

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO CONTESTADO - CONCÓRDIA

ISOLAMENTO DO VÍRUS INFLUENZA A EM SUÍNOS

Simone Silveira (aluna) – sa-se-si@hotmail.com

Janice Reis Ciacci-Zanella (orientadora) –

janice@cnpsa.embrapa.br

ISOLAMENTO DO VÍRUS INFLUENZA A EM SUÍNOS

Simone Silveira¹, Marisete Fracasso Schiochet², Neide Simon², Danielle Gava²,
Camila Sá Rocha², Rejane Shaefer², Janice Reis Ciacci-Zanella³

RESUMO

A Influenza Suína (IS) é uma doença respiratória infecciosa aguda causada pelo vírus da IS (VIS), caracterizada por início súbito e disseminação rápida no rebanho. A evolução e regressão dos sinais e lesões também são normalmente muito rápidas, podendo variar dependendo da cepa do vírus envolvido, da imunidade dos animais e da ocorrência de infecções intercorrentes. Quando acomete pela primeira vez um rebanho, cursa com alta morbidade (até 100%), mas baixa mortalidade (cerca de 2%). Em surtos típicos os animais apresentam febre, anemia, prostração, conjutivite, dispnéia, tosse, descarga nasal seromucosa e lesões pulmonares decorrentes de bronquiolite necrosante e/ou pneumonia intersticial. Este trabalho teve como objetivo o isolamento de Influenza A em suínos, a partir de pulmões. Cinquenta pulmões foram coletados nos anos 2010-2011 de suínos que apresentavam sinais clínicos compatíveis com a infecção por Influenza A e/ou apresentavam lesões de pneumonia viral. O isolamento viral foi realizado em ovos embrionados SPF (Specific Pathogen Free) de nove dias, por inoculação via cório-alantóide. Após incubação dos ovos por 96 horas a 37°C, os líquidos cório-alantóides (LCA) foram coletados e testados pelo teste de hemaglutinação (HA), para a verificação da presença viral. Para confirmação do resultado, uma segunda passagem em ovos foi realizada. A detecção do genoma viral foi realizada por RT – PCR (reação em cadeia da polimerase e transcrição reversa) com *primers* que codificam a proteína da matriz (M). Trinta e nove (78%) suspensões de pulmões foram positivas por RT – PCR, destes 39, 21 pulmões (42%) foram positivos no isolamento em ovos embrionados. Sendo 10 amostras confirmados por RT-PCR e todas por HA, 14 amostras com HA positivo na primeira passagem e 7 amostras com HA positivo apenas na segunda passagem. Os títulos virais pelo teste de HA variaram de 1:2 até \geq 1:2048. Os resultados deste trabalho indicam que o pulmão se constituiu em material de onde o VIS foi facilmente isolado.

Palavras-chave: Influenza suína, isolamento viral, PCR.

1 INTRODUÇÃO

A Influenza Suína (IS) é uma doença respiratória aguda e infecciosa, causada pelo vírus da influenza suína tipo A (VIS), um patógeno globalmente importante de interesse econômico, veterinário e de saúde pública. (FLORES, 2007) (ZANELLA, 2010)

¹ Aluna da Fundação Universidade do Contestado, Concórdia. E-mail: sa-se-si@hotmail.com
² Embrapa Suínos e Aves
³ Orientadora. E-mail: janice@cnpa.embrapa.br

Além de infectar os suínos, o vírus Influenza afeta uma grande variedade de espécies de mamíferos e aves, incluindo o ser humano. Geralmente estes vírus são espécie-específicos. Mas existe a possibilidade de transmissão e recombinação do vírus entre espécies diferentes.

Os suínos são considerados hospedeiros importantes, porque são suscetíveis a infecção tanto pelo vírus Influenza A de origem aviária como de origem humana. Consequentemente aumentando a possibilidade de ocorrência de transmissão dos vírus Influenza de aves a humanos. (SCHAEFER, 2005)

A doença é considerada endêmica em suínos e estes são portadores principalmente dos subtipos A/H1N1, A/H1N2 e A/H3N2 que circulam atualmente em suínos no mundo inteiro. Acredita-se que cepas diferentes de SIV podem estar circulando em rebanhos concomitantemente. (GRAMER, 2005) (REETH *et al*, 2008)

Caracterizada por início súbito e disseminação rápida, a IS infecta os suínos com maior frequência nos meses mais frios, sendo que após os surtos alguns animais tornam-se carreadores do vírus, e novos surtos podem ocorrer nos anos seguintes. (ALBERTON, 2010)

A principal forma de transmissão do vírus é direta, de suíno para suíno, através de gotículas ou aerossóis que atingem a via nasofaríngea, mas o VIS pode ser transmitido do contato com secreções contaminadas. (FLORES, 2007)

A morbidade pode chegar a 100%, mas a mortalidade é menor que 2%. O período de incubação pode variar de 2 a 7 dias, com disseminação e recuperação rápida, a maioria dos animais do rebanho apresenta os sinais clínicos ao mesmo tempo. Sendo que os principais sinais são: febre, anorexia, dispneia, espirros, tosse, conjuntivite, descarga nasal sero-mucosa e considerável perda de peso. (SOBESTIANSKY, BARCELLOS, 2007).

Os sinais e lesões podem variar dependendo da cepa do vírus envolvido, da imunidade dos animais e da ocorrência de infecções intercorrentes. As infecções bacterianas secundárias são muito comuns, agravando o problema e potencializando a lesão. (ALBERTON, 2010)

A infecção geralmente é limitada ao trato respiratório e a replicação viral já foi detectada na mucosa nasal, tonsilas, traquéia e pulmões. As principais lesões encontradas nos pulmões são áreas de hepatização de cor vermelho-escuro em vários lóbulos, com presença de exsudato mucoso nos brônquios e ausência de

colabamento pulmonar. Observa-se microscopicamente pneumonia intersticial com focos de necrose coagulativa e bronquite com degeneração e necrose epitelial. (SOBESTIANSKY, BARCELLOS, 2007) (BRENTANO, 2002)

Com o surgimento de vírus de influenza com genes de VIS em populações humanas na América do Norte que rapidamente alcançaram o grau de pandemia pela facilidade e rapidez de contágio, questionou-se a importância destes vírus de influenza de origem suína em rebanhos suínos no Brasil. Este trabalho teve como objetivo o estudo da etiologia de infecções respiratórias de suínos e o isolamento de Influenza A em pulmões de suínos.

2 METODOLOGIA (material e métodos)

Cinquenta pulmões foram coletados nos anos 2010-2011 de suínos que apresentavam sinais clínicos compatíveis com a infecção por VIS e/ou apresentavam lesões de pneumonia viral.

Os pulmões foram macerados em meio de cultivo MEM contendo antibióticos e antifúngicos. Preparadas as suspensões, o RNA viral foi extraído utilizando o RNeasy Mini Kit Qiagen, de acordo com recomendações do fabricante. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o primer randômico e a enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen).

A partir do RNA extraído das suspensões de pulmão, foi realizado a técnica de RT – PCR, que consiste em uma reação em cadeia da polimerase juntamente com transcrição reversa.

A sequência do gene que codifica a proteína da matriz (M) foi amplificada utilizando os primers aneladores com a seguinte sequência: M52C (5' CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG 3') e M253R (5' AGG GCA TTT TGG ACA AAGT CGT CTA 3'), os quais amplificam um fragmento com 244 pares de bases. (FOUCHIER *et al*, 2000)

Para a realização do isolamento viral, cada suspensão de pulmão foi inoculada em 5 ovos embrionados de galinhas Specific Pathogen Free (SPF) de 9 dias de idade. A inoculação ocorreu via cório-alantóide, e os ovos foram mantidos em estufa a 37° C durante 4 dias.

Duas passagens em ovos foram realizadas, sendo que após cada passagem, os embriões foram observados e o líquido cório-alantóide (LCA) foi testado pelo teste de hemaglutinação (HA). (SCHAEFER, 2008)

Os LCAs foram submetidos à extração de RNA e após à RT – PCR para detecção viral dos isolados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram realizadas provas virológicas para análise da etiologia viral de suínos que apresentavam sinais clínicos compatíveis com a infecção por VIS e/ou apresentavam lesões de pneumonia viral. Cinquenta pulmões de suínos foram coletados nos anos 2010-2011 e encaminhados para pesquisa de VIS. Na tabela 1 estão demonstrados os resultados dos ensaios. Em 39 pulmões (78%), o RNA do VIS foi detectado por RT-PCR, mas em apenas 21 pulmões (42%) foi isolado o vírus. Todas as amostras foram confirmadas pelo teste de HA e até o momento, apenas 10 LCAs foram confirmados por RT – PCR.

Sendo que 14 amostras apresentaram HA positivo já na primeira passagem em ovos, e 7 amostras apenas na segunda passagem. Os títulos virais pelo teste de HA variaram de 1:2 até $\geq 1:2048$.

Tabela 1 – Resultados PCR e isolamento viral

	Positivo/total/%	Negativo/total/%
PCR suspensão pulmonar	39/50 (78%)	11/50 (21%)
Isolamento viral – teste de hemaglutinação (HA)	21/50 (42%)	29/50 (58%)
HA 1ª passagem	14/21 (66,67%)	7/21 (33,33%)
HA 2ª passagem	7/21 (33,33%)	14/21 (66,67%)

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que o pulmão se constituiu em material de onde o VIS foi facilmente isolado. Mas são necessários mais estudos, para obtenção de um maior conhecimento sobre o desenvolvimento do VIS em suínos no Brasil, para que medidas de monitoramento e vacinação sejam tomadas.

REFERÊNCIAS

ALBERTON, Geraldo C; ZOTTI, Everson (org). **Tópicos em sanidade e manejo de suínos**. Campinas, SP: Sanphar, 2010.

BRENTANO, Liana *et al.* **Levantamento soroepidemiológico para Coronavírus respiratório e da Gastroenterite transmissível e dos vírus de Influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil**. Comunicado técnico 306, Concórdia, SC: Embrapa Suínos e Aves, 2002.

FOUCHIER, Ron A. M *et al.* Detection of Influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, nº 11, p. 4096-4101, 2000.

GRAMER, Marie R. Defining swine influenza virus. **Journal of Swine Health and Production**, v. 13, n. 3, p. 157-159, 2005.

REETH, Kristien V *et al.* Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viroses in pigs in seven European countries in 2002-2003. **Journal Compilation Blackwell Publishing Ltd, Influenza and Other Respiratory Viruses**, n. 2, p. 99-105, 2008.

SCHAEFER, Rejane. **Influenza suína: o papel epidemiológico dos suínos nas infecções causadas pelos vírus Influenza**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005.

SCHAEFER, Rejane; TREVISOL, Iara M; PALUDO, Ediane. **Avaliação da presença do vírus influenza em suínos no sul do Brasil**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2008.

SOBESTIANSKY, Jury; BARCELLOS, David. **Doença dos suínos**. Goiânia,GO: Cânone, 2007.

ZANELLA, Janice R. C. *et al.* Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, n.22, p. 3-9, 2010.