

LUIZ FELIPE CARON

**VIRUS DA GRIPE SUÍNA NO ESTADO DO PARANÁ: SOROPREVALÊNCIA;
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS E IMPLICAÇÕES
EPIDEMIOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Processos
Biotecnológicos, Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutor em Processos
Biotecnológicos.

Orientadora: Profa. Dra. Vanete Thomaz
Soccol

CURITIBA

2010

Agradecimentos

Diferente do que a regra possa mostrar, nunca acreditei que a Universidade tivesse a função de nos preparar para a vida, como se esta fosse começar depois da formatura ou da pós graduação. A vida acontece a todo momento e o que faremos dela talvez faça a diferença. Agradeço por esta que recebi (duas vezes) não sei muito bem porque ainda, e por poder compartilhá-la com tanta gente. De toda esta gente, neste momento em particular devo ratificar algumas: A Rose minha esposa, que em particular incentivou este Doutorado relevando meus preconceitos, e em geral desde 1994 tem cuidado de mim e me ajudado a viver realizado. Devido a Ela, agradeço a presença constante do Gabriel e do Lucas, meus filhos, talvez ainda sem a percepção do que este trabalho representa para todos nós, mas me movendo para frente simplesmente por estarem comigo.

- Professor Yasuyoshi Hayashi, mesmo não sendo meu “amigo”, foi o guru de minha atividade profissional, me disse para pensar em Influenza há 14 anos e me deu gratuitamente o exemplo de conduta e dedicação que tento exercitar até hoje.

- A Profa. Vanete, “comprou” e me fez “comprar” esta briga, obrigado pelo incentivo e por me mostrar os caminhos.

- Ao pessoal do Marcos Enrietti, sem os quais estes resultados não seriam possíveis, além do esforço a boas horas de conversa, agradeço a Mara Gasino, a Rosaria Richartz, a Cidinha Aparecida, ao Djalma Barbosa, ao Jurandir Cabral, ao Gilmar Dias e ao Antonio Mileo, e outros que me perdoem não citar.

Agradeço a Rejane Schaefer, pela análise na Embrapa e que tenhamos outros frutos.

VIRUS DA GRIPE SUÍNA NO ESTADO DO PARANÁ: SOROPREVALÊNCIA; IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS E IMPLICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

RESUMO

A influenza é a enfermidade re-emergente mais estudada e aguardada em todo o mundo na atualidade, principalmente pela relevância histórica de suas ocorrências. O vírus causador desta enfermidade pertence à família *Orthomyxoviridae* e infecta várias espécies animais. O vírus está presente em aves aquáticas em todo o mundo e encontra, no suíno, a possibilidade de sofrer mutações intensas, o que gera a preocupação deste como fonte para potenciais surgimentos de vírus pandêmicos. A monitoria da circulação viral é uma estratégia necessária para a identificação precoce de possíveis vírus responsáveis por surtos epidêmicos ou pandêmicos e para a orientação de medidas de controle eficientes que garantam, não apenas a segurança do homem, minimizando riscos de contágio, mas também a excelência do Brasil como grande produtor e exportador de aves e suínos. Visando contribuir para o conhecimento da taxa de prevalência e os subtipos do vírus presentes em suínos, no Estado do Paraná, sul do Brasil, foi desenvolvido o presente trabalho. Para responder esta questão foram analisadas amostras de 675 soros de suínos de 5327 coletadas em várias cidades do Estado do Paraná e realizada a pesquisa de anticorpos e a determinação da soroprevalência contra o vírus da influenza subtipo H3N2 por meio da técnica de inibição da hemaglutinação. Os animais foram divididos em dois sistemas de criação: granjas e criatórios. Numa segunda etapa do estudo procurou-se identificar a presença do vírus em amostras de tecidos do aparelho respiratório oriundo de suínos no abatedouro, com lesões nestes tecidos. Para a pesquisa viral primeiramente foi realizada a inoculação do material triturado em ovos embrionados de galinha, seguido da identificação molecular por meio da técnica de RT-PCR, para o gene 7, que codifica a proteína M, muito conservada nos vírus do tipo A. Na avaliação sorológica verificou-se que a maior prevalência de anticorpos contra o vírus ocorre em populações de suínos quando há alta densidade populacional (24% para animais de granjas e 3% para animais de criatórios), dados que indicam que a maior densidade populacional facilitaria a manutenção e propagação do vírus na população. Da mesma forma nas regiões do Estado com clima mais frio os animais apresentaram maiores prevalências de anticorpos (variando de 2,5% a 45%) o que demonstra predispor mais a infecção nos suínos. Das setenta amostras que foram submetidas ao isolamento viral seguido da técnica de RT-PCR observou-se que cinco foram positivas para vírus do tipo A. A presença do vírus em 7,15% dos rebanhos suínos analisados reforça a necessidade da monitoria ativa por meio de testes sensíveis, que permitam gerenciar o risco da da enfermidade no Brasil.

Palavras-chave: Influenza, soroepidemiologia, RT-PCR, H3N2, densidade populacional.

ABSTRACT

Influenza is the most frequently studied and anticipated re-emerging disease in the whole world, mainly because of the historical significance of its occurrences. The virus that causes it belongs to the *Orthomyxoviridae* family and infects many animal species. It is present in aquatic birds in the whole world and finds in pigs the possibility of undergoing intense mutations, thus raising the concern about its being a source for potential pandemic viruses. Monitoring viral circulation is a necessary strategy for an early identification of outbreaks and for guiding efficient control measures to ensure not only human safety – minimizing contamination risks – but also the excellence of Brazil as a major poultry and swine producing and exporting country. The present work was carried out aiming at contributing to the knowledge of prevalence rates and subtypes of the virus present in pigs. In order to answer this question, 675 samples of sera from 5327 total pigs were analyzed to study antibodies and to determine the seroprevalence against subtype H3N2 influenza by the hemagglutination inhibition test. The animals derived from different areas and growing systems in the State of Parana – Brazil. Another step in the study sought to identify the presence of the virus in tissue samples from the respiratory tract of pigs in the slaughterhouse. First the inoculation of the material was performed in embryonated eggs, followed by its molecular identification by RT-PCR, for gene 7, which encodes protein M - well preserved in type A viruses. Evaluation showed that the highest prevalence occurs when there is a high population density favoring the maintenance of the virus in the population (24% to farm animals and 3% to run). Likewise, regions characterized by colder climate proved to predispose the infection in swine more than other regions (ranged of 2,5% at 45%). Five out of the seventy studied samples were positive for the type A virus. The presence of virus in 7,15% of samples denoting the presence of the virus in swine livestocks studied, reinforcing the need for active monitoring using sensitive tests that allow managing the potential occurrence risk of the disease in Brazil.

Key-words: influenza, sero-epidemiology, RT-PCR, H3N2, population density.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO..... | 3 |
| ABSTRACT..... | 4 |
| LISTA DE QUADROS..... | 7 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 8 |
| LISTA DE GRÁFICOS..... | 9 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 10 |
| 1 – INTRODUÇÃO GERAL..... | 11 |
| 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 15 |
| 2.1 - Histórico..... | 15 |
| 2.2 - Agente etiológico..... | 18 |
| 2.3 - Taxa de mutação viral..... | 22 |
| 2.4 - Barreira interespécies..... | 26 |
| 2.5 - Patogenicidade..... | 30 |
| 2.6 – Controle..... | 33 |
| 3 - LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA INFLUENZA SUÍNA NO ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL..... | 37 |
| 3.1 - INTRODUÇÃO..... | 37 |
| 3.2 – OBJETIVOS..... | 39 |
| 3.3- METODOLOGIA..... | 40 |
| 3.4 - MATERIAL E MÉTODOS..... | 43 |
| 3.4.1 - Análise sorológica..... | 43 |
| 3.4.1.1- Amostras de soros..... | 43 |
| 3.4.1.2- Técnica de Inibição da Hemaglutinação..... | 44 |

| | |
|--|----|
| 3.4.2- Isolamento viral..... | 47 |
| 3.4.3 – Técnica molecular..... | 49 |
| 4 - RESULTADOS..... | 51 |
| 4.1 - Análise sorológica..... | 51 |
| 4.2 – Correlação da soroprevalência com temperatura ambiente..... | 53 |
| 4.3 - Isolamento viral e RT-PCR..... | 55 |
| 5 - DISCUSSÃO..... | 58 |
| 5.1 - Soroprevalência..... | 58 |
| 5.2 - O impacto da influenza suína na saúde humana..... | 61 |
| 5.3 - Identificação viral..... | 62 |
| 5.4 - Interferência do clima..... | 64 |
| 5.5 - A importância do acompanhamento dos dados sorológicos e moleculares..... | 65 |
| 5.6 - Considerações na realidade brasileira..... | 68 |
| 5.7 – Perspectivas biotecnológicas..... | 69 |
| 6 – DISCUSSÃO GERAL..... | 72 |
| 7 – CONCLUSÕES..... | 76 |
| 8- BIBLIOGRAFIA..... | 77 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Segmentos de RNA do vírus da influenza A, proteínas codificadas e suas funções..... | 19 |
| Quadro 2 - Distribuição das 675 amostras selecionadas conforme a região do Paraná..... | 44 |
| Quadro 3 - Número de amostras sorologicamente positivas contra H3N2 dentro de granjas ou criatórios em relação ao total de amostras..... | 51 |
| Quadro 4 – Número de propriedades positivas divididas em granjas e criatórios em relação ao total de propriedades..... | 51 |
| Quadro 5 - Número de amostras positivas para influenza suína em cada região do Paraná distribuídas em granjas de suínos e criatórios de suínos..... | 55 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Diagrama esquemático da estrutura do vírus da influenza A..... | 20 |
| Figura 2 - Relações entre as espécies animais susceptíveis e os diferentes subtipos de influenza identificados até o momento..... | 22 |
| Figura 3 - Variação antigênica determinada por pequenas alterações no genoma (“drift” antigênico)..... | 25 |
| Figura 4 - Variação antigênica determinada por rearranjo genômico entre dois vírus (“shift” antigênico)..... | 25 |
| Figura 5 - A medicina da conservação, representada como área de conjunção entre as áreas de saúde humana, saúde animal e meio ambiente | 29 |
| Figura 6 –Algoritmo para diagnóstico laboratorial da Influenza..... | 42 |
| Figura 7 – Interpretação do teste de inibição da hemaglutinação para a titulação de anticorpos antivírus da influenza A H3N2..... | 47 |
| Figura 8 - Média das temperaturas mínimas no Estado do Paraná entre os anos de 2000 a 2006..... | 54 |
| Figura 9 - Resultado de cinco amostras positivas para influenza, na RT-PCR com amplificação do gene M tendo como controle positivo o vírus H1N1..... | 57 |
| Figura 10 - Epidemiologia do vírus da influenza A e B humanos ao longo dos anos..... | 62 |

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Perfil de positividade para o vírus H3N2 das granjas de suínos testadas no estado do Paraná entre maio e novembro de 2003.....52
- Gráfico 2 - Perfil de positividade para o vírus H3N2 dos criatórios de suínos testados no estado do Paraná entre maio e novembro de 2003.....52
- Gráfico 3 - Porcentagem de amostras positivas em granjas de suínos, testadas no Estado do Paraná.....53
- Gráfico 4 - Porcentagem de amostras positivas em criatórios de suínos testados no Estado do Paraná..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA- DNA complementar

DIVA- Differentiating Infected from Vaccinated Animals

DNA- Ácido desoxiribonucléico

DNTPs-desoxirribonucleotídeos fosfatados

Gal - Galactose

HA- Hemaglutinina

HI- Inibição da Hemaglutinação

LCA- Líquido cório alantóide

MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MDCK- Madin Derby Canine Kidney

NA- Neuraminidase

OIE- Organização Mundial de Saúde Animal

PCR- Reação em cadeia pela Polimerase

PNSA- Programa Nacional de Sanidade Avícola

RDE- receptor-destroying enzyme

RNA- Ácido Ribonucléico

SEAB- Secretaria da Agricultura Pecuária e Abastecimento

SIV- Swine Influenza Virus

SPF- Specific Pathogen Free

1- INTRODUÇÃO GERAL

A influenza, que assolou o mundo no início do século passado, proporcionou exemplos abundantes de recomendações e regras dedicadas a minimizar impactos e novas possíveis catástrofes em termos epidemiológicos. No entanto, a situação ainda é recorrente na atualidade. A primeira descrição da influenza como enfermidade data de 492 a. C., feita por Hipócrates. Mais tarde houveram numerosos relatos durante a Idade Média e esta foi denominada como “peste catarral” em 1552 nas Américas (Garcia-Garcia & Ramos, 2006). Na verdade o vírus da influenza coexiste com o ser humano há aproximadamente 400 anos, período em que se identificou sua presença mais constantemente desde a descrição. Mas, entre o final do século passado e início deste, a influenza voltou a ser a “vedete” de calamidades e prejuízos. E trouxe consigo a preocupação do convívio do homem com as aves e suínos ou com seus subprodutos, que poderiam gerar risco à saúde (Earn et al., 2002). A influenza aviária, incita a imaginação popular e as atualizações científicas produziram muitas recomendações sensatas dentro das convicções atuais, e outras, nem tanto. Todavia, podemos e devemos estabelecer alguns conceitos que auxiliem a compreensão dos mecanismos envolvidos na transmissão e manutenção do vírus, além de suas formas de apresentação e riscos à exploração avícola e suína, bem como de aspectos zoonóticos.

As definições de surtos e do agente etiológico dos mesmos orientam as práticas associadas à exploração animal e podem justificar o manejo de aves, suínos e seus subprodutos, e mesmo espécies selvagens, quando a influenza está envolvida, como risco ou como realidade. Sob este último aspecto, é conhecida desde a década de 30 a importância que outras espécies animais

podem assumir na manutenção dos vírus da influenza na natureza. Ou o que é mais grave, na transformação ou mutação dos vírus circulantes, facilitando a sua disseminação entre os humanos. São estes alguns dos fatores que tornam o surgimento de episódios de influenza imprevisíveis, e comprometem o sucesso de todos os programas de controle propostos (Oxford, 1998).

O recente surto da chamada influenza A, ou gripe suína, assolou o mundo desde março de 2009, inicialmente no México e daí a todos os continentes. O agravante é o fato de ser este episódio encarado como uma situação nova emergencial. Situação emergencial sem dúvida, mas já reconhecida e anunciada há muito tempo (Guan et al., 1996; Newman et al., 2008).

Em sua etiologia, está envolvido um vírus da família *Orthomyxoviridae*, o qual apresenta algumas correlações com a família *Paramyxoviridae*, que tem como representante o vírus da Doença de Newcastle das aves. Estes dois vírus são objetos de controle do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) do Brasil. O grande impacto econômico envolvido com as barreiras criadas quando da ocorrência de alguma destas enfermidades nas aves, é o melhor modelo brasileiro de atenção veterinária envolvendo serviços oficiais e privados, a fim de prevenir tais prejuízos. O MAPA também implementou o Programa Nacional de Sanidade Suídea, o qual monitora e rege as regras de controle de doenças de suínos a fim de garantir o comércio dos produtos derivados e de suínos.

A influenza suína ainda não é em 2010, uma enfermidade de controle nos suínos como objeto do programa, mas muitos resultados de pesquisa,

além dos apresentados aqui, devem redirecionar o monitoramento da influenza nos suínos. Estas medidas visam facilitar o controle de possíveis focos e minimizar o impacto zoonótico desta enfermidade quando da possibilidade de transmissão para humanos, fator que pode ser facilitado pela adaptação ou mutação do vírus em outras espécies, principalmente a espécie suína.

A versatilidade do vírus da influenza, associada às diferentes estratégias de mutação, tem permitido a circulação constante do mesmo em diferentes locais e espécies animais. Verifica-se que o mesmo apresenta momentos de letalidade elevada por motivos muitas vezes não totalmente esclarecidos, como foi o caso da gripe espanhola em 1918 (Reid & Taubenberger, 2003). Webster propôs, em 2006, que o aparecimento de subtipos altamente patogênicos do vírus está relacionado à possibilidade de replicação do mesmo em várias espécies animais. E principalmente à densidade da população na qual o vírus está presente. Segundo o autor, estes foram componentes relevantes no aparecimento dos subtipos H5N1 de alta patogenicidade, que desde 1997 vem causando várias epizootias e denotando o risco de uma nova pandemia de influenza.

Em suínos, tem-se verificado a prevalência do subtipo H3N2, além do H1N1 e, diferente do ser humano, com poucas alterações antigênicas e genéticas ao longo do tempo (Peiris et al., 2001). Em 1976, um acampamento de soldados, em New Jersey, foi palco de infecção por influenza H3N2, quando vários indivíduos apresentaram doença clínica e onde a participação dos suínos na geração do episódio parece ter sido decisiva (Gaydos et al., 2006).

Vários estudos têm sugerido que trabalhadores, em explorações comerciais de suínos, possuem risco maior de apresentar infecções com vírus

da influenza comuns ao homem e aos suínos (Gray et al., 2007). O risco do “*reassortment*” pode ser aumentado em situações onde o suíno participa na epidemiologia de alguns subtipos como o H3N2 e o H1N1, com evidências de que a possibilidade é real e atual (Zhou et al., 2000).

Visando contribuir para elucidar melhor a cadeia epidemiológica da influenza suína e os riscos que a mesma traz para a saúde humana foi realizado o presente trabalho. Para facilitar a leitura, esta tese será apresentada em dois capítulos. No primeiro, será feita a contextualização histórica da Influenza e conhecimento atual do vírus e da doença. O segundo trará um levantamento epidemiológico e a pesquisa de vírus em suínos no Estado do Paraná.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Histórico

Como já foi referenciado, a primeira descrição da influenza como enfermidade data de 492 a.C., feita por Hipócrates, seguida das ocorrências na idade média e da caracterização nas Américas como peste catarral (Garcia-Garcia & Ramos, 2006).

Em suínos o primeiro relato ocorreu em 1931, por Shope e colaboradores, apesar de no verão de 1918, a enfermidade já ser relatada clinicamente em suínos no meio Oeste dos Estados Unidos (Easterday, 1992). O vírus da influenza foi isolado em seres humanos em 1933, por Smith e colaboradores, dois anos após Shope ter demonstrado que a influenza suína era causada por vírus (Van Epps, 2006). O primeiro isolamento do vírus de aves selvagens ocorreu em 1961, na África do Sul, e apenas por volta de 1970 é que investigações sistemáticas começaram a catalogar a presença do vírus em várias espécies (Alexander, 2007). Desde o início das pesquisas com influenza suína até o momento, os subtipos H3N2, H1N1 e H1N2 têm sido identificados frequentemente com circulação em suínos em todo o mundo, com relatos na China e boa parte da Europa, além de focos do subtipo H9N2 co-circulando em suínos e aves e do H4N6 no Canadá (Peiris et al., 2001).

O vírus seria inserido, na classificação atualmente proposta, como vírus do tipo A, o qual infecta o homem e várias espécies animais. Já em 1936, Shope havia demonstrado a incidência de anticorpos contra o vírus em suínos e em seres humanos (Shope, 1936). O século XX foi palco de algumas pandemias de influenza quando, com a participação de algumas espécies animais, o vírus adaptou-se, com sucesso, ao ser humano. Desde o final do último século tem

se comprovado que o suíno é importante na adaptação do vírus da influenza ao ser humano, desde a primeira descrição de um surto em aves na Itália, por Perroncito, em 1878 (Lupiani & Reddy, 2009).

A análise da especificidade dos receptores virais do subtipo H9N2 mostrou que as amostras presentes em suínos preservaram uma alta afinidade com receptores do tipo $\alpha(2,6)$, comuns em humanos e pouca afinidade com receptores do tipo $\alpha(2,3)$, comuns às aves, fato determinado pela posição de certos aminoácidos na hemaglutinina (Ito et al., 1998), principalmente a leucina substituindo a arginina na posição 142. A identificação clínica da influenza suína pode se dar pela apresentação de sinais respiratórios leves com descarga nasal, tosse, febre e letargia, o que ao longo do processo, principalmente pelo modelo de exploração brasileira, se percebe pelo menor ganho de peso dos indivíduos. De outro lado, a presença da influenza na exploração pode simplesmente contribuir como fator secundário para o aparecimento de síndromes do complexo respiratório suíno, onde bactérias como o *Mycoplasma*, *Bordetella* e outros agentes são responsáveis por grandes prejuízos (Murphy, 1999). Nesta condição é onde deve-se empregar os maiores esforços para identificação e controle da enfermidade, ou da circulação viral, pois sua presença tende a ser silenciosa e a sua manutenção na exploração poderia, a médio prazo, facilitar o surgimento de novas variantes virais com comprometimentos adventícios ao foco principal. Guan et al. (1996), já haviam alertado para a possibilidade de circulação do vírus oriundo de aves, nos suínos na China. O subtipo H1N1 tem sido detectado com maior prevalência em suínos nos EUA desde 1998, e já em 2005 foi caracterizado um vírus circulando na população humana resultado de um triplo rearranjo de

diferentes subtipos do vírus (Newman et al., 2008). Van Reeth (2007), publicou revisão demonstrando que desde 1979 o vírus da influenza ocorre de forma epidêmica em suínos na América do Norte e na Europa, bem como a co-circulação em humanos. Como demonstrado por Garten et al. (2009), a ocorrência mais recente de um grande surto de influenza em humanos, mostrou que mesmo com similaridades entre o vírus sazonal e o pandêmico, as alterações antigênicas e genéticas facilitadas pela infecção no suíno, são determinantes na ocorrência de possíveis surtos. A conclusão do artigo de Myers et al. (2007), causa reflexão tendo sido publicado dois anos antes da pandemia de influenza de 2009, pois fomenta a pesquisa da circulação viral em diferentes espécies, e reforça a necessidade de monitoramento de pessoas envolvidas com a produção de suínos.

Em 1918, à época da gripe espanhola, já se havia superado a relação da enfermidade atrelada à “influência” da conjunção astral. Que como influência emprestou o nome à doença “influenza” (Lamb et al., 1996). Mas ainda registraram-se recomendações para o tratamento da mesma, que hoje soariam cômicas, como: “A influenza espanhola está grassando em Niterói, e os clínicos aconselham - como preservativo, Paraty com limão e açúcar; toda gente sabe que a melhor caninha e a mais bem preparada com limão, é só na Rua Barão de Itapetininga, 51”- ou o que é pior: “Nada de pânico: fumem Sudan!” (Bertucci, 2004). Diante destas recomendações é impossível não se perguntar como o futuro verá nossas práticas e convicções daqui à cem anos? Ou seja, assumimos o risco e o dever de criar regras e recomendações fundamentadas em nossas percepções da verdade e do correto, com o conhecimento que

dispomos. Nesta perspectiva é fácil comparar o número de informações daquela época com as disponíveis atualmente.

Por volta do ano de 1900 registrava-se a publicação de 9.000 artigos científicos por ano. Estatísticas publicadas em 2005, apontam para a geração de 2.465 artigos científicos por dia (*Economist*, 2005). Estes números revelam que a intensidade das mudanças de nossas convicções da verdade científica, muitas vezes baseadas em hipóteses, é algo muito dinâmico e perturbador, pois determina uma adaptação quase diária dos conceitos científicos.

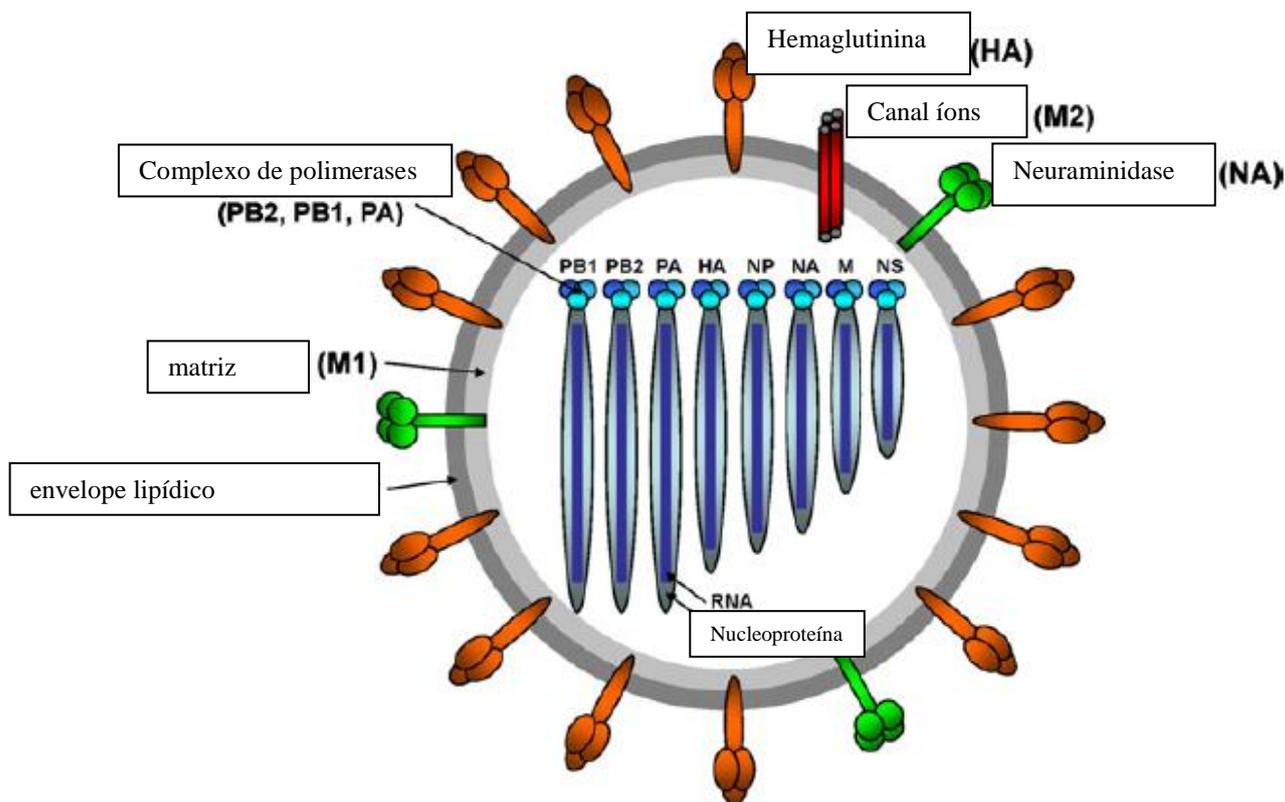
2.2- Agente etiológico

O *influenzavirus* é o gênero representante da família *Orthomyxoviridae*, composta por vírus envelopados com material genético baseado em RNA de fita simples, com polaridade negativa e segmentado. São classificados em três tipos ou espécies virais, denominadas de A, B e C, e em subtipos segundo a ocorrência das espículas do envelope, hemaglutinina e neuraminidase. Os subtipos estão presentes apenas no tipo A. Este RNA segmentado é composto por oito segmentos os quais codificam diferentes proteínas, (Quadro 1). Na figura 1 observa-se a representação dos componentes do vírus, com a organização espacial dos mesmos.

| Segmento de RNA | Proteína | Função |
|------------------------|-----------------|---|
| 1 | PB-2 | Polimerase que suporta a formação de transcriptases |
| 2 | PB-1 | Sub-unidade catalítica da RNA-polimerase, proteína participante da apoptose |
| 3 | PA | RNA-polimerase |
| 4 | HEMAGLUTININA | Principal epítipo e receptor viral |
| 5 | NP | Nucleoproteína envolvida na replicação |
| 6 | NEURAMINIDASE | Epítipo envolvida na eluição viral |
| 7 | M1- MATRIZ | Interage com o genoma, está envolvida na montagem do capsídeo |
| | M2 | Forma canal iônico, controla pH intracelular e decapsidação |
| 8 | NS-1 | Controla pós-transcrição, antagonista interferon |
| | NS-2 | Transporte do RNA do núcleo e montagem do vírus |

Fonte: Garcia-Garcia (2006)

QUADRO 1 - SEGMENTOS DE RNA DO VÍRUS DA INFLUENZA A, PROTEÍNAS CODIFICADAS E SUAS FUNÇÕES



Fonte: adaptado de Lee & Saif (2009)

FIGURA 1: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DO VÍRUS DA INFLUENZA A

A divisão dos vírus da influenza em tipos, tem como base a identidade de duas proteínas internas. A nucleoproteína (NP) e a proteínas de matriz (M), associadas com o momento de decapsidação muitas vezes. Os vírus de um mesmo subtipo compartilham entre si os antígenos hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), duas glicoproteínas que determinam diferentes antigenicidades. Nos tipos A e B, a hemaglutinina e a neuraminidase sofrem variações genéticas, que são a base do surgimento de novas cepas do vírus, e o tipo C é antigenicamente estável. Os vírus do tipo A são os mais freqüentes entre os mamíferos e os responsáveis pela influenza aviária, havendo, portanto, a possibilidade de circulação deste tipo em diferentes espécies, o que para um vírus com intensidade de mutação alta (10^{-3} a 10^{-4}) é um facilitador

para o surgimento de novos subtipos quando a barreira interespecies é quebrada. Os vírus do tipo B ocorrem mais intensamente no homem, presentes nas epidemias anuais de influenza e já detectados também em várias espécies animais (Capua & Alexander, 2002), como o exemplo dos lobos marinhos em Punta del'Este, no Uruguai (comunicação pessoal – Dr. Juan Arbiza). Há ainda uma nova proposta de classificação do vírus que inclui um quarto tipo viral também chamado *Thogotovirus*, ou tipo D, aparentemente característico de insetos, que ocasionalmente pode infectar mamíferos, e ainda um quinto tipo chamado *Isavirus*, responsável pela anemia infecciosa dos salmões (Alexander, 2007).

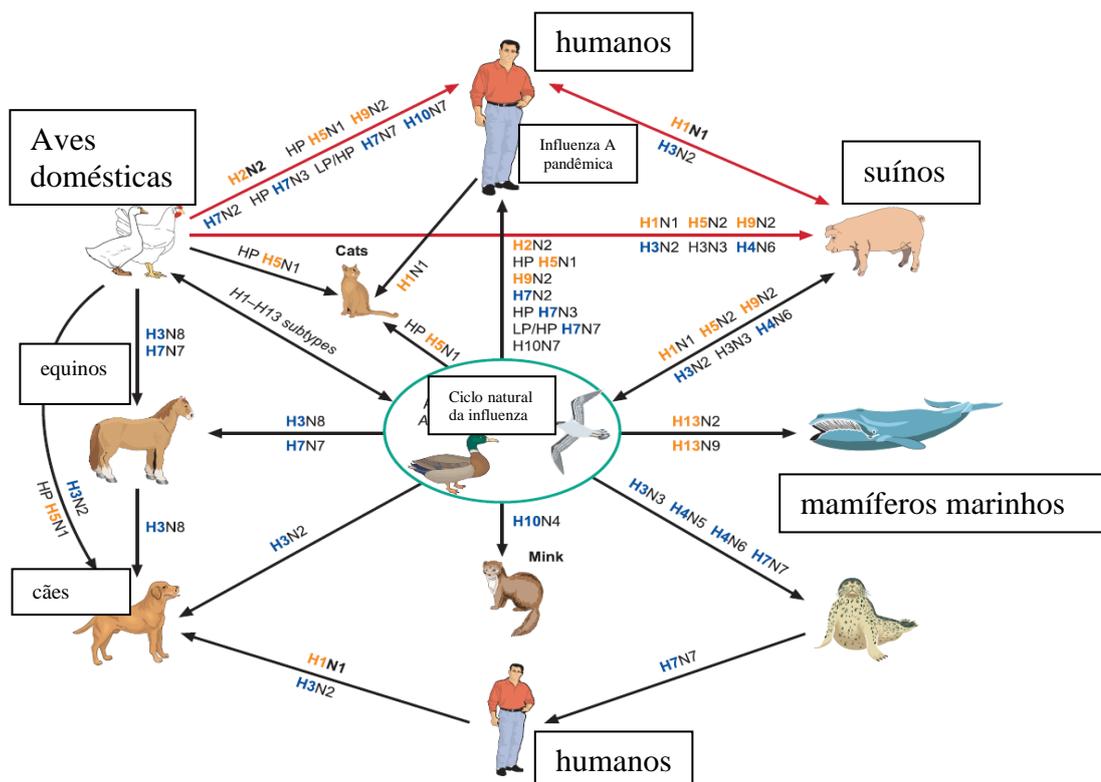
Entre os vírus da influenza do grupo A que infectam o homem, outros mamíferos e aves, são conhecidas 16 diferentes proteínas HA e 9 proteínas NA, que, por possíveis combinações entre estas, identificam determinado subtipo do vírus. Os vírus da influenza são, portanto, identificados pelo tipo (A, B ou C principalmente) e subtipo determinado por suas proteínas HA, numeradas de 1 a 16, e NA, identificadas de 1 a 9. Todas as principais combinações entre as hemaglutininas e neuraminidases têm sido isoladas de espécies aviárias, principalmente entre as espécies aquáticas selvagens (Webster & Hulse, 2004).

A circulação do vírus em várias espécies animais e a intensa taxa de mutação de alguns subtipos, exigem, no controle da influenza, uma estratégia global que extrapola as especialidades científicas. O que fomenta a interdisciplinaridade, uma vez que estas mutações poderiam favorecer a quebra da barreira interespecies.

A participação dos suínos na epidemiologia do vírus da influenza é um capítulo de extrema importância para o sucesso das medidas de controle, já que esta espécie poderia facilitar a transmissão da influenza aviária ao ser humano ou mesmo contribuir na geração de subtipos do vírus com alta patogenicidade, tanto para humanos como para as aves (Brown, 2000a).

2.3- Taxa de mutação viral

A grande versatilidade do vírus da influenza em infectar diferentes espécies animais, justifica a grande preocupação com a detecção precoce de surtos e o monitoramento da circulação viral nas diferentes espécies animais (Figura 2).



Fonte: adaptado de Forrest & Webster (2010)

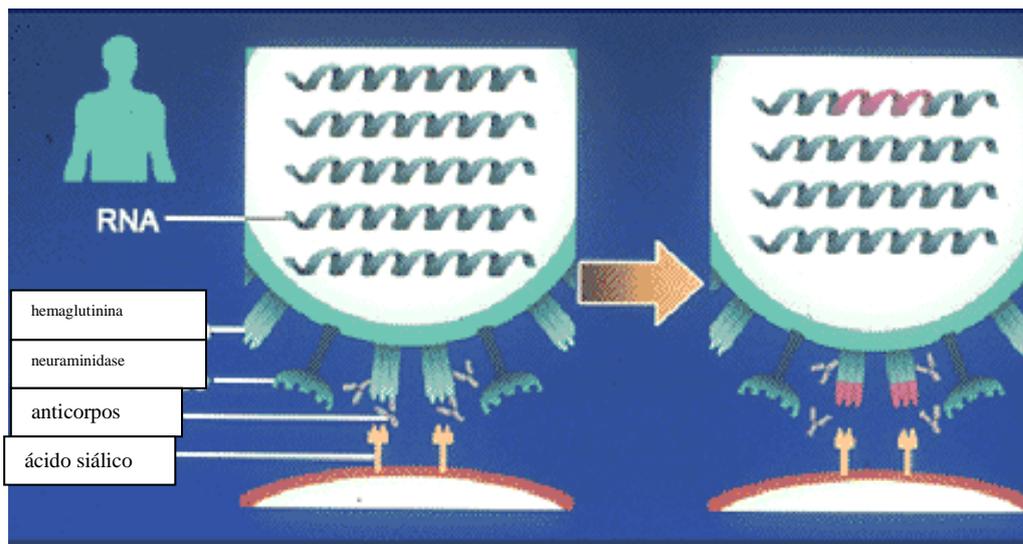
FIGURA 2: RELAÇÕES ENTRE AS ESPÉCIES ANIMAIS SUSCEPTÍVEIS E OS DIFERENTES SUBTIPOS DE INFLUENZA IDENTIFICADOS ATÉ O MOMENTO

Caracterizações realizadas no passado mostram que a capacidade do vírus em mudar e se adaptar a novos hospedeiros ocorre a todo momento. A situação da gripe de origem suína advinda do México em 2009, como um triplo rearranjo do vírus não é nova e na década de 90, Bean et al. (1992) já haviam demonstrado esta possibilidade. O vírus do subtipo H3 que gerou na população humana grande epidemia em 1968, teve seu progenitor identificado sendo originado de patos provavelmente em 1965. Desde então a similaridade com o vírus humano foi determinada com a acumulação de uma taxa de mudança de 3,4 aminoácidos por ano. No mesmo trabalho identificou-se um ancestral de vírus suíno oriundo do rearranjo de duas cepas de origem humana e duas de origem aviária. Pode-se concluir que pequenas mudanças são capazes de gerar grandes diferenças fenotípicas e permitir a adaptação viral.

A manutenção do vírus na exploração significa, como em outras situações de controle, uma pressão de seleção no agente quando, na tentativa de controlar o problema, os indivíduos lançam mão dos mecanismos da imunidade adaptativa, e por meio da ação de anticorpos e células de defesa, procuram eliminar o agente infeccioso. Na prática significa dizer que o vírus da influenza encontrará diferentes indivíduos com uma gama diferente de anticorpos, o que após três ou quatro ciclos de replicação e infecção nestes indivíduos, pode imputar uma intensidade de mutação ao vírus, grande o suficiente para o aparecimento de uma nova cepa viral, frequentemente dentro do mesmo subtipo. Mesmo as mutações ocorrendo ao acaso, a maior velocidade de adaptação do vírus frente às diferentes respostas imunes, determinaria a maior intensidade observada.

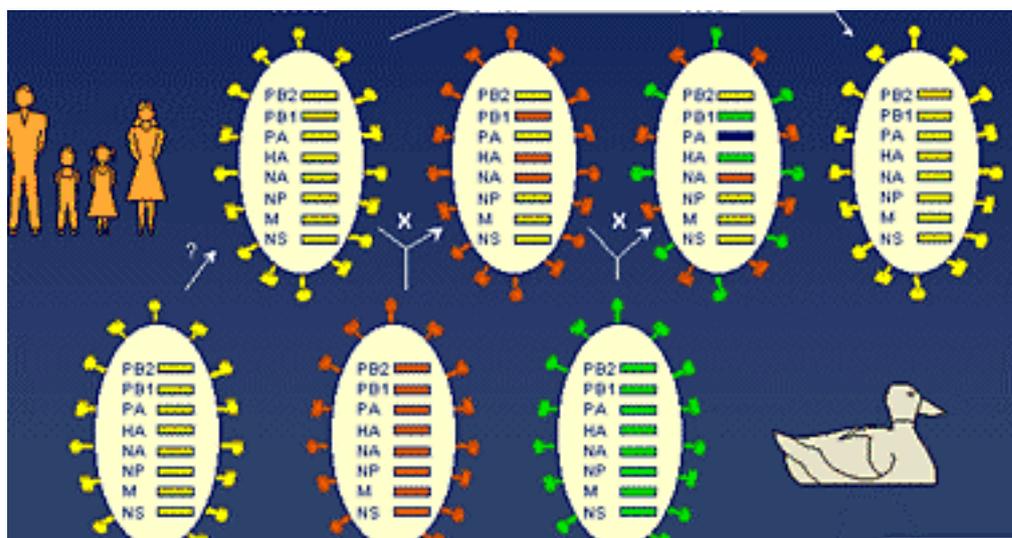
Estas variações, que são comparadas aos mecanismos envolvidos na manutenção das epidemias sazonais de influenza no ser humano, são facilitadas pelas mutações do tipo “*drift*” apresentadas pelo vírus da influenza. Quando pequenas alterações no genoma, não maiores do que 2-3% do mesmo, determinam o aparecimento de novas cepas com pouca imunidade cruzada entre os subtipos (Andreasen & Sasaki, 2006) (Figura 3).

Historicamente a taxa de mutação do tipo “*drift*” entre os suínos é muito menor quando comparada aos humanos (Olsen et al., 2000), mas não há dúvidas de que ela acontece, determinada pelos mesmos fatores. A característica do genoma do vírus de ser composto por RNA segmentado é o que favorece o tipo de mutação chamada de “reassortment” ou rearranjo, ou mesmo de “*shift*” antigênico, conforme a Figura 4. Devido ao vírus da influenza ser segmentado, o rearranjo genético pode ocorrer quando uma célula do hospedeiro é infectada simultaneamente com vírus de dois diferentes subtipos. Se uma célula é infectada com duas cepas do vírus do tipo A, por exemplo, alguns dos vírus da progênie poderão conter uma mistura dos oito segmentos do genoma de cada uma das duas cepas (*reassortment*) (Wright et al., 2007)



Fonte: adaptado de: Belshe, et al. (2003)

FIGURA 3: VARIAÇÃO ANTIGÊNICA DETERMINADA POR PEQUENAS ALTERAÇÕES NO GENOMA (“DRIFT” ANTIGÊNICO) DO VÍRUS



Fonte: adaptado de: Belshe, et al. (2003)

FIGURA 4: VARIAÇÃO ANTIGÊNICA DETERMINADA POR REARRANJO GENÔMICO ENTRE DOIS VÍRUS (“SHIFT” ANTIGÊNICO)

2.4 - Barreira interespécies

A afinidade do vírus da influenza com diferentes espécies animais, também chamada de barreira interespécies, faculta aos diferentes subtipos uma taxa de mutação dentro da espécie infectada, tanto maior quanto maior a densidade de indivíduos na população em questão, mas com pouca chance de adaptação a outra espécie sem a quebra desta barreira interespécie (Ito, 2000a; Webster & Hulse, 2004). A restrição da circulação do vírus da influenza em determinadas espécies é dada, principalmente, pela afinidade de diferentes subtipos virais, por meio da hemaglutinina viral com os receptores encontrados nas células hospedeiras (Ito, 2000b). Nas células eucarióticas encontra-se em abundância na membrana plasmática, uma variada gama de glicoconjugados e, dentre os carboidratos presentes nos glicoconjugados de membrana destacam-se os ácidos siálicos, uma família de carboidratos complexos de nove carbonos, normalmente ligados a outros carboidratos por meio de ligações α -cetósídicas. Estes receptores de ácido siálico presentes em diferentes células ocorrem na natureza em cerca de 50 tipos.

Como componentes de glicoconjugados, os ácido siálicos são encontrados ligados a hexoses, como $\alpha(2,3)$ ou $\alpha(2,6)$ ou β -Gal e ligados a outros ácidos siálicos como $\alpha(2,8)$. Estes ácidos siálicos desempenham muitas funções fisiológicas no organismo, como mediadores de renovação celular, onde sua presença nos eritrócitos é determinante, além de ações na resposta inflamatória e imune (De Fatima et al., 2005). No entanto sua função como receptores celulares específicos do vírus da influenza é de grande importância na compreensão dos fatores envolvidos na disseminação da enfermidade, também no seu diagnóstico e controle.

Os subtipos do vírus da influenza comum às aves, ligam-se preferencialmente aos receptores de ácido siálico $\alpha(2,3)$ Gal presentes abundantemente no epitélio intestinal de aves, principalmente as aquáticas, além do epitélio respiratório das mesmas e ausentes em humanos, a não ser eventualmente no sistema respiratório inferior em localizações profundas e escassas. Já os vírus comuns aos humanos ligam-se preferencialmente aos receptores de ácido siálico com ligações do tipo $\alpha(2,6)$ Gal, presentes principalmente no epitélio da traquéia, e ausente nas aves (Ito, 2000). Mesmo dentro das aves existe uma diferença quanto a especificidade dos receptores, dependendo da posição da galactose no ácido siálico (Gambaryan et al., 2005a). Os vírus de aves têm capacidade limitada de replicação em humanos, fazendo com que a transmissão direta das aves ao homem seja dificultada (Beare & Webster, 1991). Já em suínos, tanto o vírus aviário como o vírus originário do ser humano possuem ótima capacidade de replicação, pois nas células epiteliais da traquéia dos suínos ambos receptores, $\alpha(2,3)$ e $\alpha(2,6)$ são encontrados.

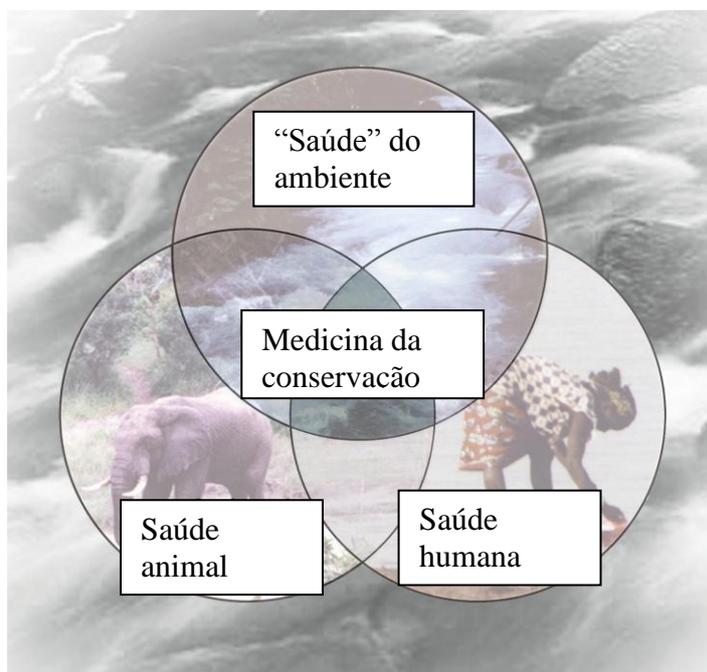
Neste momento, quando, ao acaso, dois vírus diferentes poderiam infectar uma mesma célula e estariam se replicando nesta célula na traquéia dos suínos, é que poderia surgir um terceiro vírus, recombinado com boa capacidade de replicação no ser humano (Michiels et al., 2006). A crescente preocupação com o surgimento de uma nova pandemia de influenza reside justamente neste fato. Apesar das diferentes cepas do vírus serem espécie específica, ou seja, vírus aviários infectarem apenas aves, e assim por diante, em determinadas situações, vírus provenientes de seres humanos podem infectar suínos e conseguir efetivamente replicar, da mesma forma que vírus

aviários (Horimoto & Kawaoka, 2001). Nestas células destes suínos, infectadas com duas cepas diferentes do vírus, um rearranjo poderia ocorrer entre os oito segmentos de cada subtipo formando uma nova cepa, com constituição antigênica totalmente diferente, mas com capacidade de replicação nos seres humanos (Webster et al., 1992).

Fica assim evidente, não apenas a importância da influenza como doença respiratória de suínos, mas especialmente o papel crucial dos suínos na epidemiologia de surtos de vírus de influenza em humanos e do papel dos humanos como fonte de infecção para suínos (Brown & Alexander, 2000). As relações entre as diferentes espécies e o ambiente, tomaram uma grande importância na detecção de várias enfermidades. A convivência entre várias espécies, selvagens e domésticas, traz uma preocupação adicional, onde os vírus com maior patogenicidade podem vencer as barreiras inter-espécies, e as medidas associadas a vacinação interferir na evolução viral (Philippa et al., 2005). Ao mesmo tempo devem garantir a qualidade de todos os componentes envolvidos, o que gerou uma nova especialidade para detecção destas alterações, a medicina da conservação (Caron & Thomaz-Soccol, 2009). A figura 5 ilustra quais as relações envolvidas na geração desta especialidade.

Suínos são naturalmente infectados com viroses do tipo H1N1, H3N2 e, mais raramente, H1N2, sendo estas infecções enzoóticas ao redor do mundo. Isto inclui o vírus H1N1 da influenza suína clássica, o vírus H1N1 similar ao encontrado em aves, bem como o H1N2 com H1, similar à H1N1 encontrada em humanos. Vírus da influenza similares ao humano H3N2 infectam suínos e podem causar sinais clínicos da doença (Olsen, 2002). Há evidências que sugerem que diferentes variantes dos vírus H3N2 têm sido transmitidas aos

suínos desde 1968 (Van Reeth, 2003). Estas variantes podem persistir nos suínos após elas terem desaparecido da população humana. A influenza suína foi inicialmente observada nos Estados Unidos durante a pandemia humana de 1918, e em 1933 permitiu a associação da doença com o vírus de isolados suínos. Os sinais clínicos da doença nos suínos são muito similares aos encontrados em humanos (Brown, 2002b).



Fonte: adaptado de www.tufts.edu/vet/ccm

FIGURA 5: A MEDICINA DA CONSERVAÇÃO, REPRESENTADA COMO ÁREA DE CONJUNÇÃO ENTRE AS ÁREAS DE SAÚDE HUMANA, SAÚDE ANIMAL E MEIO AMBIENTE

Em 1979, foram isoladas na Europa amostras de vírus da influenza suína, que possuíam genes de vírus de origem aviária. Estudos posteriores mostraram que os subtipos H3N2 de vírus que circulavam em suínos eram originários de ancestrais aviários e já haviam sofrido algum tipo de rearranjo, o que denota a importância do monitoramento da circulação de vírus da influenza

em suínos para detecção de potenciais cepas pandêmicas (Campitelli et al., 1997).

Os suínos também são susceptíveis à infecção experimental com todos os subtipos dos vírus A da influenza aviária, sendo que o subtipo H9N2 da influenza chegou a ser isolado de suínos em Hong Kong (Brown, 2002c; Capua & Alexander, 2002). A transmissão interespécies do vírus da influenza tem sido demonstrada repetidamente, no entanto a presença das barreiras inicialmente discutidas restringem esta disseminação.

A origem dos casos pandêmicos oriundos da Ásia e recentemente do México, são o maior reflexo da importância da medicina da conservação. A convivência íntima de diferentes espécies animais com o homem e as condições de manejo no ambiente, muitas vezes precária, aceleram e facilitam o surgimento dos novos vírus. Também sedimentam a necessidade das estratégias de controle (Talavera, et al., 2005).

2.5- Patogenicidade

A hemaglutinina viral é a principal responsável pela restrição entre hospedeiros, primariamente devido ao seu papel no reconhecimento e adsorção à célula do hospedeiro. Naturalmente outras proteínas envolvidas na decapsidação também desempenham papel fundamental na patogenicidade viral, determinando o sucesso de infecções produtivas. Para que esta adsorção ocorra, uma alteração conformacional na hemaglutinina, que é um trímero, deve ser desencadeada pela ação de proteases do hospedeiro num ponto da hemaglutinina chamado sítio de clivagem (Tong et al., 1998). Paralelamente este processo pode ser facilitado pela ação de proteases bacterianas,

presentes eventualmente no hospedeiro (Mancini et al., 2005). O pH do endossomo formado após a adsorção e penetração do vírus é determinante para a fusão do envelope viral e da membrana celular culminando com o sucesso da infecção, quando se pode observar as alterações conformacionais da hemaglutinina que permitem esta fusão (Wharton et al., 1995). A estabilidade deste sítio de clivagem é determinante para a patogenicidade da cepa viral, e a abundância das proteases em determinados sítios do corpo podem determinar a manifestação da enfermidade. O quadro clínico pode ficar restrito ao aparelho respiratório, ou evoluir para uma síndrome afetando vários sistemas (Cross et al., 2001; Webster & Hulse, 2004).

As proteases que clivam as cepas virais não patogênicas são encontradas em número limitado de células ou tecidos, o que resulta em infecções localizadas, propiciadas pela clivagem extra-celular da hemaglutinina por enzimas semelhantes à tripsina. As hemaglutininas de cepas com alta patogenicidade são clivadas no meio intracelular, dependentes do pH, o que possibilita a ocorrência de síndromes associadas a infecção atingindo diferentes órgãos, independentemente da clivagem extra-celular (Steinhauer, 1999).

Dentre os subtipos do vírus da influenza há uma preocupação maior com as cepas de origem aviária ditas de alta patogenicidade, sendo a cepa H5N1 a que tem sido mais prevalente principalmente na Ásia durante a década de 90, e a partir de 2000 com aparecimento na Europa em aves selvagens. Entre os subtipos de alta patogenicidade classificam-se até o momento os que apresentam as hemaglutininas além de H5, as H7 e H9. São estes subtipos que se apresentaram com alta patogenicidade nos focos recentes, sendo que

alguns focos podem apresentar vírus com estas mesmas hemaglutininas mas com baixa patogenicidade. A caracterização da cepa, após sua manifestação nas aves, é realizada em laboratório posterior ao seu isolamento mediante a inoculação, tanto intra-cerebral como intra-venosa, em pintos de um dia de idade, onde após monitoramento do efeito verifica-se a mortalidade e atribui-se a patogenicidade.

Quando se extrapola este efeito para a compreensão de como o vírus interage com a célula, observam-se algumas diferenças. Os vírus de baixa patogenicidade, onde se incluem os endêmicos na população humana, os presentes em suínos até o momento no Brasil, além do H5N1 presente na América do Norte e os prevalentes no México, caracterizam-se pela apresentação de um sítio de clivagem estável na hemaglutinina, que só é clivado por proteases presentes principalmente na traquéia, o que limita a intensidade de infecção além da disseminação no organismo. Algumas cepas, após a mutação nos aminoácidos que formam o sítio de clivagem, tornam este sítio instável, permitindo que várias proteases quebrem este sítio, favorecendo a infecção. Este é o principal mecanismo de aquisição de patogenicidade do vírus da influenza, que pode ser acompanhado por mutações em outros pontos que poderiam favorecer a adsorção e penetração viral, aumentando também a patogenicidade (Cross, 2001).

O seqüenciamento de nucleotídeos de todo genoma do vírus da influenza revelou que a pandemia Asiática de 1957, provocada pela circulação de um vírus da influenza A/H2N2 e a pandemia de Hong Kong de 1968 (introdução de um influenza vírus A/H3N2) foram causadas por vírus da

influenza resultantes de rearranjo antigênico (Scholtissek et al., 1978; Li et al., 2004a).

Contudo, a pandemia de 1918 de influenza (gripe espanhola) aparentemente afetou a população humana sem o rearranjo antigênico. Claas *et al.* (2000) caracterizaram em 1996, amostras de vírus isolados de humanos, oriundos de aves, sem o evento do rearranjo viral. Este fato exige provavelmente que o vírus se adapte a um hospedeiro mamífero inicialmente. Talvez isto tenha ocorrido o caso do vírus da pandemia de 1918 (A/H1N1). Este vírus apresentou certamente propriedades que lhe conferiram extrema virulência. Acredita-se que, apesar da hipótese acima ser factível, a probabilidade para que determinadas cepas se estabeleçam na população humana é baixa, limitando por isso a possibilidade de rearranjos antigênicos no futuro (Beare, 1991; Ito, 2000a).

2.6- Controle

Segundo as recomendações da OIE, de forma geral, a utilização de vacinas para o controle da gripe aviária apresentaria vantagens e desvantagens. Os argumentos contra a utilização de vacinas podem ser os seguintes:

- o uso das vacinas provavelmente não auxiliaria na implementação de medidas de biossegurança, quando equivocadamente o produtor tem a sensação de que outras medidas são menos importantes uma vez que se está vacinando;
- a vacinação pode evitar o surgimento dos sinais clínicos individualmente mas não proporcionaria a eliminação do vírus no ambiente necessariamente;

- a presença de animais vacinados quando na presença do vírus poderia facilitar o surgimento de novas variantes virais pela pressão de seleção, o que se explica pelo “drift” antigênico;
- a vacinação poderia favorecer o surgimento de portadores assintomáticos, aumentando a disseminação viral.

De outra forma os argumentos favoráveis a utilização de vacinas são:

- a vacinação prevenindo a doença pode preservar a indústria de um país especialmente na ocorrência de focos;
- a vacinação das aves poderia minimizar a possibilidade de transmissão para humanos e emergência de uma cepa pandêmica;
- poderão se verificar falhas vacinais com a adoção de animais sentinelas, não vacinados alertando para potenciais transmissões;
- a vacinação é uma etapa necessária para possível erradicação do vírus em determinada área quando todos os indivíduos deveriam tornar-se negativos;
- este protocolo não interferiria no controle da doença em humanos, sendo até uma necessidade em alguns casos.

Na realidade mundial atualmente pode-se concluir que as medidas de biossegurança devem ser o principal foco no controle da influenza e o impacto da vacinação tem características particulares em cada país. A decisão de se utilizar ou não a vacinação deve ser baseada em vários aspectos como já mencionados nas vantagens e desvantagens e o surgimento de novas tecnologias na produção de vacinas será determinante nestas decisões. A utilização de produtos enquadrados na chamada **DIVA** (Differentiating Infected from Vaccinated Animals – diferenciação de animais infectados dos vacinados) é uma realidade cada vez mais promissora no controle de várias enfermidades

incluindo a influenza. Neste sentido estas tecnologias, assim como das chamadas “vacinas mucosas”, devem minimizar as desvantagens na utilização de vacinas e favorecer o controle da influenza no futuro (Won-Lee et al., 2004; Capua & Marangon, 2007).

Na prática, diferentes estratégias de vacinação devem ser avaliadas no intuito de prospectar o impacto do uso das mesmas, comparadas aos métodos atuais de controle. Todas as interações possíveis devem ser aventadas, pois a rede de inter-relações que uma possível pandemia ou mesmo panzootia de influenza incita exige análises coerentes e planos abrangentes no seu controle (Hartvigsen et al., 2007).

Assim várias estratégias podem contemplar o alerta antecipado, garantindo o futuro não apenas das explorações suínas e aviárias, bem como a saúde humana, pois, se o vírus da influenza, tanto humana como aviária tem a capacidade de infectar e se replicar nos suínos, a vacinação de trabalhadores da suinocultura assim como dos próprios suínos poderá contribuir para o controle da influenza como pandemia (Jong et al., 2001); e apesar de ser um protocolo precoce e, no Brasil, distante do foco de influenza aviária especificamente, será fundamental num plano global de prevenção, exigindo ações inter-disciplinares coesas e objetivas que visam benefícios a longo prazo, tanto para a saúde humana como para a saúde animal. Como ficou evidente no último episódio de influenza em 2009, os cinco pontos considerados por Gross, 1996, são fundamentais para se minimizar o impacto de possíveis pandemias e da mesma forma de panzootias. Estes pontos são:

- 1) Reconhecimento rápido da nova cepa viral;

- 2) Rápido levantamento epidemiológico da população afetada, com prevalência, estratégias de detecção e impacto da doença;
- 3) Identificação da origem da nova cepa;
- 4) Definição dos grupos alvos para vacinação;
- 5) Compreensão do papel das drogas antivirais.

3- LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA INFLUENZA SUÍNA NO PARANÁ, SUL DO BRASIL

3.1- INTRODUÇÃO

Na prática dos estudos epidemiológicos, todo bom gerenciamento de risco, está associado à relevância e qualidade da base de dados para cada enfermidade. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como entidade reguladora de estratégias e medidas relacionadas a minimização dos riscos de epizootias e panzootias, tradicionalmente recomenda a análise periódica da ocorrência de enfermidades que geram barreiras sanitárias. Estas servem para de orientar os protocolos de trânsito de animais e de medidas eficazes de controle. A influenza, tanto “aviária” na década de 90 como mais recentemente a “suína” em 2009, está sujeita a estas medidas e as exige de forma premente. Na atualidade apenas a influenza aviária é objeto de controle oficial e determina barreiras sanitárias. Mas a influenza suína poderá ser considerada no mesmo contexto futuramente, uma vez que mais informações vêm sendo geradas.

Sendo assim, as próprias recomendações da OIE foram ao longo do tempo acompanhando a necessidade do alerta precoce, e detecção da ocorrência de focos ao redor do mundo. Dentro de uma expectativa hierárquica, a declaração de focos sempre esteve associada ao isolamento e caracterização do agente causador, como exemplo a influenza, em alguma espécie de interesse. No entanto, a dificuldade e a limitação, relacionadas ao isolamento viral, são compreensíveis devido à grande gama de profissionais envolvidos com coleta transporte, manipulação de amostras, o que

frequentemente cria um gargalo na cadeia epidemiológica e compromete decisões de controle de trânsito e comércio de produtos de origem animal principalmente. Nesta cadeia hierárquica é quando a monitoria ativa ou passiva de animais por meio do levantamento sorológico adquire relevância, pois está relacionada a uma maior sensibilidade de testes seguros. Ou seja, que não comprometem a biosseguridade e podem orientar outras medidas antes da declaração de focos, mas com celeridade e eficácia.

Com o advento das técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) a caracterização de amostras, permitiu inferir a ocorrência de agentes infecciosos a partir de amostras de campo, com rapidez e qualidade. E ainda estas técnicas garantem o conhecimento dos subtipos virais, o que permitiria análise e previsões de comportamento evolutivo do vírus, origem geográfica e qualidade de estratégias de prevenção. Assim, o presente estudo buscou implementar a sequência lógica na detecção da influenza suína, realizando inicialmente um levantamento sorológico de amostras de todo o Estado do Paraná, e na sequência a detecção da presença do vírus em amostras de tecido respiratório de suínos em abatedouro, preferencialmente amostras oriundas de lesões típicas do sistema respiratório.

3.2- OBJETIVOS

-Objetivo Geral

Determinar a soroprevalência em suínos no Paraná e conhecer o subtipo de vírus circulante

-Objetivos Específicos

-Determinar a soroprevalência contra o subtipo H3N2

-Correlacionar a taxa de soroprevalência com as condições de densidade populacional

-Correlacionar a positividade de anticorpos com condições climáticas

-Fazer isolamento viral em ovos embrionados de galinha

-Identificar molecularmente por meio da RT-PCR o vírus

3.3- METODOLOGIA

A análise sorológica pode ser uma ferramenta importante em levantamentos epidemiológicos, principalmente quando o isolamento viral, não representa uma possibilidade de rotina. Deve ser levado em conta que a busca por anticorpos vai refletir uma situação epidemiológica que, no caso da influenza suína no Brasil, devido à ausência de vacinas, estará sujeita aos diferentes momentos de infecção e convalescência com picos de anticorpos entre 20 e 40 dias após a infecção ou alterados em caso de re-exposição. Esta inferência pode ser feita devido à ausência de vacinas. O resultado individual dentro da população animal deve ser avaliado com critério, mas a análise global da distribuição e tendência dos resultados podem determinar medidas de detecção da ocorrência.

Na prática o impacto da declaração de um foco de influenza pelas agências oficiais de controle é devastador economicamente, principalmente quando se tratam de subtipos de alta patogenicidade. Assim a declaração de foco, em aves e suínas deve ser precedida do isolamento do vírus e da caracterização do mesmo. O isolamento é normalmente realizado por inoculação do material suspeito em ovo embrionado de galinha, após no máximo três passagens e a caracterização, que pode atualmente ser orientada pelo seqüenciamento de regiões pré-determinadas do genoma do vírus.

Neste momento é relevante a compreensão de que as técnicas moleculares como a RT-PCR ganharam espaço pela dificuldade normal do isolamento de amostras de vírus em tecidos heterólogos, e mesmo em ovo embrionado, apesar dos vírus de origem suína replicarem melhor nestes sistemas,

dependendo da fase de infecção que as Amostras foram colhidas (preferencialmente na fase aguda da doença). Outro fator relevante é que, mesmo com o sucesso destas técnicas, a morosidade das mesmas pode comprometer o sucesso das medidas de controle. Desta forma a hipótese inicial de nosso trabalho foi de que os resultados de inoculação em ovos embrionados, teriam pouca sensibilidade, mesmo após sucessivas passagens, e que a RT-PCR poderia garantir a detecção dos positivos com maior sensibilidade e especificidade, como é normalmente na rotina de diagnóstico de outras enfermidades. O processamento de amostras no laboratório segue um algoritmo descrito com a finalidade de determinar a triagem de material suspeito e as provas relacionadas tanto a este momento como a destinação nos casos de resultados inconclusivos.

No presente trabalho procurou-se realizar a detecção viral de forma direta e indireta. A detecção por via indireta optou-se por trabalhar com a técnica de Inibição da Hemaglutinação (HI), com a titulação de anticorpos, mas neste caso com o vírus do teste sendo conhecido. Para a detecção do vírus trabalhou-se com o RT-PCR. O algoritmo usado está representado na Figura 6. Trabalhou-se como hipótese que seriam encontrados animais sororreagentes e caso a mesma se confirmasse seria buscado o isolamento viral e a identificação molecular.

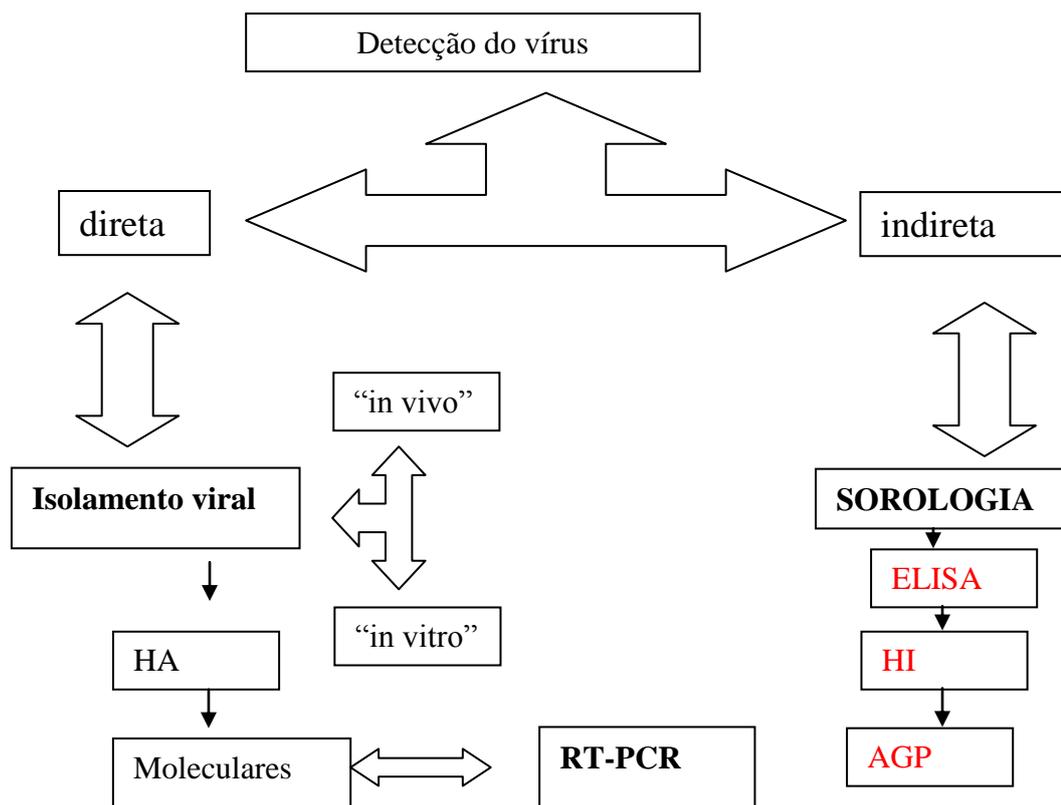


FIGURA 6: ALGORÍTIMO PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFLUENZA

3.4 - MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1- Análise sorológica

3.4.1.1- Amostras de soros

Entre maio e novembro de 2003, 675 amostras de soro suíno foram selecionadas, de um total de 5327 coletadas em várias cidades do Estado do Paraná, agrupadas nas regionais da Secretaria da Agricultura do Estado (SEAB). A escolha das amostras foi realizada para que todas as regionais estivessem representadas.

Os animais eram provenientes de duas categorias de propriedade com diferentes condições de manejo. A primeira foi denominada de criatórios (CS) que representava propriedade com pequeno número de animais sem manejo nutricional ou sanitário adequado. A segunda chamou-se granjas (GS) que representavam propriedades com manejo nutricional e sanitário adequado. De cada região escolheu-se soro de número variável de animais (Quadro 2). Do total de 675 amostras, 482 eram provenientes de 74 granjas e 193 provenientes de 90 criatórios de suínos.

| Região do Paraná | Criatório Suíno | Granja de Suíno |
|--------------------|-----------------|-----------------|
| Apucarana | 15 | 20 |
| Campo Mourão | 08 | 30 |
| Cascavel | 15 | 70 |
| Cornélio Procópio | 10 | 17 |
| Curitiba | 07 | 10 |
| Francisco Beltrão | 20 | 76 |
| Guarapuava | 07 | 40 |
| Irati | 10 | 0 |
| Ivaiporã | 12 | 11 |
| Jacarezinho | 10 | 04 |
| Laranjeiras do Sul | 08 | 15 |
| Londrina | 05 | 08 |
| Maringá | 07 | 30 |
| Paranaguá | 02 | 05 |
| Paranavaí | 10 | 07 |
| Pato branco | 06 | 15 |
| Ponta Grossa | 11 | 16 |
| Toledo | 12 | 70 |
| Umuarama | 10 | 30 |
| União da Vitória | 08 | 08 |
| TOTAL | 193 | 482 |

QUADRO 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS 675 AMOSTRAS SELECIONADAS CONFORME A REGIÃO DO PARANÁ

O sangue foi coletado assepticamente por punção venosa, donde se separou o soro para teste. Animais de várias idades e ambos os sexos foram amostrados aleatoriamente.

3.4.1.2- Técnica de Inibição da Hemaglutinação

Testes de Inibição da Hemaglutinação (HI) foram realizados em microplacas de 96 poços com fundo em V, segundo o procedimento adaptado do *WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance* (2002), com utilização de Kaolin ao invés de RDE (receptor-destroying enzyme) e hemácias de peru por estas terem apresentando maior sensibilidade nos testes prévios de HA.

Soro padrão hiperimune anti-influenza A/PANAMA/2007/99/H3N2- CDC-WHO foi utilizado como controle positivo e o subtipo viral do teste de HI foi o H3N2 (passagem n°223) de origem humana, e gentilmente cedido pelo laboratório de virologia do HC- UFPR (Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná). O vírus apresentou maior título no teste de hemaglutinação quando foi utilizado hemácias de peru (dados não mostrados).

As hemácias foram utilizadas em suspensão a 0,75% em PBS pH 7,2, após três lavagens sucessivas realizadas por centrifugação a 500g por 5 minutos em centrífuga a 8°C e sempre descartando o sobrenadante. Após duas horas em temperatura ambiente, procedeu-se a leitura visual da HI, apesar da possibilidade da leitura após 30 minutos como determina o padrão. Como critério de positividade foi considerado amostras com título igual ou superior a 1:10.

A descrição detalhada do método é dada a seguir:

- Titulação da amostra viral oriunda do cultivo em células MDCK (Madin-Derby-Canine Kidney) por meio da Hemaglutinação;

- Preparação do antígeno para o teste e retro-titulação padronizando-se 8 unidades hemaglutinantes para 50µL. Uma unidade hemaglutinante pode ser composta de uma hemaglutinina viral independente da viabilidade do vírus;

- Preparação do soro que compreende as seguintes etapas: descomplementação em banho Maria a 56°C por 30 minutos; adição de 50µL de Kaolim (25%) em 50µL de soro para retirada de inibidores da hemaglutinação e centrifugação a 1000 x g por 5 minutos em micro-centrífuga; adição de 50µL de suspensão de hemácias de peru a 10%, para eliminação de aglutinantes inespecíficos, em 50µL do soro já tratado com Kaolim e

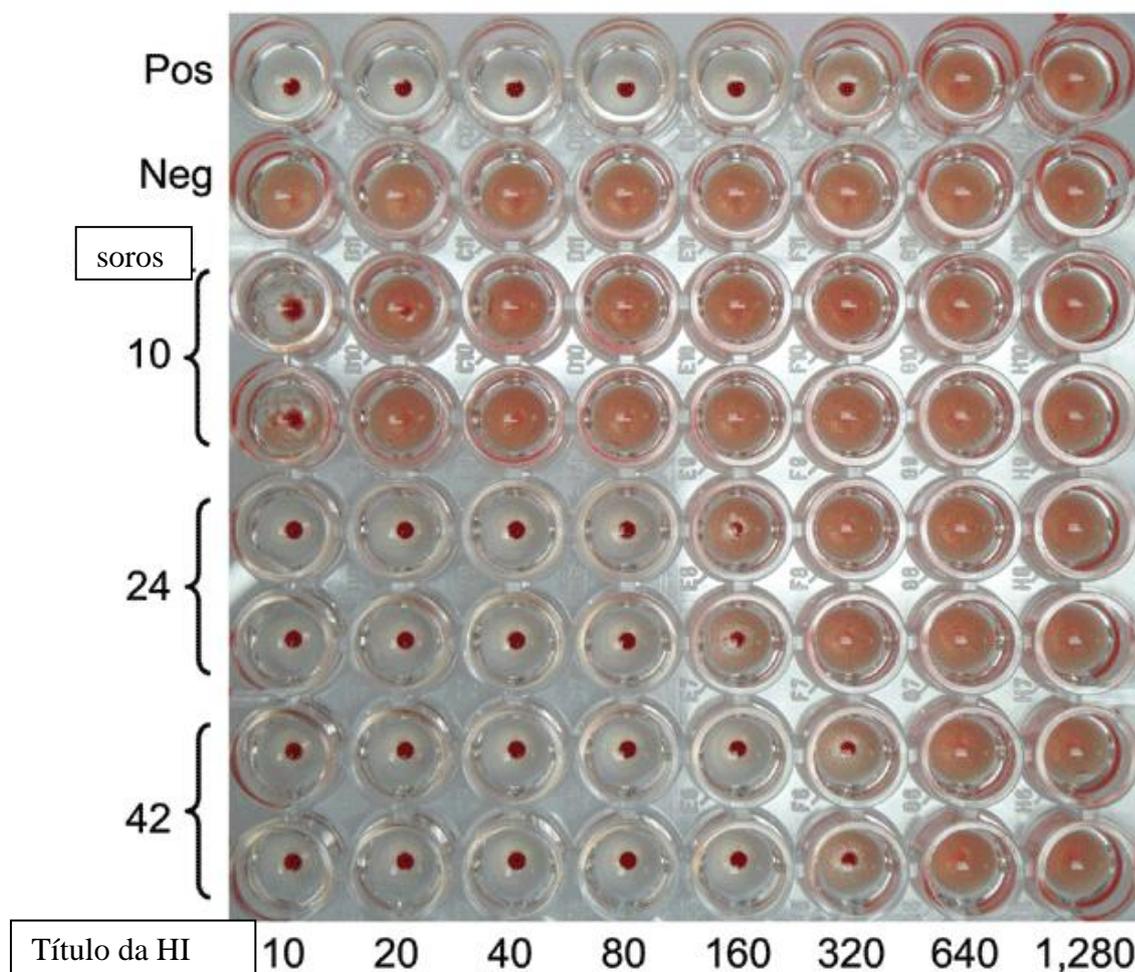
centrifugação a 1000 x g por mais cinco minutos, após a espera de 30 minutos a 8°C;

- Diluição seriada, do soro em duplicata a partir do 1:4 em PBS, em placa de 96 poços com fundo em “V”, com 50µL por poço;

- Adição de 50µL do Antígeno em cada poço, mistura por agitação manual por 10 segundos e incubação em temperatura ambiente por 30-45 minutos, com uma agitação adicional na metade do período;

- Adição de 50µL da suspensão de hemácias a 0,75% em cada poço, agitação como na etapa anterior, e incubação das placas cobertas por 2-3 horas em temperatura ambiente;

- Interpretação dos resultados foi baseada no título do soro, determinado pela formação do botão de hemácias (inibição da hemaglutinação), (Figura 7). A execução dos testes foi realizada sempre usando na placa soro controle positivo e controle sabidamente negativo.



Fonte: adaptado de www.cdc.gov

FIGURA 7-INTERPRETAÇÃO DO TESTE DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO PARA A TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIVÍRUS DA INFLUENZA A H3N2. SORO POSITIVO CONTROLE NA LINHA 1 E NEGATIVO NA LINHA 2. SOROS 10, 24 E 42 TESTADOS EM DUPLICATA, COM TÍTULOS DE 1:10; 1:80 E 1:320 RESPECTIVAMENTE

3.4.2- Isolamento viral

Nesta etapa foram analisadas 70 amostras de tecido respiratório de suínos, provenientes da região de Cascavel e de Toledo, ambas na região sudoeste do Paraná, coletadas no abatedouro. Cada amostra se constituiu de cortes de tecido do pulmão, traquéia, tonsilas e faringe dos animais. Como critério de escolha da coleta das amostras foram selecionados animais que apresentavam alguma lesão no sistema respiratório, de origem desconhecida.

Estas amostras foram colhidas posteriormente a análise sorológica e não houve relação com os resultados da sorologia. Do total de 70 amostras, as 50 com as melhores condições relativas a pouca hemólise, menor turbidez e ausência de pedaços de tecidos foram escolhidas para inoculação em ovo embrionado de galinha. As amostras foram inoculadas em ovos embrionados de galinha segundo metodologia recomendada no Manual Técnico sobre emergência sanitária em doença de Newcastle e Influenza aviária (MAPA, 2001).

- As amostras foram preparadas a partir de uma suspensão a 10 - 20% em PBS pH 7,2 adicionada de antibióticos (anfotericina B a 1,25ug/ mL; penicilina a 20UI/ mL; e estreptomicina a 200ug/ mL);

- Trituradas, em gral esterilizado, e deixadas em repouso 1 a 2 horas a 4°C;

- Centrifugadas a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C, sendo recolhido o sobrenadante;

- A suspensão foi inoculada na cavidade alantóide de ovos embrionados de galinha de granjas sabidamente negativas para influenza, com 8 a 11 dias de incubação, no volume de 0,1 a 0,2mL;

- Incubação dos ovos a 37°C por 7 dias;

- Os embriões foram observados ao longo desta semana para se observar eventuais mortos ou agonizantes, apesar de não ser o efeito normal de vírus de origem suína de baixa patogenicidade;

- Ao final dos 7 dias de incubação foi coletado líquido cório-alantóide, e submetido a prova de hemaglutinação, ou quando possível re-inoculado em ovos embrionados por mais duas vezes;

- O líquido cório alantóide coletado foi clarificado por centrifugação a 1000 x g a 4°C por 10 minutos e sua capacidade hemaglutinante testada frente a hemácias de galo;

- Todos os produtos obtidos, tanto da inoculação em ovos embrionados, assim como os inóculos iniciais que não sofreram passagens em ovos, foram submetidos a análise por RT-PCR segundo protocolo a seguir.

A amostra do vírus influenza suína (A/SW/IA/31/H1N1) utilizada como controle positivo da RT-PCR foi obtida do Laboratório Nacional de Serviços Veterinários (NVSL) do USDA, EUA. Esta amostra foi multiplicada em ovos embrionados de galinhas SPF (*Specific Pathogen Free*), sendo o líquido corioalantóide (LCA) coletado e avaliado pelo teste de hemaglutinação, com título de 1:1024.

3. 4. 3 – Técnica molecular

Extração de RNA

A extração de RNA viral foi realizada, a partir do LCA dos ovos inoculados ou a partir de suspensão de tecidos, com uma solução de fenol-guanidina (Trizol LS, Invitrogen).

RT- PCR

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita com a enzima transcriptase reversa (SuperScript II, Invitrogen) e com o *primer* Uni12 (Hoffmann et al., 2001).

A amplificação do gene M do SIV foi feita com os *primers* M52C e M253R (Fouchier et al., 2000). A reação, em 30 µL de volume final continha 2

μL cDNA, 50 mM Tris - HCl (pH 8.5); 0,4 mM do iniciador M52C, 0,4 mM do iniciador M253R, 7 mM MgCl_2 , 1mM de cada dNTPs, 2,5 U ampli-Taq DNA polimerase e 31,5 μL água ultra pura.

A ciclagem da reação de PCR foi: 1 min 94° C 1x, 35 ciclos (1 min 94° C, 1 min 56° C, 30 seg 72° C) e 10 min 72° C.

Após a amplificação os produtos das reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e fotodocumentados.

4- RESULTADOS

4.1 - Análise sorológica

Os resultados foram agrupados sob duas condições distintas segundo o manejo dos animais: criatórios e granjas de suínos. Para ser considerada positiva, a propriedade apresentou pelo menos uma amostra com titulação maior ou igual a 1:10 no teste de HI. O Quadros 3 e 4 mostram o número de amostras positivas encontradas conforme a origem das mesmas.

| | TOTAL | SELEÇÃO |
|---------------------------------------|-------|---------|
| TOTAL DE AMOSTRAS | 5327 | 675 |
| TOTAL DE AMOSTRAS GS | 4160 | 482 |
| TOTAL DE AMOSTRAS CS | 1167 | 193 |
| TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS | ----- | 123 |
| TOTAL DE AMOSTRAS GS POSITIVAS | ----- | 117 |
| TOTAL DE AMOSTRAS CS POSITIVAS | ----- | 6 |

QUADRO 3- NÚMERO DE AMOSTRAS SOROLOGICAMENTE POSITIVAS CONTRA H3N2 DENTRO DE GRANJAS OU CRIATÓRIOS EM RELAÇÃO AO TOTAL DE AMOSTRAS

| | TOTAL | SELEÇÃO |
|---|-------|---------|
| TOTAL DE PROPRIEDADES | 642 | 164 |
| TOTAL DE PROPRIEDADES GS | 323 | 74 |
| TOTAL DE PRPRIEDADES CS | 319 | 90 |
| TOTAL DE PROPRIEDADES POSITIVAS | ----- | 39 |
| TOTAL DE PROPRIEDADES GS POSITIVAS | ----- | 34 |
| TOTAL DE PROPRIEDADES CS POSITIVAS | ----- | 5 |

QUADRO 4 – NÚMERO DE PROPRIEDADES POSITIVAS DIVIDIDAS EM GRANJAS E CRIATÓRIOS EM RELAÇÃO AO TOTAL DE PROPRIEDADES

Verificou-se que em granjas a positividade representou 46% do total de propriedades testadas (Gráfico 1). Para os criatórios o percentual de positividade foi de 6% do total de propriedades testadas (Gráfico 2).

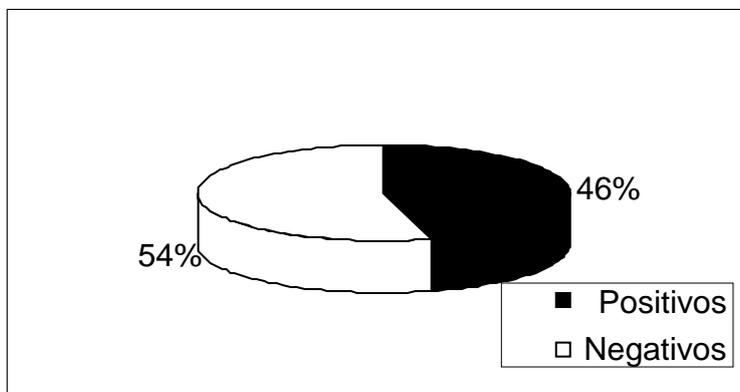


GRÁFICO 1 - PERFIL DE POSITIVIDADE PARA O VÍRUS H3N2 DAS GRANJAS DE SUÍNOS TESTADAS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE MAIO E NOVEMBRO DE 2003

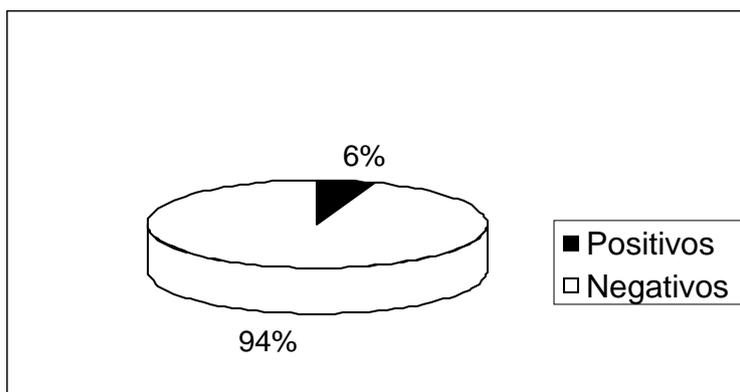


GRÁFICO 2 - PERFIL DE POSITIVIDADE PARA O VÍRUS H3N2 DOS CRIATÓRIOS DE SUÍNOS TESTADOS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE MAIO E NOVEMBRO DE 2003

Nos gráficos 3 e 4 pode-se verificar a porcentagem de amostras positivas dentro de cada tipo de exploração.

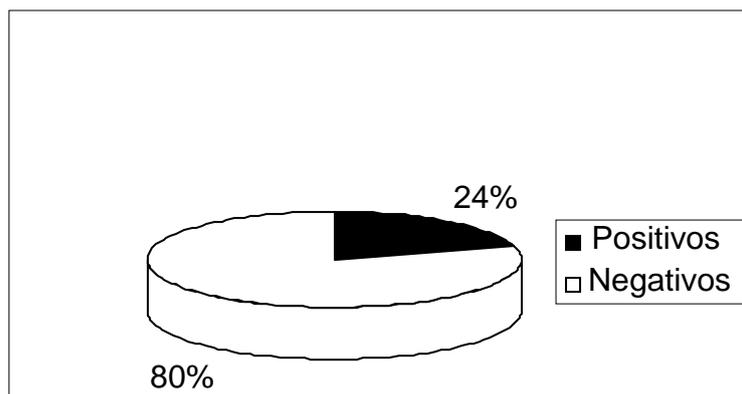


GRÁFICO 3 - PORCENTAGEM DE AMOSTRAS POSITIVAS EM GRANJAS DE SUÍNOS, TESTADAS NO ESTADO DO PARANÁ.

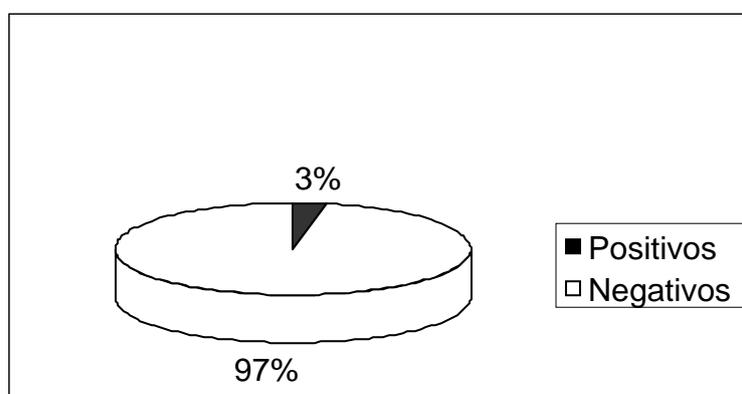
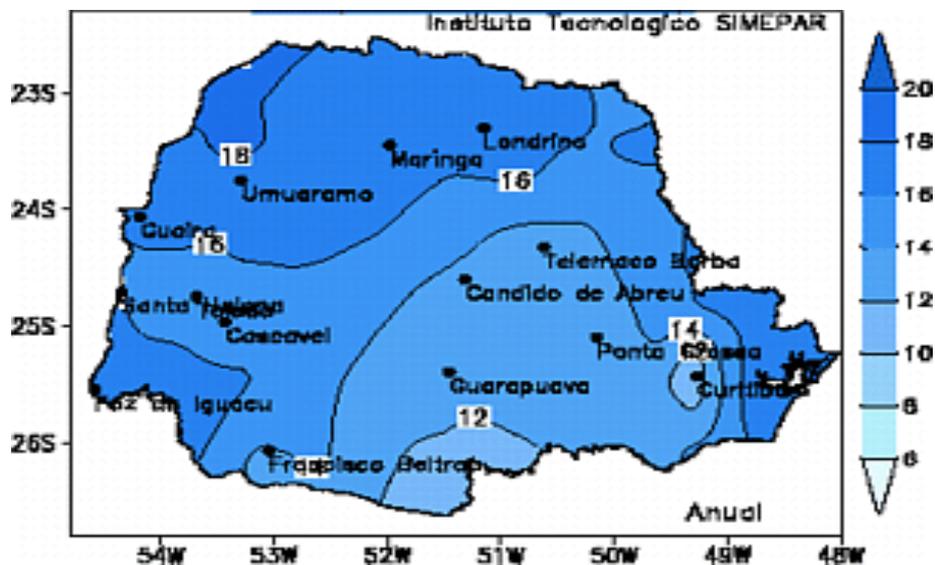


GRÁFICO 4 - PORCENTAGEM DE AMOSTRAS POSITIVAS EM CRIATÓRIOS DE SUÍNOS TESTADOS NO ESTADO DO PARANÁ

4.2 - Correlação da soroprevalência com temperatura ambiente

Assim como a densidade pode favorecer a instalação e manutenção do vírus nos indivíduos, sabe-se que para sua replicação o vírus da influenza está melhor adaptado em temperaturas menores que a média dos agentes infecciosos mais comuns. Por isso, quando encontra temperaturas ambientais baixas, ou no inverno em regiões mais frias a ocorrência da enfermidade no ser humano é mais prevalente. Como as amostras testadas no trabalho em questão representavam praticamente todo o Estado do Paraná, pode-se inferir a influência que o clima estaria tendo na ocorrência da infecção em suínos. Na

Figura 8 são dadas as temperaturas mínimas médias registradas no Estado do Paraná historicamente.



Fonte: www.simepar.com.br.

FIGURA 8- MÉDIA DAS TEMPERATURAS MÍNIMAS NO ESTADO DO PARANÁ ENTRE OS ANOS DE 2000 E 2006

Na região de Guarapuava, com média de 12°C, de 47 amostras testadas, 13 foram soro reagentes (27,6% de prevalência), proporção que se repete em todas as regiões testadas nesta faixa de temperatura. Nas faixas de temperaturas mais altas, ao norte do mapa, com média de 16°C a 18°C, pode-se observar nas regiões de Londrina e Maringá, por exemplo, que das 50 amostras testadas apenas duas foram positivas (4% de prevalência). Da mesma forma na região de Umuarama ao noroeste, com média de temperatura mínima de 18°C, das 40 amostras avaliadas, apenas uma foi positiva (2,5%). As prevalências quando associadas às regiões do Estado demonstram que naquelas áreas onde as temperaturas mínimas são menores o número de animais soro-reagentes foi maior ($p < 0,05$ no qui-quadrado).

| Região do Estado do PR | Regionais da SEAB | Nº amostras granja | Nº amostras criatório | Total |
|------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-------|
| Central | Ivaiporã | 1 | 0 | 1 |
| Centro-sul | Laranjeiras do sul | 7 | 0 | 7 |
| Leste | Paranaguá | 0 | 0 | 0 |
| Nordeste | Jacarezinho | 0 | 0 | 0 |
| Noroeste | Campo Mourão | 15 | 0 | 15 |
| Noroeste | Paranavaí | 1 | 0 | 1 |
| Noroeste | Umuarama | 1 | 0 | 1 |
| Norte | Apucarana | 0 | 0 | 0 |
| Norte | Cornélio Procópio | 0 | 2 | 2 |
| Norte | Londrina | 0 | 0 | 0 |
| Norte | Maringá | 2 | 0 | 2 |
| Oeste | Cascavel | 17 | 0 | 17 |
| Oeste | Toledo | 5 | 0 | 5 |
| Sudese | Curitiba | 2 | 2 | 4 |
| Sudeste | Ponta Grossa | 5 | 0 | 5 |
| Sudoeste | Francisco Beltrão | 43 | 1 | 44 |
| Sul | Guarapuava | 13 | 0 | 13 |
| Sul | Irati | 0 | 0 | 0 |
| Sul | Pato Branco | 2 | 0 | 2 |
| Sul | União da Vitória | 3 | 1 | 4 |

QUADRO 5 - NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA INFLUENZA SUÍNA EM CADA REGIONAL DO PARANÁ DISTRIBUÍDAS EM GRANJAS DE SUÍNOS E CRIATÓRIOS DE SUÍNOS

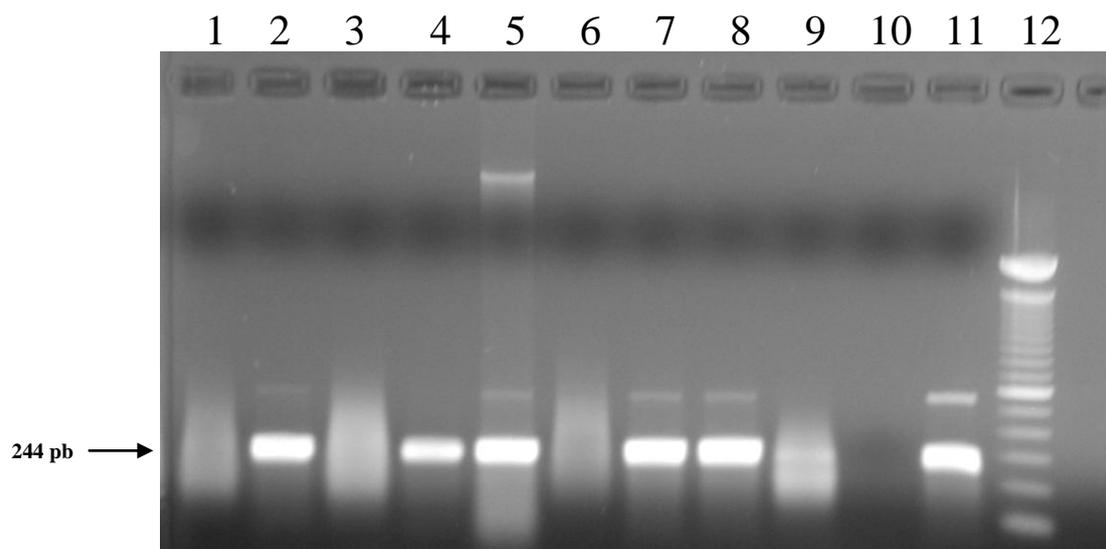
No Quadro 5 pode-se observar a distribuição dos resultados positivos em cada região, os quais comprovam a distribuição da ocorrência de casos relacionadas as regiões geográficas.

4.3 - Isolamento viral e RT- PCR

O resultado da inoculação das 50 amostras em ovo embrionado foi analisado testando-se a capacidade de Hemaglutinação do líquido cório-alantóide coletado no sétimo dia de incubação. Os resultados de hemaglutinação não foram conclusivos nestas amostras, que caso fossem positivos poderiam indicar a presença de vírus hemaglutinantes. A falta de

observações confiáveis, que representassem hemaglutinação associadas a qualidade do líquido cório alantóide colhido, a falta de especificidade com as hemácias do teste ou as diferentes concentrações virais e possíveis contaminações bacterianas podem ter determinado estes resultados.

As 70 amostras coletadas neste projeto foram enviadas para a Embrapa-Suínos e Aves, na cidade de Concórdia – SC, onde a caracterização molecular foi realizada. Do total submetido a esta técnica cinco foram positivas, comprovando a circulação do vírus. Na figura 9 podem ser observadas cinco amostras positivas, onde “primers” desenhados para amplificação da sequência do gene número 7 foram utilizados. Este gene codifica a proteína de matriz M1, a qual tem se mostrado conservada nos diferentes vírus testados em várias espécies animais e, portanto, eficiente na identificação de cepas de vírus do tipo A (Fouchier et al., 2000).



RT-PCR/ gene M /SIV. Coluna 1 à coluna 9 representam amostras analisadas onde se observa a reação positiva nas colunas 2, 4, 5, 7 e 8; coluna 10: controle negativo; coluna 11: controle positivo H1N1 e coluna 12: : Marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen)

FIGURA 9- RESULTADO DE CINCO AMOSTRAS POSITIVAS PARA INFLUENZA, NA RT-PCR COM AMPLIFICAÇÃO DO GENE M TENDO COMO CONTROLE POSITIVO O VÍRUS H1N1

5- DISCUSSÃO

5.1 – Soroprevalência

Em 1958, Souza Filho detectou, em 25% dos suínos estudados no Estado do Paraná, reação de anticorpos contra os vírus de influenza de origem humana, utilizando teste de Inibição da Hemaglutinação. Esta referência denota uma preocupação antiga com a manifestação e presença do vírus em suínos, mostrando que pelo menos nos últimos 50 anos o vírus se mantém na população suína deste Estado e carece de análises mais detalhadas, além de estratégias de controle que visem a sanidade da exploração de suínos e principalmente minimizem o risco de recombinação e transmissão ao ser humano.

Quando se faz a comparação do sistema de criação verifica-se que a quantidade de granjas positivas é muito maior que a de criatórios. O maior número de granjas positivas poderia ser justificado pela maior amostragem de soros. No entanto, a amostragem dos criatórios tende a ser mais significativa, já que a grande maioria destas propriedades é pequena e muitas vezes 100% dos animais foram avaliados, e que freqüentemente não passavam de dez indivíduos. Já nas 74 granjas, apesar de maior número de amostras, foi menos representativo do total de animais. Este primeiro resultado aponta para uma condição interessante, quando a densidade pode estar influenciando nos resultados, mais do que o manejo.

É importante se verificar que em condições de maior densidade populacional, mesmo com manejo ideal, o vírus da influenza encontra melhores condições para disseminação, apesar de não causar manifestações clínicas nos animais, com diagnóstico conclusivo. Outro aspecto relevante a ser

ressaltado é a convivência constante e contígua do homem com o suíno que se torna importante quando se consideram a possibilidade de replicação dos mesmos subtipos virais em ambas as espécies.

Nossos dados são corroborados por aqueles de Elazhary et al., (1985), que analisaram amostras de soro de 350 suínos com histórico de problemas respiratórios provenientes de 11 granjas em Quebec no Canadá e encontraram 46,6% de positividade (subtipo não especificado). Na América do Norte Olsen et al. (2000) detectaram 26 isolados de H1N1 de origem suína clássica em animais no abatedouro, além de sorologia positiva em 27,7% dos suínos amostrados. Brentano et al. (2002) verificaram amostras de 2675 soros suínos na região Sul do Brasil, encontrando 50,9% das granjas testadas positivas para H3N2, com prevalência de 16,7% de animais positivos por granja. Estas prevalências encontradas estão muito relacionadas com o melhor período para detecção de anticorpos em altos títulos, que ocorre entre 2 a 3 semanas após a infecção.

Poljak et al. (2008) concluíram que desde 2005 a incidência do subtipo H3N2 tem superado a de H1N1 em suínos, quando 40,8% das granjas testadas foram positivas em Ontário também no Canadá. Maldonado et al. (2006), na Espanha, testando granjas com alta densidade de suínos, encontraram 83% das propriedades positivas para ao menos um subtipo (H1N1, H3N2 e H1N2) e 76,3% dos animais testados foram positivos.

A epidemiologia da influenza sazonal no ser humano é muitas vezes justificada pelas mesmas condições apontadas nestes resultados, ou seja, em momentos de maior densidade populacional, com maior aglomeração, a morbidade deste tipo de vírus aumenta significativamente. Assim como no ser

humano, a presença do vírus da influenza na exploração suína pode ser um fator desencadeante de outras enfermidades, principalmente de caráter respiratório, quando a susceptibilidade está aumentada por infecções concorrentes. Nestas granjas, encontrar 20% dos animais infectados poderia justificar medidas de controle, a fim de se prevenir manifestações clínicas associadas nos suínos. Da mesma forma que o papel do mesmo na geração de uma possível pandemia, justificaria medidas preventivas no contato e manipulação dos mesmos por trabalhadores das granjas, minimizando as possibilidades de contágio de ambas as espécies. É importante também verificar a dificuldade de disseminação do vírus quando, mesmo sob condições inadequadas de manejo tanto sanitário como nutricional, a densidade populacional é baixa, como ocorre nos criatórios. Uma pequena proporção de animais positivos denota a importância das condições ambientais na instalação do vírus e de sua possível manifestação, quando a tecnificação desejada da exploração deverá estar acompanhada de medidas que minimizem as possibilidades de disseminação do vírus.

Com uma amostra representativa do Estado de Minesota, Choi et al. (2002) encontraram 33,7% de animais positivos para influenza e 26,9% destes foram representados pelo subtipo H3N2. Em estudos desenvolvidos em fazendas de criação de suínos na Malásia, por Suriya et al. (2008), 12,1% dos animais foram positivos para o subtipo H3N2 e 41,4% das propriedades foram positivas, com uma grande correlação com o tamanho das mesmas. Brown et al. (1995) detectaram uma soroprevalência de 39% para H3N2 em suínos testados entre 1991-1992 na Inglaterra. Em propriedades testadas na Coreia, Pascua et al. (2008) encontraram um alta prevalência de H1N1 e pouca de

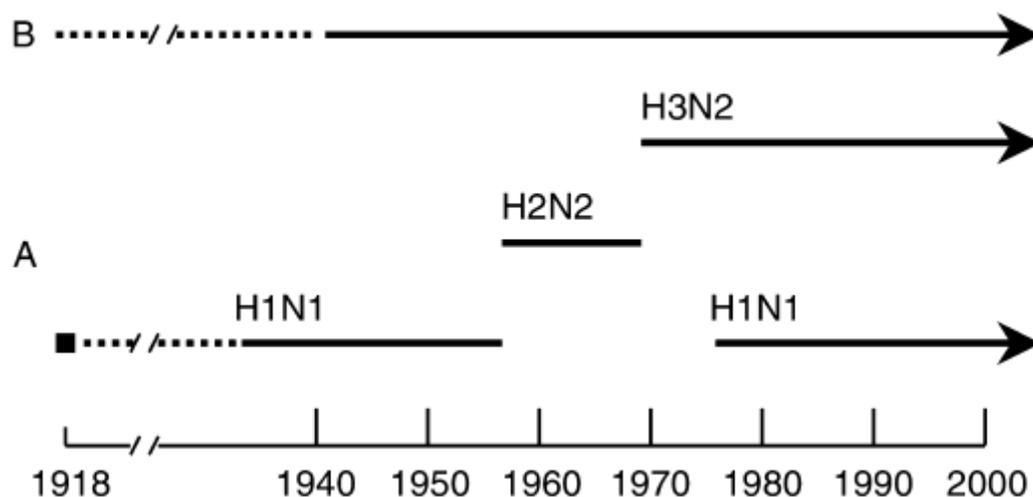
H3N2 e os isolados virais apontaram uma provável pressão de seleção devido ao uso de vacinas. O desenvolvimento de novas vacinas é essencial para que, assim como no ser humano, a ocorrência do vírus no ambiente possa ser acompanhada e controlada com eficiência (Palese & Sastre, 2002).

Amostras de soro suíno analisadas na Inglaterra mostraram que entre os anos de 1991-92 todos os três tipos de vírus, A, B e C circularam na população, sendo 26% representados pelo H1N1 clássico suíno e 39% pelo H3N2 de origem humana além de 0,9% do tipo C (Brown et al., 1995).

5.2 - O impacto da influenza suína na saúde humana

O convívio contíguo de suínos e do ser humano é um fator relevante, ao se considerar a replicação do vírus em ambas espécies. Analisando o soro de 128 pacientes nos EUA, Ramirez et al. (2006) mostraram que 49 destes eram positivos. Esses indivíduos tinham contato freqüente com a produção de suínos, e observaram freqüência maior de anticorpos contra o subtipo H1N1, especialmente quando medidas de manejo, como uso de luvas, não foram empregadas. Myers et al. (2006) concluíram que a susceptibilidade a infecção por influenza foi aumentada em trabalhadores de granjas de produção de suínos, veterinários ou magarefes. Em nosso trabalho, a detecção de 24% dos animais infectados nas granjas poderia justificar a aplicação de medidas preventivas evitando possíveis sinais clínicos nos suínos, ou doenças secundárias decorrentes da infecção pelo vírus. Da mesma forma medidas de manejo, no contexto do contato suíno-homem, poderiam minimizar o riscos de uma possível pandemia associada a geração de um subtipo por replicação nestas espécies.

Como pode-se observar na Figura 10 os tipos e subtipos da influenza se alternam nas apresentações ao longo dos anos no ser humano. A única forma de incrementar o sucesso das medidas estratégicas é o acompanhamento da circulação viral, e nos suínos e aves, assim como em humanos, predizer da melhor forma as melhores recomendações de controle.



Fonte: Palese & Sastre (2002)

Figura 10: Epidemiologia do vírus da influenza A e B humanos ao longo dos anos

5.3 - Identificação viral

Amostras de H3N2 isoladas de suínos nos EUA entre 1977 e 1999, mostraram que o rearranjo entre cepas do vírus isoladas de suínos e de humanos pode ser facilitado em propriedades onde homens e suínos tenham íntimo contato (Karasin et al., 2000). Maes et al. (2000) concluíram que a alta densidade de suínos e o inverno foram condições decisivas para o resultado de 40% de propriedades positivas para o subtipo H3N2 de um total de 150 propriedades analisadas na Europa.

A Organização Mundial de Saúde (WHO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) estabelecem recomendações para o diagnóstico de

Influenza em várias espécies e de diferentes origens, sendo que a inoculação e isolamento viral em ovo de galinha embrionado é a forma mais eficiente para recuperação de amostras virais coletadas no campo. As várias passagens recomendadas visam aumentar a sensibilidade da prova, e assim mesmo, modernamente os resultados obtidos pelo RT-PCR têm complementado e até substituído o isolamento, pois apresenta uma facilidade cada vez maior e alta sensibilidade e especificidade. No presente trabalho fica mais uma vez demonstrada a facilidade das técnicas moleculares contra o maior trabalho e menor sucesso no isolamento viral em ovos embrionados. Estes resultados contudo não excluem nem obscurecem o valor do isolamento viral, como um objetivo a ser alcançado. Desde o estabelecimento dos quatro postulados de Koch no final do século XIX, a sistemática relativa a este objetivo nunca perdeu sua importância e as técnicas moleculares ocupam um espaço de complementaridade no processo diagnóstico, mas nunca excludente.

Como demonstrado por Smith et al., 2009, o subtipo H1N1 que gerou a pandemia de gripe suína desde março de 2009, já circulava entre os humanos e suínos, principalmente na região do México, alguns meses antes. Em regiões com as características geográficas e de manejo como a da península de Yucatán no México, a vigilância ativa da circulação do vírus deverá se considerada, na prevenção de pandemias (Talavera et al., 2005). Estudo realizado por Sun et al. (2009) demonstrou que mesmo após uma década de ocorrência, muitas cepas de vírus prevalentes em humanos tornam-se as presentes em suínos e de maior ocorrência, como pode-se demonstrar nos últimos anos em que o subtipo H3N2 de humano tem rearranjado com H1N1 de suíno. Gray et al. (2007) demonstraram que trabalhadores diretos de fazendas

de suínos bem como seus contatos, tinham risco aumentado de apresentar subtipos zoonóticos de influenza, ou mesmo facilitar o rearranjo do vírus.

Como neste trabalho comprova-se a presença do vírus em suínos oriundos de granjas no Brasil, é possível que a mesma predisposição esteja ocorrendo em nosso país, o que reforça a necessidade de uma vigilância ativa tanto em suínos como nos trabalhadores que tenham contato direto.

O envolvimento da saúde pública humana bem como veterinária, deve estar associado à percepção da ocorrência dos focos de influenza em várias espécies. A ponte entre estas especialidades aliada a genômica e proteômica deste vírus podem assegurar medidas eficientes de prevenção, o que pode ser visto nos casos recentes de H5N1 e de H1N1 em aves e suínos respectivamente, ambos com envolvimento humano (Forrest et al., 2010).

A análise dos resultados de amostras sorologicamente positivas para o vírus da influenza subtipo H3N2 permite concluir que alguns fatores são determinantes para a presença e manutenção do mesmo numa exploração de suínos. De todas as variáveis, a densidade da população sujeita à infecção é um fator facilitador. Pois assim como acontece no ser humano, o vírus deve encontrar uma grande quantidade de indivíduos suscetíveis, e com a possibilidade de alta morbidade nestas explorações, a mutação pode aparecer com maior frequência.

5.4 - Interferência do clima

As temperaturas menores também parecem favorecer a instalação da infecção e a presença do vírus, por se tratar de um subtipo com potencial zoonótico para suínos e homens. Estes resultados podem sugerir a necessidade de estratégias de controle associadas, para o suíno e os

trabalhadores destas explorações uma vez que o suíno é uma peça importante na geração de um novo subtipo do vírus da influenza que, por mais que não tivesse alta patogenicidade, poderia ser um subtipo totalmente novo para o homem, e por esta condição com potencial de apresentar alta morbidade e epidemias em vários níveis. A observação de 27,6% e 45,8% de soros positivos provenientes de Guarapuava e Francisco Beltrão respectivamente, regiões mais frias do Estado do Paraná, corroboram com esta hipótese.

Experimentalmente nem sempre é fácil comprovar as correlações dos fatores ambientais com a transmissão do vírus da influenza. Zuk et al. (2009) demonstraram que fatores como a temperatura e umidade relativa, são determinantes na transmissão do vírus. Neste trabalho comprovou-se que a 30°C não ocorreram infecções enquanto que a 20°C e a 5°C com umidade relativa de 20 -35% foi mais favorável com 100% de transmissão. Com 50-65% de umidade ainda se manteve alta a transmissão e esta foi bloqueada a 80% de umidade.

Não seria improvável que os fatores dependentes da temperatura como a umidade e a própria presença de água, o pH e a salinidade atuem de forma combinada favorecendo ou dificultando a transmissibilidade (Valeika, et al., 2009).

5.5 - A importância do acompanhamento dos dados sorológicos e moleculares

O acompanhamento das manifestações do vírus é determinado pela percepção dos diferentes subtipos nas várias espécies animais suscetíveis e vários pesquisadores têm demonstrado a capacidade de adaptação e mutação do vírus dependente do hospedeiro no qual este se replica, e mesmo as

diferentes sensibilidades no crescimento viral quando se utilizam sistemas de cultivo celular ou ovos embrionados. A adaptação de alguns subtipos que evolutivamente se apresentam em suínos e perus refletem a capacidade de infecção do vírus na natureza, quando se extrapolam os resultados do laboratório mostrando efeitos relacionados em alterações nos receptores que facilitam a adsorção independente do hospedeiro (Gambaryan et al., 2006). A própria alteração na sensibilidade viral em aglutinar hemácias oriundas de diferentes espécies animais, reforça a necessidade de técnicas complementares que confirmem os achados inconclusivos de isolamento e detecção viral (Morishita et al., 1996).

A detecção da circulação do vírus usando técnica molecular mostra-se uma ferramenta útil na compreensão da distribuição e evolução ou rearranjo viral. Como contribuição deste trabalho o resultado positivo detectado na técnica de RT-PCR é impactante, pois além de demonstrar a circulação viral na produção suína passa a exigir, a partir disto, novos dados, como por exemplo o seqüenciamento do genoma viral, o qual deve permitir fazer as correlações com a ocorrência da influenza em diferentes regiões do mundo e das relações dos subtipos virais com as manifestações clínicas ou no mínimo replicação em diferentes espécies. Em outros países estas ferramentas já vêm sendo utilizadas para monitorar a circulação e rearranjo viral (Forrest et al., 2010).

A implementação de estratégias eficazes de controle é dependente destas avaliações que podem, como tem ocorrido na América do Norte, justificar a introdução de vacinas específicas para os suínos, visando não apenas o controle de manifestações clínicas nesta espécie, mas também a prevenção de uma possível pandemia. Baseadas nestas análises, as grandes

multinacionais produtoras de vacinas têm avaliado a possibilidade da introdução destes produtos contra influenza suína no Brasil, o que talvez atualmente ainda seja precoce, não devido à incidência da enfermidade, mas sim à falta de dados abrangentes, a exemplo de vários países.

Além da fundamentação do uso das vacinas para suínos, muitos trabalhos têm demonstrado os efeitos da imunidade cruzada com subtipos heterólogos do vírus da influenza, o que possibilitaria a escolha das melhores cepas e a inclusão de calendários eficazes no controle das manifestações clínicas da enfermidade, uma vez que a memória imunológica advinda da vacinação poderia, de uma forma mais intensa que no ser humano, promover a proteção desejada (Kitikoon et al., 2006). A ocorrência de vírus de alta patogenicidade, especificamente em aves, tem demonstrado que os mecanismos de imunidade, são mais complexos que a neutralização da hemaglutinina e envolvem citocinas, linfócitos T e respostas individuais diferentes para cada espécie envolvida (Suarez & Schultz-Cherry, 2000).

O monitoramento da variabilidade viral é fundamental para amparar estratégias eficientes e, a exemplo da experiência humana, o acompanhamento do vírus em suínos e aves é fundamental. Desde 1996 até 2000 são reportadas pequenas variações nos subtipos humanos, fundamentalmente H1N1, onde a análise molecular permite concluir que as variantes presentes no Brasil possuem relações com amostras ancestrais de outros continentes, com coeficientes de variação esperados para o vírus influenza, tanto para o tipo A como o tipo B, o que dá ao longo do tempo, subsídios confiáveis para novas formulações vacinais e estratégias de controle (Paiva et al., 2004).

5.6 - Considerações na realidade brasileira

Os dados obtidos são relevantes, em especial com relação à situação do Brasil como grande produtor de alimentos. Tanto a exploração de suínos como a de aves estão sujeitas a restrições e barreiras comerciais oriundas do mau uso e compreensão das informações científicas. É responsabilidade e preocupação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, que informações importantes como as obtidas neste trabalho sejam tratadas sem alarde, pois é desnecessário. O alarde geralmente é fruto da ignorância ou desinformação coletiva, o que tem ao longo do tempo inviabilizado a participação de outros órgãos, além dos serviços oficiais de vigilância sanitária. Os Institutos de pesquisa e as Universidades competentes na detecção precoce de ameaças potenciais devem se envolver cada vez mais na geração de dados que permitam o eficiente gerenciamento de risco, objeto principal do MAPA, que desta maneira baseado em dados confiáveis possam fazer a análise de risco, objeto de todas as instituições potencialmente envolvidas.

A detecção precoce da circulação de vírus influenza A em suínos é uma prioridade na prevenção de eventuais surtos da doença em suínos bem como na geração de potenciais cepas pandêmicas.

Concomitante às aplicações em protocolos já existentes, a implementação de novas estratégias, melhorando a compreensão da ecologia e ocorrência do vírus, possibilitará a vacinação de outras espécies e apresentações vacinais que permitam o uso com segurança na prevenção da influenza (Ninomiya, 2002; Ferguson et al., 2003).

A imunização das espécies envolvidas no surgimento de novos subtipos é um ponto a ser considerado na prevenção de pandemias e epizootias. Assim como a implementação de vacinas administradas via mucosa que podem mimetizar a resposta ao agente selvagem (Glück et al.,1999; Kilbourne et al.,1999), mas que ainda hoje não atendem completamente as necessidades de eficácia e segurança (Pastoret et al., 2007).

A ausência de diagnóstico de doença clínica nos suínos em nosso país não deve determinar negligência quanto aos estudos epidemiológicos, pois o vírus está presente e o prejuízo de sua manifestação em qualquer espécie animal é notório. Ademais a preocupação com a saúde pública, por se tratar de uma importante zoonose, fomenta a compreensão de toda a cadeia envolvida, a participação em todos os níveis de Institutos de pesquisa, Universidades, Agências sanitárias oficiais e produtores.

Conhecimento epidemiológico, atual e confiável, é a única maneira de garantir a implementação de medidas de controle e prevenção eficientes, que como concebido para a influenza, devem ser específicas para cada realidade, pois cada região ou país tem a sua demanda particular e será cobrado internacionalmente pela eficácia de seus protocolos e pela capacidade de seus agentes.

5.7- Perspectivas Biotecnológicas

As ferramentas biotecnológicas quando aplicadas neste escopo, deverão implementar duas ações estratégicas. A primeira seriam novas técnicas diagnósticas e em segundo lugar novas vacinas especialmente para suínos.

Como comprovado, a inoculação do vírus em ovo embrionado de galinha apresenta atualmente algumas desvantagens quando comparado à técnica da

RT-PCR, que estariam relacionadas ao processo de execução e principalmente celeridade no resultado. O desenvolvimento dos meios de cultivo celular poderiam propiciar a replicação “in vitro” dos vírus, e no caso da influenza exige a clivagem da hemaglutinina, para permitir a infecção. As enzimas envolvidas nesta clivagem são um campo de pesquisa profícuo permitindo inclusive a extrapolação dos resultados de laboratório para situações que ocorrem no ambiente, onde enzimas produzidas por microrganismos saprófitas nos indivíduos favorecem a entrada do vírus da influenza quando em co-infecção. A neutralização destas enzimas pode alcançar uma alternativa inclusive com terapia e fundamentalmente prevenção, em animais, diminuindo a carga viral. As pesquisas neste campo são factíveis e abrem um campo necessário uma vez que a presença do vírus nos rebanhos suínos Paranaenses está comprovada.

Em outro momento o desenvolvimento de vacinas exige o conhecimento do desafio na região e também a homologia entre os vírus selvagens e vacinais, afinal toda pressão de seleção determina mutações importantes para a influenza. Uma vez que a presença do vírus é percebida o seqüenciamento do genoma do mesmo, permitirá inferências, quanto a sua origem e quanto a melhor maneira de se desenvolver estratégias de controle. Estas medidas passarão seguramente pelo desenvolvimento de vacinas com epítomos conservados, e que por questões logísticas incitem a imunização de mucosas. Nesse contexto a biotecnologia tem gerado grandes avanços com alterações simples na formulação de antígenos. A experimentação associada a estes testes deverá exigir a análise dos riscos cada vez mais precisa, no que se

refere a influencia, com a facilitação e execução de todas as etapas desenvolvidas neste projeto.

6- DISCUSSÃO GERAL

O impacto da influenza aviária, enquanto enfermidade restrita às aves, ou a influenza suína, nesta espécie, podem gerar prejuízos específicos dentro de sua manifestação nas espécies exclusivamente. Assim, o risco de uma panzootia nas aves ou nos suínos assume, para países como o Brasil, uma conotação econômica além de sanitária. E o impacto da doença talvez seja muito maior neste âmbito, pois, como terceiro maior produtor e maior exportador de aves do mundo, as restrições e barreiras impostas por um surto de influenza nas aves trariam consequências certamente mais graves. Por isto, as estratégias e protocolos de prevenção visam, no Brasil, determinar inicialmente a circulação do vírus aviário, restrito à manifestação da influenza nas espécies aviárias. Mais relevante do que a própria circulação, é importante para os vírus aviários a caracterização de sua patogenicidade. O índice de patogenicidade intra-cerebral é o parâmetro buscado atualmente para determinar esta condição, além do sequenciamento de regiões determinadas do genoma viral que podem inferir a alta patogenicidade. Posteriormente, gerar o alerta da circulação do vírus em outras espécies. No entanto as diferentes apresentações do vírus associadas à sua patogenicidade e morbidade, e as diferentes formas de manifestação da enfermidade em várias espécies, podem requerer estratégias mais abrangentes de controle, visando tornar o alerta da presença viral o mais precoce possível e também garantir numa possível manifestação da doença, a presença do vírus restrita à espécie de origem, preservando a saúde humana em um nível subsequente.

Na América do Norte percebe-se, desde 1997, o exemplo do surgimento de novas cepas e sua circulação em suínos, quando após um período de 60

anos, novos subtipos como o H3N2 entre outros começam a se tornar prevalentes na população suína. A origem desde novos subtipos merece atenção especial, pois revela a possibilidade de introdução de variantes virais, antes restritas a população humana, e agora adaptadas a outras espécies.

Zhou *et al.* (1999) e Karasin *et al.* (2000) detectaram que a análise de vírus isolados de surtos de influenza H3N2, identificados em suínos nos Estados Unidos, onde antes era prevalente o subtipo H1N1, revelou que estes novos vírus têm perfil similar às cepas recentes de vírus H3 humano, tendo o vírus se originado ou de recombinação de vírus humano e suíno, ou recombinações de vírus humano, suíno e aviário.

É importante se ressaltar que técnicos e produtores de suínos atentem para a importância da influenza como doença de suínos, como também do ponto de vista de saúde pública (Olsen *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2005). Em surtos de doenças respiratórias em suínos, a influenza deve ser incluída no diagnóstico diferencial, através do envio de material ao laboratório, como fragmentos de pulmão e “swabs” nasais, para o isolamento viral. O isolamento dos vírus que estejam circulando nos plantéis é essencial para avaliar com maior sensibilidade o papel do vírus da influenza em suínos nos sistemas de produção no Brasil, pois através do isolamento viral pode-se produzir antígenos específicos para testes sorológicos e caracterizar melhor sua patogenicidade, bem como origem dos vírus em suínos (Posp- il *et al.*, 2001; Gambaryan *et al.*, 2005b).

Assim como esta possibilidade, o caminho inverso, possibilitando a transmissão dos suínos ao homem, determina a necessidade de análises freqüentes monitorando a variabilidade genética destes vírus e fornecendo

dados confiáveis quanto à distribuição e adaptação dos mesmos (Olsen, 2002). Os dados já publicados por Caron et al. (2010), reforçam estas características e fomentam o controle necessário para o futuro.

A possibilidade de circulação do vírus da influenza em outras espécies animais além da suína, e as transformações e adaptações advindas desta situação gera um espectro de controle e monitoramento da enfermidade muito mais abrangente. Por estas razões, as ações do PNSA e do PNSS devem ser intercorrentes com a percepção da influenza nas espécies animais relacionadas aos programas.

A interpretação global dos resultados encontrados reforça as medidas recomendadas pela OIE e implementadas até certo ponto no Brasil pelo MAPA. Elas visam a detecção precoce do vírus para orientar a melhor forma de prevenção. Como corroborado por outros autores, e aqui ratificado, a atenção especial em regiões produtoras de suínos deve ser constante. Como constatado no recente surto da gripe H1N1 de origem suína, esta espécie pode facilitar o rearranjo viral, e em situações de produção tecnificada como são as do Brasil, mesmo com as medidas higiênico-sanitárias ideais, a atenção deve ser especial. É importante a monitoria da presença e evolução viral para se prevenir o impacto que a alta densidade populacional acarreta na ocorrência e manutenção do vírus na população.

Como objeto de controle oficial, vê-se a influenza aviária, a qual tem como fator complicador a fonte para geração de um subtipo pandêmico do vírus, o controle e prevenção da mesma devem estar inseridos em um protocolo de alerta antecipado, o qual poderia minimizar os prejuízos de sua manifestação como epizootia principalmente no Brasil pela relevância da

exploração comercial de aves. Como expectativa de pandemia, as ações de prevenção e controle na espécie suína possuem um impacto talvez mais premente visto a capacidade do vírus de sofrer mutações nesta espécie.

7 - CONCLUSÕES

- A circulação do vírus da influenza, subtipo H3N2, está comprovada em suínos no Estado do Paraná, com alta soroprevalência;
- A densidade populacional é o principal fator associado a maior prevalência do vírus;
- O manejo sanitário, nutricional e de ambiência tem papel secundário na prevenção da ocorrência, quando comparado a densidade populacional;
- A ocorrência do vírus está relacionada positivamente com regiões geográficas das granjas e criatórios, quando em temperaturas mais baixas;
- A detecção da presença do vírus, em amostras de material por isolamento em ovo embrionado de galinha, pode apresentar resultados falso-negativos, mesmo em passagens sucessivas, associados talvez ao momento da coleta e mesmo a conservação das amostras;
- Mesmo nos casos de crescimento positivo em ovos embrionados ou cultivo celular, as diferenças na capacidade de hemaglutinação dos subtipos virais, neste caso de origem suína, dificultam o diagnóstico conclusivo;
- A detecção molecular do vírus por RT-PCR destas mesmas amostras, apresenta alta sensibilidade e vantagens com o tempo de diagnóstico.
- O seqüenciamento do genoma dos vírus detectados deverá ser uma etapa complementar a este projeto, não apenas para conclusão final dos resultados, mas para orientação de possíveis estratégias de detecção e controle de novos surtos e subtipos virais.

8 - BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER, D. J. **An overview of the epidemiology of avian influenza.** *Vaccine*. **25** (30): 5637-5644. (2007).

ANDREASEN, V, SASAKI, A. **Shaping the phylogenetic tree of influenza by cross-immunity.** *Theoretical Population Biology*. **70**: 164–173. (2006).

BEAN, W. J.; SCHEL, M.; KATZ, J.; KAWAOKA, Y.; NAEVE, C.; GORMAN, O. **Evolution of H3 influenza virus hemagglutinin from human and nonhuman hosts.** *Journal of Virology*. **66** (2): 1129-1138. (1992).

BELSHE, R. B.; BERGEN, R.; CLOCK, S. L.; BRYAN, C. S.; CLOVER, R. D.; GARDNER, P.; GLEZEN, W. P.; JACKSON, L. A.; KEYSERLING, H. L.; LIEBERMAN, J. M.; MONTO, A. S.; MUFSON, M. A.; PIEDRA, P. A.; REISINGER, K. S.; TREANOR, J. J. **Confronting influenza: prevention strategies that work.** *Medscape CME*, publicado em 12/04/2003.

BEARE, A. S., WEBSTER, R. G. **Replication of avian influenza viruses in humans,** *Archives of Virology*. **119** (1-2): 37-42. (1991).

BERTUCCI, L. M. **Influenza, a medicina enferma** – Editora Unicamp, 2004.

BRENTANO, L.; ZANELLA, J. R. C.; 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.** *CNPISA – Embrapa, (Comunicado Técnico 306)*. 1-6. (2002).

BROWN, I. H.; HARRIS, P. A.; ALEXANDER, D. J. **Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991-2.** *Epidemiology and Infection*. **114**: 511-520. (1995).

BROWN, I. H. **The epidemiology and evolutions of influenza viruses in pigs.** *Veterinary Microbiology*. **74** (1-2): 29-46. (2000)a.

BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J. **Recent zoonoses caused by influenza A viruses.** *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **19** (1): 197-225. (2000).

BROWN, I. H. **The continuing evolution of influenza viruses in pigs,** Disponível em www.esvv.unizh.ch/gent_abstracts/brown
Capturado em 26/11/2002.c

BROWN, I. H. **Influenza virus infections in pigs,** Disponível em www.pighealth.com/influenza
Capturado em 26/11/2002.b

CAMPITELLI, L. DONATELLI., FONI, E., CASTRUCCI, M. R., FABIANI, C., KAWAOKA, Y., KRAUSS, S., WEBSTER, R. G. **Continued Evolution of**

H1N1 and H3N2 Influenza Viruses in Pigs in Italy. *Virology* **232**: 310–318. (1997).

CAPUA, I.; ALEXANDER, D. J. **Avian influenza and human health.** *Acta Tropica*. **83**: 1–6. (2002).

CAPUA, I., MARANGON, S. **Control and prevention of avian influenza in an evolving scenario.** *Vaccine*. **25** (30): 5645-5652. (2007).

CARON, L. F.; THOMAZ- SOCCOL, V. T. **Threat of an influenza panzooty: a review based on conservation medicine.** *Brazilian archives of biology and technology*. **52** (4): 863-873. (2009).

CARON, L. F.; JOINEAU, M. E. G.; SANTIM, E.; RICHARTZ, R. T. B.; PATRICIO, M. A. C.; THOMAZ- SOCCOL, V. T. **Seroprevalence of H3N2 influenza a virus in pigs from Paraná (south Brazil): interference of the animal management and climatic conditions.** *Virus reviews and research*. **15** (01): 1-11. (2010).

CHOI, Y. K.; GOYAL, S. M.; JOO, H. S. **Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States.** *Archives of Virology*. **147**: 1209-1220. (2002).

CLAAS, E. C. J. **Pandemic influenza is a zoonosis, as it requires introduction of avian-like gene segments in the human population.** *Veterinary Microbiology*. **74** (1-2): 133-139. (2000).

CROSS, K.J.; BURLEIGH, L.M.; STEINHAEUER, D.A. **Mechanisms of cell entry by influenza virus.** *Expert reviews in molecular medicine*. **3** (21): 1-18. (2001).

De FATIMA, A.; BAPTISTELLA, L. H. B.; PILLI, R. H. **Ácidos siálicos – da compreensão do seu envolvimento em processos biológicos ao desenvolvimento de fármacos contra o agente etiológico da gripe.** *Química Nova*. **28** (2): 306-316. (2005).

EARN, D. J.; DUSHOFF, J.; LEVIN, S. A. **Ecology and evolution of the flu.** *Trends in Ecology & Evolution*. **17** (7): 334-340. (2002).

EASTERDAY, B.C., HINSHAW, V.S., **Swine influenza.** In: *Diseases of Swine*. LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L.; D'ALLAIRE, S.D.; TAYLOR, D.J. Iowa State Press, Ames, IA, 349–357. (1992).

ELAZHARY, M. A.; DEA, S.; MITTAL, K. R.; HIGGINS, R. **Prevalence of antibodies to swine influenza virus, porcine adenovirus Type 4 and *Haemophilus pleuropneumoniae* in Quebec pig farms with respiratory problems.** *The Canadian veterinary journal*. **26**: 190- 192. (1985).

FERGUSON, N. M.; GALVANI, A, P.; BUSH, R. M. **Ecological and immunological determinants of influenza evolution.** *Nature*. **422**: 428-433. (2003).

FORREST, H. L.; WEBSTER, R. G. **Perspectives on influenza evolution and the role of research.** *Animal health research reviews.* **11** (1): 3-18. (2010).

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.* **38** (11): 4096-4101. (2000).

GAMBARYAN, A. S.; YAMNIKOVA, S.; LVOV, D.; TUZIKOV, A.; CHINAREV, A.; PAZYNINA, G.; ROBERT WEBSTER, R. G.; MATROSOVICH, M.; BOVIN, N. **Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: New data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain.** *Virology.* **334** (2): 276-283. (2005)a.

GAMBARYAN, A. S.; KARASIN, A. I.; TUZIKOV, A. B., CHINAREV, A. A.; PAZYNINA, G. V.; BOVIN, N. V.; MATROSOVICH, M. N.; OLSEN, C. W.; KLIMOV, A. I. **Receptor-binding properties of swine influenza viruses isolated and propagated in MDCK cells.** *Virus Research.* **114** (1-2): 15-22. (2005)b.

GAMBARYAN, A.; TUZIKOV, A.; PAZYNINA, G.; BOVIN, N.; BALISH, A.; KLIMOV, A. **Evolution of the receptor binding phenotype of Influenza A (H5) viruses.** *Virology.* **344**: 432 – 438. (2006).

GARCIA- GARCIA J. RAMOS, C. **La influenza, un problema vigente de salud publica.** *Salud publica Mexicana.* **48**: 244-267. (2006).

GARTEN, R. J.; DAVIS, C. T.; RUSSEL, C. A.; SHU, B.; LINDSTRON, S.; BALISH, A. SESSIONS, W. M.; XU, X.; SKEPNER, E.; DEYDE, V.; ADHIAMBO, M. O.; GUBAVERA, L.; BARNES, J.; SMITH, C. B.; EMERY, S. L.; HILLMAN, M. J.; RIVAILLER, P.; SMAGALA, J.; GRAAF, M.; BURKE, D. F.; FOUCHIER, A. M.; PAPPAS, C.; ARANDA, C. M. A.; GATELL, H. L.; OLIVEIRA, H.; LÓPEZ, I.; MYERS, C. A.; FAIX, D.; BLAIR, P. J.; YU, C.; KEENE, K. M.; DOTSON, P. D.; BOXRUD, D.; SAMBOL, A. R.; ABID, S. H.; GEORGE, K. S.; BANNERMAN, T.; MOORE, A. L.; STRINGER, D. J.; BLEVINS, P.; HARRISON, G. J. D.; GINSBERG, M.; KRINER, P.; WATTERMAN, S.; SMOLE, S.; GUEVARA, H. F.; BELONGIA, E. A.; CLARK, P. A.; BEATRICE, S. T.; DONIS, R.; KATZ, J.; FINELLI, L.; BRIDGES, C. B.; SHAW, M.; JERNIGAM, D. B.; UYEKI, T. M.; SMITH, D. J.; KLIMOV, A.; COX, N. J. **Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans.** *Science.* **325**: 197- 201. (2009).

GAYDOS, J. C.; TOP, F. H.; HODDER, R. A.; RUSSELL, P.K. **Swine Influenza A Outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976.** *Emerging Infectious Diseases.* **12**: 9-14. (2006).

GLÜCK, U.; GEBBERS, J.; GLÜCK, R. **Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin in adult volunteers.** *Journal of Virology.* **73**: 7780-7786. (1999).

GRAY, G. C.; MCCARTHY, T.; CAPUANO, A. W.; SETTERQUIST, S. F.; OLSEN, C. W.; ALAVANJA, M. C.; LYNCH, C. F. **Swine Workers and Swine Influenza Virus Infections.** *Emerging Infectious Diseases*. **13**: 1871-1878. (2007).

GROSS, P. A. **Preparing for the next influenza pandemic: a reemerging infection.** *Annals of Internal Medicine (American College of Physicians)*. **124** (7): 682-685. (1996).

GUAN, Y.; SHORTRIDGE, K. F.; KRAUSS, S.; LI, P. H.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G. **Emergence of Avian H1N1 influenza viruses in pigs in China.** *Journal of virology*. **70** (11): 8041-8046. (1996).

HARTVIGSEN, G.; DRESCH, J. M.; ZIELINSKI, A. L.; MACULA, A. J.; LEARY, C. C. **Network structure, and vaccination strategy and effort interact to affect the dynamics of influenza epidemics.** *Journal of Theoretical Biology*. **246** (2): 205-213. (2007).

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. **Pandemic Threat posed by avian influenza A viruses.** *Clinical Microbiology Reviews*. **14**: 129-149. (2001).

ITO, T.; KAWAOKA, Y. **Host-range barrier of influenza A viruses.** *Veterinary Microbiology*. **74**: 71-75. (2000)a.

ITO, T., COUCEIRO, J. S.; KELM, S.; BAUN, L. G.; KRAUSS, S.; CASTRUCCI, M. R.; DONATELLI, I.; KIDA, H.; PAULSON, J. C.; WEBSTER, R. G.; KAWAOKA, Y. **Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential.** *Journal of Virology*. **72**: 7367-7373. (1998).

ITO, T. **Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A viruses.** *Microbiology & Immunology*. **44**: 423-430. (2000)b.

JONG, J. C.; HEINEN, P. P.; LOEFFEN, W. L. A.; VAN NIEUWSTADT, A. P.; CLAAS, E. C. J.; BESTEBROER, T. M.; BIJLSMA, K.; VERWEIJ, C.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; RIMMELZWAAN, G. F.; FOUCHIER, R. A. M.; KIMMAN, T. G. **Antigenic and molecular heterogeneity in recent swine influenza A(H1N1) virus isolates with possible implications for vaccination Policy.** *Vaccine*. **19**: 4452-4464. (2001).

JUNG, K.; HA, Y.; CHAE, C. **Pathogenesis of Swine Influenza Virus Subtype H1N2 Infection in Pigs.** *Journal of Comparative Pathology*. **132** (2-3): 179-184. (2005).

KARASIN, A. I.; SCHUTTEN, M. M.; COOPER, L. A.; SMITH, C. B.; SUBBARAO, K.; ANDERSON, G. A.; CARMAN, S.; OLSEN, C. W. **Genetic Characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1997-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes.** *Virus research*. **68** (1): 71-85. (2000).

KILBOURNE, E. D., ARDEN, N. H. **Inactivated influenza vaccines.** In: PLOTKIN, A S., ORENSTEIN, W.A. *Vaccines*, third edition, Philadelphia, Saunders. 531-552. (1999).

KITIKOON, P.; NILUBOL, D.; ERICKSON, B. J.; JANKE, B. H.; HOOVER, T. C. ; SORNSEN, S. A. ; THACKER, E. L. **The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination.** *Veterinary Immunology and Immunopathology.* **112:** 117–128. (2006).

LAMB, R. A.; KRUG R.M. **Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication.** In: *Fields Virology*, Ed. BN, Fields DM, Knipe PM. Howley, 3^a ed., Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, 1353-1395. (1996).

LEE, C. W.; SAIF, Y. M. **Avian influenza virus.** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* **32:** 301-310. (2009).

LI, H.; YOU, K.; XIN, X.; YANG, H.; LI, Y.; QIN, Y.; BI, Y.; TONG, G.; CHEN, H. **Serological and virologic surveillance of swine influenza in China from 2000 to 2003.** *Congress Series.* **1263:** 754-757.(2004)a.

LI, K. S.; GUAN, Y.; WANG, J.; SMITH, G. J.; XU, K. M.; DUAN, L.; RAHARDJO, A. P.; PUTHAVATHANA, P.; BURANATHAI, C.; NGUYEN, T. D.; ESTOEPANGESTIE, A. T.; CHAISINGH, A.; AUEWARAKUL, P.; LONG, H. T.; HANH, N. T.; WEBBY, R. J.; POON, L. L.; CHEN, H.; SHORTRIDGE, K. F.; YUEN, K. Y.; WEBSTER, R. G.; PEIRIS, J. S. **Genesis of highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia.** *Nature.* **430:** 209-213. (2004)b.

LUPIANI, B.; REDDY, S. M. **The history of avian influenza.** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious diseases.* **32:** 311-323. (2009).

MAES, D.; DELUYKER, H.; CASTRYCK, E. **Herd factors associated with seroprevalences of four major respiratory pathogens in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds.** *Veterinary Research.* **31:** 313-327. (2000).

MALDONADO, J.; VAN RETH, K.; RIERA, P.; SITJÁ, M.; SAUBI, N.; ESPUÑA, E.; ARTIGAS, C. **Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain.** *Veterinary Journal.* **172:** 377-381. (2006).

MANCINI, D. A. P. ; MENDONÇA, R. M. Z.; MENDONÇA, R. Z.; DIAS, A. L. F. ; PINTO, J. R. **Co- infection between influenza vírus and flagellated bacteria.** *Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo.* **47** (5):275 – 280. (2005).

MAPA- **Projeto de Vigilância Ativa da Doença de Newcastle e da Influenza Aviária, Manual de Procedimentos Operacionais, Versão Preliminar.** *Programa Nacional de Sanidade Avícola, Coordenação de Vigilância e*

Programas Sanitários, Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasília. 2001.

MICHIELS, B.; PHILLIPS, H.; COENEN, S.; DENEKENS, J.; VAN ROYEN, P. **Serum antibodies against circulating influenza strains among vaccinated and unvaccinated general practitioners during two consecutive years (2002, 2003).** *Vaccine.* **24** (16): 3145-3152. (2006).

MORISHITA, T.; NOBUSAWA, I.; NAKAJIMA, K.; NAKAJIMA, S. **Studies on the molecular basis for loss of the ability of recent influenza a (H1N1) virus strains to agglutinate chicken erythrocytes.** *Journal of General Virology.* **77**: 2499-2506. (1996).

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Orthomyxoviridae.** In: *Veterinary Virology.* Third edition- Academic Press. 459-468. (1999).

MYERS, K. P.; OLSEN, C. W.; SETTERQUIST, S. F.; CAPUANO, A. W.; DONHAN, K. J.; THACKER, E. L.; MERCHANT, J. A.; GRAY, G. C. **Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus?** *Clinical Infectious Diseases.* **42**: 14- 20. (2006).

MYERS, K. P.; OLSEN, C. W.; GRAY, G. C. **Cases of swine influenza in humans: a review of the literature.** *Clinical Infectious Diseases.* **44** (8): 1084-1088. (2007).

NEWMAN, A. P.; REISDORF, E.; BEINEMANN, J.; UYEKI, T. M.; BALISH, A.; SHU, B.; LINDSTROM, S.; ACHENBACH, J.; SMITH, C.; DAVIS, J. P. **Human case of swine influenza A (H1N1) triple reassortant virus infection, Wisconsin.** *Emerging infectious diseases.* **14** (9): 1470-1472. (2008).

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

OLSEN, C.W., CAREY, S., HINSHAW, L., KARASIN, A.I. **Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the northcentral United States.** *Archives of virology.* **145**: 1399–1419. (2000).

OLSEN, C.W., BRAMMER, L. EASTERDAY, B.C., ARDEN, N. BELAY, E. BAKER, I. COX, N.J., **Serologic evidence of H1 swine influenza virus infection in swine farm residents And employees.** *Emerging Infectious Diseases.* **8** (8): 814-819. (2002).

OLSEN, C.W. **The emergence of novel swine influenza viruses in North America.** *Virus Research.* **85**: 199–210. (2002).

OXFORD J. **Pandemias são como vulcões.** *Ciência Hoje.* **25** (149): . 7-12. (1998).

PAIVA, T. M.; KLIMOV, A.; HALL, H.; BENDER, C.; SUBBARAO, K.; COX, N. **Molecular epidemiology of influenza virus isolated in Brazil from 1996 to 2000.** *International Congress Series.* **1263**: 728–732. (2004).

PALESE, P., SASTRE, A. G. **Influenza vaccines: present and future.** *Journal of clinical investigation.* **1**: 9-13. (2002).

PASCUA, P. N.; SONG, M. S.; LEE, J. H.; CHOI, H. W.; HAN, J. H.; KIM, J. H.; YOO, G. J.; KIM, C. J.; CHOI, Y. K. **Seroprevalence and genetic evolutions of swine influenza viruses under vaccination pressure in Korean swine herds.** *Virus Research.* **138**: 43-49. (2008).

PASTORET, P. P.; SCHUDEL, A. A.; LOMBARD, M. **Future trends in veterinary vaccinology.** *Reviews science and technology Oficina Internacional de epizootias.* **26** (2): 489-494. (2007).

PEIRIS, J. S. M., GUAN, Y., MARKWELL, D., GHOSE, P., WEBSTER, R. G., SHORTRIDGE, K. F. **Cocirculation of avian H9N2 and contemporary “human” H3N2 influenza A viruses in pigs in southeast China: potential for genetic reassortment?** *Journal of virology.* **75** (20): 9679-9686. (2001).

PHILIPPA, J. D. W.; MUNSTER, V. J.; BOLHUIS, G. H.; VAN BESTBROER, T. M.; SCHAFTENAAR, W.; BEIER, W. E. P.; FOUCHIER, R. A. M.; KUIKEN, T.; OSTERHAUS, A. D. M. E. **Highly pathogenic influenza (H7N7): vaccination of zoo birds and transmission to non-poultry species.** *Vaccine.* **23**: 5743-5750. (2005).

POLJAK, Z.; FRIENDSHIP, R. M., CARMAN, S. **Investigation of exposure to swine influenza viruses in Ontario (Canada) finisher in herds 2004 and 2005.** *Preventive Veterinary Medicine.* **83**: 24-40. (2008).

POSPÍ-IL, Z., LÁNY, P., TÓMOVÁ, B., BUCHTA, J., ZENDULKOVÁ, D., AÍHAL, P.; **Swine influenza surveillance and the impact of human influenza epidemics on pig herds in the Czech Republic.** *Acta Veterinaria Belgrado.* **70**: 327-332. (2001).

RAMIREZ, A.; CAPUANO, A. W.; WELLMAN, D. A.; LESHER, K. A.; SETTERQUIST, S. F.; GRAY, G. C. **Preventing Zoonotic Influenza Virus Infection.** *Emerging Infectious Diseases.* **12**: 997-1000. (2006).

REID A.H.; TAUBENBERGER J.K. **The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma.** *Journal of General Virology.* **84**: 2285–2292. (2003).

SCHOLTISSEK, C.; RHODE, W.; VON HOYNINGEN, V.; ROTT, R. **On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2.** *Virology.* **87**: 13-20. (1978).

SHOPE, R.E. **The incidence of neutralizing antibodies for swine influenza virus in the sera of human beings of different ages.** *The journal of experimental medicine.* **63:** 669-684. (1936).

SMITH, G. J. D.; VIJAYKRISHNA, D.; BAHL, J.; LYCETT, S. J.; WOROBEY, M.; PYBUS, O. G.; MA, S. K.; CHEUNG, C. L.; RAGHWANI, J.; BHAT, S.; PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y.; RAMBAUT, A. **Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic.** *Nature.* **459.** 1122- 1126. (2009).

Simepar (05/04/2008). Previsão Climática para o Paraná - 2008, capturado em 07/04/2009, de [http:// www.simepar.br/tempo/clima/parana](http://www.simepar.br/tempo/clima/parana).

SOUZA FILHO, A. M. **Anticorpos do vírus da influenza em suínos.** *Tese apresentada para o concurso de cátedra de higiene veterinária e rural- Escola superior de agricultura e veerinária do Paraná (UFPR).* (1958).

STEINHAUER, D. A. **Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza vírus.** *Virology.* **258:** 1-20. (1999).

SUAREZ, D. L. SCHULTZ-CHERRY, S. **Immunology of avian infuenza virus: a review.** *Developmental and Comparative Immunology.* **24 :** 269-283. (2000).

SUN, L.; ZHANG, G.; SHU, Y.; CHEN, X.; ZHU, Y.; YANG, L.; MA, G.; KITAMURA, Y.; LIU, W. **Genetic correlation between H3N2 human and swine influenza viruses.** *Journal of clinical virology.* **44:** 141-144. (2009).

SURIYA, R.; HASSAN, L.; OMAR, A. R.; AINI, I.; TAN, C. G.; LIM, Y. S.; KAMARUDIM, M. I. **Seroprevalence and risk factors for influenza A viruses in pigs in Peninsular Malaysia.** *Zoonoses and Public Health.* **55:** 342-351. (2008).

TALAVERA, G. A.; BURGOS, J. M. C.; ARMAS, A. B. C. **Serologic evidence of human and swine influenza in Mayan persons.** *Emerging infectious diseases.* **11 (1):**158-160. (2005).

TONG, N.; NOBUSAWA, E.; MORISHITA, M.; NAKAJIMA, S.; NAKAJIMA, K., M. **Protein correlates with the receptor-binding specificity of haemagglutinin protein of reassortant influenza A (H1N1) virus.** *Journal of General Virology.* **79:** 2425-2434. (1998).

VALEIKA, S.; BROWN, J. D.; GOEKJIAN, G.; POULSON, R.; STALLKNECHT, D. E. **Avian influenza virus in water: infectivity is dependent on pH, salinity and temperature.** *Veterinary Microbiology.* **136:** 20-26. (2009).

VAN EPPS, H.L. **Influenza: exposing the true killer.** *The Journal of experimental medicine.* **203:** 803- 803. (2006).

VAN REETH, K.; GREGORY, V.; HAY, A.; PENSAERT, M. **Protection against a European H1N2 swine influenza virus in pigs previously infected with H1N1 and/or H3N2 subtypes.** *Vaccine.* **21 (13-14):** 1375- 1381. (2003).

- VAN REETH, K. **Avian and swine influenza viruses: our current understanding off the zoonotic risk.** *Veterinary Research.* **38**: 243-260. (2007).
- WEBSTER, R. G., BEAN, W. J., GORMAN, O. T., CHAMBERS, T. M., KAWAOKA, Y. **Evolution and ecolgy of influenza A viruses.** *Microbiology Review.* **56** (1): 152-179. (1992).
- WEBSTER, R. G; HULSE, D. J. **Microbial adaptation and change: avian influenza.** *Reiews Science techinology officine International of epizooties.* **23** (2): 453-465. (2004).
- WEBSTER, R.G.; PEIRIS M.; CHEN, H.; GUAN, Y. **H5N1 outbreaks and enzootic influenza.** *Emerging Infectious Diseases.* **12**: 3-8. (2006).
- WHARTON, S.A.; CALDER, L. J.; RUIGROKL, R. W. H.; SKEHEL, J. J.; STEINHAUER, D. A.; WILEY, D. C. **Electron microscopy of antibody complexes of influenza virus haemagglutinin in the fusion pH conformation.** *The EMBO Journal.* **14** (2): 240-246. (1995).
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Identification of influenza isolates by hemagglutination inhibition** *In: WHO Manual on animal influenza diagnosis and surveillance.* (World Health Organization) Department of Communicable Disease Surveillance and Response: 28- 35. (2002).
- WON-LEE, C., SENNE, D. A., SUAREZ, D. L. **Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilization of a diva (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the control of avian influenza.** *Vaccine.* **22**: 3175-3182. (2004).
- WRIGHT, P. F.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. **Orthomyxoviruses** *In: Fields Virology.* 5th ed., Lippincott – Willians and Wilkins Publishers, Philadelphia. **2**: 1691-1739. (2007).
- ZHOU, N. N.; SENE, D. A.; LANDGRAF, J. S.; SWENSON, S. L.; ERICKSON, G.; ROSSOW, K.; LIU, L.; YON, K.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G. **Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses un American pigs.** *Journal of virology.* **73** (10): 8851-8856. (1999).
- ZHOU, N. N.; SENE, D. A.; LANDGRAF, J. S.; SWENSON, S. L.; ERICKSON, G.; ROSSOW, K.; LIU, L.; YON, K.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G. **Emergence of reassortant influenza A virus in North American pigs.** *Veterinary Microbiology.* **74** (1-2): 47-58. (2000).
- ZUK, T.; RAKOWSKI, F.; RAKOWSKI, J. P. **A model of influenza virus spread as a function of temperature and humidity.** *Computational Biology and Chemistry.* **33**. 176 - 180. (2009).