

VIABILIDADE DO VÍRUS INFLUENZA H1N1 PANDÊMICO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E MEIOS DE MANUTENÇÃO

Vanessa Haach¹, Danielle Gava², Arlei Coldebella² e Rejane Schaefer²

¹Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC, Campus de Joaçaba, Joaçaba, SC. Bolsista PIBIC/CNPq na Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

vanessahaach@hotmail.com

²Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

Palavras-chave: Influenza, isolamento viral, RT-qPCR, suínos.

INTRODUÇÃO

A influenza é uma doença respiratória viral aguda, altamente contagiosa, que afeta suínos e outras espécies, incluindo humanos (6). O vírus influenza A (FLUAV) replica no epitélio respiratório e é excretado nas secreções nasais entre 24 horas e oito dias pós-infecção (1). Desde 2009, surtos periódicos de influenza em suínos têm sido observados em rebanhos brasileiros, sendo o vírus pandêmico H1N1 (H1N1pdm) frequentemente detectado (4). O diagnóstico virológico é realizado por RT-qPCR, pela amplificação do gene da matriz do H1N1pdm (1, 7). A amostra de escolha para o diagnóstico é a secreção nasal colhida de suínos apresentando sinais clínicos da infecção (5, 6). Contudo, problemas na colheita e armazenamento das amostras biológicas, bem como no tempo decorrido entre a colheita e a análise das amostras, em função da distância entre as granjas produtoras de suínos e os laboratórios de diagnóstico do FLUAV no Brasil, pode comprometer o diagnóstico da doença, levando a detecção de amostras falso-negativas. Sendo assim, faz-se necessário uma correta preservação e transporte das amostras biológicas ao laboratório a fim de manter a integridade do RNA viral, bem como a viabilidade viral para posterior caracterização antigênica e/ou produção de candidatos vacinais. Neste estudo foi analisada a viabilidade viral de uma amostra do FLUAV H1N1pdm, mantida em diferentes meios de manutenção, e submetida a diferentes temperaturas por um período de 120 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra do vírus influenza H1N1pdm (protocolo 107/10) com título de inibição da hemaglutinação de 1:128 foi utilizada no teste de avaliação da viabilidade viral. Suabes nasais sintéticos foram embebidos em 100uL da solução estoque do vírus por cinco minutos e imediatamente submetidos às diferentes condições testadas. Foram utilizados como meios de manutenção o meio UTM (*Universal Transportation Media*), disponível comercialmente (Copan), o meio VTM (*Viral Transportation Media*) produzido no laboratório de virologia da Embrapa Suínos e Aves, tendo como base o MEM, e algumas amostras de suabe foram mantidas sem meio de manutenção (a seco). As amostras virais, armazenadas em UTM, VTM ou a seco foram incubadas a 4°C, 23°C e 37°C por um período de cinco dias (120 horas). Alíquotas das amostras foram colhidas a cada 12 horas e armazenadas a -80°C para posterior análise. As amostras de suabe mantidas a seco foram colocadas em frasco contendo 900uL de VTM, no momento da colheita, mantendo a mesma diluição viral para os demais meios (1:10). Para testar a viabilidade viral foi realizada uma passagem das amostras em ovos embrionados de galinhas SPF (*Specific Pathogen Free*). Após um período de incubação de quatro dias a 37°C, o líquido cório-alantóide dos ovos foi colhido e o RNA viral extraído utilizando *beads* magnéticas (MagMAX™, Ambion). O ciclo de quantificação (Cq), inversamente associado à carga viral, foi determinado por RT-qPCR para cada condição testada (7), ou seja, quanto menor o Cq maior a carga viral presente na amostra. A análise da variância foi realizada para o modelo que considera os efeitos de meio de manutenção, temperatura e tempo e as interações duplas entre eles. O desdobramento dos efeitos significativos ($p < 0,05$) foi realizado por meio do teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras mantidas em meio UTM, VTM ou a seco, e submetidas a diferentes temperaturas foram positivas para o FLUAV por RT-qPCR. Contudo, após a inoculação em ovos SPF foi observada uma redução da carga viral das amostras, associada ao aumento da temperatura e quando o período de armazenamento ultrapassou às 84 horas. Em relação aos meios de manutenção utilizados, houve diferença estatística significativa na carga viral observada quando o FLUAV foi mantido em meio UTM frente aos demais (VTM e a seco). As amostras que permaneceram a seco apresentaram carga viral inferior em relação às amostras que foram mantidas em meio UTM e VTM (Tabela 1). Isto foi observado principalmente quando as amostras foram mantidas a 23°C e a 37°C (Tabela 1). Druce et al. (2012), avaliaram a capacidade de detecção do FLUAV por RT-qPCR em intervalos de 24 horas, e resultados similares foram observados em amostras de suabes nasais mantidos a seco (2). Contudo, o trabalho citado avaliou somente a integridade do RNA viral e não a infectividade das amostras. Os vírus influenza apresentam uma baixa viabilidade quando expostos ao ambiente, pois são facilmente inativados em condições de alta temperatura (6). A viabilidade viral diminui com o passar do tempo de armazenamento, e esta taxa de decréscimo é frequentemente acelerada em altas temperaturas (2, 3). O meio de manutenção ideal para amostras de vírus deve manter a viabilidade viral com perda mínima de título do vírus, bem como deve conter componentes para evitar a contaminação microbiana (3). Desta forma, para aumentar as chances de isolamento viral, a colheita das amostras biológicas deve ser realizada durante o pico da excreção viral (nos primeiros 5 a 7 dias pós-infecção), as amostras devem ser mantidas em

baixas temperaturas e o tempo decorrido entre a colheita e a análise laboratorial deve ser o menor possível, a fim de evitar a degradação do material genético (3, 5).

CONCLUSÕES

A integridade do RNA viral das amostras analisadas, avaliada por RT-qPCR, foi mantida para todas as condições testadas (meio de manutenção x temperatura x tempo). Entretanto, a viabilidade viral foi maior para as amostras mantidas em meio de manutenção de vírus, em temperatura máxima de 23°C, e tempo de armazenamento não superior a 84 horas. Valores acima destes levam a uma diminuição significativa da carga viral. Baseado nos resultados encontrados é recomendado que as amostras biológicas encaminhadas para diagnóstico de FLUAV sejam armazenadas em meio de manutenção de vírus, em temperaturas não superiores a temperatura ambiente (22-23°C) e que o período de transporte não seja maior do que três dias.

REFERÊNCIAS

1. DETMER, S. et al. Diagnostics and surveillance for swine influenza. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v.370, p.85-112, 2012.
2. DRUCE, J. et al. Evaluation of swabs, transport media, and specimen transport conditions for optimal detection of virus by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v.50, n.3, p.1064-1065, 2012.
3. JONHSON, F.B. Transport of viral specimens. **Clinical Microbiology Reviews**. v.3, n.2, p.120-131, 1990.
4. NELSON, M.I. et al. Influenza A viruses of human origin swine, Brazil. **Emerging and Infectious Diseases**. v.21, n.8, p.1339-1347, 2015.
5. SCHAEFER, R. et al. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.1, p.61-73, 2013.
6. VAN REETH, K. et al. 2012. Influenza Virus. In: ZIMMERMAN, J.J., KARRIKER, L.A., RAMIREZ, A., SCHWARTZ, K.J. & STEVENSON, G.W. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press, 2012, p.557-571.
7. ZHANG, J. & HARMON, K.M. RNA extraction from swine samples and detection of influenza A virus in swine by real-time RT-PCR. **Methods in Molecular Biology**. v.1161, p.277-293, 2014.

Tabela 1. Avaliação dos ciclos de quantificação do FLUAV (média das 120 horas) submetido às diferentes condições de temperatura e meio de manutenção.

	Temperatura (°C)			Média
	4	23	37	
Sem meio	16.21±0.73 ^a	18.58±1.89 ^a	26.44±1.28 ^b	20.41±1.12 ^A
Meio UTM	15.80±0.30 ^a	15.99±0.36 ^a	15.60±0.18 ^a	15.80±0.16 ^B
Meio VTM	19.11±0.93 ^a	18.06±0.58 ^a	19.85±1.50 ^a	19.01±0.61 ^A
Média	17.04±0.48 ^A	17.54±0.68 ^A	20.63±1.04 ^B	18.40±0.47

Médias seguidas por letras minúsculas distintas no desdobramento da interação diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nos efeitos principais diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).