

CAPÍTULO 4

Agilização do método de diagnóstico e tipagem do vírus da influenza aviária e análises de simulação de risco de introdução de influenza na avicultura industrial do Brasil

Liana Brentano
Marcus Vinicius Gouvêa
Fulvia DiPilo
Dilmara Reischak
Soraya Cecília Albieri Camillo
André de Oliveira Mendonça
Paulo Augusto Esteves
Iara Maria Trevisol

Introdução

A influenza aviária é causada por vírus de influenza do grupo A aviário, que são vírus com genoma composto por oito genes, dos quais o gene da proteína e hemaglutinina e neuraminidase são importantes em classificar os diferentes subtipos de vírus. As aves silvestres, principalmente as aves aquáticas, são o reservatório natural do vírus de influenza e constituem a fonte dos diferentes subtipos de vírus de influenza aviária encontrados nas outras espécies, inclusive de alguns subtipos de vírus associados a zoonoses, tais como o vírus H5N1 asiático de alto potencial de mortalidade em humanos. As perdas econômicas resultantes de surtos de vírus de influenza aviária altamente patogênicos são significativas e a ocorrência de influenza na avicultura comercial brasileira seria devastadora pelo seu impacto na perda das receitas cambiais, perdas internas no consumo e desemprego no setor responsável por mais de quatro milhões de vagas diretas e indiretas. A adoção das ações de vigilância sanitária e rápido diagnóstico laboratorial são de extrema importância em condições de risco de ocorrência de influenza, sendo primordial a adoção e aprimoramento de diferentes recursos tecnológicos que possam dar suporte a essas ações.

Os vários subtipos diferentes de vírus de influenza aviária, assim como os Paramyxovírus do tipo I – vírus da doença de Newcastle, variam muito quanto a seu grau de patogenicidade. Dentre os 16 diferentes subtipos de vírus de influenza aviária apenas os vírus com as hemaglutininas H5 e H7 são notificáveis por serem potencialmente patogênicos a galinhas e a algumas outras espécies de aves domésticas. A doença de Newcastle é também uma infecção viral altamente contagiosa das aves, causada pelo vírus da doença de Newcastle, um vírus da família Paramyxoviridae, gênero avulavirus, do sorotipo 1 dentre nove diferentes sorotipos de paramyxovirus aviários já identificados. Dependendo da patogenicidade da cepa viral, a doença de Newcastle pode manifestar-se em diferentes graus de patogenicidade, que variam desde uma infecção subclínica onde os sintomas são inaparentes ou discretos, até uma doença fatal que aparece repentinamente e resulta em alta morta-

lidade das aves e que clinicamente pode ser muito similar a surtos de influenza aviária, devendo sempre ser realizado o diagnóstico laboratorial diferencial de Newcastle ou influenza. Ambas doenças, influenza aviária e Newcastle, são consideradas como notificáveis, de alto risco e impacto econômico quando causadas por vírus altamente patogênicos e, portanto, é essencial a caracterização laboratorial destes vírus para fins de diagnóstico e notificação obrigatória aos órgãos internacionais de controle de saúde animal (MANUAL..., 2008).

O diagnóstico da influenza aviária e da doença de Newcastle necessita ser confirmado pela combinação de diferentes exames laboratoriais, devendo os laboratórios oficiais utilizar metodologias de diagnóstico que estejam de acordo com os padrões e normas internacionais preconizadas pela Organização Internacional de Sanidade Animal (OIE) (MANUAL..., 2008, versão online em www.oie.int). Para a confirmação de um diagnóstico de surtos de influenza ou doença de Newcastle é necessário primeiramente realizar o diagnóstico laboratorial da presença do vírus, que em caso positivo requer subsequentes análises de caracterização do subtipo do vírus de influenza (diagnóstico de hemaglutinina (HA) Neuraminidase (NA) viral) e, no caso de doença de Newcastle, determinar o sorotipo de paramyxovirus aviário como sendo o APMV-1 (Avian Paramyxovirus 1) – vírus da doença de Newcastle, também é requerido que seja determinada a patogenicidade do vírus de influenza ou diagnosticado, envolvendo assim a execução de diferentes metodologias laboratoriais para um diagnóstico definitivo destes vírus.

Antes da execução deste projeto, realizado em parceria entre a Embrapa Suínos e Aves, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL) e Laboratório Nacional Agropecuário de Campinas (Lanagro - SP), o diagnóstico de influenza estava inteiramente baseado em metodologias extremamente laboriosas e demoradas, tais como isolamento do vírus em ovos e testes sorológicos para os 15 diferentes subtipos do vírus, assim como a determinação *in vivo* da patogenicidade viral, podendo demorar até mais de duas a três se-

manas para realização do diagnóstico de influenza aviária e diagnóstico diferencial de doença de Newcastle, outra doença notificável e também de enorme impacto econômico na avicultura. Estas metodologias acarretavam em tempo excessivo de espera de resultados laboratoriais para que as medidas de contenção imediata de focos pudessem ser tomadas e eram um fator limitante para a ampliação da população de aves que poderia ser monitorada. Em contraste, testes moleculares como Transcrição Reversa – Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR) e RT-PCR em tempo real são metodologias que permitem pelo menos um diagnóstico preliminar destes vírus em 24 horas. Também, metodologias de sequenciamento de DNA de fragmentos do gene HA do vírus de influenza aviária ou do gene F dos vírus da doença de Newcastle podem agilizar o diagnóstico de patogenicidade viral em menos tempo que os testes *in vivo* em aves, que demoram pelo menos dez dias. Portanto, diagnósticos por RT-PCR associados a sequenciamento de DNA são ferramentas de diagnóstico essenciais e estratégicas para o monitoramento oficial destas enfermidades no país.

Objetivos

Apoiar os programas oficiais de monitoria e controle de influenza e aumentar a segurança e competitividade da produção avícola comercial do Brasil por meio de metodologias de diagnóstico.

Resultados

Serviços e produtos gerados

1. Convênio de Cooperação Técnica MAPA/DAS/CGAL/Lanagro-SP e Embrapa. Atividades executadas no Lanagro-SP vigente entre em maio de 2006 e renovado em outubro de 2008: Convênio de Cooperação Técnica MAPA e Embrapa, assinado em 17 de outubro de 2008. Publicado em DOU nº 216, de 6 novembro de 2008. - Seção 3, página 4.

2. Executada a implantação do laboratório de Biologia Molecular/PCR do Lanagro-SP, do MAPA. Em colaboração entre a Embrapa Suínos e Aves e MAPA/CGAL/Lanagro-SP foi realizada a estruturação física (equipamentos, insumos) e o treinamento e capacitação técnica de pessoal do Lanagro-SP para a execução de diagnósticos moleculares dos vírus da doença de Newcastle, influenza aviária e laringotraqueíte infecciosa das aves. Atualmente o Lanagro-SP está com capacidade física e técnica para realizar extrações de ácidos nucleicos por método automatizado e métodos manuais convencionais, execução de diagnósticos por métodos de RT-PCR e PCR convencional e eletroforese de produtos de DNA, diagnóstico por RT-PCR e PCR em tempo real e metodologias de sequenciamento automático de DNA a partir de produtos de RT-PCR ou PCR para análises de patogenicidade dos vírus.

3. Implantados métodos de diagnóstico molecular dos vírus de influenza aviária e vírus da doença de Newcastle conforme metodologias indicadas pela OIE, desenvolvidas e validadas pelo Laboratório Nacional de Serviços Veterinários (NVSL - National Veterinary Services Laboratories), Ames, Iowa, e pelo Serviço de Pesquisa em Agricultura (ARS – Agricultura Research Services/USDA) em Athens, GA, Estados Unidos.

Métodos de diagnóstico implantados no Lanagro-SP

1. RT-PCR em tempo real para diagnóstico do Gene M dos vírus de influenza aviária (AIV), em execução na rotina de diagnóstico molecular do laboratório.

2. RT-PCR em tempo real para diagnóstico do Gene M dos Paramyxovirus-1 para diagnóstico do vírus da doença de Newcastle (NDV), em execução na rotina de diagnóstico molecular do laboratório.

3. RT-PCR em tempo real para diagnóstico dos vírus de influenza aviária dos subtipos H5 e H7 (linhagens virais Américas e Ásia e vírus H7 da América do Sul – Chile), em execução na rotina de diagnóstico molecular do laboratório.

4. RT-PCR em tempo real para diagnóstico do Gene F de amostras altamente patogênicas do vírus da doença de Newcastle (NDV) em galinhas.

5. RT-PCR convencional para os diagnóstico dos subtipos H2, H3 e H4 de influenza aviária, únicos subtipos de vírus já identificados oficialmente no Brasil em aves domésticas ou migratórias.
 6. RT-PCR convencional para diagnóstico do gene F dos vírus da doença de Newcastle, para sequenciamento de DNA e patotipagem molecular, em execução na rotina de diagnóstico molecular do laboratório.
 7. RT-PCR para amplificação e sequenciamento do gene HA dos vírus de influenza aviária. Os protocolos de sequenciamento do gene HA (hemaglutinina) de vírus H5 e H7 foram implantados mediante colaboração com o Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura (IICA) e apoio técnico e treinamento realizado pela Dra. Alice Fusaro do Reference Laboratory for Newcastle disease and avian influenza/Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Itália. Protocolos para amplificação e sequenciamento de todo gene HA de outros subtipos de influenza foram padronizados no laboratório de sanidade animal da Embrapa Suínos e Aves.
4. Implantados protocolos e realizado treinamento de pessoal do Lanagro-SP em métodos de diagnóstico molecular (PCR e sequenciamento) do vírus da laringotraqueíte infecciosa das aves. Treinamento de técnico do Lanagro-SP na Embrapa Suínos e Aves em metodologias de cultivo celular para isolamento de vírus da laringotraqueíte infecciosa das aves.
 5. Realizada pela Embrapa, com autorização do MAPA, a importação de amostras de referência do vírus de influenza aviária de baixa patogenicidade, compreendendo 15 diferentes subtipos de hemaglutinina e nove diferentes neuraminidases, para disponibilizar ao Lanagro-SP amostras viriais de referência para padronização de reagentes controles de diagnóstico e para a produção de antígenos de referência e preparo de estoques virais para padronização das técnicas de diagnósticos por real time RT-PCR e RT-PCR e para implantação da caracterização dos vírus de influenza por sequenciamento de DNA. As amostras de baixa patogenicidade dos subtipos H5 (H5N2 A/TY/CA/209092/02) e H7 (H7N3 A/TY/Ore/71) importadas do NVSL/USDA, são os subtipos virais que causam doença de notificação obrigatória e por determinação do MAPA foram propagadas no Laboratório de Segurança Nível 3 - Laboratório NB-3+, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II) da Universidade de São Paulo

(USP), em cooperação entre Embrapa Suínos e Aves e Prof. Dr. Edison L. Durigon, do laboratório de virologia do ICB II/USP. Os vírus de referência dos subtipos H5 e H7 foram disponibilizados ao Lanagro-SP para fins de produção de antígenos e implantação de métodos de HI para sorologia específica para vírus H5 e H7 a ser executada pelo Lanagro-SP. RNA extraído destes vírus estão sendo utilizados no Lanagro-SP como controles positivos para os testes de RT-PCR em tempo real na rotina de diagnóstico dos vírus dos subtipos H5 e H7.

5. Colaboração na aprovação do programa de Twinning da OIE para parceria técnica entre o Lanagro-SP e o United States Department of Agriculture, National Veterinary Services Laboratories (USDA/APHIS/NVSL) e Laboratório Internacional de Referência da OIE para influenza aviária e doença de Newcastle, para colaboração técnica e capacitação do Lanagro-SP nas normas preconizadas pela OIE para laboratórios internacionais de referência. Execução da redação do projeto e colaboração da Embrapa Suínos e Aves como integrante dos currículos de responsáveis técnicos da proposta do projeto submetida à OIE pela Secretaria de Defesa Agropecuária/CGAL/Lanagro-SP. Aprovação do projeto pela OIE em setembro de 2008 para execução estimada até dezembro de 2010. A aprovação e execução deste programa de Twinning entre o NVSL e Lanagro-SP, amparado por recursos financeiros da OIE, poderá permitir ao MAPA a submissão à OIE de requerimento para que o Lanagro-SP seja reconhecido como Laboratório Internacional de Referência da OIE para diagnóstico oficiais dos vírus de influenza aviária e doença de Newcastle.

Considerações finais

Em colaboração entre a Embrapa e o MAPA foi efetivada a implantação do laboratório de diagnóstico molecular de enfermidades virais de aves (influenza aviária e doença de Newcastle), no Lanagro-SP, que é o laboratório oficial de referência do MAPA para diagnóstico de influenza aviária e doença de Newcastle do Brasil.

A implantação deste laboratório é um resultado relevante do projeto uma vez que atendeu as expectativas de viabilizar ao país diagnósticos mais rápidos do que eram até então disponíveis, e que fossem também já reconhecidos pela OIE para diagnósticos oficiais de influenza aviária e doença de Newcastle para fins de comércio doméstico e internacional. Com a viabilização do laboratório de diagnóstico molecular do Lanagro-SP os diagnósticos de influenza aviária, assim como da doença de Newcastle, podem ser feitos em 24 a 48 horas, permitindo ao laboratório oficial do MAPA melhor atender as expectativas e demandas do serviço oficial de defesa sanitária animal com metodologias mais rápidas para o controle e monitoramento destas doenças de notificação obrigatória e que provocam grande impacto econômico aos países produtores de aves. Antes da estruturação do laboratório e implantação das metodologias de diagnóstico molecular os diagnósticos, oficiais de influenza aviária e doença de Newcastle baseados apenas nas metodologias virológicas convencionais poderiam demorar entre até duas a três semanas ou mais, acarretando em grandes dificuldades aos serviços de defesa e colocavam em desvantagem a competitividade do Brasil em questões sanitárias reguladas pela OIE e a capacidade do país em monitorar e enfrentar eventual surto destas doenças.

Referências

MANUAL of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris: OIE/World Organisation for Animal Health, 2008. 1343 p.

Literatura recomendada

ALDOUS, E .W.; MYNN, J. K.; BANKS, J.; ALEXANDER, D. J. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. **Avian Pathology**, v. 32, n. 3, p.239-257, jun. 2003.

CHEUNG, T. K .W.; POON, L .L. M. Biology of influenza A virus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1102, n. 1, p. 1-25, 2007.

COLLINS, M. S.; BASHIRUDDIN, J. B.; ALEXANDER, D. J. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. **Archives of Virology**, v. 128, p. 363-370, 1993.

HOFFMANN, E.; STECH, J.; GUAN, Y.; WEBSTER, R. G.; PEREZ, D. R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Archives of Virology**, v. 146, p. 2275-2289, 2001.

SPACKMAN, E.; SENNE, A.; BULGA, L. L.; MYERS, T. J.; PERDUE, M. L.; GARBER, L. P.; LOHMAN, K.; DAUUM, L. T.; SUAREZ, M. L. Development of real-time RT-PCR for the detection of avian influenza virus. **Avian Disease**, n. 47, p. 1079-1082, 2004.

SEAL, B. S.; KING, D. J.; BENNETT, J. D. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 33, p. 2624-2630, 1995.

SUAREZ D. L.; SENNE, D. A.; BANKS, J.; BROWN, I. H.; ESSEN, S. C.; LEE, C. W.; MANVELL, R. J.; MATHIEU-BENSON, C.; MARENO, V.; PEDERSEN, J.; PANIGRAHY, B.; ROJAS, H.; SPACKMAN, E.; ALEXANDER, D. J. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 693-699, 2004.

WEBSTER, R. G.; BEAN, W. J.; GORMAN, O. T.; CHAMBERS, T. M.; KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 1, p. 152-179, 1992.

WEBSTER, R. G.; PEIRIS, M.; CHEN, H.; GUAN, Y. H5N1 Outbreaks and Enzootic Influenza. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 3-8, 2006.

WISE, M. G.; SUAREZ, D. L.; SEAL, B. S.; PEDERSEN, J. C.; SENNE, D. A.; KING, D. A.; KAPCZYNSKI, D. R.; SPACKMAN, E. Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 329-338, 2004.