

13 Jinc

Jornada de
Iniciação Científica

Anais da 13^a Jornada de Iniciação Científica (JINC)



Universidade
do Contestado



Fundação Universidade do Contestado

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Suínos e Aves
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da 13^a Jornada de Iniciação Científica (JINC)

*Fundação Universidade do Contestado
Embrapa Suínos e Aves
Concórdia, SC
2019*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves

BR 153, Km 110
Caixa Postal 321
CEP 89.715-899 - Concórdia, SC
Fone: (49) 3441 0400
Fax: (49) 3441 0497
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Fundação Universidade do Contestado - UnC

Rua Victor Sopesla, 3.000
Bairro Salete - Caixa Postal 211
CEP 89.700-970 - Concórdia, SC
Fone: (49) 3441-1000
Fax: (49) 3441-1020
reitoria@unc.br
www.unc.br

Unidade responsável pela edição

Embrapa Suínos e Aves e Fundação
Universidade do Contestado - UnC

Instituição responsável pelo conteúdo

Fundação Universidade do Contestado - UnC

Coordenação editorial: *Tânia M. B. Celant*
Editoração eletrônica: *Vivian Fracasso*
Normalização bibliográfica: *Claúdia A. Arrieche*
Criação da logomarca: *Marina Schmidt*
Arte da capa: *Vivian Fracasso*
Foto da capa: *Jairo Backes*

Nota

Os artigos publicados são de inteira responsabilidade de seus autores. As opiniões neles contidas não representam, necessariamente, a visão da Embrapa Suínos e Aves. A revisão ortográfica e gramatical dos artigos é de inteira responsabilidade dos respectivos autores.

1ª edição

Publicação digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Suínos e Aves

Jornada de Iniciação Científica (13. : 2019 : Concórdia, SC).

Anais da 13ª Jornada de Iniciação Científica (JINC), Concórdia, 23 de outubro de 2019. – Concórdia, SC : Fundação Universidade do Contestado : Embrapa Suínos e Aves, 2019.

127 p.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

ISBN 000-00-00000-00-0

1. Produção Animal. 2. Suíno. 3. Ave. I. Embrapa Suínos e Aves.
II. Fundação Universidade do Contestado (UnC).

CDD 636

© Embrapa 2019

PADRONIZAÇÃO DE UMA RT-qPCR MULTIPLEX ONE-STEP PARA SUBTIPAGEM DO VÍRUS INFLUENZA A EM SUÍNOS

Vanessa Haach¹, Danielle Gava², Maurício Egídio Cantão², Ana Cláudia Franco¹ e Rejane Schaefer²

¹Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, vanessahaach@hotmail.com

²Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina.

Palavras-chave: vírus influenza A, suínos, subtipagem, RT-qPCR multiplex.

INTRODUÇÃO

A influenza é uma doença respiratória viral aguda que afeta várias espécies de aves e mamíferos, incluindo o homem (4). A doença é causada pelo vírus influenza A (IAV), e possui um impacto econômico significativo nos rebanhos suínos afetados, além de representar uma ameaça à população humana devido ao seu potencial pandêmico e zoonótico (6). Muito embora os subtipos virais prevalentes em suínos na maioria dos países sejam o H1N1, H1N2 e H3N2, estes são geneticamente e antigenicamente distintos, de acordo com a região geográfica de origem (5). Estudos recentes realizados com isolados brasileiros do IAV confirmaram que as linhagens virais detectadas em suínos no Brasil são geneticamente distintas, não sendo encontrados vírus semelhantes em suínos de outros países (2). Desta forma, um teste de diagnóstico rápido, que seja capaz de detectar e diferenciar os subtipos do IAV em suínos é importante para o monitoramento e controle da infecção nesta espécie. Além disso, no Brasil não existem testes rápidos disponíveis comercialmente, como a RT-qPCR, para a determinação do subtipo viral em amostras clínicas de suínos. Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver e validar dois ensaios de RT-qPCR multiplex, (hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA)) para a detecção e diferenciação dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 do IAV circulantes em suínos no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas sequências nucleotídicas dos genes HA e NA, obtidas a partir de IAVs isolados de suínos no Brasil. Os iniciadores e sondas para cada segmento gênico foram desenhados utilizando-se o software Primer Express (Applied Biosystems) e estão listados na Tabela 1. O ensaio de RT-qPCR foi realizado em duas reações distintas: uma visando a amplificação do gene HA (H1pdm, H1hu e H3) e a outra visando a amplificação do gene NA (N1pdm, N1hu e N2). Para a quantificação absoluta e padronização dos ensaios foram produzidos RNAs padrão para cada segmento gênico. Ademais, um controle interno (SPUD) (3) foi incluído nas reações. O limite de detecção (LOD), foi determinado a partir de diluições em base dez de cada RNA padrão, contendo $5,09 \times 10^8$ a $5,09 \times 10^0$ cópias de RNA viral por microlitro. Para a avaliação da especificidade analítica de ambos os ensaios, foram testadas 85 amostras de IAV isoladas de suínos entre 2009 e 2016, previamente caracterizadas por sequenciamento genômico. Além disso, para verificar a especificidade diagnóstica dos ensaios, 50 amostras clínicas colhidas de suínos, e consideradas negativas para o IAV por RT-PCR (1) e positivas para outros patógenos de suínos, também foram testadas. Setenta e três amostras clínicas (34 suabes nasais e 39 amostras de tecido pulmonar) colhidas de suínos durante 2017 e 2018, e previamente diagnosticadas como positivas para IAV por RT-PCR (1), foram avaliadas. O RNA viral foi extraído utilizando-se o MagMAX Viral RNA Isolation Kit (Ambion), e as amostras foram avaliadas pelos ensaios de RT-qPCR desenvolvidos, utilizando o AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit (Ambion).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação para amplificação do gene HA foi padronizada com os seguintes parâmetros: 0,75X da solução tampão da RT-PCR, 1,67µL do detection enhancer, 1X do RT-PCR Enzyme Mix, 200nM do par de iniciadores do H1pdm, H3 e SPUD, 160nM do par de iniciadores do H1hu, 48nM da sonda do H1pdm e H1hu, 60nM da sonda do H3 e SPUD, 1µL do DNA do SPUD, e 5µL do RNA viral da amostra. A reação do gene NA foi padronizada com 0,75X da solução tampão da RT-PCR, 1,67µL do detection enhancer, 1X do RT-PCR Enzyme Mix, 400nM do par de iniciadores do N1pdm, 200nM do par de iniciadores do N1hu e N2, 120nM do par de iniciadores do SPUD, 132nM da sonda do N1pdm, 60nM da sonda do N1hu, 48nM da sonda do N2, 36nM da sonda do SPUD, 1µL do DNA do SPUD, e 5µL do RNA viral da amostra. A ciclagem para ambas as reações foi estabelecida com a transcrição reversa a 45°C por 10 minutos, desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 30 segundos. A especificidade analítica da técnica foi de 100%, ou seja, os subtipos e a linhagem viral foram corretamente identificados pelo teste, de acordo com os resultados previamente obtidos pelo sequenciamento genômico (Tabela 2). O ensaio apresentou 100% de especificidade diagnóstica. O LOD para o segmento HA foi de $5,09 \times 10^2$ cópias de RNA viral/µL para o H1pdm, $5,09 \times 10^3$ para o H1hu e $5,09 \times 10^2$ para o segmento H3; e o LOD para o segmento NA foi de $5,09 \times 10^2$ cópias de RNA viral/µL para o N1pdm, $5,09 \times 10^1$ para o N1hu e $5,09 \times 10^2$ para o N2. Setenta e quatro por cento (74%) das amostras clínicas analisadas por RT-qPCR multiplex tiveram o subtipo e a linhagem viral identificados (Tabela 2). O subtipo viral mais detectado foi o H3N2 (46,3%), seguido pelo H1N1pdm (33,3%) e H1N2 (11,1%). A

presença de coinfeção foi detectada em 3,7% das amostras e rearranjo gênico em 1,9% das amostras analisadas. Embora os limites de detecção dos ensaios sejam altos, o subtipo viral não pôde ser determinado em 26,0% das amostras clínicas. No entanto, para 3,7% das amostras, apenas o segmento NA do N1pdm foi determinado pelo ensaio NA. Isso pode ser explicado pelo LOD do segmento NA ser maior comparado ao LOD do segmento HA. A ausência de detecção do subtipo viral em 19 das 73 amostras clínicas é provavelmente devido à presença de uma baixa concentração viral nas amostras clínicas, abaixo do limite de detecção do teste.

CONCLUSÕES

O ensaio de RT-qPCR multiplex desenvolvido e validado nesse estudo mostrou-se um método rápido, muito sensível e específico para a identificação dos subtipos e linhagens genéticas do IAV em amostras clínicas de suínos e isolados virais. A técnica descrita é economicamente viável quando comparada a outros métodos, como o sequenciamento genômico, e, uma vez implementada em laboratórios de diagnóstico, poderá fornecer informações sobre a prevalência dos subtipos virais em suínos, contribuindo para o monitoramento e vigilância da influenza em rebanhos suínos.

REFERÊNCIAS

1. FOUCHIER, R. 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, n. 11, p. 4096–4101, 2000.
2. NELSON, M. I. et al. Influenza A viruses of human origin in swine, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1339–1347, 2015.
3. NOLAN, T. et al. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. **Analytical Biochemistry**, v. 351, n. 2, p. 308–310, 2006.
4. VAN REETH, K.; BROWN, I. H.; OLSEN, C. W. Influenza virus. In: ZIMMERMAN, J. J. et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10th. ed. Ames: Iowa State University Press, 2012. p. 557–571.
5. VINCENT, A. L. et al. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, n. 1, p. 4–17, 2014.
6. ZHANG, J.; GAUGER, P.; HARMON, K. Swine Influenza A Virus. In: LIU, D. (Ed.). **Molecular Detection of Animal Viral Pathogens**. Boca Raton: CRC Press, 2016. p. 399–406.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores e sondas para RT-qPCR multiplex one-step (segmentos gênicos HA e NA).

Iniciadores e sondas	Sequências dos iniciadores e sondas (5' → 3')	Posição	Fragmento (pb)
H1pdm_F	CACAAAWTTGAGACTGGYMACA	1007 – 1028	
H1pdm_R	CTGTCCAYCCYCTTCAAT	1107 – 1089	101
H1pdm_Sonda	FAM-CCTATTTGGRGCCATTGCYGGTT-QSY	1064 – 1086	
H1hu_F	GGTTTGTGGWGCCATTGC	1062 – 1081	
H1hu_R	CAGCATAVCCAGAYCCTTGC	1167 – 1148	106
H1hu_Sonda	VIC-TTCATTGAAGRRGGDTGGACTGGAAT-QSY	1086 – 1111	
H3_F	GTTGGTAYGGTTTCAGGCATC	1115 – 1135	
H3_R	TCCAYTGATTTGGTCRATTG	1207 – 1187	93
H3_Sonda	NED-CAAGCWGCAGAYCTTAAAGYACTCAAGCA-QSY	1156 – 1185	
N1pdm_F	GAGGARTGYTCYTGTATCCTGA	849 – 871	
N1pdm_R	AAAGACACCCAHGGYCGRTT	937 – 918	89
N1pdm_Sonda	FAM-ATGTGTRTGCAGGGATAACTGGCATGG-QSY	887 – 913	
N1hu_F	CCGATGGCCCGAATAATG	748 – 765	
N1hu_R	TGGAAATTGGGTGCATTTAACTC	844 – 822	97
N1hu_Sonda	NED-CCGCCTCGTACAAGATCTTCAAGATCGA-QSY	769 – 796	
N2_F	GGGTRTYCCRTTTCAYTTGGGAA	508 – 530	
N2_R	CTGGCRGTTGCATTTTYATCATG	630 – 608	123
N2_Sonda	VIC-CAAGTGTGYATDGCATGGTCCAGYTCAA-QSY	536 – 563	

Tabela 2. Amostras testadas pela RT-qPCR multiplex one-step na especificidade analítica de IAVs isolados e sequenciados, bem como na avaliação de amostras clínicas.

Subtipo/linhagem	IAVs isolados e sequenciados	Amostras clínicas
H1N1pdm	45	18
H1N2hu	17	6
H3N2hu	11	25
H1pdmN2 ^r	3	1
H1N1hu ^r	3	0
H1N1pdm + H3N2hu	4	0
H1N2hu + H3N2hu	1	0
H3N2hu + H1pdmN2 ^r	1	0
H1N1pdm + H1N2hu	0	1
H1N1pdm + H1pdmN2 ^r	0	1
HxN1pdm	0	2
Não subtipado	0	19
Total	85	73