

## **SORONEUTRALIZAÇÃO (SN) FRENTE A DIFERENTES TIPOS E SUBTIPOS DE HERPESVÍRUS BOVINOS TIPOS 1 E 5**

**CIBULSKI, S.P.<sup>1</sup>; HOLZ, C.L.<sup>1</sup>; TEIXEIRA, T.F.<sup>1</sup>; BATISTA, H.B.C.R.<sup>2</sup>; ROEHE, L.R.<sup>2</sup>; CAMPOS, F.S.<sup>2</sup>; OLIVEIRA, M.T.<sup>2</sup>; VARELA, A.P.M.<sup>1</sup>; FRANCO, A.C.<sup>2</sup>; ROEHE, P.M.<sup>1, 2#\*</sup>**

1. Equipe de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS. 92990-000

2. Laboratório de Virologia, DM-ICBS/ UFRGS, Porto Alegre, RS, Av Sarmiento Leite 500 sala 208, CEP 90050-170.

#Endereço para correspondência: Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90 001 970. Tel.: (51) 3481-3711. E-mail: [proehe@gmail.com](mailto:proehe@gmail.com)

### **Abstract**

This study was carried out to evaluate the sensitivity of serum neutralization (SN) tests when performed with distinct bovine herpesviruses 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes as challenge viruses when applied on serum samples collected in distinct geographic regions. Sera (n=810) from two widely distant states (Rio Grande do Sul, RS; Goiás, GO) were tested in SN tests against six distinct bovine herpesviruses (BoHV-1.1 strains "Los Angeles" and "EV1123/98"; BoHV-1.2a strain "SV265/96"; BoHV-5a strain "EVI88/95"; BoHV-5b strain "A663" and BoHV-5c "ISO95/97"). The sensitivity of the SN varied greatly depending on the viral strain used in the test. Variation in sensitivity was detected even when challenge viruses belonged to the same subtype. Sensitivity also varied between strains when test sera were from distinct geographical regions. When positive results to each single strain were considered, SN sensitivity varied from 41.7% to 81.7%, depending on the virus and the region of origin of the sera. The single virus which displayed the highest sensitivity at SN (76.4%) was BoHV-5 strain A663 (250/327 positive sera). The greatest sensitivity (327 positive/810 sera) was attained when the positive results to the six viruses were added together. No association could be drawn between any particular type or subtype of virus and the sensitivity of the test. These results indicate that the choice of virus used for challenge is critical in SN tests; performing SN against a number of different viruses may increase considerably SN sensitivity. In addition, sera from different geographic regions may react differently against different strains of BoHV-1 and BoHV-5. This might be particularly relevant for control programs and in international trade activities where maximum sensitivity should be targeted.

Keywords: BoHV-1; BoHV-5; serum neutralization.

### **Resumo**

Este estudo objetivou avaliar a sensibilidade de testes de soroneutralização (SN) utilizando diversos tipos e subtipos de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) como vírus de desafio. A detecção de anticorpos neutralizantes foi realizada em soros bovinos coletados de duas regiões geograficamente distintas. Amostras de soros (n=810) de dois estados brasileiros (Rio Grande do Sul, RS; Goiás, GO) foram testados pela técnica de SN contra seis distintos BoHV (BoHV-1.1 cepa Los Angeles - LA e EVI123/98; BoHV-1.2a cepa SV 265/96; BoHV-5a cepa EVI88/95; BoHV-5b cepa A663 e BoHV-5c cepa ISO95/97). A sensibilidade dos testes variou dependendo da cepa viral utilizada e da região geográfica dos soros testados. Também houve diferença nos níveis de sensibilidade quando os vírus de desafio eram do mesmo subtipo. Considerando-se os resultados positivos das diferentes cepas, observou variação de 41,7 a 81,7% na sensibilidade do teste. A cepa viral que exibiu maior sensibilidade quando utilizada isoladamente nas SN foi a de BoHV-5b A663 (76,4% - 250 positivos/810 soros). Ao analisarmos os resultados conjuntos das seis cepas virais avaliadas no estudo, foi determinada a sensibilidade máxima (327 - 100%). Através dos resultados encontrados nenhuma associação poderia ser estabelecida entre os diferentes tipos e subtipos virais e a sensibilidade do teste. Estes resultados indicam que a escolha do vírus utilizado para desafio é crítica em testes de SN, sendo que o desempenho dos testes pode ser aumentado consideravelmente ao utilizar diferentes cepas virais. Além disso, soros de diferentes regiões geográficas podem reagir diferentemente contra cepas de BoHV-1 e 5. Isso poderá ser particularmente relevante para os programas de controle dessas infecções e para o comércio internacional, onde uma sensibilidade máxima deve ser requisitada.

Palavras chave: BoHV-1; BoHV-5; soroneutralização.

### Introdução

Os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) pertencem à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Thiry et al., 2007). Com base em características genômicas e antigênicas, os BoHV-1 foram divididos em três diferentes genótipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoVH-1.2b. Os subtipos 1.1 e 1.2a são os mais patogênicos e estão normalmente associados, respectivamente, a casos de doença respiratória clássica e abortos. O BoHV-1.2b possui patogenicidade moderada e causa vulvovaginite ou balanopostite, não tendo sido, até o presente, relacionado a casos de aborto. Já com relação ao BoHV-5, de acordo com estudos baseados no perfil eletroforético de clivagens utilizando enzimas de restrição e na reação frente a anticorpos monoclonais, foi possível demonstrar que amostras desse tipo podiam ser subdivididas em BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5 “não a-não b”, ou “c” (D’Arce et al., 2002; Franco & Roehe, 2007).

Os diferentes tipos e subtipos de BoHV-1 e BoHV-5 apresentam extensa reatividade sorológica cruzada, que pode ser evidenciada por testes de SN. Assim, o anti-soro produzido contra o vírus de um determinado subtipo reage com vírus heterólogos. Desta forma, infecções pelo BoHV-5 podem se confundir sorologicamente com aquelas causadas pelo BoHV-1 e vice-versa, impedindo a discriminação entre estas (Teixeira et al., 1998).

Em função da necessidade de realizar um amplo levantamento sorológico para avaliação da soroprevalência de BoHV-1 e BoHV-5 e, face à existência de diferentes tipos e subtipos de vírus, a questão que se impôs foi: qual seria a cepa viral mais apropriada para uso em análises soro-epidemiológicas em nossa região? Para resolver esse problema, foi realizado um estudo comparando a sensibilidade de amostras de BoHV-1 e BoHV-5 de diferentes tipos e subtipos em testes de SN, na busca daquela(s) capaz(es) de detectar o maior número possível de soros positivos, o que forneceria uma medida mais próxima da real prevalência dessas infecções. Além disso, para avaliar a possibilidade de variação entre os resultados em função da origem dos soros a serem testados, foram utilizados soros provenientes de duas regiões geograficamente distantes do País. O presente estudo descreve os achados destes experimentos.

## **Material e Métodos**

### *Células*

Foram utilizadas células de rim de bovino "*Madin Darby Bovine Kidney*" (MDBK, ATCC CCL-22) cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (Gibco) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Soraly) e antibióticos (Penicilina e Estreptomicina) em concentrações usuais (Paul, 1970).

### *Vírus*

Foram utilizadas as amostras: Los Angeles, ou LA (BoHV-1.1), EVI123/98 (BoHV-1.1), SV265/96 (BoHV-1.2a), EVI88/95 (BoHV-5a), A663 (BoHV-5b) e ISO95/97 (BoHV-5c). A multiplicação e titulação dos vírus foram realizadas em células MDBK (Paul, 1970).

### *Soros*

Foram examinadas 810 amostras de soro bovino, sendo 502 coletadas na região Sul do Brasil (Rio Grande do Sul) e 308 amostras coletados na região Centro-Oeste (Goiás). A população bovina analisada nesse estudo era constituída de fêmeas e machos de diferentes idades e tipos de exploração, não vacinadas contra o BoHV-1 e 5.

Todas as amostras de soro foram inativadas em banho-maria a 56° C por 30 minutos e em seguida foram estocadas a -20° C até o momento do uso.

### *Testes de Soroneutralização*

A pesquisa de anticorpos neutralizantes para BoHV-1 e BoHV-5 foi realizada utilizando-se a técnica de soroneutralização (SN) em microplacas de 96 orifícios (Deregt et al., 1993). Os soros foram diluídos em duplicata nas diluições  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$  e as misturas soro-vírus foram incubadas por uma hora antes do acréscimo das células. Os testes foram repetidos frente a cada uma das seis cepas virais, utilizando-se em cada teste 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC<sub>50</sub>). O termo "sensibilidade máxima" foi usado para referir-se ao conjunto de soros que foram positivos em pelo menos um dos testes de SN.

### *Análise estatística*

A comparação das SN foi estabelecida pelo teste estatístico de McNemar para populações relacionadas, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade.

A comparação entre as concordâncias observadas e esperadas empregou o coeficiente Kappa, com o auxílio do programa Dag Stat (Mackinnon 2000).

### Resultados e Discussão

Utilizando seis diferentes cepas de vírus de confrontação na SN, sendo duas de BoHV-1.1 (LA e EVI123/98), uma de BoHV-1.2a (SV265/96) e três de diferentes subtipos de BoHV-5 (EVI88/95, BoHV-5a; A663, BoHV-5b e ISO95/97, BoHV-5c) foi encontrado um total de 327 (40,4%) amostras positivas em pelo menos um dos testes. À medida que o número de amostras consideradas foi decrescendo, a sensibilidade foi igualmente decaindo.

A concordância entre os resultados dos testes realizados com as diferentes cepas variou de moderado a excelente, como pode ser constatado na Tabela 1, demonstrando que existe grande variação entre os resultados encontrados nas diferentes SN. Com relação a análise estatística da concordância entre positivos das provas de SN (Teste de McNemar) observou-se diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nas comparações dos resultados da maioria das SN (Tabela 2). Este fato também demonstra que existem grandes variações na detecção de amostras positivas de um teste em comparação com o outro.

Tabela 1. Resultado e interpretação do valor Kappa na comparação dos resultados das SN frente a diferentes cepas virais.

Tipo das cepas	SN comparadas	Kappa	Concordância
BoHV-1.1 X BoHV-1.1	LA X EVI123*	0,64	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-1.2a	LA X SV265**	0,7	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-5a	LA X EVI88***	0,63	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-5b	LA X A663	0,77	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-5c	LA X ISO95****	0,78	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-1.2a	EVI123 X SV265	0,63	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-5a	EVI123 X EVI88	0,59	Moderada
BoHV-1.1 X BoHV-5b	EVI123 X A663	0,66	Boa
BoHV-1.1 X BoHV-5c	EVI123 X ISO95	0,61	Boa
BoHV-1.2a X BoHV-5a	SV265 X EVI88	0,67	Boa
BoHV-1.2a X BoHV-5b	SV265 X A663	0,75	Boa
BoHV-1.2a X BoHV-5c	SV265 X ISO95	0,76	Boa
BoHV-5a X BoHV-5b	EVI88 X A663	0,67	Boa
BoHV-5a X BoHV-5c	EVI88 X ISO95	0,71	Boa
BoHV-5b X BoHV-5c	A663 X ISO95	0,83	Excelente
BoHV-1 X BoHV-5	BoHV-1 X BoHV-5	0,8	Boa

\* refere-se à amostra EVI123/98; \*\* refere-se à amostra SV265/96; \*\*\* refere-se à amostra EVI88/95; \*\*\*\* refere-se à amostra ISO95/97/95 (vide métodos para detalhes). Kappa entre 0,41 e 0,6 = moderada; entre 0,61 e 0,8 = bom; Kappa > 0,81 = excelente

Tabela 2. Comparação da concordância entre os resultados positivos obtidos à SN frente às seis diferentes cepas virais utilizadas no estudo.

	<b>LA (BoHV-1.1)</b>	<b>EVI123/98 (BoHV-1.1)</b>	<b>SV265/96 (BoHV-1.2a)</b>	<b>EVI88/95 (BoHV-5a)</b>	<b>A663 (BoHV-5b)</b>	<b>ISO95/97/95 (BoHV-5c)</b>
<b>LA (BoHV-1.1)</b>	231 (100%#)	166 (71,9%)	166 (71,9%)*	158 (68,4%)*	202 (87,4%)*	190 (82,3%)
<b>EVI123/98 (BoHV-1.1)</b>	166 (76,9%)	216 (100%)	148 (68,5%)*	147 (68,1%)	177 (81,9%)*	156 (72,2%)
<b>SV265/96 (BoHV-1.2a)</b>	166 (85,6%)*	148 (76,3%)*	194 (100%)	150 (77,3%)	182 (93,8%)*	171 (88,1%)*
<b>EVI88/95 (BoHV-5a)</b>	158 (77,5%)*	147 (72,1%)	150 (73,5%)	204 (100%)	173 (84,8%)*	167 (81,9%)
<b>A663 (BoHV-5b)</b>	202 (80,8%)*	177 (70,8%)*	182 (72,8%)*	173 (69,2%)*	250 (100%)	207 (82,8%)*
<b>ISO95/97/95 (BoHV-5c)</b>	190 (86%)	156 (70,6%)	171 (77,4%)*	167 (75,6%)	207 (93,7%)*	221 (100%)

\*McNemar <0,05; # percentagem refere-se ao total de positivos detectados isoladamente pela cepa viral da linha de referência.

Através deste estudo, foi possível perceber que a cepa que isoladamente mostrou-se mais sensível à detecção dos soros positivos foi a amostra de BoHV-5b A663. Ainda assim, esta cepa detectou apenas 76,4% (250/327) do total de amostras soropositivas (sensibilidade máxima).

Outro ponto analisado foi o referente à distribuição geográfica das populações que originaram os soros componentes da amostragem testada. Essa variável foi examinada em função de que a possível exposição da população a vírus diferentes poderia levar a diferenças na sensibilidade dos testes realizados. A cepa viral que apresentou isoladamente maior sensibilidade tanto para o RS, quanto para GO foi a A663, sendo que ela detectou 71,1% (116/163) e 81,7% (134/164) da sensibilidade máxima encontrada para o RS e GO, respectivamente. No entanto, a cepa que detectou menor número de positivos diferenciou-se em relação à origem das amostras analisadas, sendo que para o RS a amostra em questão foi a SV265/96 (BoHV-1.2a; 41,7%; 68/163) e para GO foi a EVI123/98 (BoHV-1.1; 67,1%; 110/164). Analisando os resultados de detecção de animais soropositivos frente às três cepas de BoHV-1 (LA, EVI123/98 e SV265/96), a sensibilidade (em relação à sensibilidade máxima) foi de 88,9% (145/163) para o RS e 89,6% (147/164) para GO. Os resultados frente às três cepas de BoHV-5 (EVI88/95, A663 e ISO95/97) foram de 84,7% (138/163) para o RS e 92,1% (151/164) para GO.

A SN frente a uma cepa dita “clássica” é utilizada como técnica padrão para detecção de BoHV-1 e 5, devido ao alto grau de reatividade sorológica cruzada encontrado entre estes vírus. Acreditava-se que o anti-soro produzido contra o vírus de um subtipo reagiria em títulos semelhantes ou iguais tanto contra o vírus homólogo, quanto contra o vírus heterólogo (Teixeira et al., 1998) a níveis que não pudessem comprometer os programas de erradicação e controle desses agentes. No entanto, pelos índices Kappa e pelo teste de McNemar encontrados nesse trabalho, fica evidenciado que nem sempre existe concordância nos resultados obtidos na comparação dos resultados das SN realizadas com diferentes cepas virais.

### **Conclusões**

Quando a SN for utilizada com a finalidade de avaliar o estado sorológico de infecções por BoHV-1 e BoHV-5, esta idealmente deve ser realizada frente a uma combinação de cepas virais que apresente a maior sensibilidade possível, minimizando assim, a possibilidade da ocorrência de amostras “falso-negativas”, que poderiam comprometer seriamente os programas de controle e erradicação dessas infecções.

Diversas combinações utilizando diferentes cepas virais apresentaram-se como boas candidatas na detecção de um número satisfatório de animais soropositivos. No entanto, cabe a cada laboratório e a cada região do País avaliar qual seria a combinação ideal a ser utilizada, levando-se em conta o custo-benefício e os objetivos dos testes que venham a ser empregados.

### **Referências**

D’Arce R.C.F., Almeida R.S., Silva T.C., Franco A.C., Spilki F.R., Roehe P.M. & Arns C.W. 2000. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Veterinary Microbiology* 88(4):315-324.

Deregt D., Cho H.J.C. & Kozub G.C. 1993. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus-1 antibodies. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 57:56-59.

Franco A.C. & Roehe P.M. 2007. Herpesviridae, p. 433-488. In: Flores, E.F. *Virologia Veterinária*. 1ª ed. Ed. Da UFSM, Santa Maria.

Mackinnon A. 2000. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Computers in Biology and Medicine* 30(3):127-134.

Paul J. 1970. *Cell and tissue cultures*. 4ªed. London: E. e S., Livingstone.

Teixeira M.F.B., Esteves P.A.E., Coelho C.S.S., Silva T. C., Oliveira L.G. & Roehe P.M. 1998. Diferenças em níveis de anticorpos contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). Pesquisa Agropecuária Gaúcha 4(1):61-65.

Thiry J., Widén F., Grégoire F., Linden A., Belák S. & Thiry E. 2007. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. BioMed Central Veterinary Research 3(2):26.