

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA *in house* INDIRETO BASEADO
NA PROTEÍNA p24 RECOMBINANTE PARA DIAGNÓSTICO DA
LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Paula Andreolla

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

**DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA *in house* INDIRETO BASEADO NA
PROTEÍNA p24 RECOMBINANTE PARA DIAGNÓSTICO DA LEUCOSE
ENZOÓTICA EM BOVINOS**

Ana Paula Andreolla

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**

Orientador: Prof. Luiz Carlos Kreutz

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

CIP – Catalogação na Publicação

A559d Andreolla, Ana Paula
Desenvolvimento de um ELISA in house indireto
baseado na proteína p24 recombinante para
diagnóstico da leucose enzoótica em bovinos / Ana
Paula Andreolla. – 2017.
49 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. PhD. Luiz Carlos Kreutz.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2017.

1. Bovino. 2. Leucose enzoótica bovina. 3. Teste
imunoenzimático. 4. Diagnóstico I. Kreutz, Luiz Carlos,
orientador. II. Título.

CDU: 636.2

Catálogo: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA *in house* INDIRETO BASEADO NA
PROTEÍNA p24 RECOMBINANTE PARA DIAGNÓSTICO DA LEUCOSE
ENZOÓTICA EM BOVINOS**

Elaborada por
Ana Paula Andreolla

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

Comissão Examinadora

**Luiz Carlos Kreutz, PhD, UPF
(Orientador/Presidente)**

Deniz Anziliero, Dr. IMED

Daisy Maria Strottmann, Dra. ICC/Fiocruz

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

AGRADECIMENTOS

Para a realização desse trabalho foi indispensável a ajuda, primeiramente do meu orientador, Prof. Luiz Carlos Kreutz, que nos momentos de dúvidas me mostrou o caminho, além de todo o apoio e amizade ao longo do mestrado. O prof. Kreutz, foi o responsável por me inserir nesse mundo incrível da Biotecnologia. Ao prof. Rafael Frandoloso, que auxiliou muito no decorrer da pesquisa.

Também, agradeço muito a minha família, que foram a base e o empurrão que faltava nos momentos difíceis. Sempre estiveram do meu lado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada, por todos os momentos que passamos, sendo eles de alegria, de estresse, de gripes e resfriados. Foi um momento único de troca de conhecimento em diversas áreas.

Também, gostaria de agradecer o apoio financeiro da CAPES e da Fundação Universidade de Passo Fundo (FUPF) pela concessão de bolsas de apoio a pesquisa, com a qual foi possível desenvolver todo o trabalho. Agradeço à Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia (SDECT) do estado do Rio Grande do Sul (convênio 46/2014, processo 328-25.00/14-0) pelos recursos financeiros para aquisição de equipamentos para o laboratório, com os quais foi possível realizar esse estudo.

Enfim, muito obrigada a todos!

EPIGRAFE

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

Benjamin Disraeli

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Visão geral	18
2.2. Agente Infeccioso: o Vírus da Leucemia Bovina (BLV).....	18
2.3. Patogenia e sinais clínicos	19
2.4. Transmissão	20
2.5. Prevenção e tratamento	21
2.6. Prevalência.....	21
2.7. Diagnóstico	22
3. CAPÍTULO 1	24
4. CONCLUSÃO	53
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
6. REFERÊNCIA.....	57

LISTA DE FIGURAS

3. CAPÍTULO 1

- FIGURA 1. (A) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the nucleotide sequence corresponding to the BLV capsid protein gene. Lymphocytes from BLV-infected cows (lanes 1 and 2) and from a non-infected cow (lane 3) were used for DNA extraction and analyzed by PCR. The fragment amplified was 666 nucleotides in length. M: 1 Kpb molecular weight markers. (B) Analyses of the recombinant BLV capsid protein (BLV p24r). Samples were collected prior to IPTG induction (lane 1), after overnight induction (lane 2), and after purification by the HisTrap column (lane 3), analyzed by SDS-PAGE and stained by Coomassie blue. The size of the molecular weight markers are indicated on the left side. (C) Western blot analysis of the BLVp24r protein. The purified BLVp24r protein resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Membrane strips containing the BLVp24r were incubated with serum from non-infected (panel C; n = 8) and naturally BLV-infected (panel D; n = 8) cows, and with rat serum (panel E) collected prior to (day 0) or after immunization (day 41) with the BLVp24r. All sera were also evaluated by our in house iELISA and the optical density (OD_{450nm}) of each serum is indicated below the strips. M: molecular weight markers.....47
- FIGURA 2. Ideal antigen concentration determination for the in house iELISA. Different antigen concentrations were adsorbed to the *Polysorp*® microplates and then incubated with serum from non-infected (n = 16) and naturally BLV-infected (n = 16) cows diluted 1:100. The antigen concentrations evaluated are indicated. The results represent the OD mean ± SEM at each antigen concentration. The arrow indicates the ideal antigen concentration.....48
- FIGURA 3. Receiver operating characteristic (ROC) analysis. The ROC curve was created using the results obtained from analyzing 70 BLV negative and 30 BLV positive bovine serum samples (diluted 1:100) by the in house iELISA (50 ng

antigen/well) performed with the *Polysorp*® microplate. The area under the ROC curve was 0.9989..... 49

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO 1

- TABELA 1. Performance of *Maxisorp*® e *Polysorp*® ELISA microplates. The wells of both plates were sensitized with BLVp24r (2 µg/well) and evaluated in triplicates with negative (n = 4) and BLV-positive (n = 4) sera samples to determine the P/N ration (P/N) and the percentile of the coefficient of variation (%CV). The index value was then obtained by dividing the P/N ratio by the CV (%) from positive samples..... 50
- TABELA 2. Anti-BLV antibodies prevalence in dairy and beef cattle. Serum samples from dairy cattle (n = 736) and beef cattle (n = 451) were evaluated in duplicates by the in house iELISA, using 50 µg/well of BLVp24r in Polysorp® microplates and a 1:100 sera dilution. Samples with a OD > 0.320 were considered positive..... 51
- TABELA 3. Rate of agreement between the iELISA (anti-p24 antibodies) and a commercial competitive ELISA (anti-gp51 antibodies) evaluated using 255 samples selected randomly amongst dairy cattle serum samples..... 52

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micrometro
%CV	Coefficiente de variação em porcentagem
ASC	Área sob a curva
BLV	Do inglês <i>Bovine Leukemia Virus</i> ou Vírus da Leucemia Bovina
BLVp24r	p24-TEV-Mbp-His
DNA	Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> ou ácido desoxirribonucleico;
dNTPs	Deoxinucleotídeos
ELISA	Do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ou ensaio de imunoabsorção enzimática
FLK	Do inglês <i>Fetal Lamb Kidney</i> ou células de rim de feto de ovelha
His	Cauda de seis histidinas
ICTV	Do inglês <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> ou Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IDGA	Imunodifusão em Gel de ágar
IPTG	Do inglês <i>Isopropil β-D-1-thiogalactopiranoside</i>
Kb	Quilo base
KDa	Quilo Dalton
LEB	Leucose Enzoótica Bovina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mbp	Do inglês <i>membrane binding protein</i> , ou proteína de ligação à membrana
mM	Milimolar
Nm	Nanômetro
Ng	Nanograma
OD	Do inglês <i>optical density</i> ou densidade ótica;
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
Pb	Pares de Bases

PBS	Do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> ou solução salina tamponada
PBS-T	PBS com 0,05% de Tween 20
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase
P/N	Razão das médias das OD das amostras positivas e negativas
ROC	Do inglês <i>receiver operating characteristic curve</i> ou curva de característica de operação do receptor
RNA	Do inglês <i>ribonucleic acid</i> ou ácido ribonucleico
SDS-Page	Gel de dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
SEM	Do inglês <i>standard error mean</i> ou erro padrão da média
SKM	<i>Skim Milk</i>
TEV	Do inglês <i>tobacco etch virus</i>
U	Unidades

RESUMO
Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

**DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA *in house* INDIRETO BASEADO NA
PROTEÍNA p24 RECOMBINANTE PARA DIAGNÓSTICO DA LEUCOSE
ENZOÓTICA EM BOVINOS**

Autor: Ana Paula Andreolla
Orientador Luiz Carlos Kreutz
Passo Fundo, 07 de agosto de 2017

O vírus da leucemia bovina (BLV) é o agente etiológico da leucose enzoótica bovina (LEB), uma doença infecciosa persistente e altamente prevalente no gado leiteiro. Testes sorológicos e remoção de animais infectados são fundamentais para o controle da doença. No Brasil, a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) usando o BLV produzido em cultivo de células de rim fetal de carneiro é o único teste comercial genuinamente brasileiro disponível para o diagnóstico da LEB. Para suprir essa deficiência no diagnóstico, desenvolvemos um ELISA indireto com base na proteína recombinante do capsídeo viral (p24) do BLV para detectar anticorpos em bovinos com diferentes aptidões. Para isso, foi desenhado um par de *primer* para amplificar por meio da PCR a sequência de nucleotídeos que codifica a proteína p24, clonando o DNA resultante no plasmídeo pET-20. O plasmídeo foi clonado em *Escherichia coli* ER2566 cálcio-competente e a expressão da proteína foi induzida com IPTG (0.1mM). A proteína resultante (BLVp24r) foi purificada pelo sistema de cromatografia através da coluna *HisTrap* acoplada no equipamento *ÄKTA Pure Chromatography* e, posteriormente, analisada por SDS-PAGE. As características de antigenicidade e imunogenicidade da BLVp24r foram avaliadas através da técnica de *Western Blot*, utilizando soro policlonal de ratos imunizados com a BLVp24r e soro de bovinos naturalmente infectados, para posterior desenvolvimento do ELISA. Para o ELISA, o tipo de microplaca, a concentração de antígeno e a diluição de soro ideal foram determinados por titulação seriada das amostras. A análise da curva de Característica de Operação do Receptor (ROC) e a Análise de Área sob Curva (AUC) foram utilizadas para avaliar o desempenho do ELISA desenvolvido. Ao fim da padronização, realizamos um estudo soroepidemiológico da prevalência de anticorpos anti-BLV em soros de bovinos. A proteína BLVp24r foi expressa com a proteína de fusão com peso molecular de 67 KDa.. O soro de ratos imunizados e soro de

bovinos naturalmente infectados com BLV reconheceram somente a proteína BLVp24r por *Western Blot*. A microplaca *Polysorp*® obteve melhor performance no ELISA com BLVp24r utilizando 50 ng/poço de proteína e soro bovino diluído a 1:100. O ELISA indireto padronizado para BLV possui um *cut-off* de 0.320 na OD450nm e apresentando uma sensibilidade de 98.5% e especificidade de 100%. A ROC representa um valor da ASC de 0,9989 (intervalo de confiança de 95% de 0,9961 em 1,002; $p < 0,0001$), o que indica um alto nível de precisão. Com o ELISA padronizado, realizamos um estudo soropidemiológico para validação do teste utilizando soros bovinos, demonstrando que a prevalência de anticorpos para o BLV foi de 31.1% em bovinos de leite e de 9.5% em bovinos de corte. O ELISA desenvolvido e otimizado utilizando a BLVp24r como antígeno é adequado para detectar anticorpos anti-BLV em soros bovinos e pode ser considerado um forte candidato a kit comercial visando o controle de BLV em bovinos

Palavras chaves: Leucose enzoótica bovina, padronização, ELISA indireto, soroprevalência.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de pós-graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

DEVELOPMENT OF AN *in house* INDIRECT ELISA BASED ON THE RECOMBINANT p24 PROTEIN FOR THE DIAGNOSIS OF ENZOOTIC LEUKOSIS IN CATTLE

Author: Ana Paula Andreolla

Advisor: Luiz Carlos Kreutz

Passo fundo, dia de Julho de 2017

Bovine Leukemia Virus (BLV) is the etiological agent of enzootic bovine leukemia (EBL) a persistent infectious disease highly prevalent in dairy cattle. Serological testing and culling infected animals are central to disease control. The agar gel immunodiffusion (AGID) assay that uses BLV cultivated in Fetal Lamb Kidney cells is the only assay produced in Brazil and used in most laboratories for EBL diagnosis. Aiming to fulfil this gap, we developed an indirect ELISA based on the recombinant capsid protein (p24) of BLV to detect antibodies in cattle. To reach our goals, we designed PCR primers to amplify the nucleotides coding for the p24 protein and cloned the resulting DNA fragment in the pET-20 plasmid. The resulting plasmid was transformed in competent *E. coli* ER2566 and the protein expression was induced by IPTG (0.1mM). The protein (BLVp24r) was purified using a *HisTrap* column coupled to an ÄKTA Pure Chromatography equipment, and later analyzed by SDS-PAGE. The antigenicity and immunogenicity of the BLVp24r were evaluated by Western blot using sera from rats immunized with BLVrp24 and with sera from naturally infected cows prior to the development of the ELISA. For the ELISA, the microplate type, antigen concentration and serum dilution were determined by checkboard analysis. The receptor operation characteristics (ROC) curve analysis and the area under the curve (AUC) analysis were used to evaluate the ELISA performance. After that, the ELISA was used to evaluate the prevalence of anti-BLV antibodies in cattle blood. The BLVp24r protein was expressed as a fusion protein and had a molecular mass of 67 KDa. Only the serum from immunized rats and from cattle naturally infected with BLV recognized the BLVp24r by Western blot. The PolySorp® plates provide the best performance on the BLVp24r ELISA with 50 ng/well of the protein and with bovine serum diluted 1:100. Our indirect ELISA to BLV was set with a cut-off value of 0.320 at OD450nm and had sensibility of 98.5% and 100% specificity. The ROC had an AUC value of 0.9989 (95% confidence interval from 0.9961

to 1.002), indicating high level of precision. With this ELISA we screened sera samples from cattle and found a prevalence of antibodies to BLV in 31.1% of dairy cattle and 9.5% in beef cattle. The BLVp24r is suitable to detect antibodies to BLV in bovine serum by ELISA and should be a strong candidate for the development of a commercial assay aiming to control EBL in cattle.

Key words: enzootic bovine leukemia, standardization, indirect ELISA, seroprevalence.

1. INTRODUÇÃO

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma doença infectocontagiosa viral de distribuição mundial, que atinge principalmente bovinos leiteiros (1,2). Os Estados Unidos possui uma das maiores taxas de animais infectados do mundo, chegando à 38% em rebanhos de bovinos de corte e 84% em bovinos com aptidão leiteira (3,4). As perdas econômicas decorrentes da infecção pelo vírus da LEB (BLV) ultrapassam os US\$500 milhões ao ano (5). A situação epidemiológica no Brasil não é diferente. Diversos estudos realizados em várias regiões do Brasil demonstraram que a prevalência é alta; a estimativa nacional em 2006 era de 27,6% de animais soropositivos (6). No ano de 1996, a prevalência média de animais soropositivos, no estado do Rio Grande do Sul era de 12% (7), e, em 2004, no município de Passo Fundo/RS, 23,5% dos rebanhos bovinos leiteiros possuíam prevalência superior a 30% (8).

O BLV é um vírus envelopado que possui um genoma constituído de duas fitas de RNA não complementares, senso positivo, pertencente à família *Retroviridae* (9,10). O genoma do BLV possui três janelas abertas de leitura, a saber: a) GAG, que origina as proteínas do capsômero; b) ENV, que origina as proteínas do envelope viral; e c) POL que codifica as enzimas transcriptase reversa e a DNA-ligase (11,12). As principais proteínas produzidas pelo BLV e que desencadeiam a produção da resposta imune do animal infectado estão inseridas no envelope viral (gp51 e gp30) ou fazem parte do capsídeo viral (p24) (13,14).

A infecção causada pelo BLV é considerada de caráter persistente e ocorre através do contato com os linfócitos B contaminados. As duas principais vias de transmissão são a iatrogênica, em procedimentos como descornas, vacinações, aplicações de tuberculina, palpações retais, e colocações de brincos de identificação; além disso, o colostro/leite de bovinos positivos são importantes na transmissão aos animais lactantes. Há outras vias de transmissão, que ocorrem em menor frequência, como vetores mecânicos (insetos hematófagos), infecção intrauterina e perinatal (1,2,15). A maioria dos animais infectados são assintomáticos, mas em alguns casos a infecção pode progredir para uma linfocitose persistente (30%) e, em pelo menos 5% dos animais infectados a infecção pode evoluir para linfomas (2). Animais soropositivos para o BLV geralmente possuem altos níveis de infecções secundárias e queda na produção naqueles com

aptidão leiteira quando comparados com os negativos, aumentando a taxa de descartes desses animais pelo proprietário (1,2,15).

O controle da LEB é dificultado, pois não há vacinas disponíveis comercialmente. O único controle disponível consiste na identificação e segregação dos animais positivos e negativos. Há várias técnicas que podem ser utilizadas para o diagnóstico, dentre elas o *Western Blot*, imunodifusão em gel de ágar (IDGA), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), e reação em cadeia da polimerase (PCR), (15,16). Entretanto, pela facilidade e, principalmente, pelo custo, os testes de IDGA e ELISA são os mais utilizados na rotina diagnóstica.

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) recomendam a IDGA e o ELISA como testes sorológicos oficiais para a LEB (16,17). O teste de IDGA possui baixa sensibilidade quando comparado com o teste de ELISA e a leitura do resultado é mais demorada e leva em torno de 48 a 72h. Entretanto, a IDGA é o teste para LEB mais utilizado no Brasil, por ser nacional e possuir melhor custo/benefício se quando comparado com o ELISA, pois, os reagentes do teste de ELISA, que possui autorização do MAPA para ser comercializado, não são produzidos no Brasil, encarecendo muito o diagnóstico. Por isso, a importância de desenvolver um teste de ELISA nacional com alta sensibilidade e especificidade, minimizando os custos quando comparados aos testes disponíveis comercialmente.

Nesse trabalho, foi desenvolvido e caracterizado um antígeno recombinante baseado na proteína p24 do capsídeo viral do BLV. O antígeno foi utilizado no ELISA indireto, onde descrevemos a otimização do teste e a capacidade de diagnosticar sorologicamente bovinos reagentes para o BLV. Apresentamos dados sorológicos da prevalência de anticorpos em bovinos com aptidão leiteira e de corte. Os resultados gerados nesse estudo, estão descritos no artigo “**Development of an indirect ELISA based on recombinant capsid protein to detect antibodies to bovine leukemia virus**” que será submetido ao “**Brazilian Journal of Microbiology**”.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Visão geral

A LEB é uma infecção viral crônica disseminada em rebanhos bovinos de todo o mundo. O primeiro relato da infecção data de 1871 e foi feito por Leisering, na Europa (11). No Brasil, o primeiro caso de LEB foi registrado em 1943 (18). A LEB é considerada uma doença de alta morbidade e, em rebanhos de bovinos leiteiros onde não se faz controle da infecção, a prevalência pode chegar até 90% (15).

2.2. Agente Infecioso: o Vírus da Leucemia Bovina (BLV)

O agente etiológico da LEB é um vírus, denominado de vírus da LEB (*Bovine Leukemia Virus* = BLV). O BLV é um vírus envelopado, icosaédrico, com 90-120nm de diâmetro, possui duas fitas simples de RNA como material genético, senso positivo, pertencente à família *Retroviridae*, sub-família *Ostheretrovirinae*, ordem *Deltaretrovirinae* (19). As principais características dessa família são a presença de uma enzima denominada de transcriptase reversa, que durante a replicação viral nas células converte o RNA viral em DNA e é crucial para os próximos passos da replicação. Além disso, possui, também, a enzima DNA ligase que tem como função integrar ao genoma da célula hospedeira o DNA pró viral produzido durante a transcrição reversa, tornando essa célula persistentemente infectada (20–23).

O genoma viral possui aproximadamente 8,7Kb e contém três importantes janelas abertas de leitura (*Open Reading Frames* = ORF) denominadas GAG, ENV e POL. Através do DNA pró-viral, as proteínas da ORF GAG são codificadas e dão origem aos capsômeros, formando o capsídeo viral, sendo a proteína p24 a mais importante dessa janela de leitura. A ORF ENV codifica as glicoproteínas do envelope, como a gp51 e a proteína gp30, que são determinantes na adsorção viral, no tropismo e na especificidade, bem como na formação de sincícios e na ancoragem celular, respectivamente. E a ORF POL, é responsável pela codificação das enzimas transcriptase reversa e DNA-ligase (12,23,24). A ação das duas enzimas codificadas pela POL é de suma importância na replicação e persistência viral, pois a transcriptase reversa age no RNA viral transcrevendo-o em DNA e, a DNA-ligase, integra a nova fita de DNA viral no genoma do hospedeiro, tornando a célula e, por consequência, o hospedeiro persistentemente infectados

(25,26). Além das ORFs estruturais e enzimática, o BLV possui uma importante região de leitura, a pX, responsável pela regulação do gene e pela codificação, principalmente, das proteínas Tax e Rex. A Tax atua na modulação dos genes que estão envolvidos na proliferação dos linfócitos, regulando o crescimento, a imortalização e a oncogênese das células infectadas; e a Rex é importante na manutenção dos linfomas e atua nos processos após a transcrição do genoma viral, exportando o RNA do núcleo para o citoplasma, acumulando o RNA mensageiro e iniciando a codificação das proteínas estruturais do BLV (23,27).

A replicação *in vitro* do BLV é restrita à poucas células, como as células fetais de rim de carneiro (*Fetal Lamb Kidney* = FLK), desenvolvida em 1974, as quais tem sido utilizadas para o estudo da replicação do vírus e produção de antígenos virais para uso em testes de diagnóstico (28).

2.3. Patogenia e sinais clínicos

O BLV apresenta tropismo pelos linfócitos B, integrando seu material genético. A entrada do vírus no linfócito B é mediada através das glicoproteínas do envelope, a gp30 e a gp51 (23). Inicialmente, a gp51 se liga aos receptores celulares específicos dos linfócitos B, propiciando que a gp30 se ligue, por meio de receptor específico, na membrana celular, ancorando o vírus. A ligação da gp30 com a célula proporciona que a gp51 induza a célula a iniciar a formação de sincícios. Os sincícios promovem a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira que resulta na liberação total do RNA viral de dentro do capsídeo para o citoplasma celular. No citoplasma, o RNA viral será convertido em DNA por meio da enzima transcriptase reversa. A nova fita de DNA formada migrará para o núcleo da célula hospedeira onde irá integrar-se ao DNA do hospedeiro através da enzima DNA-ligase, tornando o animal persistentemente infectado. Assim, o provírus, agora integrado ao genoma da célula do hospedeiro, começa a utilizar a maquinaria da célula para transcrever seu genoma, sintetizando mRNA que irá originar as proteínas virais no citoplasma e novos genomas virais. As proteínas formadas serão complexadas ao RNA viral e a nova partícula viral será liberada a partir da superfície celular por meio de exocitose (23,25,26).

A infecção pelo BLV é de caráter persistente e a resposta imune inicia-se, principalmente, contra as glicoproteínas de superfície (gp51 e gp30) e contra a proteína do capsídeo (p24) (13). Os anticorpos gerados são produzidos após uma a duas semanas do início da infecção (2,29).

Após o estabelecimento da persistência da infecção, a doença pode progredir de 3 formas: assintomática, desenvolvimento de linfocitose persistente ou linfoma. Em um rebanho infectado, as chances de um animal adquirir a infecção aumentam conforme a idade. Estima-se que até 10% das infecções podem ocorrer via transplacentária; a probabilidade de infecção até os 25 meses de vida da terneira é de aproximadamente 40% e, após isso, devido às práticas de manejo, a probabilidade de infecção aumenta para 80% ou mais, o que explica o alto índice de animais adultos soropositivos ao BLV (1,10).

A maioria das infecções (70%) são assintomáticas, ou seja, os animais são portadores persistentes da infecção e não demonstram sinais clínicos da infecção, mas são potenciais transmissores virais mesmo possuindo altos níveis de anticorpos circulantes (15,30). Outra forma de infecção manifesta-se por meio de uma linfocitose persistente que se caracteriza por níveis elevados de linfócitos B policlonais circulantes, considerado um processo linfoproliferativo benigno, que acomete cerca de 30% dos animais infectados (10,15,31). Entretanto, a principal forma de infecção, ou a responsável pelos maiores prejuízos na cadeia bovina, manifesta-se pelo desenvolvimento de linfomas e acomete em torno de 2 a 5% dos animais, considerada altamente fatal (2,31). Os linfomas se desenvolvem principalmente a partir dos 6 anos de vida do animal e causam transtornos como paresias do trem posterior, diarreias e/ou constipações, exoftalmias, problemas cardíacos e respiratórios devido ao aumento dos linfonodos afetados (2). Além disso, animais soropositivos para o BLV possuem queda na produção e, por comprometer a imunidade do animal, aumenta a taxa de infecções secundárias, elevando as taxas de descarte. Quando o foco da produção dos rebanhos bovinos é a exportação, tanto vivo como embriões ou sêmen, não ter controle do BLV no país aumenta o custo de produção, pois é necessário o diagnóstico de todos os animais do rebanho quando comercializa-se com países livres da infecção (1,2,15).

2.4. Transmissão

O BLV possui tropismo pelos linfócitos B, permanecendo com o material genético inserido nessas células (32). A transmissão ocorre pelo contato com fluídos biológicos, como sangue,

leite, sêmen e saliva, contendo linfócitos B íntegros contaminados (10,33). Assim, podemos apontar duas formas de transmissão: vertical e horizontal (15).

Entre as principais formas de transmissão vertical temos: transplacentária e colostro/leite. A mais importante forma entre esse grupo é via ingestão do leite de vacas positivas que pode atingir uma taxa de infecção de até 16% (32,34).

Dentre a horizontal a iatrogênica é a forma mais importante nessa via. Geralmente é causada pela má higienização dos fômites e instrumentos cirúrgicos utilizados na prática comum de manejo bovino (15). Comumente ocorre no momento da vacinação, aplicação de tuberculina descorna, colocação de brincos, palpação, inseminação e castração (10,35). Também, em animais confinados, pode ocorrer outras formas de contágio através do contato direto com secreções nasais, urina e fezes e através de vetores mecânicos, como insetos hematófagos (2).

2.5. Prevenção e tratamento

Até o momento não há vacinas disponíveis comercialmente. O método mais eficiente para prevenir a infecção é a segregação de animais negativos dos positivos, e dentro do possível, removendo os soropositivos do rebanho e implementação da biossegurança na propriedade (10,32). Animais nascidos de vacas positivas devem ser alimentados de colostro ou leite proveniente de vacas negativas ou de um banco de colostro (2). A higienização adequada de todos os equipamentos utilizados que tenham entrado em contato com o sangue de animais infectados é obrigatória. O confinamento intenso em determinadas épocas do ano também pode ser um fator agravante se possuir animais positivos no rebanho, pois em épocas quentes e chuvosas pode aumentar a população de insetos, principalmente, mosquitos hematófagos, aumentando a possibilidade de disseminação da infecção (34).

2.6. Prevalência

Todos os bovinos são susceptíveis a infecção do BLV e a infecção possui distribuição mundial. Ocorre com maior frequência em rebanhos com aptidão leiteira do que de corte, principalmente por serem submetidos à um manejo e confinamento mais intensos (1). Alguns países europeus conseguiram erradicar a doença dos rebanhos, como por exemplo, Bélgica (36) e

Finlândia (37). No entanto, na maioria dos países a infecção pelo BLV tem sido negligenciada, como é o caso do Brasil, e a prevalência de animais soropositivos é alta.

No Brasil, há diversos estudos sobre a prevalência da infecção. No entanto, nenhum estudo apresenta uma abordagem epidemiologicamente correta. Mesmo assim, os resultados destes estudos são importantes, pois indicam que a doença encontra-se amplamente disseminada nos rebanhos bovinos de todas as regiões, e, de forma geral, tem uma prevalência nacional estimada em 27,6% (6). Esses estudos demonstram que a prevalência pode variar muito entre estados e aptidão do rebanho (5,7% à 70%) (1). No Rio Grande do Sul, vários estudos realizados com bovinos produtores de leite demonstram prevalência de até 33% e na região de Passo Fundo 23,5% dos rebanhos possuem uma prevalência superior à 30% (1,8).

2.7. Diagnóstico

As técnicas de diagnóstico recomendadas pela OIE são tanto para identificação do agente infeccioso (PCR) como para detecção de anticorpos circulantes no sague do animal (IDGA e ELISA) (16).

A PCR consiste em identificar o pró vírus através da extração do DNA das células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) do animal infectado. Essa técnica é importante para diferenciar animais infectados daqueles que possuem imunidade colostrar contra o BLV ou para aqueles animais que são doadores de sangue total, colostro, ou sêmen, pois é uma técnica altamente específica e sensível quando comparada as outras (2,15). Segundo a OIE, os genes alvos da PCR são ENV, GAG e POL, dependendo do par de *primer* utilizado (16).

Entretanto, os métodos sorológicos são os mais utilizados na rotina diagnóstica. Os testes recomendados pela OIE são o teste de ELISA para amostras de soro e leite e a IDGA apenas para soro (16). A principal diferença entre as técnicas de IDGA e ELISA é a sensibilidade, pois a IDGA requer maior quantidade de anticorpos circulantes para detectar animais infectados, possuindo menor sensibilidade quando comparado com o ELISA. (38).

A técnica mais utilizada no Brasil é o teste de IDGA. Entretanto, o antígeno disponibilizado para o teste de IDGA (TecPar®) apresenta alto número de falsos-negativos por conta da baixa sensibilidade do teste quando comparado a outros testes sorológicos, além disso, a sua leitura é demorada (48-72h) (14). Além do IDGA, há testes de ELISA indireto que utilizam proteínas

recombinantes mas, para comercialização no Brasil, necessita de autorização do MAPA. Este teste possui boa sensibilidade e especificidade, além de ser um método rápido de diagnóstico. Todavia, por ser um teste importado, o custo é elevado.

Nesse contexto, em função das limitações diagnósticas atuais, é importante desenvolver testes que possibilitam facilitar e acelerar o diagnóstico da infecção, e contribuir para o controle dessa importante enfermidade. Com esse objetivo, nesse estudo, utilizamos a proteína p24 recombinante do BLV para desenvolver um teste do tipo ELISA indireto para aplicação no soro de bovinos. Os procedimentos e resultados deste projeto estão relatados no próximo capítulo, o qual está formatado na forma de um artigo científico para publicação.

3. CAPÍTULO 1

Development of an indirect ELISA based on recombinant capsid protein to detect antibodies to bovine leukemia virus

Running title: indirect ELISA to bovine leukemia virus

Ana Paula Andreolla, Luana Marina Sheer Erpen, Rafael Frandoloso, Luiz Carlos Kreutz*

Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada – Prédio G3, UPF, FAMV

Submitted to Brazilian Journal of Microbiology

Universidade de Passo Fundo (UPF), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada – Prédio G3. Campus I, Bairro São José, BR 285, km 292. CEP 99052-900 Passo Fundo, RS, Brazil. Tel. +55 54 3316 8444; Fax. +55 54 3316 8163.

* Corresponding author. E-mail: lckreutz@upf.br (L.C. Kreutz)

Abstract

Serological testing and culling infected animals are key management practices aiming eradication of bovine leukemia virus (BLV) infection. Here we report the development of an indirect ELISA based on BLV recombinant capsid protein (BLVp24r) to detect anti-BLV antibodies in cattle serum. The BLVp24r was expressed in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography, and then used to set up iELISA parameters. The *Polysorp*® plate sensitized with 50 ng of antigen/well and bovine serum diluted 1:100 gave the best results during standardization. Using sera from infected and non-infected cattle we set up the cutoff point at 0.320 (OD_{450nm}) with a sensitivity of 98.5% and specificity of 100.0%. Then, we tested 1.187 serum samples from dairy (736 samples) and beef cattle (451 samples) with unknown status to BLV. We found that 31.1% (229/736) and 9.5% (43/451) of samples amongst dairy and beef cattle, respectively, had antibodies to BLV. The rate of agreement with a commercial competitive ELISA was 84.3% with a κ value of 0.68. Thus, our BLVp24r iELISA is suitable to detect BLV infected animals and should be a useful tool to control BLV infection in cattle.

Key words: bovine leukemia virus, retrovirus, diagnosis, immunoassay

Introduction

Bovine leukemia virus (BLV) is the etiological agent of a neglected, silent lifelong infection commonly found in dairy cattle¹ named enzootic bovine leukosis (EBL). A large percentile of animal infected by the BLV might be asymptomatic or aleukemic (AL), at least at the initial stages of infection, while up to 30% develop a persistent lymphocytosis (PL)² that in some cases, depending on the animal's BOLA genotype³, progresses to B cell lymphoma.^{4,5} The infection is considered eradicated in several parts of the world⁶ but is widely spread in North⁷⁻⁹ and most South American countries¹⁰ in which dairy farming is considered an important economic activity. There is no official data on the rate of infection in Brazilian dairy farm and most limited and biased epidemiological studies indicate that the range of seropositive animal varies from 12,5% to 100%.^{11,12} In South Brazil, in which most high productivity dairy farms are located, a within-herd infection rate usually exceeds 30%^{13,14}. BLV transmission might occur during pregnancy, calving or by ingesting colostrum from infected cows.¹⁵ In the herd, BLV spreading occurs mostly by management practices such as vaccination, dehorning, ear tagging, artificial insemination and uterine palpation^{8,16,17} that, when performed with the same equipment, might transfer BLV-infected cells from infected to non-infected animals.

Historically, BLV was considered a quite benign infection of cattle mainly because lymphomas were detected mostly in older animals that were still kept in the herd.¹ However, in the last decade, several studies indicated that BLV negatively affects the productivity of dairy cows¹⁸⁻²⁰ and that B and T lymphocytes from BLV-infected animals have impaired immune functions²¹, which could affect the overall immune status by reducing the ability to respond to vaccine antigens²² and by predisposing to other infectious diseases including mastitis. Furthermore, a tremendous turnover on BLV research is on the way driven by data indicating that

BLV might be associated with certain types of human cancer.²³⁻²⁵ Altogether, these data should encourage official measures to introduce compulsory diagnosis aiming to limit the spread of BLV and initiate control and eradication programs.

BLV infected animal produce a robust anti-BLV humoral immune response that might be detected by agar gel immunodiffusion (AGID) or by immune-enzymatic assays such as ELISA.^{26,27} In Brazil, antigen to AGID is produced on fetal lamb kidney (FLK) cells persistently infected with BLVs but, unfortunately, it is scarce and not reliable, and the use of overseas made ELISA kits for diagnosis is restricted by regulatory agency, discouraging even more voluntary diagnosis. Because several countries, mostly at the European Economic Community already eradicated EBL, the presence of BLV-infected animals in the herd might soon affect international trade of dairy products. Thus, controlling BLV spreading amongst dairy cattle by continuous diagnosis and culling infected animal should become mandatory to assure trading and safety of dairy products. With this in mind, in this study our major goal was to evaluate a recombinant BLV capsid protein as antigen to develop an iELISA to diagnose BLV-infected cattle.

Material and methods

DNA extraction, cloning and sequencing of BLV capsid protein gene

Blood samples from a cow infected by BLV (positive by AGID) was collected with EDTA and centrifuged (1300 x g / 10 min) to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from which total DNA was extracted using the *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (PROMEGA®, WI). The amount of DNA was measured by spectrophotometry and stored (-20°C) up to use.

PCR primers were designed to amplify a 666 bp DNA fragment covering the complete nucleotide sequence of the BLV capsid protein and we included restriction sites at the 5' end (*Bam*HI and *Hind*III in the forward and reverse primer, respectively, underlined) to easy directional cloning of the amplified fragments into the cloning vector (Forward: 5'-ATTAGGGGATCCCAATCATATCTGAAGGGAATCGCAA-3'; Reverse: 5'-TGGCAGAAGCTTTTAGAGAAGTGCAGGCTGTTTCA-3'). The amplification was performed using 400 ng of DNA, 0.4 μM of each primer, 1,5U of *Taq* DNA polymerase, 2,5 μL of 10X buffer supplemented with MgSO₄, 100 μM of dNTPs (Promega®, Brazil) and DNA/RNA-free water (Sigma, Brazil) to a final volume of 25 μL. DNA was denatured at 95°C/5 min, and then amplified by 35 cycles of denaturing (94°C/1min), annealing (52°C/40sec) and extension (72°C/2min) followed by a final amplification at 72°C for 10 min. The resulting DNA fragment was analyzed by electrophoresis in agar gel (1%), purified and cloned into the *pGEM-T-Easy* vector (Promega®, Brazil), and transformed into calcium competent TOP10 *E. coli* (ThermoFisher Scientific®). Penicillin-resistant clones were obtained and the presence of the capsid protein gene into the vector (pGEM-BLVp24) was confirmed by PCR and by sequencing using the vector forward primer (pUC/M13, Promega, Brazil). The sequence obtained was compared with reference genes available at GeneBank.

Expression of BLV capsid protein

The pGEM-BLVp24 vector was digested with *Bam*HI and *Hind*III (Promega, Brazil) restriction enzymes and analyzed by low melting point agar gel electrophoresis, The DNA fragment corresponding to the complete sequence that codifies de p24 capsid protein was cut out of the gel, purified (*Wizard SV Gel* Promega, Brazil) and cloned into the pET-20 vector previously digested with the same restriction enzymes. The resulting plasmid (pET-20-BLVp24)

was transformed into competent ER2566 *E. coli* (New England Biolabs Inc®, USA) for expression as a fusion protein containing histidine, a maltose binding protein (MBP) and a restriction site for the tobacco etch virus (TEV) protease at the N-terminus. The expression of the recombinant His-Mbp-TEV-BLVp24 (BLVp24r) was induced overnight with 0.1 M *isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG, Sigma, USA). The bacteria cells were pelleted (4000 x g, 15 min, 4°C), suspended in lysis buffer (20mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 10mM Imidazol, pH 8,0) and sonicated thrice (70watts) (Ultronic, Brazil). Then, the sonicated bacteria was centrifuged (13000 x g, 1h, 4°C) and the supernatant filtered (0.22 μM) and purified using the *Äkta Pure Chromatography System* (GE Healthcare, Germany) connected to a HisTrap (GE Healthcare, Germany) column. The purified proteins were measured (nanospectrophotometry), aliquoted and stored at -80° up to use.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Aliquots containing the BLVp24r protein eluted from the HisTrap affinity columns were analyzed by standard SDS-PAGE under reducing conditions (5% β-mercaptoethanol) using 5% acrylamide stacking gel overlaid on 10% acrylamide resolving gel. Samples collected prior to and after induction were also analyzed simultaneously. The SDS-PAGE gel was stained with Coomassie Blue R-250 or used for Western blotting.

Production of polyclonal antibodies to the BLVp24r

Two Wistar rats were immunized twice (subcutaneous route, 21 days apart) with 50 μg/dose of BLVp24r mixed to Montanide gel (15%v/v, Seppic, France). Blood samples were collected prior to and during immunization by puncturing the caudal vein, and final bleeding was performed by cardiac puncture. All procedures with rats were performed after anesthetizing with

Isoflurane (Cristalia, Brazil). The experimental protocol was approved by the local Committee on Animal Ethics and Usage (CEUA, protocol 12/2014)

Western Blotting

After SDS-PAGE, BLVp24r were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, USA) using a semi-dry apparatus (Electrosystems, Brazil). The nitrocellulose membrane containing the proteins was blocked overnight at 4°C with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) and 3% skim milk (PBS-TSK) constant shaking and then cut into strip (4 mm each). Serum from rats previously and after immunization with the BLVp24r, and serum from non-infected cows (IDGA negative; n = 8) and cows naturally infected with BLV (n = 8) were analyzed by western blotting. Rat or bovine serum samples were diluted 1:100 in 1% PBS-SK and incubated with the membrane strips for 1 h at 22°C under constant shaking. Then, the membranes were washed three times, 10 min each, with PBS-T. Peroxidase conjugated anti-rat, or anti-bovine IgG whole molecule was diluted 1:1000 and incubated with the membranes under the same conditions as the primary antibody. After washing thrice, the membranes were incubated with peroxidase substrate (*4-Chloro-1-Naphthol* + 0.06% H₂O₂) for 10 minutes and then transferred to distilled water to stop the reaction.

In house indirect ELISA

Two commercially available polystyrene microplates (Maxisorp[®] and Polysorp[®], Nunc, USA) were evaluated regarding the ability to adsorb the BLVp24r. The plates were coated with BLVp24r (2 µg/well) diluted in carbonate buffer (pH 9.6) at 4°C for 12 h and then washed three times with phosphate buffered saline 0.05% Tween (PBST, pH 7.2). Plate wells were blocked with PBS-TSM at 37°C for 2 h. Bovine serum positive (n = 4) and negative (n = 4) to BLV antibodies were diluted 1:100 in PBS-TSK1%, added to the wells and allowed to react with the

antigen for 1h at 27°C, in duplicates. After washing three times, peroxidase conjugated goat anti-bovine IgG (Sigma, USA) diluted 1:10.000 in PBS-TSK1% was added and the plates were incubated as indicated above, followed by three washes and addition of substrate (3,3, 5,5'-tetrametilbenzidina + 0,06% H₂O₂). The plates were then incubated in the dark at 22 °C for 10 min and the reaction was stopped by adding 3 N HCl. The plates were read at 450 nm using a Synergy HI plate reader (BioTek[®], USA). We used the optical density (OD) from three plates to calculate the mean positive/negative (P/N) ratio and the mean within-plate percent coefficient of variation (CV%) as previously described.²⁸ The plates were then compared using an index obtained by dividing the P/N ratio by the CV%.

After selecting the best plate (*Polysorp*[®]), the optimal antigen concentration was evaluated in duplicates using different concentrations of the BLVp24r (2.0000, 1.000, 500, 250, 125, 100 e 50 ng/well) in a final volume of 100 µL, and serum from naturally infected (n = 16) or non-infected cows (n = 16). Cows negative to BLV by the AGID were further evaluated by PCR targeting the Tax (nested PCR) and GAG BLV genes²⁵ to assure they were negative. The optimal antigen concentration was defined as the lowest antigen concentration that caused no significant changes in the OD obtained with the positive and negative sera.

The ideal serum dilution was determined by diluting bovine serum (negative and positive, n = 16 each) from 1:25 to 1:200, and plates sensitized with the best antigen concentration determined in the previous step (50 ng/well). The ideal dilution was determined taking into consideration the best specificity and sensitivity obtaining by the receiver operating characteristics (ROC) curve performed in all sera in duplicates.

The cut-off point was set by analyzing 100 serum samples previously tested by AGID (Tecpar, Brazil). Out of this, 70 samples were positive and 30 were negative to the presence of

anti-BLV antibodies. Polysorp® plates were sensitized with BLVp24r (50ng/well) and serum samples were diluted 1:100. With the samples OD values we determined the threshold following the ROC curve analysis.

The in house ELISA was then used to evaluate the prevalence of BLV infection in dairy (n = 736) and beef (n = 451) cattle in the central region of Rio Grande do Sul, Brazil. Samples were obtained from our Virology Diagnosis Laboratory and from the Virology Laboratory at the Federal University of Santa Maria (UFSM), RS. Then, we randomly selected 255 serum samples and tested them also by a commercial competitive BLV ELISA kit (Ingezim BLV Compac 2.0, Spain) to estimate the rate of agreement and Kappa (κ) values.

Statistical Analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the normal distribution of the data. The results were analyzed by Kruskal-Wallis or One Way Anova followed by Tukey post-test according to the data. Significant differences were considered when $p < 0.05$. All the statistics were performed using the GraphPad Prism software (GraphPad, USA).

Results

Cloning, expression and characterization of BLVp24r

A 666 bp DNA fragment (Fig. 1A) was obtained and cloned into the *pGEM-T-Easy* vector and then sub-cloned into the pET20 aiming expression of a recombinant capsid protein from BLV (BLVp24r). The inserted fragment was sequenced and aligned to reference BLV genome (GenBank access number K02120, AP018032, LC080653, HE967302 and KT122858) resulting in 96% to 99% identity (data not shown).

The expression of the pET-20-BLVp24 construction in *E.coli* ER2566 was analyzed by SDS-PAGE and the resulting fusion protein His-Mbp-TEV-BLVp24 (BLVp24r) had a molecular mass of 67 Kda (BLVp24r + MBP 43Kda) (Fig. 1B). The expression yielded 14mg/L of purified BLVp24r.

The immunogenicity and reactivity of the BLVp24r was demonstrated by western blot using sera from immunized rats and sera from non-infected or from cows naturally infected with BLV. Sera from non-infected cows (Fig. 1C) and serum collected from rats prior to immunization failed to recognize BLVp24 (Fig. 1E 0) while sera from naturally infected cows and post-inoculation rat serum recognized the same protein (Fig. 1 D and 3E 41). The reactivity of each serum used in the western blot was later evaluated by the standardized ELISA and the OD obtained is indicated in the lower panel.

Microplates

The mean OD obtained with negative and positive serum samples was significantly lower ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) when tested with antigen adsorbed to *Polysorp*® microplate compared to the *Maxisorp*® microplate (not shown). However, the overall analysis indicated a better efficiency with the *Polysorp*® microplates in that the P/N ratio obtained (4.5) was 2.2 times higher than the P/N ratio obtained with the *Maxisorp*® microplates (2.04). A lower CV was observed amongst negative and amongst positive samples with *Polysorp*® microplates which yielded a higher microplate index (Table 1). Considering that *Polysorp*® microplates allowed a better distinction between positive and negative samples (P/N ratio) compared to *Maxisorp*® microplates, they were then used on the remaining experiments.

Optimal antigen concentration and serum dilution

The ideal concentration of BLVp24r antigen to be used in the *Polysorp*® microplates was evaluated using a wide range of antigens dilutions and BLV negative (n = 16) and positive (n = 16) bovine serum. The mean serum OD reading obtained in each antigen dilution was not significantly different ($p > 0.05$) from the next lower dilution and thus we choose the lower antigen concentration evaluated (50 ng/well) to perform the remaining assay (Fig. 2).

To set up the best serum dilution we tested samples diluted 1:25, 1:50, 1:100 and 1:200 with *Polysorp*® microplates sensitized with 50 ng of BLVp24r/well. When all dilutions were compared, we observed a reduced sensitivity only with serum diluted 1:200 (83.33%) compared to 91.67% of sensitivity obtained with the other serum dilutions (not shown). Thus, we use the highest possible serum dilution (1:100) for the remaining studies.

Specificity, sensitivity and cut-off point determination

Seventy AGID negative sera samples and 30 AGID positive samples were used to determine the in house ELISA sensitivity and specificity for different cut-off point values. The ROC curve analysis of the in house ELISA data produced paired estimates of relative sensitivity and relative specificity at different cut-off values. A cut-off of $OD \geq 0.320$ was recommended. At this cut-off value we obtained a relative sensitivity of 98.5% (95% confidence interval = 91.96.3% to 99.96%) and specificity of 100% (95% confidence interval = 95.01% to 100%) with a likelihood ratio of 75. The ROC curve had an area under the curve (AUC) value of 0.9989 (95% confidence interval = 0.9961 to 1.002; $p < 0.0001$) demonstrating a high level of accuracy for this ELISA (Fig. 3). Thus, samples with an OD higher than 0.320 were considered positive when the negative control was at least 1.5 times smaller than the cut-off value.

Epidemiology study of BLV infection on dairy and beef cattle and comparison between *in house* ELISA and commercial assay

By using our *in house* ELISA, we analyzed 1187 sera samples from dairy (736) and beef (451) cattle from the North part of Rio Grande do Sul State. Within dairy cattle, we found 229 (31.1%) positive samples and within beef cattle only 43 (9.5%) samples had antibodies to BLVp24r (OD > 0.270) (Table 2).

The performance of the *in house* ELISA to detect anti-BLV antibodies was compared with the commercial anti-gp51 competitive ELISA assay. We randomly selected 255 sera previously tested in the *in house* iELISA (118 negative and 137 positive) and evaluated them in duplicates using the commercial ELISA. We found 122 negative and 133 positive samples (Table 3) resulting in 84,3% of agreement and a *Kappa* (*K*) index of 0.68 (good agreement).

Discussion

Enzootic bovine leukosis usually occurs as a silent, asymptomatic disease in most dairy farms and, for this reason, has been neglected for decades. Up to 30% of infected animal develop a persistent lymphocytosis (PL) which in some animal might progress to B cell lymphoma. There are no vaccines and all infected animals respond to infection by producing antibodies to the gp51 viral envelope glycoprotein and to the p24 viral capsid protein. These viral antigens have been explored in diagnosis assays; the gp51 is used mostly, but not exclusively, in AGID assays and the p24 in immunoassays.^{26,29-32} The AGID assay is the only official diagnostic method accepted in Brazil but, unfortunately, antigen production is limited and the assay yields unreliable results that frustrates diagnosticians and difficult a rational approach to disease control. In addition, because

the possible involvement of BLV with certain types of human cancer,^{23,24} EBL control in dairy cattle becomes a matter of public health and should become mandatory.

With this in mind, here we describe the production of a recombinant BLV capsid protein (BLVp24r) and its use for development of an indirect ELISA assay to detect anti-BLV antibodies in blood samples. The vector and expression system was chosen aiming to improve the recombinant protein yield, solubility and purification without losing immunogenicity and recognition by antibodies from BLV naturally infected animals. Indeed, the recombinant protein was easily purified by standard procedures and its immunogenicity demonstrated in rats. Furthermore, the protein was recognized by antibodies from BLV naturally infected cows, both by western blot and ELISA, and by the OIE reference serum E 05, kindly provided by the OIE reference laboratory for EBL at the University of Leipzig (Germany), that was also used in the iELISA settings. In addition, the MBP tail is not immunogenic to rats, or even other species, which allows the recombinant fusion protein to be used in developing diagnostic assays.^{33,34}

We found that microplate characteristics affected the outcome of the assay. Overall, negative and positive sera samples tested with the *Polysorp*® microplate had a lower OD reading but the P/N ratio and the %CV found with both types of plates indicated that the *Polysorp*® microplates should be used to better differentiate negative from positive samples. Interestingly, in a previous study in which we expressed the capsid protein of Hepatitis E virus (BEV) in the same expression system we found that *Maxisorp*® microplates had a higher antigen binding efficiency and a lower CV compared to *Polysorp*® microplates.³³ We are aware that antigen adsorption to microplates is affected by hydrophobic and hydrophilic domains present on the molecules and this should account for by the differences observed in the ability of antigen binding to different microplate. Thus, in this sense, testing different microplates for antigen binding is required to achieve better

results. Considering the maximal binding capacity/cm² of the well (0.5 µg protein) and the final volume used in the assay (100 µl), we estimated that saturation would be achieved with 0,037 µg of antigen. However, the differences on P/N ratio and %CV were not significant when we compared different antigen concentration and, therefore, we choose the lowest antigen concentration tested (50 ng/well) to carry out the study. Even though antigen concentration might affect ELISA parameters, similar recombinant antigen concentrations were used in previous study to detect BLV³⁰ and other viral infections.³⁵ Furthermore, our BLV p24r was fused to MBP and resulted in a protein with a higher molecular mass (67 kDa) when compared to the BLV capsid protein *per se* (24 kDa). When larger proteins are used, lower concentrations (µg/well) might be required to optimize ELISA parameters. We hypothesize that MBP would contribute to protein adsorption to the microplate well leaving relevant antigenic epitopes completely uncovered and available improving the efficiency of antibody binding to the recombinant protein and reducing the amount of antigens required to optimize ELISA parameters.

The performance of our in house iELISA was compared to the AGID and a commercial competitive ELISA that used a peroxidase-labelled monoclonal antibody as detecting antibody. There was a 72% agreement between the in house iELISA and AGID and the *kappa* index was low (0.42; data not shown). However, in our experience with the available AGID assay, we noticed that even the positive control serum provided with the kit commonly fails to give a reliable result, which is difficult to read even by experienced diagnosticians. Furthermore, because iELISA is more sensitive than AGID in detecting even small amounts of antibody to a given antigen,^{27,32} animals recently infected would not be detected by AGID. However, when compared to the commercial ELISA, we found 84.3% of agreement between the results with a κ value of 0.68. Although the agreement found between the assays is considered good, it is worth

nothing that the commercial assay detects antibodies to the BLV gp51 glycoprotein using a peroxidase-labelled competing monoclonal antibody. Thus, in this case, because gp51 is a highly variable surface glycoprotein, animals infected with a different genotype¹⁰ might not have antibodies to the epitope targeted by the detecting monoclonal antibody and would result negative in the commercial but positive in the in house iELISA that uses the highly conserved BLV p24r protein. In fact, one animal positive by iELISA and Western Blot assay (Fig. 1C, second strip OD₄₅₀ 0.997) ended negative when assayed by the commercial ELISA, strengthening the hypothesis that different genotypes of BLV are circulating on different geographical areas and would escape detection by serological assay that would target unique epitopes. In the other hand, animals negative to the in house iELISA but positive in the commercial assay could have been infected recently and developed antibodies mostly to the viral surface glycoprotein. In any case, controlling BLV infection in a herd requires periodical testing to remove positive animals as long as any positive animal is still detected within the herd.

BLV causes a silent, life-long infection of dairy cattle which has been mostly underestimated or even overshadowed by other diseases. However, as the economic impact of BLV on cow's health and milk production is appreciated^{18–20,36,37} and, most recently, with its possible link with human breast cancer,^{23,25} a major switch on diagnosis and disease control should be expected. Thus, rapid and reliable serological test should be promptly available at low cost to milk farmers and eradication policies should become mandatory. Using our in house iELISA, we tested 736 dairy and 451 beef cattle sera samples from the North region of Rio Grande do Sul and found a prevalence of 31.1% (229/736) and 9.5% (43/451) respectively. For dairy cattle, the prevalence to BLV infection remains similar to that reported in previous studies.^{13,14} In fact, we were expecting a higher prevalence. Thus, we hypothesize that current

invasive management procedures like ear tagging, vaccination, artificial insemination and tuberculosis testing are performed taking into consideration the risk of transmitting BLV amongst cattle, mainly because most veterinarians are aware of the relatively high prevalence of within herd infection already reported in dairy cattle from this region. By doing so, iatrogenic transmission of BLV is kept at minimum. Also, we are aware that most veterinarians recommend that once an infected animal is detected, it should be removed from the herd or managed in such a way to reduce the risk of transmitting BLV to non-infected cows.

In conclusion, the in house iELISA we developed using BLVp24r might be explored as a commercial test to detect BLV infected animals. The protein expressions and purification system we used yields enough protein to make it affordable and simple to use. Because BLV is widespread in dairy cattle and we showed a high rate of infection also in beef cattle, and because of the recent reports of BLV infection in humans, controlling BLV infection in cattle becomes a public health issue that should become mandatory.

Acknowledgements

Ana Paula Andreolla was a Master Student supported by the Fundação Universidade de Passo Fundo and then by CAPES (01947247000). L.M.S. Erpeen has an undergraduate fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. The Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada is equipped with funding from the Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia (SDECT - Convênio 46/2014 processo 328-25.00/14-0). L.C. Kreutz holds a fellowship from CNPq (Produtividade em Pesquisa - PQ 307900/2016-9).

References

1. Barez PY, de Brogniez A, Carpentier A, et al. Recent advances in BLV research. *Viruses*. 2015;7(11). doi:10.3390/v7112929.
2. Johnson R, Kaneene JB. Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Vet Bull*. 1992;62(4):287-311.
3. Juliarena MA, Poli M, Sala L, et al. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim Genet*. 2008;39(4):432-438. doi:10.1111/j.1365-2052.2008.01750.x.
4. Gillet N, Florins A, Boxus M, et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 2007;4(18):1-32. doi:10.1186/1742-4690-4-18.
5. Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima S-N. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol*. 2013;4(November):328. doi:10.3389/fmicb.2013.00328.
6. EFSA AHAW Panel. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA J*. 2015;13(7):4188-4251. doi:10.2903/j.efsa.2015.
7. Merlini R, Gutierrez G, Alvarez I, et al. Bovine leukemia virus becomes established in dairy herds before the first lactation. *Arch Virol*. 2016;161(11):3215-3217. doi:10.1007/s00705-016-2973-x.
8. Bartlett PC, Sordillo LM, Byrem TM, et al. Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 2014;244(8):914-922. doi:10.2460/javma.244.8.914.

9. Bauermann F V., Ridpath JF, Dargatz DA. Bovine leukemia virus seroprevalence among cattle presented for slaughter in the United States. *J Vet Diagnostic Investig.* 2017;29(5):704-706. doi:10.1177/1040638717702183.
10. Polat M, Takeshima SS, Hosomichi K, et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology.* 2016;13(1):1-23. doi:10.1186/s12977-016-0239-z.
11. Del Fava C, Pituco E. Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BLV) no Brasil. *Biológico.* 2004;66:1-8.
12. Álvaro L, Junior L, Alfieri AF, Amauri ;, Alfieri A. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina Enzootic bovine leukosis and Bovine leukemia virus. *Semin Ciências Agrárias Agrárias.* 2001;22(2):211-221.
13. Frandoloso R, Anziliero D, Spagnolo J, et al. Prevalência De Leucose Enzoótica Bovina , Diarréia Viral Bovina , Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina E Neosporose Bovina Em 26 Propriedades Leiteiras Da Região Nordeste Do Rio Grande Do Sul , Brasil. *Ciência Anim Bras.* 2008;9(4):1102-1106. doi:10.5216/cab.v9i4.1398.
14. Poletto R, Kreutz LC, Gonzales JC, Barcellos LJG. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. *Ciência Rural.* 2004;34(2):595-598. doi:10.1590/S0103-84782004000200043.
15. Mekata H, Sekiguchi S, Konnai S, et al. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. *Vet Rec.* 2014;176(10):1-4. doi:10.1136/vr.102464.

16. Hopkins SG, DiGiacomo RF. Natural Transmission of Bovine Leukemia Virus in Dairy and Beef Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1997;13(1):107-128.
doi:10.1016/S0749-0720(15)30367-4.
17. Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, et al. Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol.* 2011;151(3-4):255-263.
doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.035.
18. Yang Y, Fan W, Mao Y, et al. Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score. *J Dairy Sci.* 2016;99(5). doi:10.3168/jds.2015-10580.
19. Norby B, Bartlett PC, Byrem TM, Erskine RJ. Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *J Dairy Sci.* 2016;99(3):2043-2052.
doi:10.3168/jds.2015-10089.
20. Yang Da, Roger D. Shanks JAS and HAL. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *J Am Vet Med Assoc.* 2015;13(8):914-922. doi:10.2903/j.efsa.2015.
21. Frie MC, Coussens PM. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;163(3-4):103-114.
doi:10.1016/j.vetimm.2014.11.014.
22. Frie MC, Sporer KR, Wallace JC, et al. Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016;182.
doi:10.1016/j.vetimm.2016.10.013.

23. Giovanna M, Carlos UJ, María UA, Gutierrez MF. Bovine Leukemia Virus Gene Segment Detected in Human Breast Tissue. *Open J Med Microbiol*. 2013;3(1):84-90.
doi:10.4236/ojmm.2013.31013.
24. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Yeon Choi K, Sun D, Nuovo G. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(5):772-782.
doi:10.3201/eid2005.131298.
25. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Jin DL, Hudes M, Block G. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. *PLoS One*. 2015;10(9):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0134304.
26. Dolz G, Moreno E. Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1999;46(8):551-558.
27. Simard C, Richardson S, Dixon P, Bélanger C, Maxwell P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: Comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can J Vet Res*. 2000;64(2):101-106.
28. Pandolfi R, Almeida DR De, Pinto MA, Kreutz LC, Frandoloso R. In house ELISA based on recombinant ORF2 protein underline high prevalence of IgG anti- hepatitis E virus amongst blood donors in south Brazil. *PLoS One*. 2017:1-12.
doi:10.6084/m9.figshare.4902104.
29. Bicka L, Kuźmak J, Kozaczyńska B, Płucienniczak A, Skorupska A. Expression of bovine leukemia virus protein p24 in *Escherichia coli* and its use in the immunoblotting assay. *Acta Biochim Pol*. 2001;48(1):227-232.

30. Gutiérrez G, Alvarez I, Fondevila N, et al. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet Microbiol.* 2009;137(3-4):224-234. doi:10.1016/j.vetmic.2009.01.022.
31. De Giuseppe A, Feliziani F, Rutili D, et al. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(1):147-151. doi:10.1128/CDLI.11.1.147.
32. Choi KY, Liu RB, Buehring GC. Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. *J Virol Methods.* 2002;104(1):33-39. doi:10.1016/S0166-0934(02)00040-X.
33. Pandolfi R, De Almeida DR, Pinto MA, Kreutz LC, Frandoloso R. In house ELISA based on recombinant ORF2 protein underline high prevalence of IgG antihepatitis e virus amongst blood donors in south Brazil. *PLoS One.* 2017;12(5). doi:10.1371/journal.pone.0176409.
34. Ramos DDA, Miani M, Pandolfi R, et al. Production and characterization of a Brazilian candidate antigen for Hepatitis E Virus genotype 3 diagnosis. 2016;(January):1-9. doi:10.1093/femsle/fnw021.
35. Pezzoni G, Caminiti A, Stercoli L, et al. Comparison of three in-house ELISAs for the detection of hepatitis E virus infection in pigs under field conditions. *J Virol Methods.* 2014;207:95-103. doi:10.1016/j.jviromet.2014.06.025.

36. Della Libera AMMP, De Souza FN, Batista CF, et al. Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. *Vet Res.* 2015;46(1). doi:10.1186/s13567-014-0125-4.
37. Gillet NA, Willems L. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology.* 2016;13(1). doi:10.1186/s12977-016-0308-3.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the nucleotide sequence corresponding to the BLV capsid protein gene. Lymphocytes from BLV-infected cows (lanes 1 and 2) and from a non-infected cow (lane 3) were used for DNA extraction and analyzed by PCR. The fragment amplified was 666 nucleotides in length. M: 1 Kpb molecular weight markers. (B) Analyses of the recombinant BLV capsid protein (BLV p24r). Samples were collected prior to IPTG induction (lane 1), after overnight induction (lane 2), and after purification by the HisTrap column (lane 3), analyzed by SDS-PAGE and stained by Coomassie blue. The size of the molecular weight markers are indicated on the left side. (C) Western blot analysis of the BLVp24r protein. The purified BLVp24r protein resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Membrane strips containing the BLVp24r were incubated with serum from non-infected (panel C; n = 8) and naturally BLV-infected (panel D; n = 8) cows, and with rat serum (panel E) collected prior to (day 0) or after immunization (day 41) with the BLVp24r. All sera were also evaluated by our in house iELISA and the optical density (OD_{450nm}) of each serum is indicated below the strips. M: molecular weight markers.

Figure 2. Ideal antigen concentration determination for the in house iELISA. Different antigen concentrations were adsorbed to the *Polysorp*® microplates and then incubated with serum from non-infected (n = 16) and naturally BLV-infected (n = 16) cows diluted 1:100. The antigen concentrations evaluated are indicated. The results represent the OD mean ± SEM at each antigen concentration. The arrow indicates the ideal antigen concentration.

Figure 3. Receiver operating characteristic (ROC) analysis. The ROC curve was created using the results obtained from analyzing 70 BLV negative and 30 BLV positive bovine serum samples (diluted 1:100) by the in house iELISA (50 ng antigen/well) performed with the *Polysorp*® microplate. The area under the ROC curve was 0.9989.

Figure 1

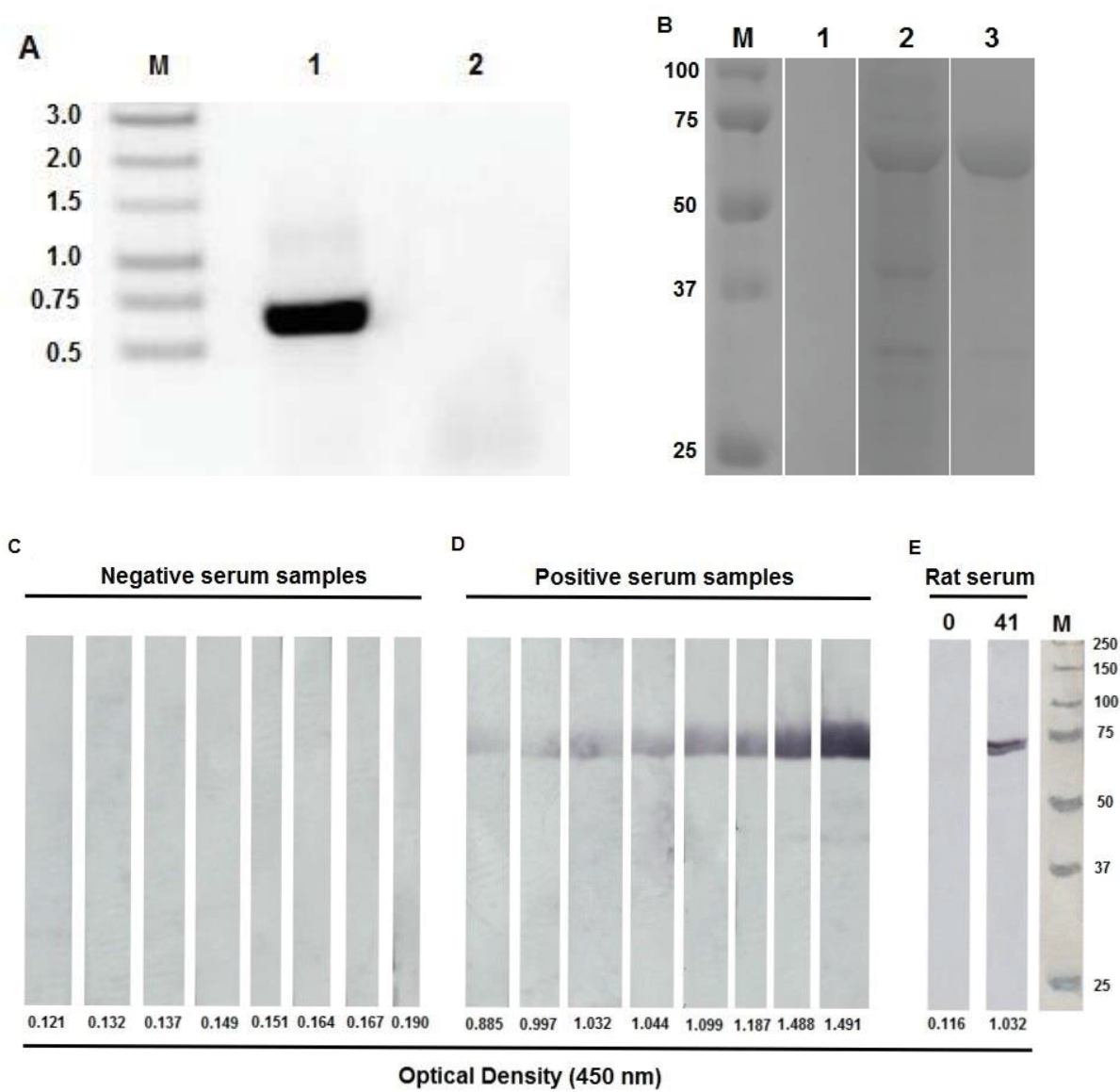


Figure 2

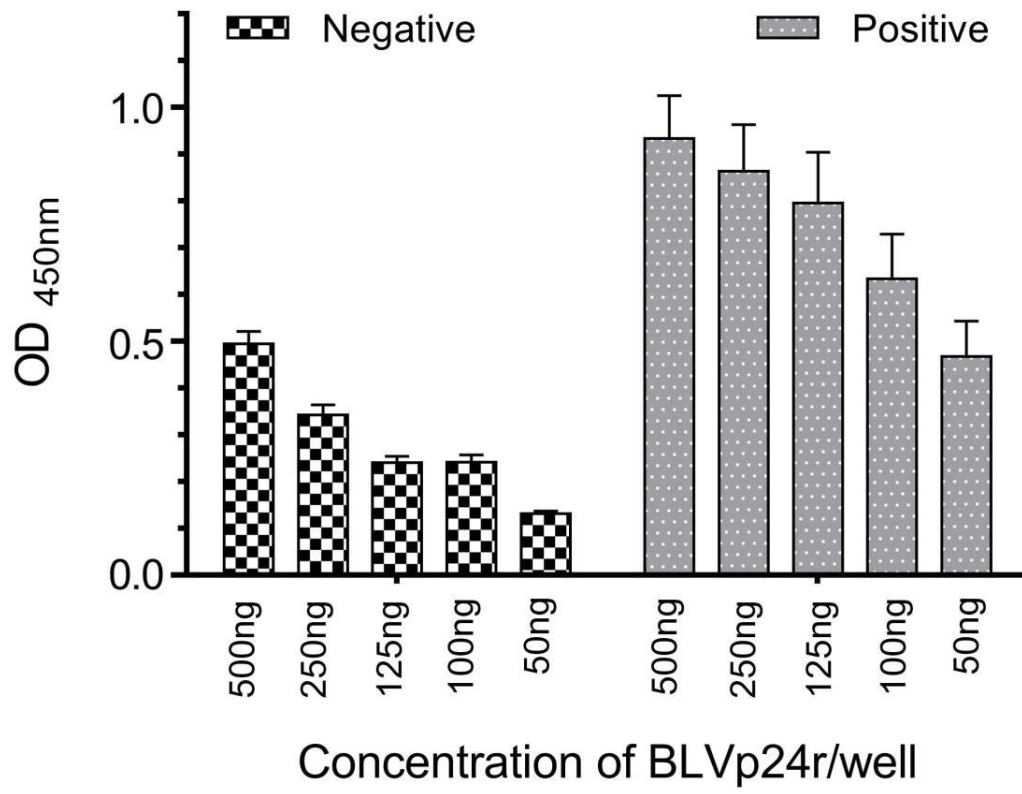


Figure 3

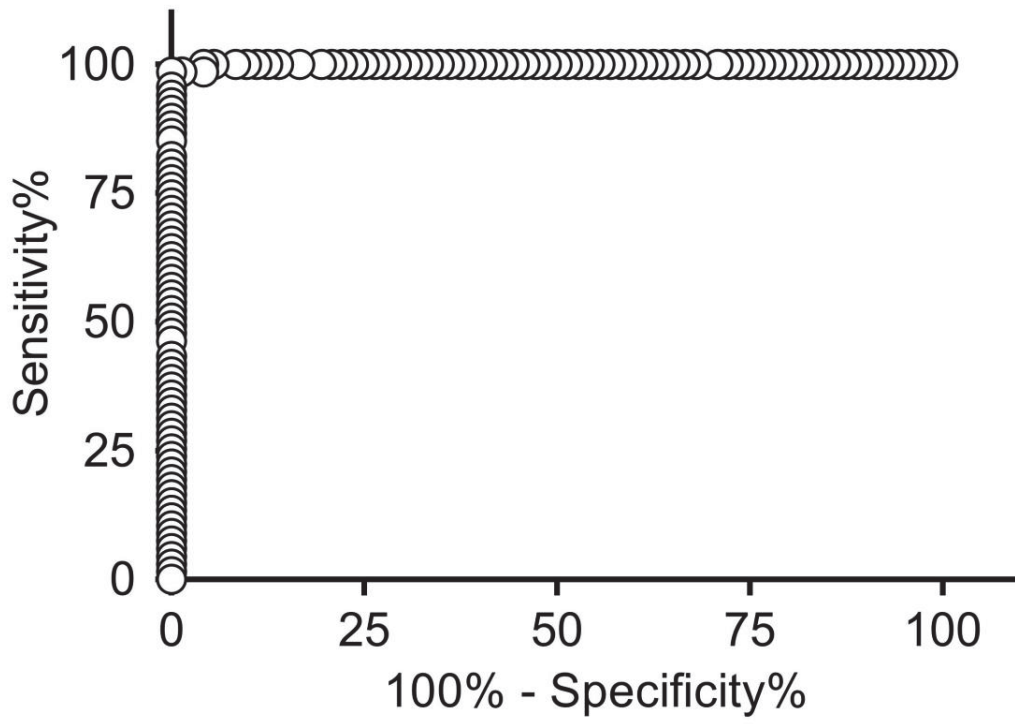


Table 1. Performance of *Maxisorp*® e *Polysorp*® ELISA microplates. The wells of both plates were sensitized with BLVp24r (2 µg/well) and evaluated in triplicates with negative (n = 4) and BLV-positive (n = 4) sera samples to determine the P/N ration (P/N) and the percentile of the coefficient of variation (%CV). The index value was then obtained by dividing the P/N ratio by the CV (%) from positive samples.

Microplate	P/N	CV		Index
		Negative	Positive	
Maxisorp	2.04	7.1%	8.8%	0.23
Polysorp	4.50	2.2%	4.1%	1.1

Table 2. Anti-BLV antibodies prevalence in dairy and beef cattle. Serum samples from dairy cattle (n = 736) and beef cattle (n = 451) were evaluated in duplicates by the in house iELISA, using 50 µg/well of BLVp24r in Polysorp® microplates and a 1:100 sera dilution. Samples with a OD > 0.320 were considered positive

Cattle type	n	Result	
		Positive	Negative
Dairy	736	229 (31.1%)	507 (68.9%)
Beef	451	43 (9.5%)	408 (90.5%)
Total	1187	272 (22.9%)	915 (77.1%)

Table 3. Rate of agreement between the iELISA (anti-p24 antibodies) and a commercial competitive ELISA (anti-gp51 antibodies) evaluated using 255 samples selected randomly amongst dairy cattle serum samples.

		Competitive gp51 ELISA		Total
		Positive	Negative	
iELISA BLVp24r	Positive	115	22	137
	Negative	18	100	118
	Total	133	122	255

4. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de um teste de ELISA indireto genuinamente brasileiro é imprescindível para o controle da LEB no Brasil. Assim, consideramos o nosso ELISA um possível candidato para kit comercial, o que possibilita diagnosticar corretamente todos os animais de um rebanho, pois o teste apresenta altíssima sensibilidade e especificidade, ou seja, alta acuracidade no diagnóstico. Com os resultados desse trabalho concluímos que:

1. A tecnologia que foi utilizada para obtenção da proteína recombinante é de alta complexidade, considerada uma técnica difícil de ser realizada. Entretanto, quando comparamos o sistema de expressão por nós utilizado (*E. coli* e um vetor que expresse uma proteína de fusão) com outros sistemas, como por exemplo, baculovírus e células eucariotas, percebemos que é uma técnica menos laboriosa e mais rápida de obter a proteína purificada.

2. A padronização de qualquer interferente no teste é de suma importância, pois reduzimos ao máximo a quantidade de reagentes utilizado sem prejudicar os resultados. Além disso, a otimização total do teste gera resultados que aumenta ainda mais a confiabilidade do diagnóstico.

3. O ELISA desenvolvido consegue eliminar muitos interferentes e limitações que o IDGA possui, como por exemplo, falsos negativos decorrentes do manejo, animais no período perinatal ou lactantes.

4. O estudo sorológico demonstrou que a nossa região continua sendo endêmica para o BLV em rebanhos com aptidão leiteira. Além disso, demonstramos que a infecção está presente em bovinos de corte também, porém com uma prevalência menor do que aquele de leite.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para chegarmos a esse nível de padronização do ELISA utilizando a BLVp24r foi necessário mudar várias vezes a estratégia utilizada, tanto inicialmente, na clonagem do fragmento no vetor, bem como na purificação da proteína.

Primeira

A primeira dificuldade enfrentada foi a clonagem do fragmento no plasmídeo pET-20. Realizamos a PCR e a digestão do fragmento e do plasmídeo com as enzimas de restrição BamHI e HindIII, incubação e inativação das mesmas, em diferentes tempos e temperaturas, segundo as recomendações do fabricante. Entretanto, quando essas amostras foram submetidas a ligação com a T4-ligase, nenhuma das tentativas foi bem sucedida. Nesse momento, realizamos o sequenciamento do fragmento do PCR para analisar que, se de fato, os primers possuíam a sítio de restrição correto. Após análise, comprovamos que o problema não estava nos sítios de restrição. Assim, partimos para uma nova estratégia: a clonagem do fragmento no plasmídeo pGEM. Seguimos conforme as instruções do fabricante e a clonagem foi bem sucedida.

Com o fragmento no pGEM, digerimos e purificamos o fragmento de interesse, e mais uma vez falhamos na clonagem com o pET-20. Nesse momento, mudamos o método de purificação, ou seja, estávamos usando o kit e passamos a utilizar a purificação por precipitação do DNA por etanol, pois acreditávamos que o kit deixava muitos resíduos no produto eluído. Assim, uma nova tentativa de ligação foi realizada e a clonagem foi bem sucedida, conseguindo, finalmente, a construção BLVp24-pET-20.

Segunda

A expressão e purificação da proteína também foi um desafio. Várias concentrações do agente indutor (IPTG) de expressão gênica foram testadas em diferentes tempos de expressão (1-5h e overnight), para se chegar na maior concentração possível da proteína BLVp24r expressa. Além disso, a purificação também passou por vários passos de padronização, iniciando pelos tampões utilizados para ligação do produto na resina de afinidade ao níquel, bem como nos tampões de lavagem e de eluição da proteína. Além da resina de afinidade ao níquel, também

utilizamos a *Q-Sepharose* para testarmos se, após o produto ser eluído da primeira purificação, conseguiríamos deixar a proteína livre de quaisquer proteínas co-purificadas, entretanto a segunda purificação com a *Q-sepharose* não surtiu o efeito desejado.

Assim, partimos para a expressão em escala maior, utilizando 0.1M de IPTG overnight e a purificação apenas com a coluna com a resina de afinidade ao níquel (*HisTrap*).

Terceira

Além da proteína do capsídeo viral (BLVp24r), tentamos expressar a glicoproteína do envelope viral (BLVgp51r). Conseguimos padroniza-la, utilizando os mesmos passos que foi utilizado para a BLVP24r, entretanto a concentração de proteína obtida foi bem inferior. Isso se deve ao fato de que o plasmídeo que utilizamos para clonar foi o pBAD-TOPO. Esse plasmídeo não possui expressão tão boa quanto o pET-20, pois não possui nenhuma proteína fusionada, diminuindo a solubilidade das proteínas expressas. Entretanto, foi iniciada a padronização do ELISA utilizando a gp51 e observamos que ela teve reatividade no *Western Blot* e no ELISA com soros de bovinos naturalmente infectados.

Quarta

O teste de ELISA não era o único teste sorológico que gostaríamos de ter padronizado. O teste de IDGA foi realizado de várias formas utilizando tanto a proteína BLVp24r e a BLVgp51r. Utilizamos várias metodologias, mudamos tampões em que a proteína estava eluída, o tampão que a agarose é diluída, temperaturas de incubação, quantidade de proteína colocada no teste, soros fortemente positivos no ELISA e no IDGA comercial, soro de referência da OIE para a LEB, mas não obtivemos sucesso. Apenas conseguimos que o soro hiperimune de cada proteína reagisse contra a proteína alvo e, quando testamos de forma cruzada, não houve reação.

Outra padronização que gostaríamos de ter feito é a combinação das duas proteínas (BLVp24r e BLVgp51r) tanto no teste de ELISA como no teste de IDGA. No teste de IDGA descartamos, pois não conseguimos fazer com que o teste funcionasse e no ELISA descartamos, pois não conseguimos caracterizar perfeitamente a gp51, necessitando mais testes para, primeiramente, sua padronização no ELISA e, posteriormente, como iriam se comportar as duas proteínas num mesmo poço e a padronização desse novo ELISA.

Quinta

Há relatos na literatura de que o BLV pode infectar seres humanos. Com isso, testamos 872 amostras humanas no ELISA por nós desenvolvidos. Utilizamos os mesmos parâmetros de análise dos bovinos, ou seja, nosso *cut-off* continuou em 0.270. Com isso, obtemos 4.2% (26) de soros reagentes. Entretanto, é necessário melhorar a padronização, utilizando amostras humanas sabidamente positivas e negativas testadas através de PCR e IDGA. Infelizmente, não dispomos dessas amostras de soro e portanto, teremos que achar outro meio de padronizar o teste visando detectar anticorpos anti-BLV em pessoas.

Perspectivas futuras

Com os resultados obtidos, o próximo passo para o teste de ELISA desenvolvido seria a inoculação experimental de BLV em bovinos, para acompanhar a partir de quantos dias, após contato com o vírus, seria possível diagnosticar o animal como positivo. Também, seria necessário, a comparação interlaboratorial de amostras positivas e negativas testadas, além de ajustá-lo e realizar as validações conforme as normas da ANVISA para poder ser candidato à comercialização no Brasil.

6. REFERÊNCIAS

1. Del Fava C, Pituco E. Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BLV) no Brasil. *Biológico*. 2004;66:1–8.
2. Leuzzi Junior LA, Alfieri, A F, Alfieri AA. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. *Semin Ciências Agrárias*. 2001;22(2):211–21.
3. USDA. Bovine Leukosis Virus (BLV) on U . S . Dairy Operations , [Internet]. APHIS Info Sheet. 2008. Available from: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_BLV.pdf
4. USDA. Bovine Leukosis Virus (BLV) in U.S. beef cattle. 1999.
5. Ott SL, Johnson R, Wells SJ. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. 2003;61:249–62.
6. Birgel Junior EH, Dias WMC, Souza RM, Pogliani FC, Birgel DB, Birgel EH. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em animais da raça Simental, criados no estado de São Paulo. *Ars Vet* [Internet]. 2006;22(2):122–9. Available from: <http://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/90>
7. Moraes MP, Weiblen R, Flores E, Furtado, Oliveira JCD, Rebelatto MC, Zanini M, et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da Leucose Bovina nos Rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. 1996;26(2):257–62.
8. Poletto R, Kreutz LC, Gonzales JC, Barcellos LJG. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. *Ciência Rural*. 2004;34(2):595–8.
9. ICTV. ICTV 2015 Master Species List (MSL30). 2017; Available from: <http://www.ictvonline.org/>
10. Braga FM, Van der Laan CW, Schuch LF, Halfen DC. Infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV). *Ciência Rural*. 1998;28(1):163–72.
11. Flores EF. *Virologia veterinária* [Internet]. 1st ed. Santa Maria: Ed. da UFSM. Santa Maria: Ed. da UFSM; 2007. 888 p. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Virologia+veterin?ria#0>

12. Rice NR, Stephens RM, Burny A, Gilden R V. The Gag and Pol Genes of Bovine Leukemia-Virus - Nucleotide-Sequence and Analysis. *Virology* [Internet]. 1985;142(2):357–77. Available from: [isi:A1985AEL3000014](#)
13. Bex F, Bruck C, Mammerickx M, Portetelle D, Ghysdael J, Leclercq M, et al. Humoral Antibody Response to Bovine Leukemia Virus Infection in Cattle and Sheep. *Am Assoc Cancer Res.* 1979;39:1118–23.
14. Dolz G, Moreno E. Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1999;46(8):551–8.
15. EFSA AHAW Panel. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA J* [Internet]. 2015;13(7):4188–251. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/45/5/1987.short%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23332856%5Cnhttp://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10089%5Cnhttp://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.244.8.914%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24697767%5Cnht>
16. OIE. Chapter 2.4.10—Enzootic Bovine Leukosis. *OIE Terr Man* [Internet]. 2012;721–32. Available from: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/>
17. MAPA. Manual de Legislação: Programas Nacionais de Saúde Animal no Brasil. 1st ed. Brasília - DF; 2009. 440 p.
18. Rangel NM, Machado AV. Contribuição à oncologia comparada em Minas Gerais. *Arq da Esc Super veterinária do Estado Minas Gerais.* 1943;1:84–96.
19. Flores EF. *Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas* Ed 2. 2012. p. 351-352.
20. Zhang W, Cao S, Martin JL, Mueller JD, Mansky LM. Morphology and ultrastructure of retrovirus particles. *AIMS Biophys.* 2015;2(3):343–69.
21. Martins A, Catroxo M. Vírus oncogênicos em animais. *Biológico.* 2009;71(1):21–7.
22. Bushman F, Lewinski M, Ciuffi A, Barr S, Leipzig J, Hannenhalli S, et al. Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. Vol. 3, *Nature reviews. Microbiology.* 2005. p. 848–58.

23. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burtreau C, Nigro A, Vandermeers F, et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* [Internet]. 2007;4(18):1–32. Available from: <http://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4690-4-18>
24. Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y, Ikawa Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1985;82:677–81. Available from: <http://www.pnas.org/content/82/3/677.short>
25. Suzuki T, Ikeda K. The mouse homolog of bovine leukemia virus receptor is closely related to the β subunit of the adapter-related protein complex AP-3, not associated with the cell surface. *J Virol*. 1998;72:593–9.
26. Seiki M, Eddy R, Shows TB, Yoshida M. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. *Nature*. 1984;309:640–2.
27. Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima S-N. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol* [Internet]. 2013;4(November):328. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3820957&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. Van Der Maaten MJ, Miller JM, Boothe AD. Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissue from cattle with lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst*. 1974;52:491.
29. Emanuelson U, Scherling K, Pettersson H. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev Vet Med*. 1992;12:121–31.
30. Tirziu E, Cumpanasoiu C, Nichita I, Reman GD, Sonea C. Performance assessment of three tests applied in enzootic bovine leukosis diagnosis. *Romain Biotechnol Lett*. 2014;19(5):9666–77.
31. Ferrer JF., Marshak RR., Abt DA., Kenyon SJ. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: A review. *J Am Vet Med Assoc*. 1979;175(7):105–800.

32. Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, S??nchez-Alcaraz MT, Boxus M, et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV. *Viruses*. 2011;3:1210–48.
33. Johnson R, Gibson CD, Kaneene JB. Bovine Leukemia virus: a herd- based control strategy. *Prev Vet Med*. 1985;3:339–49.
34. Hopkins SG, DiGiacomo RF. Natural Transmission of Bovine Leukemia Virus in Dairy and Beef Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 1997;13(1):107–28. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072015303674>
35. Johnson R, Kaneene JB. Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Vet Bull*. 1992;62(4):287–311.
36. Knapen K, Kerkhofs P, Mammerickx M. Eradication de la leucose bovine enzootique en Belgique: bilan du dépistage de masse réalisé sur l'ensemble du cheptel national en 1989, 1990 et 1991. *Ann Med Vet*. 1993;137:197–201.
37. Nuotio L, Rusanen H, Sihvonen L, Neuvonen E. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev Vet Med*. 2003;59:43–9.
38. Mammerickx M, Cormann A, Burny A, Dekegel D, Portetelle D, Mammerickx M, et al. Eradication Of Enzootic Bovine Leukosis Based On The Detection Of The Disease By The Gp Immunodiffusion Test To cite this version : *Ann Rech Vet*. 1978;9(4):885–94.
39. Murphy FA., Gibbs EPJ., Horzineck MC., Studdert MJ. *Veterinary Virology*. 3rd ed. California: Academic Press; 1999. 4495 p.
40. Dube S, Dolcini G, Abbott L, Mehta S, Dube D, Gutierrez S, et al. The Complete Genomic Sequence of a BLV Strain from a Holstein Cow from Argentina. *Virology* [Internet]. 2000;277(2):379–86. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682200906226>
41. Leite RC, Reis JKP Dos, Oliveira AP De, Nascimento PMP Do, Oliveira FG De, Naves JHFDF, et al. Retrovíroses Dos Animais Domésticos. *Veterinária e Zootec*. 2013;20:73–92.

42. Troiano LDC, Thomaz-Soccol V, Agottani JVB, Brodzinski J, Penha TR, Ozaki SC. Production, Characterization, and Use of Monoclonal Antibodies Against gp51 Protein to Diagnose Bovine Leukemia Virus Infection. *BioResearch* [Internet]. 2013;2(1):55–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3569942&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
43. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003;19(12):1105–13.
44. Barez PY, de Brogniez A, Carpentier A, Gazon H, Gillet N, Gutiérrez G, et al. Recent advances in BLV research. *Viruses*. 2015;7(11).
45. Gutiérrez G, Alvarez I, Fondevila N, Politzki R, Lomónaco M, Rodríguez S, et al. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet Microbiol*. 2009;137(3–4):224–34.
46. Bicka L, Kuźmak J, Kozaczyńska B, Plucienniczak A, Skorupska A. Expression of bovine leukemia virus protein p24 in *Escherichia coli* and its use in the immunoblotting assay. *Acta Biochim Pol*. 2001;48(1):227–32.
47. Trottier YL, Wright PF, Lariviere S. Optimization and standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay protocol for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *J Clin Microbiol*. 1992;30(1):46–53.
48. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Yeon Choi K, Sun D, Nuovo G. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(5):772–82.
49. Gonzalez ET, Oliva GA, Norimine J, Cid de la Paz V, Echeverría MG. Evaluation of western blotting for the diagnosis of enzootic bovine leukemia. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec*. 1999;51(4):299–305.
50. Momtaz H, Hemmatzadeh F, Keyvanfar H. Expression of bovine leukemia virus p24 protein in bacterial cell [Internet]. Vol. 11, *Pak J Biol Sci*. 2008. p. 2433–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19137855
51. Portetelle D, Bruck C, Burny A, Dekegel D, Mammerickx M, Urbain J. Detection of complement-dependent lytic antibodies in sera from bovine leukemia virus-infected animals. *Ann Rech Vet*. 1978;9(4):667–74.

52. Ministério da Agricultura P e AB. Instrução Normativa N° 50, de 24 de setembro de 2013. Dou N° 186 [Internet]. 2013;47. Available from: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/0arquivos/a/IN_50_Lista_DNO_DOU_2013_09_25.pdf