula Finger, pelo apoio e amizade.

Ao meu grande amigo Matheus Costa da Rosa que me ajudou sempre que precisei, pelas muitas horas de conversas e cafezinhos nos intervalos dos ELISAs e pelas grandes caronas altas horas da noite no seu fusca vermelho.

Aos demais amigos dos Laboratórios do Centro de Biotecnologia, Talita, Régis e principalmente ao Rélber, pela amizade e ajuda em vários momentos.

A todos os meus queridos colegas que ao longo da nossa formação mostraram que é possível ser feliz sendo biólogo.

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

Muito Obrigado!

Resumo

ARAUJO, Itauá Leston. **Padronização da técnica de ELISA Indireto utilizando a glicoproteína D recombinante (rgD) expressa em *Pichia pastoris* como antígeno para o diagnóstico de Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5. 2011. 53f.**

Trabalho acadêmico de conclusão de curso – Curso de Ciência Biológicas, Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Considerado um dos principais patógenos de bovinos, o Herpesvírus bovino tipo 5 é responsável por grandes prejuízos econômicos. É caracterizado pela neurovirulência, devido sua ativa replicação nas células neurais e disseminação através do sistema nervoso central do hospedeiro, causando lesões e originando surtos de meningoencefalite. A glicoproteína D, presente no envelope do BoHV-5, é essencial a penetração do virion na célula do hospedeiro. Por estimular a resposta humoral permite o seu emprego em métodos de diagnóstico sorológico. Utilizada para a produção de antígenos glicoprotéicos a levedura *Pichia pastoris* concilia vantagens na manipulação e expressão protéica por mecanismos eucarióticos de modificações pós-traducionais. O diagnóstico sorológico para infecções por BoHV-5 é realizado por ELISA e Soroneutralização. O objetivo do trabalho foi desenvolver e padronizar um ELISA Indireto para detecção de anticorpos contra BoHV-5 utilizando a rgD, expressa em *P. pastoris*, como antígeno. Os parâmetros avaliados foram: diferentes concentrações do antígeno, bloqueio, diluições de soros e marcas de placa. A diluição 1:400, a adição de 5% de leite em pó e 3% de caseína para bloqueio, a concentração do antígeno testada (50 µg/placa) e a placa da marca Nunc foram os critérios de padronização que proporcionaram maior diferenciação entre soros positivos e negativos, conseqüentemente, melhor desempenho do teste ELISA.

Palavras-chave: Herpesvirus. Imunodiagnóstico. Proteína recombinante.

Abstract

ARAUJO, Itauá Leston. **Padronização da técnica de ELISA Indireto utilizando a glicoproteína D recombinante (rgD) expressa em *Pichia pastoris* como antígeno para o diagnóstico de Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5.** 2011. 53f.

Trabalho acadêmico de conclusão de curso – Curso de Ciências Biológicas, Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Considered one of the main pathogens of cattle, Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) is responsible for several economic losses. It is characterized by its neurovirulence active replication in neural cells and spread through the host's Central Nervous System, being responsible for outbreaks of Meningoencephalitis. The glycoprotein D (gD), present in the envelope of BoHV-5 is essential for the virion penetration in the host permissive cell. Also, the gD stimulate strong immune humoral responses in the host which allows its use for serological based diagnostic. The yeast *Pichia pastoris* has been used for the production of recombinant antigens and combines advantages in handling and protein expression by mechanisms of eukaryotic post-translational modifications. Serological diagnosis of BoHV-5 infection is mainly performed by ELISA and serum neutralization. The aim of this study was to develop and standardize an Indirect ELISA for detection of antibodies against BoHV-5 using the recombinant gD expressed in *P. pastoris* as antigen. The parameters evaluated were: different concentrations of antigens, blocking solution, serum dilutions and plate brands. The dilution of 1:400; blocking solution with 5% skim milk plus 3% casein; antigen concentration of 50 mg per plate from NUNC brand provided the more consistent values and greater differentiation between positive sera and negative. Consequently, the parameters above mentioned provided the best standardization criteria for the development of an Indirect ELISA against BoHV-5.

Keywords: Herpesviruses. Immunodiagnosis. Recombinant protein.

Lista de Figuras

Figura 1	ELISA de soros bovinos contra BoHV-5. Os dados representam as absorvâncias médias dos soros positivos (SN 512) e negativos (SN 0) nas diluições 1/500, 1/400, 1/300, 1/200 e 1/100 utilizando a rgD nas concentrações de 12,5 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200 ng/ orifício.....	27
Figura 2	ELISA de soros bovinos contra BoHV-5. Os dados representam as absorvâncias médias dos soros positivos (SN 512) e negativos (SN 0) nas concentrações 200, 150, 100, 50, 25, 12,5 ng/ orifício utilizando as diluições dos soros 1/100, 1/200, 1/300, 1/400 e 1/500 µl.....	29
Figura 3	ELISA Indireto com o antígeno rgD e soroneutralização viral.....	31
Figura 4	Dados referentes a absorvância (iELISA) e soroneutralização (SN) dos animais pertencentes ao grupo controle, obtidos nas coletas dos dias 77, 91 e 161, respectivamente, desafio, 14º dia após o desafio e 14º dia após a reativação.....	32
Figura 5	Comparação da leitura do iELISA entre os controles positivos soros hiperimunes BoHV1 e BoHV5 e controles negativos, SFB e cepa KM71H não transformada.....	32
Figura 6	Médias obtidas a partir do uso de dois desvios padrão em comparação com as médias e o desvio padrão iniciais.....	33

Lista de Tabelas

Tabela 1	Comparação da resposta imunológica expressa por soroneutralização e iELISA entre os dias 42 e 154.....	34
-----------------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

Álcool Oxidase – AOX

Densidade Óptica – D.O.

Desvio Padrão - DP

Doses Infectantes para 50% dos Cultivos Celulares – DICC₅₀

Efeito Citopatogênico – ECP

Ensaio de adsorção imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) – ELISA

ELISA indireto – iELISA

Glicoproteína D – gD

Glicoproteína D recombinante – rgD

Herpesvírus Bovino Tipo 1 – BoHV-1 (*Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus*) (Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina)

Herpesvírus Bovino Tipo 5 – BoHV-5 (*Bovine encephalitis virus*) (Vírus da Encefalite Bovina)

Horseradish Peroxidase – HRP

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE

Madin Darby Bovine Kidney Cells – Célula de Rim Bovino – MDBK

Microlitro – µl

Methanol Utilization Slow – Mut^s

Nanograma – ng

Nanometro – nm

Ortofenilenodiamina (orthophenylenediamine) – OPD

Sistema Nervoso Central – SNC

Soro albumina bovina (*Bovine Serum Albumin*) – BSA

Soro Fetal Bovino – SFB

Soroneutralização - SN

Phosphate Buffered Saline Tween-20 – PBS-T (Tampão Fosfato Salino)

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Objetivos.....	14
3. Revisão de Literatura.....	15
3.1. Aspectos Gerais.....	15
3.2. Herpesvírus Bovino Tipo 5.....	16
3.3. Glicoproteína D Recombinante.....	18
3.4. <i>Pichia pastoris</i> como Sistema de Expressão de Proteínas Heterólogas.....	20
4. Metodologia.....	23
4.1. Concentração da rgD e da Diluição dos Soros Teste.....	23
4.2. Padronização do IELISA.....	23
4.3. Avaliação do iELISA.....	24
4.4. Soroneutralização.....	24
5. Resultados.....	26
5.1. Padronização do iELISA.....	26
5.1.1. Concentração da Glicoproteína D Recombinante.....	26
5.1.2. Diluição dos Soros Testados.....	28
5.2. Avaliação do iELISA.....	30
5.3. Ponto de Corte do iELISA.....	33
5.4. Relação iELISA – Soroneutralização.....	34
6. Discussão.....	35
7. Conclusão.....	38
Referências.....	39
Anexos.....	51

1. Introdução

O maior rebanho comercial bovino do mundo é do Brasil. Essa característica foi fundamental para elevá-lo, ainda na década passada, à condição de principal exportador de carne. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicou, em seus dados mais atuais, de 2009, rebanho nacional de 205,3 milhões de animais, dado que inclui o gado leiteiro. Segundo a fonte oficial, o plantel cresceu em 5,6 milhões de animais no fim da década passada. O Brasil ampliou em 17% o seu faturamento com as exportações de carne bovina em 2010, alcançando US\$ 4,8 bilhões frente aos US\$ 4,1 bilhões atingidos no ano anterior (SANTOS et al., 2011).

Em 2010, a Rússia importou 30% da carne *in natura* brasileira. O embargo parcial, a partir de junho de 2011, evidenciou a necessidade de ampliar as remessas e fidelizar clientes em outros países. Em agosto de 2011, o Brasil ampliou o número de frigoríficos credenciados para exportar carne bovina à Ucrânia. A Malásia também é um mercado crescente e que atrai por sua condição de referência entre os países muçulmanos da Ásia. Em 2010, os embarques nacionais aportaram em mais de 130 países. Os mercados, nacional e internacional, devem manter em 2012 um cenário muito similar ao de 2011 para o Brasil (SANTOS et al., 2011).

Entretanto, o Brasil possui grandes perdas econômicas relacionadas a doenças que atingem os rebanhos e que podem prejudicar o ganho de peso, índices reprodutivos ou até mesmo ocasionar a perda de animais. As doenças neurológicas, por exemplo, ocupam papel de destaque entre aquelas que mais afetam ruminantes (FILHO et al., 2005), uma vez que muitas apresentam alta morbidade e letalidade e desta forma contribuem com as perdas econômicas não apenas nacionais como internacionais (CLAUS et al., 2007). Destacam-se, dentre estas neuropatias, as causadas por vírus da Família *Herpesviridae*.

O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) possui genoma DNA linear fita-dupla e envelope lipoprotéico. Com característica neurotrópica é capaz de replicar eficientemente no sistema nervoso central e causar meningoencefalite (MEYER et al., 2001). Considerado um dos principais patógenos de bovinos, o BoHV-5 é

responsável por grandes prejuízos econômicos à exploração pecuária (ROIZMAN et al., 1992) por estar associado à meningoencefalite de curso geralmente fatal (DIEL et al., 2005).

Estudos moleculares e imunológicos demonstraram que o BoHV-5 e o Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) compartilham 85% de identidade no DNA genômico, porém, apresentam propriedades antigênicas distintas (DELHON et al., 2003; OLDONI et al., 2004). Entretanto, técnicas sorológicas são incapazes de distinguir infecções entre ambos, por apresentarem reações de neutralização cruzada (ROEHE et al., 1997; VOGEL et al., 2002). Vários relatos têm demonstrado que as infecções por BoHV-1 e BoHV-5 estão amplamente disseminadas no rebanho bovino brasileiro (GOMES et al., 2002; DE PAULA et al., 2005; RIET-CORRÊA et al., 2006; HOLZ et al., 2009). O diagnóstico laboratorial de infecções agudas por BoHV-5 é geralmente realizados através de testes sorológicos pareados – soroneutralização e ELISA (KAHRS, 2001).

A técnica de ELISA, por ser rápida, permite uma triagem de rebanhos, distinguindo animais com presença de anticorpos anti-BoHV-1 ou anti-BoHV-5 e pela capacidade de análise simultânea de grande número de amostras tornou-se muito utilizada para a detecção de anticorpos para o BoHV-1 em soros bovinos (NOGUEIRA-DANTAS et al., 2007). A soroneutralização é uma técnica padrão para diagnóstico laboratorial de infecções agudas pelo BoHV-1 e BoHV-5, além de ser bastante sensível. No entanto é cara e demorada e requer condições laboratoriais que possibilitem a manutenção de linhagens celulares (CHAT, 2003).

Um excelente alvo para o desenvolvimento de imunobiológicos contra os Alphaherpesvírus, as glicoproteínas do envelope viral, são essenciais no processo de penetração nas células do hospedeiro (BABIUK; VAN DRUNEN LITTEL – VAN DEN HURK; TIKOO, 1996), atuando na indução de anticorpos neutralizantes, prevenindo a infecção, e estimulam a imunidade mediada por células. As glicoproteínas mais abundantes presentes no envelope são a gB, gC e gD (THIRY et al., 2006) destacando-se pelo papel fundamental nos processos iniciais das interações entre os vírions e as células hospedeiras (SCHWYZER; ACKERMANN,

1996). A gD é o principal antígeno candidato à produção de vacinas de subunidades, pois é essencial para a penetração do virion na célula uma vez que induz uma resposta imunológica celular forte e consistente (THIRY et al., 2006). Anticorpos desenvolvidos contra a gD impedem a fusão do envelope evitando a infecção das células permissivas pelos Alphaherpesvírus (GERAGHTY; JOGGER; SPEAR, 2000; CSELLNER et al., 2000). O estímulo da resposta humoral no hospedeiro permite o emprego da gD em métodos de diagnóstico sorológico (MÉDICI et al., 2000; FERREIRA et al., 2005).

Leveduras, como a *Pichia pastoris*, utilizadas para a produção de antígenos glicoprotéicos têm recebido grande destaque nas últimas décadas (TORRES; MORAES, 2000; HYKA et al., 2010; MACAULEY-PATRICK et al., 2005; HEYLAND et al., 2010), uma vez que conciliam vantagens na manipulação e permitem a expressão de proteínas através de mecanismos eucarióticos de modificações pós-traducionais. Por ser metilotrófica tem a capacidade de crescer em cultura contendo metanol como fonte de carbono e ainda ser cultivada de forma simples utilizando níveis razoavelmente altos de metanol (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). A *P. pastoris* pode secretar proteínas de forma solúvel ao meio, simplificando etapas de purificação, expressando sob controle de um promotor induzível, evitando danos celulares pela toxicidade de algumas proteínas e permitindo a obtenção de uma alta densidade celular antes do início da expressão protéica (CEREGHINO et al., 2002; DUMMER et al., 2009).

A padronização da metodologia do ELISA Indireto utilizando a glicoproteína D, pode tornar esta uma ferramenta prática e de baixo custo e ainda uma forma de imunodiagnóstico confiável para obtenção de dados referentes à presença de BoHV-5. Dando seqüência às pesquisas na área de produção de insumos utilizando o diagnóstico de doenças infecciosas realizadas na Universidade Federal de Pelotas.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Desenvolver e padronizar a técnica de ELISA Indireto para detectar anticorpos anti-BoHV-1 e anti-BoHV-5 utilizando a glicoproteína D na forma truncada, expressa em *Pichia pastoris*, como antígeno;

Objetivos Específicos

1) Padronizar as diluições dos soros a serem testados para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis dos animais imunizados ou infectados com BoHV-5, aprimorando a técnica de ELISA Indireto, utilizando a rgD como antígeno para sensibilização de placas; 2) Avaliar o efeito da marca/ fornecedor da placa de ELISA quanto a sua eficiência; 3) Avaliar os soros de bovinos infectados ou imunizados com BoHV-1 e 5 procedentes de diferentes origens; 4) Relacionar os resultados do ELISA com os resultados da Soroneutralização.

3. Revisão de Literatura

3.1. Aspectos Gerais

Os herpesvírus são considerados uns dos principais agentes causadores de doenças virais em humanos e animais. 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 família *Herpesviridae* possui cerca de 200 espécies de vírus isolados de vários animais, como moluscos, peixes, anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos (THIRY et al., 2006). A maioria desses agentes é estreitamente associada com a espécie hospedeira. 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 110nm de diâmetro e 162 capsômeros, divididos em 12 pentâmeros e 150 hexâmeros. Os herpesvírus 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 na sua replicação.

Segundo seu comportamento biológico, a família *Herpesviridae* é classificada em três subfamílias: *Alpha-*, *Beta-* e *Gammaherpesvirinae*. 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 similaridade dos arranjos do genoma e na correlação entre as proteínas virais (ENGELS et al., 1986). Os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 pertencem à subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* e são geneticamente e antigenicamente muito semelhantes,

juntamente com outros alphaherpesvírus de importância veterinária (ROIZMAN et al., 1992). Os alphaherpesvírus caracterizam-se por um ciclo reprodutivo curto com lise das células infectadas e uma gama variável de hospedeiros e tipos celulares (ENGELS et al., 1986; FIELDS et al., 2001).

Os alphaherpesvírus apresentam um ciclo de replicação rápido e lítico tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e possuem capacidade de infectar células epiteliais e nervosas, estabelecendo infecção latente em neurônios de gânglios do sistema nervoso (ROIZMAN et al., 1992; DELHON et al., 2003). Os alphaherpesvírus podem infectar uma variedade de células epiteliais, que se constituem nas principais células-alvo para a replicação viral *in vivo*. Apesar de alguns desses vírus possuírem neurotropismo e neurovirulência marcantes (METTENLEITER, 2003), as bases moleculares para essas propriedades ainda não estão completamente esclarecidas. Entretanto, alguns fatores da célula hospedeira e dos genes virais estão associados ao processo de invasão e replicação no SNC e no desenvolvimento de doença neurológica (ABRIL et al., 2004; AL-MUBARAK; CHOWDHURY, 2004; ZAJAC et al., 2009).

3.2. Herpesvírus bovino tipo 5

Descrito pela primeira vez em 1962 na Austrália (FRENCH, 1962), o BoHV-5 foi previamente classificado como uma variante neuropatogênica do BoHV-1 – BoHV1.3. No entanto, através de comparações subseqüentes de mapas de restrição do DNA viral (ENGELS et al., 1986), reatividade com anticorpos monoclonais (MAbs) e testes de neutralização cruzada (METZLER; SCHUDEL; ENGELS, 1986; ABDELMAGID et al., 1995; ROEHE et al., 1997; SOUZA et al., 2002) foi possível distinguir os dois vírus quanto ao genoma e propriedades antigênicas.

Agente etiológico da meningoencefalite herpética bovina, enfermidade infecto-contagiosa, aguda ou subaguda. Ocorrência mais freqüente em animais jovens submetidos a situações de estresse. A doença caracteriza-se histologicamente por meningoencefalite não-supurativa com necrose do córtex cerebral (ELIAS et al.,

2004; RIET-CORREA et al., 2006; RISSI, et al., 2006). Os sintomas clínicos são caracterizados por apatia profunda, tremores, andar cambaleante e/ou em círculos, bruxismo, profusão de língua, flexionamento do pescoço, opistótono, salivação excessiva, pressionamento da cabeça contra anteparos, ataxia, decúbito, convulsões e morte (RISSI et al., 2007).

A distribuição geográfica do BoHV-5 já foi descrita em vários continentes, no entanto, parece ocorrer com maior freqüência na América do Sul, sobretudo no Brasil e na Argentina (CARRILLO et al., 1983; SALVADOR et al., 1998; SILVA et al., 2007). Vários estudos indicam que surtos de meningoencefalite associados ao BoHV-5 foram registrados em países europeus e da América do Norte, onde há baixa ocorrência dessa enfermidade. Ao contrário, no hemisfério sul há alta incidência principalmente em países da América do Sul como Argentina e Brasil (onde tem sido conduzida a maior parte dos estudos com BoHV-5), nos últimos dez anos o número de amostras de BoHV-5 isoladas em rebanhos brasileiros e argentinos tem sido bastante significativo (SOUZA et al., 2002; D'ARCE et al., 2002; SILVA et al., 2007, ESTEVES et al., 2007). 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 ou que não utilizam vacinação em grande escala (METZLER et al., 1986; D'OFFAY et al., 1995; ELY et al., 1996).

A transmissão de BoHV-5 ocorre principalmente por contato direto ou indireto entre bovinos, e os sítios de replicação primária são as mucosas oral, nasal, orofaríngea e ocular. Nesses locais ocorre uma fase de replicação primária em células epiteliais, após a qual o vírus invade as terminações nervosas e é transportado até neurônios de gânglios sensoriais, nos quais pode replicar ativamente ou estabelecer latência (ENGELS & ACKERMANN, 1996). BoHV-5 pode invadir o SNC por duas vias: 1) transporte intraaxonal por nervos cranianos ou 2) barreira hematoencefálica (RISSI et al., 2007). A localização e intensidade das

lesões no encéfalo de bovinos afetados por meningoencefalite por BoHV-5, mais acentuadas nas porções rostrais do telencéfalo (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; ELIAS et al., 2004; RISSI et al., 2006), e a ausência de lesões no gânglio de Gasser de bovinos afetados pela doença (RISSI et al., 2006) fornecem fortes evidências de que a via olfatória é a principal rota de invasão do vírus no SNC em surtos espontâneos.

3.3. Glicoproteína D

Os Herpesvírus bovino tipo 1 e 5 possuem mais de dez glicoproteínas no envelope viral, que desempenham importantes funções na biologia do vírus, pela mediação da penetração nas células, fusão, disseminação direta entre células e interação com o sistema imunológico do hospedeiro (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996). As glicoproteínas podem ser classificadas em essenciais, quando são necessárias para replicação viral produtiva em células de cultivo, e não-essenciais, se são dispensáveis para a multiplicação viral *in vitro* (SCHWYZER & ACKERMANN, 1996; METTENLEITER, 2003).

Dentre as principais glicoproteínas do envelope, a glicoproteína D (gD) é o principal antígeno. Presente apenas nos Alphaherpesvírus, com exceção do Varicella-Zoster, esta glicoproteína é essencial para a penetração do virion na célula. Estudos realizados com anticorpos anti-gD mostram que partículas virais com o sítio de ligação ao receptor da gD bloqueado são incapazes de realizar a fusão do envelope com a membrana, impedindo a infecção (ABDELMAGID et al., 1995; ZHU; LETCHWORTH, 1996; ZHU; WU; LETCHWORTH, 1997; GERAGHTY; JOGGER; SPEAR, 2000; CSELLNER et al., 2000; GERAGHTY et al., 2001).

A gD também constitui um importante mecanismo de defesa do BoHV-1, uma vez que pode ligar-se a receptores celulares da família dos Receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFR), semelhantes aos receptores conhecidos como *Herpesvirus Entry Mediator* (HVEM ou HveA), os quais permitem a ligação da gD dos Herpes Simplex Vírus (HSV) (WHITBECK et al., 1997; HANON, et al., 1999;

JONES; CHOWDHURY, 2008). A ligação a estes receptores induz a produção de sinais celulares capazes de iniciar a apoptose em certos tipos celulares, como as células mononucleares do sangue e linfócitos, contribuindo com a imunossupressão de animais infectados (BAKER; REDDY, 1998; HANON et al., 1998; HANON, et al., 1999; JONES; CHOWDHURY, 2008).

Além dos receptores da família dos TNFR, moléculas conhecidas como Nectina-1 (HveC) também atuam como receptores para a gD do HSV e do BoHV-1 (CONNOLLY et al., 2001; JONES; CHOWDHURY, 2008). Estas moléculas pertencem à superfamília das imunoglobulinas e estão envolvidas nas interações de adesão célula-célula, sendo expressas principalmente em células epiteliais e neurônios (GERAGHTY et al., 2001; SPEAR; LONGNECKER, 2003).

Comparações estruturais realizadas com gD dos HSV-1 e 2, BoHV-1 e SuHV-1 demonstram a conservação de 6 cisteínas na cadeia, sugerindo a formação de pontes dissulfídicas, mantidas também na cadeia da gD do BoHV-5 (TIKOO et al., 1990; ABDELMAGID et al., 1995; DASIKA; LETCHWORTH, 1999). Além disso, também apresenta sítios para a adição covalente de carboidratos aos resíduos de asparagina (Asn-X-Ser/Thr) constituindo a N-glicosilação. A gD do BoHV-1 e do HSV possui na sua seqüência de aminoácidos três sítios de N- glicosilação enquanto a do BoHV-5 apenas dois, um localizado no domínio extracelular e outro no domínio citoplasmático (TIKOO et al., 1993; WHITBECK et al., 1997). Importante para a manutenção das funções biológicas e imunológicas das glicoproteínas, esse padrão de glicosilação irá determinar a conformação tridimensional (3D) da proteína (TIKOO et al., 1993).

No entanto, nem todos os prováveis sítios recebem a adição de carboidratos e a gD do BoHV-1 apresenta a N-glicosilação em apenas um sítio (Asn102), localizado no domínio extracelular. A localização dos dois sítios da gD do BoHV-5 sugere, desta forma, que apenas o sítio do domínio extracelular desta glicoproteína é glicosilado (TIKOO et al., 1993; KUKURUZINSKA; LENNON, 1998).

Além dos sítios de N-glicosilação, a gD dos alphaherpesvírus apresenta sítios de O-glicosilação (GalNAc1-O-Ser/Thr), importantes também na manutenção da

conformação 3D da molécula (TIKOO et al., 1993; HOUNSELL; DAVIES; RENOUF, 1996). Estas modificações pós-traducionais, juntamente com a adição de ácido siálico, contribuem no processamento do precursor da gD até a formação de um oligossacarídeo complexo e heterogêneo (WENSKE; BRATTON; COURTNEY, 1982). A adição de resíduos de ácido siálico em células de mamíferos ocorre nos carboidratos terminais 2,3 ou 2,6, ocorrendo nas etapas finais da rota de glicosilação e estabilizando glicoproteínas como a gD, contribuindo, portanto, na sua infectividade (TEUTON; BRANDT, 2007).

3.4. *Pichia pastoris* como sistema de expressão de proteínas heterólogas

A levedura *Pichia pastoris*, utilizada como sistema de expressão de proteínas heterólogas, tem recebido destaque nas últimas duas décadas (TORRES; MORAES, 2000). A utilização desta levedura metilotrófica proporciona vantagens com relação aos sistemas de expressão em procariotos, mantendo a fácil manipulação genética associada ao crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples, permitindo a sua expansão para a produção de proteínas em escalas industriais, além de possuir um forte promotor induzível por metanol (CEREGHINO; CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000; TORRES; MORAES, 2000; CEREGHINO et al., 2002).

Considerada uma levedura com baixa capacidade fermentativa tem preferência por crescimento respiratório (CEREGHINO et al., 2002). A vantagem desta característica em relação às leveduras fermentativas é a possibilidade de obter cultivos com densidades celulares extremas sem que os produtos de fermentação causem danos de toxicidade para as células (TORRES; MORAES, 2000; CEREGHINO et al., 2002).

Por ser um organismo eucarioto simples, *Pichia pastoris*, proporciona a expressão de proteínas com modificações pós-traducionais, como a glicosilação e adição de pontes dissulfídicas, além de secretar as proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, simplificando etapas de purificação (CEREGHINO; CREGG, 1999). Além da capacidade de crescimento através da utilização de metanol como fonte

única de carbono, a rota metabólica é totalmente reprimida na presença de outras fontes, como glicerol.

Enzimas que participam desta rota estão presentes em altos níveis na célula, como a Álcool Oxidase (AOX) que pode chegar a níveis acima de 30% do total de proteínas celulares. No entanto, estas mesmas enzimas não são detectáveis quando outras fontes de carbono estão disponíveis (CEREGHINO; CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000). A primeira etapa no metabolismo do metanol é a sua oxidação pela AOX, resultando na formação de formaldeído e peróxido de hidrogênio, o qual é enviado para os peroxissomos para evitar a toxicidade. Por ter pouca afinidade com O_2 , a AOX é gerada em grandes quantidades pela célula, como forma de compensação (COUDERC; BARATTI, 1980; CREGG et al., 1985). Dois genes codificam para a enzima AOX: *AOX1* e *AOX2*, sendo o primeiro responsável por grande parte da presença de AOX ativa nas células. A regulação dos genes envolve dois mecanismos: inibição/desinibição e um mecanismo de indução (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Alguns vetores obtidos comercialmente, como o pPICZB comercializado pela Invitrogen (INVITROGEN, 2005), possuem a seqüência da extremidade 5' do promotor *AOX1* e na extremidade 3', uma seqüência necessária para conduzir o término da transcrição. Entre as seqüências promotoras e terminadoras, há um sítio de múltipla clonagem para a inserção do gene heterólogo. Para a detecção da proteína recombinante bem como a purificação mediante cromatografia de afinidade pode ser realizada pela adição de uma cauda de seis histidinas (6xHis) na porção carboxi-terminal da proteína (CEREGHINO; CREGG, 2000; DALY; HEARN, 2005). Procedimentos de transformação em sistemas metilotróficos empregam métodos similares descritos para outras leveduras, sendo que a eletroporação pode ser utilizada (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Células de *P. pastoris* recombinantes devem ainda ser selecionadas quanto ao fenótipo de utilização de metanol. A cepa KM71H possui uma deleção no gene *AOX1*, o qual é parcialmente substituído pelo *ARG4* de *Saccharomyces cerevisiae*. Como possui apenas o *AOX2*, permite um crescimento lento em metanol,

apresentando fenótipo Mut^s (Methanol Utilization Slow). A KM71H, devido à utilização lenta de metanol, produz melhor algumas proteínas recombinantes, além de não necessitarem de grandes quantidades de metanol em produções de larga escala (CREGG et al., 1985; CEREGHINO; CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000).

Diversas proteínas virais de interesse médico ou veterinário já foram eficientemente expressas em *P. pastoris*, como a gD de BoHV-1 (ZHU; WU; LETCHWORTH, 1997, 1999), do HSV 1 e 2 (KOOIJ et al., 2002), Herpesvírus Eqüino tipo 1 (EHV-1) (RUITENBERG et al., 2001), proteínas dos vírus da Hepatite B e C (HARDY et al., 2000; HAN et al., 2006; LEE et al., 2006; MARTINEZ-DONATO et al., 2006; LI et al., 2007), nucleoproteína do Coronavírus responsável pela *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS – SCoV) (HAN et al., 2004; LIU et al., 2004), proteínas estruturais do vírus da Dengue (SUGRUE et al., 1997; BISHT et al., 2001; WEI et al., 2003; VALDÉS et al., 2007), glicoproteínas do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (JIANG et al., 2005; ZHAO et al., 2007), dentre outras (FARNÓS et al., 2005, 2006; LIU et al., 2007; WANG et al., 2007), mostrando que esta levedura pode ser um recurso para a expressão de proteínas de forma segura, em larga escala e com estruturas 3D semelhantes às proteínas nativas, possibilitando o uso destas tanto em vacinas como para testes de imunodiagnóstico para obtenção de dados confiáveis referentes aos BoHV-1 e 5.

4. Metodologia

A padronização e validação do iELISA incluíram as seguintes etapas: (1) Concentração do antígeno rgD e diluição dos soros; (2) Padronização do iELISA; (3) Avaliação do iELISA; (4) Soroneutralização dos soros testados.

4.1. Concentração da rgD e diluição dos soros

Para determinar a concentração mais adequada do antígeno, a glicoproteína D recombinante foi testada nas concentrações de 12,5ng, 25ng, 50ng, 100ng, 150ng e 200ng/ placa. Para os soros foram testadas as diluições: 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 e 1:500. Os ELISAs realizados para determinar a concentração do antígeno e também a diluição dos soros foram feitos em triplicatas com duas repetições independentes.

4.2. Padronização do iELISA

Com a finalidade de padronizar a técnica de ELISA foram utilizadas microplacas (Cral e Nunc) de 96 orifícios. O antígeno (rgD) diluído em 10ml de Tampão Carbonato/ Bicarbonato – $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 9,6) para sensibilização das placas, mantidas em câmara úmida, “*overnight*”, à temperatura de 4°C. Em seguida adicionou-se solução bloqueio – 0,5 g de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé, BR) + 0,3g de caseína, diluídos em PBS-TWEEN (0,05% de TWEEN 20; 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 100mM Na_2HPO_4 ; 2mM KH_2PO_4), pH 7,2 – pelo período de 60min a 37°C. Posteriormente, foi adicionado, em triplicata, cada soro a ser testado e inoculado por 60min a 37°C. Para detecção de anticorpos foi utilizado soro Anti-Bovino IgG conjugado com HRP (Horseradish peroxidase) diluído 1:20.000 em PBS-T, por 90min a 37°C em câmara úmida a 4°C. Após, foi adicionado o substrato para a coloração (10mL de Tampão Fosfato de Citrato – 0,05M Fosfato de Sódio - Na_2HPO_4 anidro e 0,02M Ácido Cítrico) + 0,004mg de o-Phenylenediamine ou ortho-

phenylene-diamine (OPD) + 10µl de H₂O₂, por 15min em câmara escura. Para a leitura da Densidade Óptica, em absorbância, foi usado espectrofotômetro com filtro de 490nm. Como controle positivo foi utilizado soro hiperimune de bovinos imunizados com BoHV-1 e BoHV-5 – cedidos pela prof. Ana Claudia Franco, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – e como controle negativo Soro Fetal Bovino (SFB) e KM71H não transformada.

4.3. Avaliação do iELISA

Análises por iELISA foram realizadas com o soro individual dos animais em coletas que aconteceram em intervalos de sete dias. Entre os soros testados estavam amostras de animais do grupo que recebeu a vacina de BoHV-5 inativado e de animais que serviram de controle, não sendo vacinados. Os dias testados para o grupo que recebeu a vacina foram: dia zero, dia 14 (14^o dias após a 1^a dose), dia 28 (dia da 2^a dose), dia 42 (14^o dia após a 2^a dose), dia 77 (desafio), dia 91 (14^o dia após o desafio), dia 98 (21^o dia após o desafio) e dia 154 (7^o dia após a reativação). Os soros relativos ao dia 77 foram coletados antes da realização do desafio. Totalizando 64 soros coletados de 8 animais diferentes. O teste foi avaliado a partir da análise de 70 amostras de soros bovinos pertencentes ao laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo1).

4.4. Soroneutralização

A técnica de soroneutralização em bovinos e camundongos foi realizada, respectivamente, nos laboratórios de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte da tese de doutorado do pesquisador Fabrício Souza Campos e no laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas como parte da tese de doutorado da pesquisadora Luana Alves Dummer. A técnica foi executada de acordo com Fischer et al. (2007), utilizando Herpesvírus bovino tipo 5 e células *Madin Darby Bovine Kidney Cells*

(MDBK). Brevemente, cada soro foi diluído em base logarítmica 2 de 1:2 até 1:256. Após a distribuição (25µl) em microplacas de 96 cavidades (TPP), 25µl de suspensão de BoHV-5 contendo 100DICC_{50%} foram adicionados e as microplacas incubadas por 60min a 37°C em atmosfera umedecida contendo 5% CO₂. Posteriormente, cerca de 30.000 a 50.000 células MDBK foram adicionadas por cavidade, incubando até a leitura em microscópio óptico invertido, até a observação de 100DICC_{50%} no controle celular.

5. Resultados

5.1. Padronização do iELISA

5.1.1. Concentração da glicoproteína D recombinante

Os valores de absorvância obtidos com o teste ELISA Indireto variaram conforme as concentrações (12,5ng a 200ng de rgD/ orifício) testadas. Variáveis como o tipo de placa (Nunc e Cral), diluição do soro (1:100 a 1:500) e título de anticorpos obtidos na SN (0 e 512) também foram analisadas (Figuras 1).

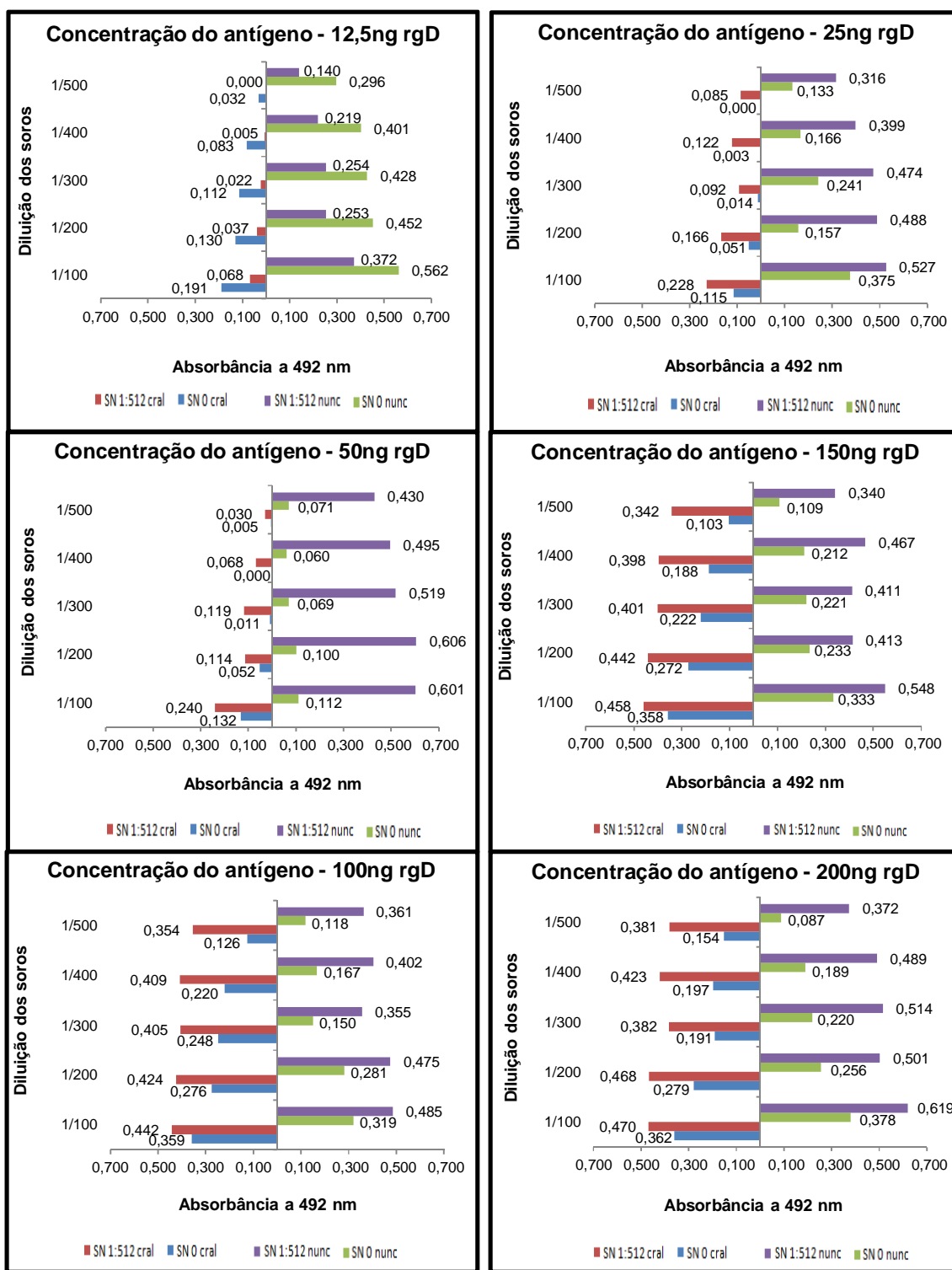


Figura 1. ELISA de soros bovinos contra BoHV-5. Os dados representam as absorvâncias médias dos soros positivos (SN 512) e negativos (SN 0) nas diluições 1/500, 1/400, 1/300, 1/200 e 1/100 utilizando a rgD nas concentrações de 12,5 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200 ng/ orifício.

5.1.2. Diluição dos Soros

Os valores de absorvância obtidos com o teste iELISA também variaram conforme as diluições de soros testadas (1:100 a 1:500). Variáveis como o tipo de placa (Nunc e Cral), diluição do antígeno (12,5ng a 200ng) e título de anticorpos obtidos na SN (0 e 512) também foram analisadas (Figura 2).

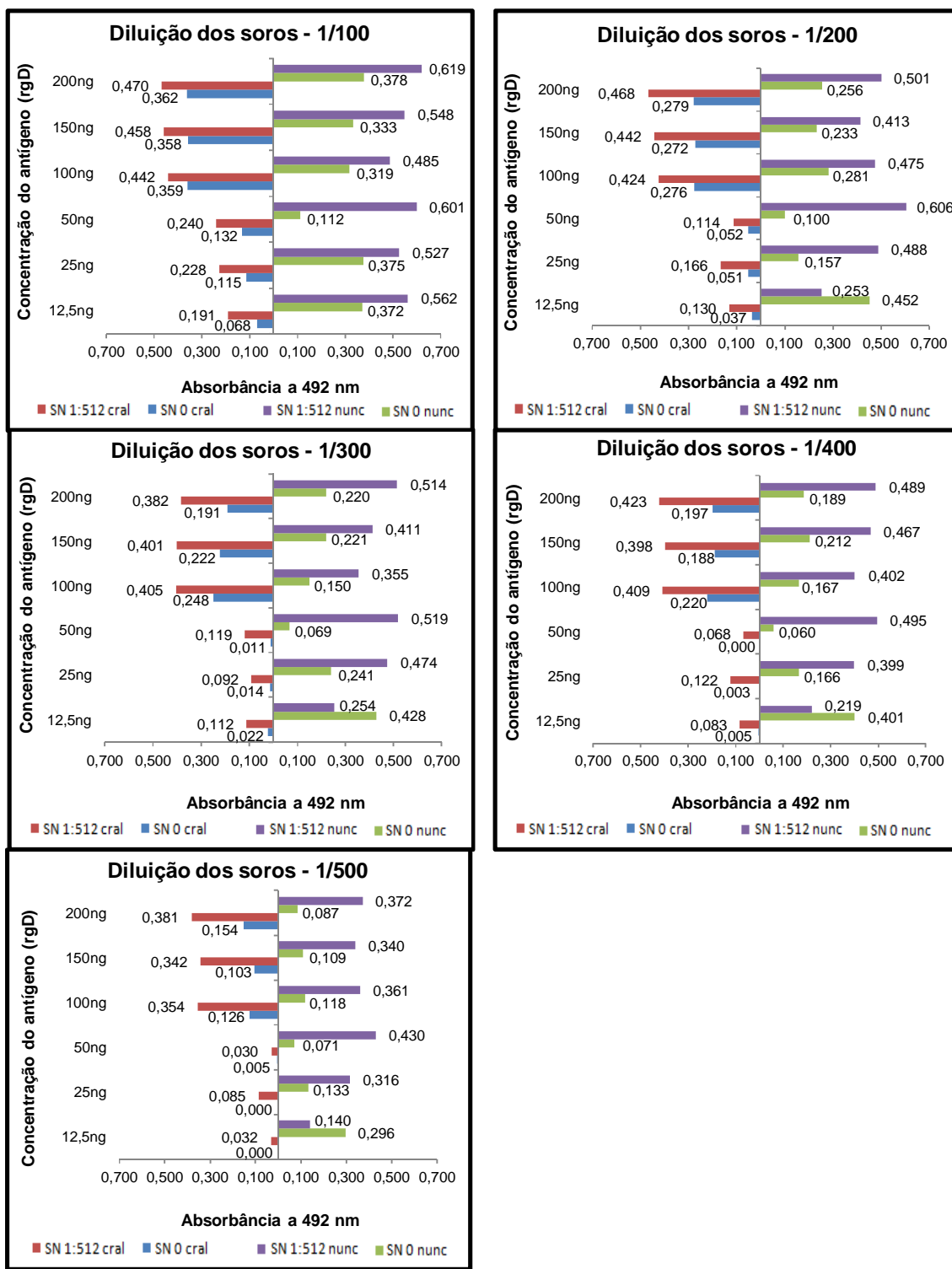


Figura 2. ELISA de soros bovinos contra BoHV-5. Os dados representam as absorbâncias médias dos soros positivos (SN 512) e negativos (SN 0) nas concentrações 200, 150, 100, 50, 25, 12,5 ng/orifício utilizando as diluições dos soros 1/100, 1/200, 1/300, 1/400 e 1/500 μ l.

5.2. Avaliação do iELISA

Baseados nos resultados anteriores, foi padronizada a utilização de 50 ng de rgD, diluição de soro 1:400 e placa Nunc para a avaliação do iELISA. Os resultados obtidos no iELISA e na Soroneutralização demonstraram que apesar de um título baixo (8) nos anticorpos neutralizantes na coleta do dia 77, houve maior sensibilidade no iELISA. A absorbância obtida pelos animais controles na coleta 77 apresentaram uma média de 0,134 no iELISA e zero em títulos pela Soroneutralização (Figura 4). As médias da Soroneutralização permaneceram baixas praticamente até a coleta do dia 77, exceto pelos dados das médias das coletas do dia 42 que possuem leitura de 64, já considerada como uma resposta alta para o diagnóstico sorológico (Figura 3).

Os animais do grupo controle (não vacinados, porém desafiados e reativados) apresentaram leituras baixas provavelmente pela não formação ou pouca presença de anticorpos, uma vez que não foram imunizados com o BoHV-5 (Figura 4).

Os soros controle hiperimune positivo para BoHV-5 e para BoHV-1 utilizados durante o experimento apresentaram absorbâncias equivalentes as medidas nos dias 77, 91 e 98. Já os controles negativos (SFB e KM71H não transformada) mostraram durante todo o experimento absorbâncias iguais ou muito próximas de zero (Figura 5).

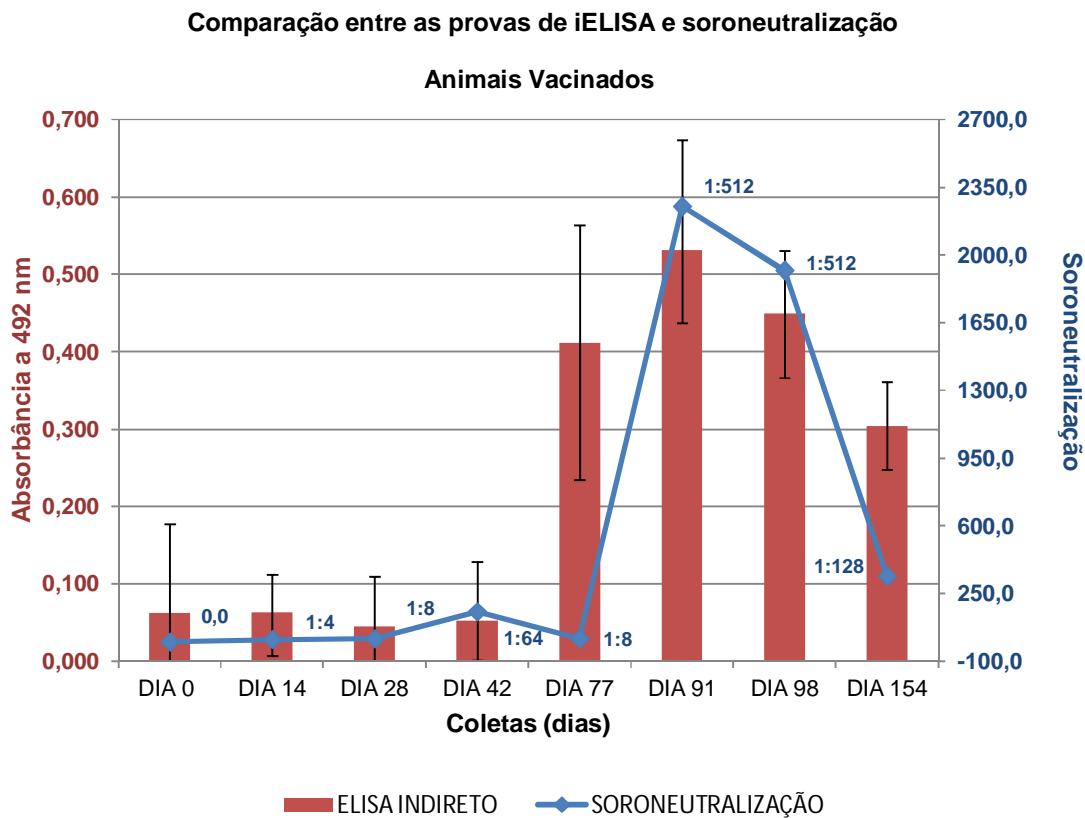


Figura 3. Comparação entre as médias das absorbâncias no ELISA Indireto com o antígeno rgD e Soroneutralização (SN) utilizando vacina inativada. Desvio padrão das médias das leituras da absorbância no ELISA de cada coleta.

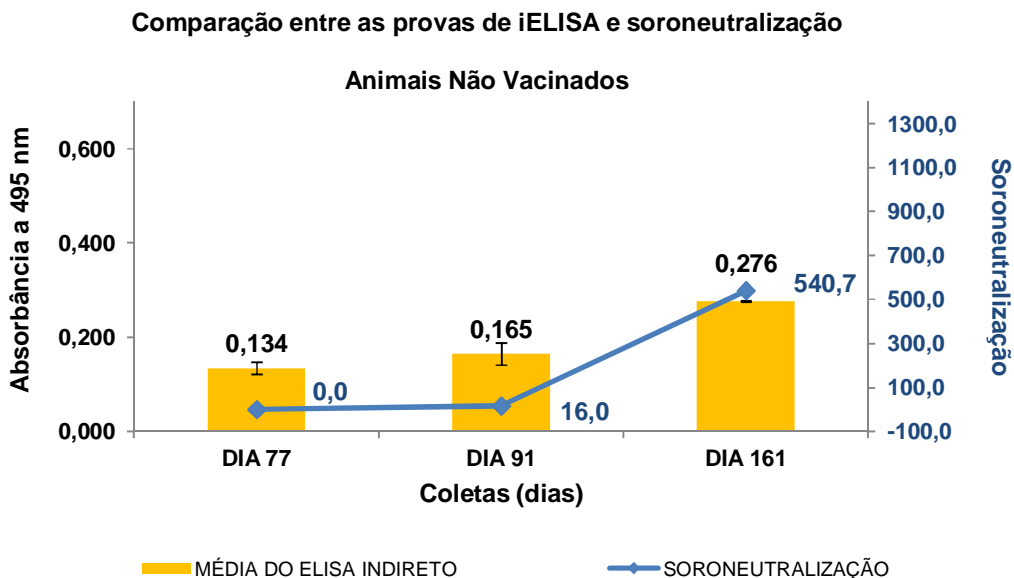


Figura 4. Dados referentes a absorvância (iELISA) e soroneutralização (SN) dos animais pertencentes ao grupo controle (animais não vacinados), obtidos nas coletas dos dias 77, 91 e 161, respectivamente, desafio, 14^o dia após o desafio e 14^o dia após a reativação.

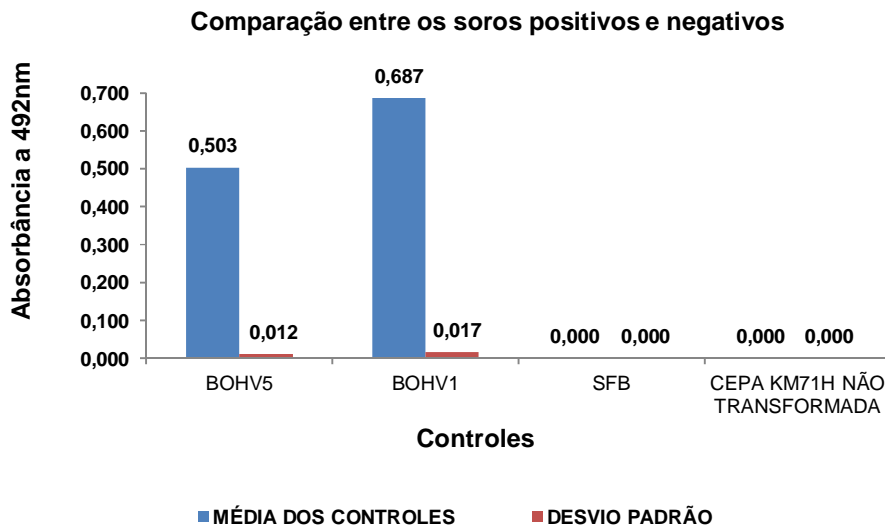


Figura 5. Comparação dos resultados da absorvância entre os controles positivos (BoHV5 e BoHV1) e negativos (SFB e cepa KM71H não transformada) obtidos a partir da diluição 1/400 dos soros e concentração de 50 ng de rgD.

5.3. Ponto de Corte do iELISA

Foram utilizados os resultados obtidos pela absorbância e os dados da Soroneutralização considerados positivos e os negativos. O ponto de corte foi ajustado a partir da diferença do desvio padrão calculado das médias de absorbância de cada coleta (Figura 3) que tiveram os seus valores acrescidos de dois desvios padrão para mais e para menos. As novas médias de absorbância (Figura 16) continuaram apresentando o mesmo padrão original (Figura 13).

Assim, as médias de absorbância a partir de 0,300 (Figura 6) ficaram caracterizadas como animais que provavelmente estiveram em contato com o herpesvírus bovino. Médias de absorbância iguais/inferiores a 0,150 (Figura 4) (Figura 6) como animais que não estiveram em contato recente com nenhum dos herpesvírus bovino.

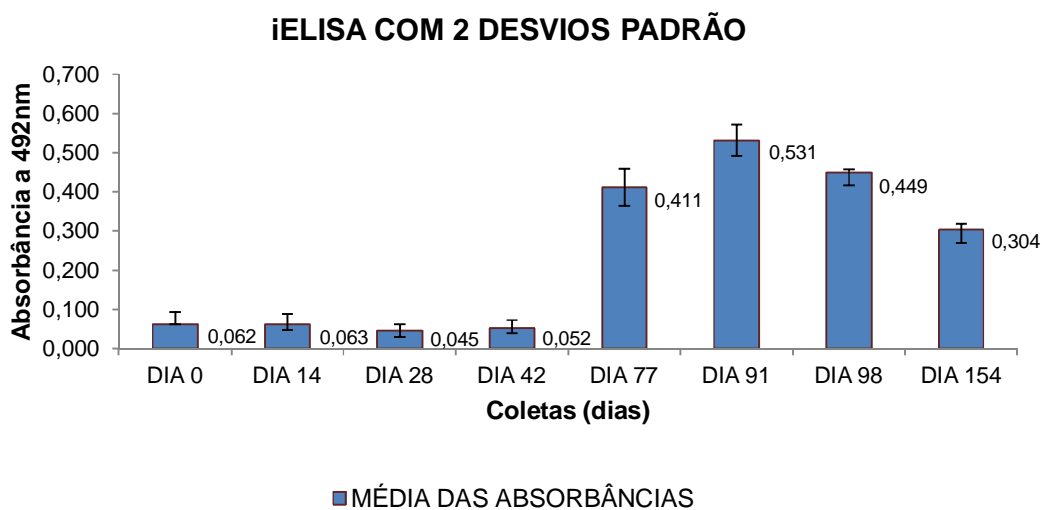


Figura 6. Médias obtidas a partir do uso de dois desvios padrão em comparação com as médias e o desvio padrão iniciais.

5.4. Relação iELISA – Soroneutralização

Os resultados do iELISA em relação aos dados da Soroneutralização mostram que os testes podem ser mais sensíveis (iELISA) ou menos (Soroneutralização) (Figura 3). A relação entre as técnicas também pode ser vista, pela quantidade de vezes, que a leitura obtida a partir de uma determinada coleta em relação à subsequente apresenta resultados com tendências comparáveis (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação da resposta imunológica expressa por Soroneutralização e iELISA entre os dias 42 e 154.

COLETAS	SN	iELISA
42 – 91	14,5 (x menor)	10,2 (x maior)
91 – 98	1,2 (x menor)	1,2 (x maior)
98 – 154	5,6 (x menor)	1,5 (x maior)

6. Discussão

O presente trabalho descreve a padronização e avaliação de um iELISA utilizando a glicoproteína D recombinante de BoHV-5 para a detecção de anticorpos séricos que reagem com BoHV-5 e também BoHV-1. O ensaio consolidado apresenta como principais propriedades: facilidade e simplicidade de execução; custo baixo; aplicabilidade para a detecção de anticorpos que reagem contra BoHV-5 e também BoHV-1. Essas propriedades sugerem que o iELISA pode ser utilizado na rotina de diagnóstico sorológico e no monitoramento do status imunológico do rebanho desses dois vírus, podendo representar uma alternativa para a Soroneutralização e também em substituição a kits de ELISA importados.

A glicoproteína D, é essencial para a penetração do vírion na célula, está presente nos estágios iniciais da infecção, assim, é uma das primeiras proteínas a aparecer na célula infectada e em grande quantidade. Estudos realizados com anticorpos anti-gD mostram que partículas virais com o sítio de ligação ao receptor da gD bloqueado são incapazes de realizar a fusão do envelope com a membrana, impedindo a infecção (ABDELMAGID et al., 1995; CSELLNER et al., 2000; GERAGHTY et al., 2001).

Alguns epítomos conformacionais são necessários para o reconhecimento do receptor, no entanto, a existência de outros epítomos pode estimular a formação de anticorpos não essenciais para a técnica de Soroneutralização, a qual consiste na ligação de anticorpos em determinados epítomos bloqueando o sítio de combinação antígeno-receptor celular (REF). Desta forma, pode-se sugerir um aumento na sensibilidade do teste imunoenzimático, sendo possível termos um título maior de anticorpos anti-gD no iELISA, pois há a formação de um número maior de anticorpo anti-gD no animal infectado com o vírus. Entretanto, não necessariamente todos os anticorpos formados contra a gD serão neutralizantes. Assim no iELISA com a rgD estão sendo detectados anticorpos que reconhecem epítomos importantes na neutralização do vírus e outros que podem não ser importantes para a neutralização em si, mas que acabam sendo formados, através do reconhecimento de vários

epítomos. Neste trabalho, tal característica foi observada na absorvância do iELISA na coleta de soro do dia 77. Assim, o iELISA mostrou ser uma ferramenta sensível e prática para diagnóstico do Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5.

Apesar da alta identidade genômica, 85%, BoHV-5 e BoHV-1 podem ser diferenciados (DELHON, et al.,2003) em nível laboratorial por PCR (CLAUS et al., 2005) e pela análise de restrição genômica (D'ARCE et al., 2002; ENGELS et al., 1986). A maioria das proteínas do BoHV-5 é homóloga às do BoHV-1.

A gD é a glicoproteína com maior similaridade entre o BoHV-5 e BoHV-1, representando 98% de identidade, enquanto outras como a gB e a gC apresentam 93% e 75% de identidade, respectivamente (DELHON et al., 2003). Assim, testes sorológicos de rotina muitas vezes são incapazes de distinguir entre esses dois vírus. A Proteção cruzada entre BoHV-5 e BoHV-1, através de imunização ativa e passiva, já foi demonstrada experimentalmente em bovinos (BELKNAP et al., 1994; CASCIO et al., 1999).

As pequenas diferenças antigênicas existentes entre BoHV-5 e BoHV-1 podem resultar em títulos diferentes na soroneutralização, que são detectáveis quando amostras de soro de animais infectados por um destes vírus são testadas em paralelo frente a diferentes subtipos de BoHV-1 e 5 (HOLZ et al., 2009). No entanto, a diferenciação de BoHV-1 e 5 nem sempre é possível e uma parcela considerável de amostras com anticorpos neutralizantes reage em diluições iguais tanto com o BoHV-5 quanto com BoHV-1 (SILVA et al., 2007).

A reatividade cruzada foi demonstrada no presente trabalho, que utilizou a glicoproteína D recombinante de BoHV-5 como antígeno. Os dados obtidos no ELISA observados neste estudo corroboram com a similaridade entre a gD dos dois vírus. Observamos reações cruzadas com a rgD de BoHV-5 com o soro hiperimune de BoHV-1, surpreendentemente com DO mais elevado que os resultados com soro hiperimune BoHV-5 (figura 14). Essa reatividade sorológica cruzada tem sido responsabilizada, em parte, pela baixa prevalência do BoHV-5 e pela baixa ocorrência de enfermidade neurológica em países que vacinam regularmente contra o BoHV-1 (STUDDERT, 1989; D'OFFAY et al., 1995; VOGEL et al., 2002; SILVA,

2007). Os resultados obtidos com o experimento demonstram que a reatividade sorológica cruzada entre o BoHV-5 e BoHV-1 pode traduzir-se em proteção cruzada.

Pelos resultados obtidos com relação a reação cruzada observada entre os dois vírus, sugere que possamos diferenciá-los, pois com os soros nas mesmas diluições as absorbâncias foram mais altas para BoHV-1 que BoHV-5, desta forma podendo se diferenciar a ocorrência de um surto.

Devido ao teste desenvolvido ter produzido resultados apenas qualitativos (positivo/negativo), não permite a diferenciação entre os dois agentes. Os resultados positivos no ELISA indicam a presença de anticorpos contra um destes vírus (e que reagem também com o outro, por conta da similaridade em geral e também entre proteínas) ou contra os dois vírus em casos de co-infecção. As diferenças de sensibilidade observadas quando se compararam os resultados do ELISA com a Soroneutralização frente ao BoHV-5 não comprometem a utilização do ensaio, pois mesmo a Soroneutralização quando realizada frente aos dois vírus (e mesmo frente a diferentes isolados do mesmo vírus) apresenta um percentual significativamente maior de resultados discordantes (ROEHE et al., 1997, HOLZ et al., 2009).

O estudo realizado em camundongos a partir de vacina recombinante utilizando a glicoproteína D como antígeno (Anexo 2) contra o BoHV-5, demonstrou uma sensibilidade maior do iELISA, no reconhecimento de anticorpos formados em um curto espaço de tempo. Em relação, a vacinação utilizando como antígeno o BoHV-5 inativado onde o iELISA somente apresentou leitura na absorbância acima da considerada como animal infectado/ doente em um tempo maior. Explicado pela baixa apresentação da gD no antígeno inativado e presente no vírus ativo sendo facilmente detectado em casos de exposição. O que pode significar a forma mais rápida de reconhecimento para um rebanho recentemente exposto ao agente causador da Meningoencefalite. Dessa forma, podendo substituir a soroneutralização como teste sorológico para esses vírus, devido às dificuldades e restrições que o teste apresenta, sobretudo, a dificuldade de teste de um grande número de amostras (FLORES, 2007).

7. Conclusão

O estudo possibilitou viabilizar a padronização na diluição dos soros dos animais imunizados ou infectados com BoHV-5.

A padronização permitiu demonstrar diferenças entre as placas empregadas e a escolha da mais adequada para o desenvolvimento do iELISA.

O iELISA desenvolvido a partir dos soros utilizados no experimento foi capaz de discriminar animais considerados positivos, que estiveram em contato recente, de animais negativos, que apresentaram títulos baixos de anticorpos contra o Herpesvírus bovino tipo 5.

O estudo realizado demonstrou que a utilização da glicoproteína D recombinante produzida em biorreator a partir do cultivo da levedura *Pichia pastoris* como um sistema de expressão de proteínas heterólogas no desenvolvimento de um teste imunodiagnóstico, ELISA Indireto, é viável.

Método rápido em sua execução e utilizando de uma metodologia simplificada e segura, e ainda, de um custo mais acessível, o ELISA Indireto é uma alternativa com capacidade de se estabelecer no mercado comercial.

Dentre os usos potenciais do teste destacam-se estudos soro-epidemiológicos, monitoramento de rebanhos e diagnóstico individual.

Eventualmente, este ensaio pode ser utilizado em programas de combate às infecções por BoHV-5 e também BoHV-1.

Referências

ABDELMAGID, O. Y.; MINOCHA, H. C.; COLLINS, J. K.; CHOWDHURY, S. I. Fine mapping of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. **Virology**, v. 206, p. 242-253, 1995.

ABRIL, C.; ENGELS, M.; LIMAN, A. Both viral and host factors contribute to Neurovirulence of bovine Herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. **Journal of Virology**, v. 78, p. 3644-3653, 2004.

AL-MUBARAK, A.; CHOWDHURY, S. I. In the absence of glycoprotein I (gI), gE determines bovine herpesvirus type 5 neuroinvasiveness and neurovirulence. **Journal of Neurovirology**, v. 10, n. 4, p. 233-243, 2004.

ASHBAUGH, K.; THOMPSON, K.; BELKNAP, E.; SCHULTHEISS, P.; CHOWDURY, S.; COLLINS, J. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v. 9, n. 4, p. 387-394, 1997.

BABIUK, L. A.; van DRUNEN-LITTEL-van den HURK, S.; TIKOO, S. K. Immunology of Bovine Herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 31-42, 1996.

BAKER, S. J.; REDDY, E. P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. **Oncogene**, v. 17, p. 3261-3270, 1998.

BELKNAP, E. B.; COLLINS, J. K.; AYERS, V. K. *et al.* Experimental infectious of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3 **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 358-365, 1994.

BISHT, H.; CHUGH, D. A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Expression and purification of Dengue Virus type 2 envelope protein as a fusion with Hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 23, p. 84-96, 2001.

CARRILLO, B. J.; AMBROGÍ, A.; SCHUDEL, A.; VAZQUEZ, M.; DAHME, A.; POSPISCHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt für Veterinär Medizin B**, v. 30, n. 5, p. 327-332, 1983.

CASCIO, K. E.; BELKNAP, E. B.; SCHULTHEISS, P. C.; AMES, A. D.; COLLINS, J. K. Encephalitis induced by Bovine Herpesvirus 5 and protection by prior vaccination of infection with Bovine Herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 134-139, 1999.

CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 329-332, 2002.

CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 422-427, 1999.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; FOLGUERASFLATSCHART, 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.

CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. A. Bovine Herpesvirus 5 detection by virus isolation in cell culture and MULTIPLEX-PCR in central nervous system from cattle with neurological disease in Brazilian herds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 15, p. 485-490, 2007.

COLODEL, E. M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R. M.; SILVA, R. R. P. da; SOUZA, M. de A.; FILHO, J. A. de O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por Herpesvírus Bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 293-298, 2002.

CONNOLLY, S. A.; WHITBECK, J. C.; RUX, A. H.; KRUMMENACHER, C.; van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S. COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J. Glycoprotein D homologs in Herpes Simplex Virus type 1, Pseudorabies Virus, and Bovine Herpes Virus type 1 bind directly to Human HveC (Nectin-1) with different affinities. **Virology**, v. 280, p. 7-18, 2001.

COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, p. 2279-2289, 1980.

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; MADDEN, K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 12, p. 3376-3385, 1985.

CSELLNER, H.; WALKER, C.; WELLINGTON, J. E.; McLURE, L. E.; LOVE, D. N.; WHALLEY, J. M. EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. **Archives of Virology**, v. 145, p. 2371-2385, 2000.

DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, p. 119-138, 2005.

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

DASIKA, G. K.; LETCHWORTH, G. J. Cellular expression of Bovine Herpesvirus 1 gD inhibits cell-to-cell spread of two closely related viruses without blocking their primary infection. **Virology**. V. 245, p. 24-36, 1999.

DELHON, G.; MORAES, M. P.; LU, Z.; AFONSO, C. L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. Genome of Bovine Herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347, 2003.

DE PAULA, R. R.; SOUZA, M. A.; COLODEL, E. M.; HÜBNER, S. O.; BRUM, K. B.; JORGE, K. B. C.; DAMASCENO, A. D. Meningoencefalite causada pelo BHV-5 em um bovino do Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 2, 2005.

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

DIEL, D. G.; FONSECA, E. T. da; SOUZA, S. F. de; MAZZANTI, A.; BAUERMANN, F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. O Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de

coelhos, dependendo da via de inoculação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 164-170, 2005.

DUMMER, L. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; NIZOLI, L. Q.; MORAES, C. M. de; ROCHA, A. R.; SOUZA, L. L. de; ROOS, T.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. L. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of *Bovine herpesvirus type 5* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 161, p. 84-90, 2009.

ELIAS, F.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalacia por Herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2004.

ELY, R. W.; d'OFFAY, J. M.; RUEFER, A. H. et al. Bovine herpes viral encephalitis: a retrospective study on archived formal infixed, paraffin-embedded brain tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 487 - 492, 1996.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant Herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 3-15, 1996.

ENGELS, M.; GIULIANI, C.; WILD, P. 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.

ESTEVES, P. A.; DELLAGOSTIN, O. A.; PINTO, L. S.; SILVA, A. P.; SPILKI, F. R.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; HÜBNER, S. O.; PUENTES, R.; MAISONNAVE, J.; FRANCO, A. C.; RIJSEWIJK, F. A. M.; BATISTA, H. B. C. R.; TEIXEIRA, T. F.; DEZEN, D.; OLIVEIRA, A. P.; DAVID, C.; ARNS, C. W.; ROEHE, P. M. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). **Virus Research**, v. 131, n. 1, p. 16-22, 2007.

FARNÓS, O.; BOUÉ, O.; PARRA, F.; MARTÍN-ALONSO, J. M.; VALDÉS, O.; JOGLAR, M.; NAVEA, L.; NARANJO, P.; LLEONART, R. High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60

capsid protein obtained in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 117, p. 215-224, 2005.

FARNÓS, O.; RODRÍGUEZ, M.; CHIONG, M.; PARRA, F.; BOUÉ, O.; LORENZO, N.; COLÁS, M.; LLEONART, R. The recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 protein obtained from *Pichia pastoris* induces a strong humoral and cell-mediated immune response following intranasal immunization in mice. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 187-195, 2006.

FERREIRA, M. C.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico sorológico da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1. **Semina, Ciências Agrárias**, v. 26, n. 3, p. 363-372, 2005.

FIELDS, Bernard et al. **Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 3280p.

FILHO, E. J. F.; ALVARENGA, M.; FERREIRA, P. M.; CARVALHO, A. U. de. Abordagem clínica das neuropatias dos ruminantes. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE BUIATRIA, 2, 2005, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Anais do...** Belo Horizonte: ABMG, 2005.

FISCHER, G.; CLEFF, M. B.; DUMMER, L. A.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S.; VILELA, C. O.; CAMPOS, F. S.; STORCH, T.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; VIDOR, T. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, p. 79–84, 2007.

FLORES, E. F. Epidemiologia das infecções víricas. In: FLORES, E.F. (Org). **Virologia Veterinária**, Santa Maria: UFSM, p.261-294, 2007.

FRENCH, E. L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization on the causal agent. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, p. 216-221, 1962.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 54, p. 741-750, 2000.

GERAGHTY, R. J.; FRIDBERG, A.; KRUMMENACHER, C.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J.; SPEAR, P. G. Use of chimeric Nectin-1 (HveC)-related receptors to demonstrate that ability to bind Alphaherpesvirus gD is not necessarily sufficient for viral entry. **Virology**, v. 285, p. 366-375, 2001.

GERAGHTY, R. J.; JOGGER, C. R.; SPEAR, P. G. Cellular expression of Alpha herpesvirus gD interferes with entry of homologous and heterologous Alpha herpesvirus by blocking access to a shared gD receptor. **Virology**, v. 268, p. 147-158, 2000.

GOMES, L. I.; ROCHA, M. A.; COSTA, E. A.; LOBATO, Z. I. P.; MENDES, L. C. N.; BORGES, A. S.; LEITE, R. C.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Detecção de Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 217-220, 2002.

HANON, E.; MEYER, G.; VANDERPLASSCHEN, A.; DESSY-DOIZÉ, C.; THIRY, E.; PASTORET, P. -P. Attachment but not penetration of Bovine Herpesvirus 1 is necessary to induce apoptosis in target cells. **Journal of Virology**, v. 72, p. 7638-7641, 1998.

HANON, E.; KEIL, G.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; GRIEBEL, P.; VANDERPLASSCHEN, A.; RIKSEWIJK, F. A. M.; BABIUK, L. A.; PASTORET, P. -P. Bovine Herpesvirus 1-induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D. **Virology**, v. 257, p. 191-197, 1999.

HAN, X.; BARTLAM, M.; JIN, Y.; LIU, X.; HE, X.; CAI, X.; XIE, Q.; RAO, Z. The expression of SARS-CoVM gene in *Pichia pastoris* and the diagnostic utility of the expression product. **Journal of Virological Methods**, v. 122, p. 105-111, 2004.

HAN, X.; YE, L.-B.; LI, B.; BO, G.; CAI, W.; HONG, Z.; SHE, Y.-L.; YE, L.; KONG, L.-B.; WU, Z.-H. Expression, purification and characterization of the Hepatitis B virus entire envelope large protein in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 49, p. 168-175, 2006.

HARDY, E.; MARTÍNEZ, E.; DIAGO, D.; DÍAZ, R.; GONZÁLEZ, D.; HERRERA, L. Large-scale production of recombinant Hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 77, p. 157-167, 2000.

HEYLAND, J.; FU, J.; BLANK, L. M.; SCHMID, A. Quantitative Physiology of *Pichia pastoris* During Glucose-Limited High-Cell Density Fed-Batch Cultivation for Recombinant Protein Production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 2, 2010.

HOLZ, C. L.; CIBULSKI, S. P.; TEIXEIRA, T. F.; BATISTA, H. B. C. R.; CAMPOS, F. S.; SILVA, J. R.; VARELA, A. P. M.; CENCI, A.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M.

Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 767-773, 2009.

HOUNSELL, E. F.; DAVIES, M. J.; RENOUF, D. V. O-linked protein glycosylation structure and function. **Glycoconjugate Journal**, v. 13, n. 1, p. 19-26, 1996.

HYKA, P.; ZÜLLIG, T.; RUTH, C.; LOOSER, V.; MEIER, C.; KLEIN, J.; MELZOCH, K.; MEYER, H.; GLIEDER, A.; KOVAR, K. Combined Use of Fluorescent Dyes and Flow Cytometry To Quantify the Physiological State of *Pichia pastoris* during the Production of Heterologous Proteins in High-Cell-Density Fed-Batch Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4486–4496, 2010.

INVITROGEN, **Easy Select™ *Pichia* Expression Kit**: A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*. Cat. nº K1780-01, version H, INVITROGEN, 2005. 74p.

JIANG, W. Z.; JIN, N. Y.; LI, Z. J.; ZHANG, L. S.; WANG, H. W.; ZHANG, Y. J.; HAN, W. Y. Expression and characterization of Gag protein of HIV-1CN in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 123, p. 35-40, 2005.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of Bovine Herpesvirus type 1, its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 187-205, 2008.

KAHRS, Robert. Infectious bovine rhinotracheitis pustular vulvovaginitis. In: Idem (ed.), **Viral Disease of Cattle**. Iowa State University Press, Ames, 2001.p. 159-170.

KOOIJ, A. van; MIDDEL, J.; JAKAB, F.; ELFFERICH, P.; KOEDIJK, D. G. A. M.; FEIJLBRIEF, M.; SCHEFFER, A. J.; DEGENER, J. E.; THE, T. H.; SCHEEK, R. M.; WELLING, G. W.; WELLING-WESTER, S. High level expression and secretion of truncated forms of Herpes Simples virus type 1 and type 2 glycoprotein D by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 25, p. 400-408, 2002.

KUKURUZINSKA, M. A.; LENNON, K. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 9, n. 4, p. 415-448, 1998.

LEE, K.-H.; HONG, H.-J.; LIM, S.-M.; CHEON, S.-H.; KIM, D.-I. Expression of Human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (hCTLA4) fused with Hepatitis B surface antigen

(HBsAg) using *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 481-485, 2006.

LI, Z.-X.; HONG, G.-Q.; HU, B.; LIANG, M.-J.; XU, J.; LI, L. Suitability of yeast- and *Escherichia coli*-expressed Hepatitis B virus core antigen derivatives for detection of anti-HBc antibodies in human sera. **Protein Expression and Purification**, v. 56, p. 293-300, 2007.

LIU, R.-S.; YANG, K.-Y. LIN, J.; LIN, Y.-W.; ZHANG, Z.-H.; ZHANG, J.; XIA, N.-S. High-yield expression of recombinant SARS Coronavirus nucleocapsid protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 24, p. 3602-3607, 2004.

LIU, D.; ZHANG, Y.; YU, X.; JIANG, C.; CHEN, Y.; WU, Y.; JIN, Y.; NIU, J.; QU, N.; LIU, M.; KONG, W. Assembly and immunogenicity of Human Papillomavirus type 16 major capsid protein (HPV16 L1) in *Pichia pastoris*. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 23, n. 2, p. 200-203, 2007.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-270, 2005.

MARTINEZ-DONATO, G.; ACOSTA-RIVERO, N.; MORALES-GRILLO, J.; MUSACCHIO, A.; VINA, A.; ALVAREZ, C.; FIGUEROA, N.; GUERRA, I.; GARCIA, J.; VARAS, L.; MUZIO, V.; DUEÑAS-CARRERA, S. Expression and processing of Hepatitis C virus structural proteins in *Pichia pastoris* yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 625-631, 2006.

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

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

METTENLEITER, T. C. Pathogenesis of neurotrópica herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research, Amsterdam**, v. 92, n. 2, p. 197-206, 2003.

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.

NOGUEIRA-DANTAS, E. O.; FERREIRA, A. J. P.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S. Cloning and expression of chicken anemia virus VP3 protein in *Escherichia coli*. **Comparative Immunology, Microbiology e Infectious Diseases**, v. 30, p. 133-142, 2007.

OLDONI, I.; WEIBLEN, R.; INKELMANN, M. A.; FLORES, E. F. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 213-221, 2004.

RIET-CORREA, G.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; CERQUEIRA, V. D.; BRITO, M. de F.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e polioencefalomalacia causada por Herpesvírus Bovino 5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 44-46, 2006.

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

RISSI, D. R.; RECH, R. R.; FLORES, E. F.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Meningoencefalite por Herpesvírus Bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 251-260, 2007.

ROEHE, P. M.; SILVA, T. C. da; NARDI, N. B.; OLIVEIRA, L. G.; ROSA, J. C. de A. Diferenciação entre os 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.

ROIZMANN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A. C.; STUDDERT, M. J. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v. 123, n. 3-4, p. 425-449, 1992.

RUITENBERG, K. M.; GILKERSON, J. R.; WELLINGTON, J. E.; LOVE, D. N.; WHALLEY, J. M. Equine Herpesvirus 1 glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris* is hyperglycosylated and elicits a protective immune response in the mouse model of EHV-1 disease. **Virus Research**, v. 79, p. 125-135, 2001.

SALVADOR, S. C.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P. M.; OSORIO, A. L. A. R. Meningoencefalite em bovinos causada por Herpesvírus Bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 75-82, 1998.

SANTOS, C.; REETZ, E. R.; BELING, R. R.; VENCATO, A.; POOL, H.; KIST, B. B. **Anuário Brasileiro da Pecuária, 2011**, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2011. 69p.

SCHAT, Karel. Infectious anemia. In: SAIF Y. M.; BARNES, H. J.; FADLY, A.M.; CLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D. E. Diseases of Poultry. **Ames Iowa State University**, 2003. p.182-202.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesvirus. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 17-29, 1996.

SILVA, M. S.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 403-408, 2007.

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.; LONGNECKER, R. Herpesvirus entry: an update. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10179-10185, 2003.

STUDDERT, M. J. Bovine encephalitis herpesvirus. **Veterinary Research**. v. 125, p.584. 1989.

SUGRUE, R. J.; FU, J.; HOWE, J.; CHAN, Y.-C. Expression of the Dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1861-1866, 1997.

TEUTON, J. R.; BRANDT, C. R. Sialic Acid on Herpes Simplex Virus type 1 envelope glycoproteins is required for efficient infection of cells. **Journal of Virology**, v. 81, n. 8, p. 3731-3739, 2007.

THIRY, E.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; THIRY, J.; VANDERPLASSCHEN, A; SCHYNTS, F. Recombination in the Alphaherpesvirus Bovine Herpesvirus 1. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 3-4, p. 171-177, 2006.

TIKOO, S. K.; FITZPATRICK, D. R.; BABIUK, L. A.; ZAMB, T. J. Molecular cloning, sequencing, and expression of functional Bovine Herpesvirus 1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells. **Journal of Virology**, v. 64, n. 10, p. 5132-5142, 1990.

TIKOO, S. K.; PARKER, M. D.; VAN DEN HURK, J.V.; KOWALSKI, J.; ZAMB, T.J.; BABIUK, L.A. Role of N-linked glycans in antigenicity, processing, and cell surface expression of Bovine Herpesvirus 1 glycoprotein gIV. **Journal of Virology**, v. 67, p. 726-733, 1993.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. de. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 20-22, 2000.

VALDÉS, I.; HERMIDA, L.; ZULUETA, A.; MARTÍN, J.; SILVA, R.; ÁLVAREZ, M.; GUZMÁN, M. G.; GUILLÉN, G. Expression in *Pichia pastoris* and immunological evaluation of a truncated Dengue envelope protein. **Molecular Biotechnology**, v. 35, p. 23-30, 2007.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUNRATH, C. F. Atividade neutralizante anti-Herpesvírus Bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no soro de bovinos imunizados com vacinas contra o BHV-1. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 881-883, 2002.

WANG, C. Y.; LUO, Y. L.; CHEN, Y. T.; LI, S. K.; LIN, C. H.; HSIEH, Y. C.; LIU, H. J. The cleavage of the hemagglutinin protein of H5N2 avian influenza virus in yeast. **Journal of Virological Methods**, v. 146, p. 293-297, 2007.

WEI, H.; JIANG, L.; XUE, Y.; FANG, D.; GUO, H. Secreted expression of Dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 109, p. 17-23, 2003.

WENSKE, E. A.; BRATTON, M. W.; COURTNEY, R. J. Endo--N-Acetylglucosaminidase H sensitivity of precursors to Herpes Simplex Virus type 1 glycoproteins gB and gC. **Journal of Virology**, v. 44, n. 1, p. 241-248, 1982.

WHITBECK, J. C.; PENG, C.; LOU, H.; XU, R.; WILLIS, S. H.; DE LEON, M. P.; PENG, T.; NICOLA, A. V.; MONTGOMERY, R. I.; WARNER, M. S.; SOULIKA, A. M.; SPRUCE, L. A.; MOORE, W. T.; LAMBRIS, J. D.; SPEAR, P. G.; COHEN, G. H.;

EISENBERG, R. J. Glycoprotein D of Herpes Simplex Virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily and a mediator of HSV entry. **Journal of Virology**, v. 71, n. 8, p. 6083-6093, 1997.

ZAJAC, M. P. D. M.; ROMERA, S. A.; LADELFA, M. F.; KOTSIAS, F.; THIRY, J.; ZIANT, D.; MEURENS, F.; KEIL, G. M.; THIRY, E.; MUYLKENS, B. Characterization of interspecific recombinants generated from closely related bovine herpesviruses 1 and 5 through multiple PCR sequencing assays. **Journal of Virological Methods**, v. 161, n. 1, p. 75-83, 2009.

ZHAO, L. H.; YU, X. H.; JIANG, C. L.; WU, Y. G.; SHEN, J. C.; KONG, W. Studies on antigenicity of Human Immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) external glycoprotein as well as its expression in *Pichia pastoris*, **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 23, n. 3, 457-461, 2007.

ZHU, X.; LETCHWORTH, G.J. Mucosal and systemic immunity to Bovine Herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in cattle. **Vaccine**, v. 14, p. 61-69, 1996.

ZHU, X.; WU, S.; LETCHWORTH, G. J. Yeast-secreted Bovine Herpesvirus type 1 glycoprotein D has authentic conformational structure and immunogenicity. **Vaccine**, v. 15, n. 6/7, p. 679-688, 1997.

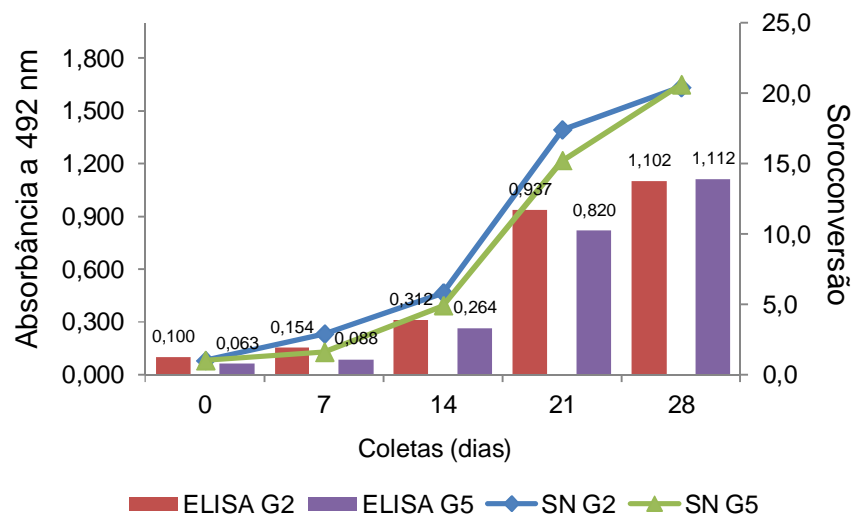
ZHU, X.; WU, S.; LETCHWORTH, G. J. A chimeric protein comprised of Bovine Herpesvirus type 1 glycoprotein D and bovine interleukin-6 is secreted by yeast and possesses biological activities of both molecules. **Vaccine**, v. 17, p. 269-282, 1999.

Anexos

Anexo 1. Referente aos dados da leitura da soroneutralização dos soros bovinos utilizados na padronização do iELISA. No grupo 1 estão inseridos os animais vacinados (vacina inativada) e no grupo 2 apenas os animais controles.

Animais	1ª dose		2ª dose		Desafio		Reativação		
	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42	Dia 77	Dia 91	Dia 98	Dia 154	Dia 161
Grupo 1									
1	0,0	4,0	6,8	180,7	11,3	361,5	2580,3	645,1	
2	0,0	0,0	6,7	160,7	8,0	361,5	1448,2	362,0	
3	0,0	2,8	8,0	48,4	2,8	361,5	1024,0	181,0	
4	0,0	0,0	6,0	180,7	9,0	361,5	1290,2	45,3	
5	0,0	3,0	4,7	128,0	4,0	361,5	2048,0	128,0	
6	0,0	22,6	32,0	180,7	27,2	361,5	2580,3	646,0	
7	0,0	32,0	27,2	361,5	64,0	361,5	1448,2	645,1	
8	0,0	22,6	27,2	75,0	8,0	361,5	2048,0	322,5	
Grupo 2									
9					0,0	16,0			436,3
10					0,0	16,0			645,1

Anexo 2. Resultados referentes ao experimento com vacinas em camundongos. Os dados nele apresentados foram obtidos através dos testes de Soroneutralização e iELISA. O grupo G2 recebeu a vacina rgD + óleo enquanto o grupo G5 recebeu a vacina rgD + BoHV5 + óleo.



Anexo 2. Dados da Soroneutralização (SN) e ELISA a partir do experimento com vacinação em camundongos. Grupo G2: vacina com rgD + óleo. Grupo G5: vacina com rgD + BoHV5 + óleo.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

A663p Araujo, Itauá Leston

Padronização da técnica de ELISA indireto utilizando a glicoproteína D recombinante (rgD) expressa em *Pichia pastoris* como antígeno para o diagnóstico de Herpesvírus Bovino tipo 1 e 5 / Itauá Leston Araujo. – 53f. : fig. – Monografia (Conclusão de curso). Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2011. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite; co-orientador Luana Alves Dummer.

1. Biologia. 2. Herpesvírus Bovino tipo 5. 3. *Pichia pastoris*. 4. Glicoproteína D. 5. ELISA indireto. 6. Diagnóstico sorológico. 7. Soroneutralização. 8. Vacinas. 9. Meningoencefalite. 10. Herpesvírus Bovino tipo 1. 11. Neurovirulência. I. Leite, Fábio Pereira Leivas. II. Dummer, Luana Alves. III. Título.

CDD: 615.372