

Capítulo 1

Isolamento e caracterização
molecular do vírus de
Influenza Suína

Rejane Schaefer
Iara Maria Trevisol

Introdução

O vírus influenza é um dos agentes infecciosos envolvidos em surtos de doença respiratória aguda em suínos, atuando como agente primário de lesões no aparelho respiratório e também como responsável pelo agravamento de quadros respiratórios pela co-infecção com outros agentes infecciosos. Em suínos, a doença é considerada endêmica e os animais são considerados portadores dos subtipos A/H1N1, A/H3N2 e A/H1N2 (Brown, 2000; Olsen, 2002). Os vírus influenza são geralmente espécie-específicos. Todavia, existe a possibilidade de transmissão de vírus de uma espécie a outra. A partir disto, e devido a possibilidade de troca de segmentos gênicos entre vírus originários de diferentes espécies animais, podem surgir novos vírus contendo diferentes combinações de genes (Ito & Kawaoka, 2000). Os suínos, ao contrário das aves e humanos, foram identificados como a única espécie que contém receptores celulares tanto para vírus de origem aviária como humana (Brown, 2000; Ito & Kawaoka, 2000) e são suscetíveis à infecção com todos os subtipos de vírus aviário até hoje testados (H1-H13; Kida et al., 1994). Desta forma, os suínos participariam do ciclo de influenza como hospedeiros intermediários, importantes para a transmissão do vírus de aves a humanos. Segundo Ninomiya et al. (2002), os suínos podem infectar-se naturalmente com outros subtipos do vírus influenza (H4, H5 e H9), aumentando o risco de interação destas amostras com aquelas de origem humana e, conseqüentemente, aumentando o risco de surgimento de novas amostras virais patogênicas para humanos. Portanto, o estabelecimento de um sistema de monitoramento das infecções causadas pelo vírus influenza em suínos, ainda inexistentes no Brasil, é importante uma vez que o suíno funcionaria como um sentinela para epidemias de influenza em humanos e aves e também como modelo para a investigação do vírus influenza. O monitoramento das populações suínas visando a identificação de vírus influenza "tipo aviário" faz parte de um plano mundial preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO) e pela Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) para o combate

às infecções causadas pelo vírus Influenza em humanos e animais domésticos.

Objetivos

Os objetivos do projeto foram:

- a) Investigar a ocorrência do vírus influenza em plantéis de suínos localizados na região oeste do estado de Santa Catarina, a qual concentra 27,46% da população de suínos do Sul do Brasil.
- b) Realizar o isolamento e a caracterização molecular do vírus influenza em suínos, através da análise de diferentes genes virais.
- c) Determinar as origens filogenéticas dos vírus isolados.

Resultados e discussão

Durante os anos de 2005 e 2006 foram coletadas duzentas e oitenta e uma (281) amostras de secreção nasal de suínos oriundos de 29 criações comerciais no Sul do Brasil, com e sem histórico de ocorrência de problemas respiratórios. As amostras coletadas foram inoculadas em ovos embrionados de galinhas SPF, de 9-11 dias de incubação. Após 4 passagens virais, os fluidos alantóides dos ovos inoculados foram coletados e submetidos à reação de hemaglutinação (HA) utilizando hemácias de galinhas. Quarenta e quatro (44) amostras foram consideradas positivas pelo teste de HA e duzentas e trinta e sete (237) foram consideradas negativas. Entretanto, quando foram utilizadas no teste hemácias de perus, mais três (3) amostras foram consideradas positivas, totalizando quarenta e sete (47) amostras hemaglutinantes. Segundo Rogers et al. (1983), os eritrócitos de perus apresentam, predominantemente, receptores sialo-oligossacarídeos terminados por ácido N-acetilsialíco ligado a galactose por ligação -2,6 (NeuAc2,6Gal), reconhecidos como receptores de células preferenciais para a ligação dos vírus influenza de origem de suínos, sendo portanto, importantes na identificação de vírus encontrados nesta espécie.

Como uma alternativa ao isolamento viral em ovos embrionados foi padronizado o isolamento em células da linhagem MDCK, consideradas permissíveis aos vírus influenza. Estudos realizados por Erickson et al. (1999), em um pequeno número de amostras (10), sugerem que o isolamento do vírus de influenza suína poderia ser otimizado em células da linhagem MDCK. Entretanto, segundo Clavijo et al. (2002), o isolamento do vírus influenza em ovos embrionados seria a opção de escolha para a detecção viral. No presente trabalho, o vírus controle positivo (H1N1) foi inoculado em células MDCK e, após 24 horas de cultivo, o RNA viral foi extraído das células infectadas (Fig 1). Este método apresentou como vantagem um menor período de tempo para a obtenção dos vírus, quando comparado com o isolamento viral padrão em ovos embrionados onde são necessárias, pelo menos, três passagens para a multiplicação viral, o que leva em torno de 3 semanas. Entretanto, estes resultados dizem respeito a uma amostra de vírus possivelmente já adaptada a ovos embrionados. Este trabalho não avaliou o isolamento de amostras de campo do vírus influenza em células.

Posteriormente, as amostras que apresentaram positividade no teste de HA foram analisadas por PCR. Para isto, foi otimizada uma reação de PCR que amplifica uma sequência do gene da matriz (M) do vírus influenza. A PCR/M amplifica um fragmento do genoma de vírus isolados de diferentes espécies animais (aves, suínos e humanos), permitindo o monitoramento desta infecção em outras espécies (Fouchier et al., 2000). Após a análise das amostras de campo com a PCR/M foram identificadas 3 amostras que apresentaram bandas fracas, após a eletroforese em gel de agarose, com tamanho compatível com a amplificação de um fragmento do gene M (244pb) do vírus influenza (Fig 2). Entretanto, não foi possível recuperar DNA suficiente para a reação de sequenciamento. Desta forma, com o objetivo de identificar nas amostras coletadas de suínos outros vírus que poderiam causar infecção nesta espécie, foi realizado o teste de RAPD (Random amplified polymorphic DNA; Amersham Biosciences) a partir do cDNA

das amostras consideradas positivas pelo teste de HA. O teste de RAPD é uma técnica utilizada para detectar polimorfismos genômicos utilizando para isto um único primer oligonucleotídeo curto e de sequência arbitrária em uma reação de PCR. A reação de PCR é realizada em condições de baixa estringência de forma a gerar um arranjo reprodutível de produtos sequência-específicos que são analisados por eletroforese. Os produtos da PCR, após passarem por um processo de purificação, podem ser analisados através do seqüenciamento de DNA. Entretanto, após ser realizada a reação de RAPD, somente foram verificados fragmentos de DNA na amostra controle positivo do teste (DNA de *E. coli*) e bandas fracas quando utilizou-se cDNA da amostra controle positiva (H1N1). Neste caso, não foi possível detectar sequências do vírus de influenza e nem de outros vírus que infectam suínos.

Muito embora não tenha sido possível isolar nenhuma amostra do vírus influenza em suínos, é sabido que o vírus circula nesta espécie. Em um trabalho prévio, desenvolvido pela Embrapa Suínos e Aves, o qual analisou amostras de soro de suínos coletadas entre os anos de 1996 e 1999 foi identificada a presença de anticorpos contra os subtipos H1N1 (em 2,2% dos soros testados) e H3N2 (em 16,7% dos soros testados; Brentano et al., 2002), subtipos prevalentes em suínos, nos quais a infecção é considerada endêmica. A prevalência desta infecção em suínos poderá ser muito baixa de acordo com as características de sazonalidade da doença, que pode ser maior no inverno, o que determina uma possível variabilidade na ocorrência da doença e número provável de isolamentos do vírus.

Esta dificuldade em isolar amostras do vírus influenza em suínos pode ocorrer em virtude da presença de imunidade prévia ao vírus em suínos, o que faz com que o mesmo circule sem evidências de sintomatologia clínica. Nestes casos, o vírus funcionaria como porta de entrada para outras infecções respiratórias em suínos. Também, o sucesso do isolamento viral é determinado pela oportunidade ou não de detectar e

coletar em tempo o material de animais ainda em fase aguda da doença. O sucesso na detecção do vírus é maior quando as amostras são coletadas na fase inicial da infecção, durante o período febril, nos primeiros sete dias de doença (Easterday et al., 1999). Após isto, e em virtude da ocorrência de infecção secundária com outros agentes virais ou bacterianos, as oportunidades de isolar o vírus são menores.

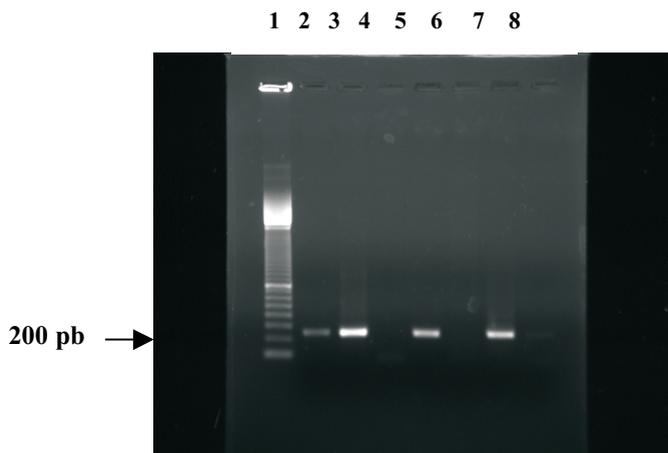


Fig 1. PCR/ M (H1N1; extração viral a partir de fluido alantóide de ovos e a partir do SN de células MDCK; 24 e 48 horas de cultivo). L1: Marcador de peso molecular de 100pb; L2. Líq. alantóide; L3. SN/MDCK 48hs; L4. SN/MDCK (extração dupla); L5. Líq. alantóide (extração dupla); L6. SN/MDCK 48hs (extração dupla); L7. SN/MDCK 24hs; L8. Controle negativo.

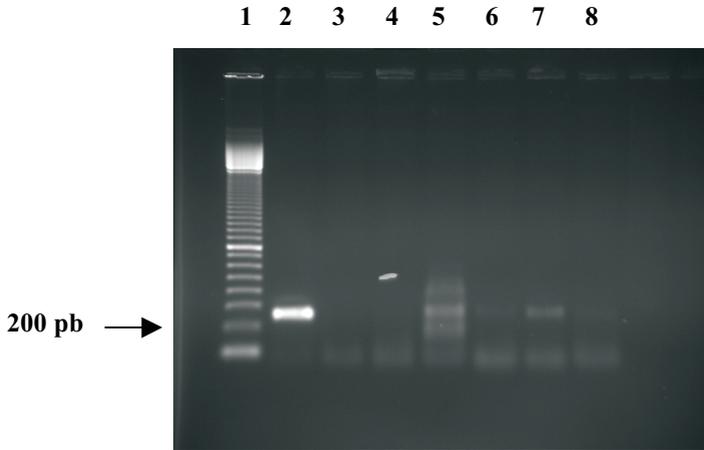


Fig 2. PCR/ M (H1N1). L1: Marcador de peso molecular de 100pb; L2: controle positivo, amostra H1N1; L3: amostra 36; L4: amostra 37; L5: amostra 45; L6: amostra: 74; L7: amostra 76 e L8: controle negativo.

Considerações finais

- A dificuldade encontrada no isolamento do SIV em suínos no presente trabalho não exclui a presença do mesmo nos rebanhos suínos no Sul do Brasil, uma vez que a avaliação sorológica dos rebanhos indicou a circulação do vírus influenza na população suína, mas com baixa prevalência.
- Mais estudos serão necessários para a confirmação dos resultados encontrados com a PCR/M em 3 das amostras analisadas.
- A identificação e o monitoramento de quais subtipos virais são predominantes na população suína somente será possível com a intensificação da vigilância da infecção na população suína e avaliação de material colhido de suínos com sintomas da infecção.

Referências

- BRENTANO, L.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N.; PIFFER, I. A. Levantamento soroepidemiológico para Coronavírus Respiratório e da Gastroenterite Transmissível e dos Vírus de Influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. 6 p. (Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 306).
- BROWN, I. H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 74, p. 29-46, 2000.
- CLAVIJO, A.; TRESNAN, D. B.; JOLIE, R.; ZHOU, E -M. Comparison of embryonated chickens eggs with MDCK cell culture for the isolation of influenza swine virus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.66, p. 117-121, 2002.
- EASTERDAY, B. C., VAN REETH, K. Swine influenza In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. (Ed). *Diseases of Swine*. 8.ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 277-290.

FOUCHIER, R. A. M.; BESTEBROER, T. M.; HERFST, S.; VAN DER KEMP, L.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 4096-4101, 2000.

ITO, T., KAWAOKA, Y. Host range barrier of influenza A virus. *Veterinary Microbiology*, v.74, p.71-75, 2000.

KIDA, H.; ITO, T.; YASUDA, J.; SHIMIZU, Y.; ITAKURA, C.; SHORTRIDGE K. F.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. C. Potential for transmission of avian influenza virus to pigs. *Journal of General Virology*, v.75, p. 2183-2188, 1994.

NINOMIYA, A.; TAKADA, A.; OKAZAKI, K.; SHORTRIDGE, K. F.; KIDA, H. Seroepidemiological evidence of H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in southeastern China. *Veterinary Microbiology*, v.88, p. 107-114, 2002.

OLSEN, C. W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Research*, v.85, p. 199-210, 2002.

ROGERS, G. N.; PAULSON, J. C.; DANIELS, R. S.; SKEHEL, J. J.; WILSON, I. A.; WILEY, D. C. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature*, v.304, p. 76-78, 1983.

Agradecimentos: às agroindústrias da região (Seara Alimentos e SADIA) que permitiram a coleta de animais das integrações sob sua responsabilidade. Este trabalho foi realizado com o apoio técnico laboratorial de Tania P. Klein e Magda Mulinari.