13Jinc

Jornada de Iniciação Científica

Anais da 13ª Jornada de Iniciação Científica (JINC)

UnC Universidade do Contestado

Embrapa

Fundação Universidade do Contestado

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

Anais da 13ª 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 Sopelsa, 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 Schmidtt*
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

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS SUABES GENOTUBE® NA PRESERVAÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA DETECTADO EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE SUÍNOS

Fernanda Barbieri[1], Danielle Gava[2] e Rejane Schaefer[2]
[1]Graduanda em Medicina Veterinária pelo Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, Concórdia – SC, Brasil, bolsista PIBIC/CNPq na Embrapa Suínos e Aves, Concórdia SC, fernandabarbieri01@hotmail.com
[2]Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

Palavras-chave: influenza, suabe, diagnóstico, viabilidade viral.

INTRODUÇÃO

A influenza é uma doença respiratória aguda que acomete diferentes espécies, dentre elas, a espécie suína. A infecção causada pelo vírus Influenza A (IAV) tem um impacto negativo na produção de suínos devido ao aumento dos custos de produção (1). Ademais, a influenza tem implicações consideráveis à saúde pública, dada a possibilidade de emergência de vírus pandêmicos, sendo importante o monitoramento de suínos por meio de testes de diagnóstico rápido (2). Para o diagnóstico, as condições de manutenção das amostras (as quais envolvem as variáveis: acondicionamento, tempo e temperatura), desde a colheita da amostra até o envio do material ao laboratório, podem interferir negativamente na detecção viral (3). Dentre os métodos inovadores para a colheita e manutenção de amostras clínicas, encontra-se disponível o suabe GenoTube® (Thermo Fischer Scientific), o qual permite detecção de material genético viral por RT-qPCR de forma assegurada, com colheita facilitada de amostras biológicas, secagem rápida e, transporte das mesmas sem refrigeração, fatos estes, que o torna simples e favorável na sistemática custo x benefício (4), no entanto sem análises específicas frente a viabilidade viral, importante para outras análises. Este estudo tem como objetivo, determinar a viabilidade do vírus Influenza A, após acondicionamento da amostra clínica em suabe Genotube®, por meio dos métodos de isolamento viral em ovos livres de patógenos específicos (SPF) e por RT-qPCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Para os ensaios de viabilidade viral, utilizou-se uma amostra do vírus influenza A/H1N1 isolada de suínos (A/swine/Brazil/107/2010) e armazenada na CMISEA (BRMSA 00099). Após a titulação da amostra viral, feita através de teste de hemaglutinação (HA), foram selecionadas alíquotas com títulos de 128 UHA (unidades hemaglutinantes) (alíquota A) e 256 (alíquota B) para inoculação no GenoTube®. Para simular a colheita de amostra biológica, os suabes foram embebidos em 30µL da amostra viral, e mantidos em temperatura ambiente (TA) durante 12 horas (dia 0), 24 horas (dia 1), 48 horas (dia 2), 72 horas (dia 3), 96 horas (dia 4), 120 horas (dia 5), 168 horas (dia 7) e 240 horas (dia 10). Em cada dia foram anotadas as temperaturas máximas e mínimas da sala onde os suabes haviam sido armazenados. Após, todos os suabes foram ressuspensos em 1mL de PBS estéril, vortexados por 30 segundos, mantidos em descanso por cinco minutos e novamente vortexados por 30 segundos. Para testar a viabilidade viral, as suspensões finais foram inoculadas em três ovos SPF (200µL por ovo) e uma alíquota foi armazenada a -80ºC para posterior análise por RT-qPCR. Após um período de incubação de quatro dias a 37°C, o líquido cório-alantóide (LCA) dos ovos foi colhido e submetido ao teste de hemaglutinação (HA) (5) para a confirmação da presença viral, e por RT-qPCR (6) para quantificação do gene M do IAV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade do vírus influenza A, a partir do armazenamento da amostra 107/2010 no GenoTube® mantido em TA, foi avaliada pela inoculação da amostra viral recuperada em ovos SPF. No decorrer do período de armazenamento, as temperaturas mínimas e máximas variaram de 22,1ºC a 32,2ºC. Para a alíquota A, o IAV se manteve viável, com título de 128 UHA por um período de 96 horas. Após 168 horas de armazenamento, o título foi reduzido em 64 UHA e, a partir deste período, a amostra foi considerada negativa. Para a alíquota B foi verificada a redução do título viral nas primeiras 48 horas de armazenamento (128 UHA). No entanto, no período de 72 horas, o título registrado foi igual ao inicial (256 UHA), o que pode ser justificado pela sensibilidade da técnica diagnóstica utilizada. No período entre 96 e 168 horas, a amostra manteve título de 64 UHA e, no 10º dia de armazenamento, o título viral foi de 32 UHA (Figura 1A). É sabido que a viabilidade de uma amostra de vírus bem conservada pode ser mantida por um longo período de tempo e o título viral pode ser aumentado após passagem em ovos SPF (1,3). Ao avaliar as amostras recuperadas do Genotube e submetidas ao ensaio de RT-qPCR, foi verificado que o CT das amostras com título de 128 UHA variou de 23,02 a 28,39, e o CT das amostras com título de 256 UHA variou de 21,84 a 24,83. Para as amostras recuperadas do Genotube e inoculadas em ovos SPF, o CT variou de 11,48 a 18,43 (amostras com título de 128 UHA) e variou de 10,99 a 13,31 nas amostras com título de 256 UHA (Figura 1B). Os resultados obtidos foram satisfatórios revelando a manutenção da viabilidade viral para amostras armazenadas sob altas temperaturas e por períodos prolongados, simulando as condições que ocorrem a campo, desde o momento da colheita da amostra até o envio ao laboratório de diagnóstico. Para aumentar as chances de isolamento viral, é preconizado que a colheita de amostras de suínos suspeitos de infecção pelo IAV seja realizada durante a fase aguda da doença (3-5 dias após a infecção) (1,3). Além disto, de acordo com as recomendações descritas no Manual Terrestre da Organização Mundial de Saúde

Animal (OIE), as amostras devem ser armazenadas em meio de transporte a 4°C e remetidas ao laboratório, preferencialmente, em até 48 horas (3). Haach et al. (2018) (2) testaram a viabilidade do IAV a partir de amostras biológicas acondicionadas em diferentes meios de manutenção viral e constataram que as amostras se mantiveram viáveis após 120 horas, quando mantidas a 4°C. Os resultados do presente estudo mostram a manutenção da viabilidade viral em amostras armazenadas sob temperatura ambiente elevada (temperatura máxima: 32.2ºC), por um período prolongado de tempo (até 10 dias) e sem meio de manutenção. Considerando-se a grande extensão territorial brasileira e a distância entre as áreas de produção de suínos e os laboratórios de diagnóstico, a disponibilização de um sistema de manutenção de amostras clínicas de suínos em temperatura ambiente, até o envio das mesmas ao laboratório, é bastante oportuna. Além disto, este é o primeiro trabalho acerca da utilização do suabe GenoTube® na colheita de amostras de suínos para o diagnóstico do vírus influenza pela detecção do RNA viral e também pela avaliação da viabilidade viral por meio de isolamento em ovos SPF. Outros estudos demonstraram a eficiência do GenoTube® na preservação de amostras biológicas positivas para o vírus da peste suína africana (7), da síndrome respiratória e reprodutiva suína (8, 9) e o circovirus suíno tipo 2 (9).

CONCLUSÕES

O suabe GenoTube® mostrou-se efetivo na conservação e preservação do vírus Influenza A. Tanto a estabilidade do RNA viral como a viabilidade da amostra viral foram evidenciadas, mesmo diante de condições oscilatórias de temperatura e/ou tempo de armazenamento.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de iniciação científica à Fernanda Barbieri, à EMBRAPA (projeto 02.16.05.004.00.00) pelo suporte financeiro e à Thermo Fisher Scientific que oportunizou a elaboração deste projeto.

REFERÊNCIAS

1. VAN REETH, K. et al. Influenza Virus. In: ZIMMERMAN, J.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W. Diseases of Swine. 10th, p.557-571, 2012.
2. HAACH, V. et al. Influência das condições de armazenamento do vírus influenza na detecção por RT-qPCR e isolamento viral. Cienc Anim Bras, Goiânia, v.19, p.1-9, 2018.
3. OIE. Transporte de material biológico. In: OIE Terrestrial Manual, 2016. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/1.01.03_TRANSPORT_F.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2019.
4. BLANC, A. et al. Evaluation of GenoTubes for transport, storage and extraction of nucleic acids from Porcine Oral Fluids. Thermo Fisher Scientific, 2018.
5. KILLIAN, M.L. Hemagglutination assay for influenza virus. Methods Mol Biol, v.1161, p.3-9, 2014.
6. ZHANG, J. & Harmon, K. RNA extraction from swine samples and detection of influenza A virus in swine by real-time RT-PCR. Methods Mol Biol, v.1161, p.277-293, 2014.
7. PETROV, A. et al. Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar. Vet Microbiol, v.173, n.3-4, p.360-365, 2014.
8. SATTLER, T. et al. Evaluation of the specificity of a commercial ELISA for detection of antibodies against porcine respiratory and reproductive syndrome virus in individual oral fluid of pigs collected in two different ways. BMC Vet Res, v.11, n.1, p.70-77, 2015.
9. STEINRIGL, A. et al. Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus Type 2 in blood and oral fluid collected with GenoTube swabs. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, v.129, n.9, p.437-443, 2016.

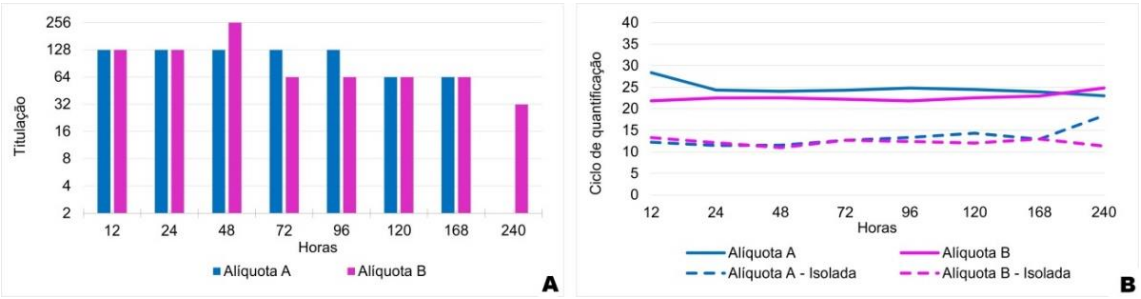

Figura 1. A) Titulação de amostras do vírus influenza A (alíquota A e B) pelo teste de HA, após armazenamento em GenoTube® por um período de até 240 horas em temperatura ambiente. **B)** Detecção de RNA viral por RT-qPCR em amostras do vírus influenza A (alíquota A e B) armazenadas em GenoTube® por um período de até 240 horas em temperatura ambiente.