

Tópico de Interesse Geral

Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos¹

Rejane Schaefer^{2*}, Raquel R. Rech², Marcia C. Silva³, Danielle Gava²
e Janice R. Ciacci-Zanella²

ABSTRACT.- Schaefer R., Rech R.R., Silva M.C., Gava D. & Ciacci-Zanella J.R. 2013. [Guidelines for diagnosis of swine influenza.] Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(1):61-73. Embrapa Suínos e Aves, BR 153 Km 110, Concórdia, SC 89700-000, Brazil. E-mail: rejane.schaefer@embrapa.br

This article is intended to describe the adequate sample collection, the laboratory procedures/techniques, the expected results and their interpretation for diagnosis of influenza infection in swine, serving as a support for field veterinarians. In live pigs, the samples to be taken are nasal secretions, oral fluids and blood. For dead pigs, preference should be given to samples of cranioventral lung consolidation. Nasal discharge and chilled lung fragments are used for detection of virus (virus isolation - VI) or viral nucleic acids (conventional RT-PCR and real-time RT-PCR). Samples should not be frozen, because the virus is inactivated at -20°C. Molecular characterization of isolates is performed by phylogenetic analysis of gene sequences obtained by DNA sequencing. Serum is used for the detection of antibodies using hemagglutination inhibition (HI) test and ELISA. Oral fluid may be used for either antibody (ELISA) or viral detection. Fragments of lung fixed in 10% formaldehyde are used for histopathological analysis to identify bronchointerstitial pneumonia, and for immunohistochemistry (IHC) for antigens. For a successful diagnosis, sampling should be preferably performed in the acute phase of the disease to improve chances of virus detection. The best options to perform the diagnosis of influenza A in a swine herd are RT-PCR and VI from nasal swabs or oral fluid in live pigs and/or lung tissue for RT-PCR, VI or IHC in dead pigs. Serological tests are of very limited diagnostic value and are useful only to determine the immune status of the herd, not indicating clinical disease, because antibodies are detected after 7-10 days post infection (subacute phase). The diagnosis of influenza is important to evaluate the involvement of this agent in the complex of respiratory diseases in pigs. Furthermore, the isolation of influenza virus is essential for monitoring the main subtypes circulating in a given region or country, as well as for the detection of potential new viral reassortants, because influenza is considered a zoonosis.

INDEX TERMS: Influenza A virus, oral fluid, sampling, diagnostic tests, respiratory diseases, swine.

RESUMO.- Este trabalho descreve a colheita adequada de amostras, as técnicas/procedimentos disponíveis para o diagnóstico de influenza A em suínos, assim como os resultados e suas respectivas interpretações, para auxiliar médicos veterinários de campo na identificação dessa doença. Em suínos vivos, as amostras adequadas são: secreção nasal, fluido oral e sangue (soro). Para suínos mortos, colher preferencialmente amostras de pulmão com consolidação

cranioventral. Secreção nasal e fragmentos de pulmão refrigerado são utilizados para detectar partícula viral viável (isolamento viral - IV) ou ácido nucleico viral (RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real). As amostras não devem ser congeladas, pois o vírus é inativado a -20°C. A caracterização molecular dos isolados é feita pela análise filogenética obtida pelo sequenciamento de DNA. O soro é utilizado para a detecção de anticorpos (Acs) por meio do teste da inibição da hemaglutinação e ELISA. O fluido oral pode ser utilizado para detecção de anticorpo (ELISA) ou de vírus. Fragmentos de pulmão fixados em formol a 10% são examinados microscopicamente para identificar pneumonia broncointersticial e para detecção de antígeno viral pela imuno-histoquímica (IHQ). Para o sucesso do diagnós-

¹ Recebido em 3 de setembro de 2012.

Aceito para publicação em 31 de outubro de 2012.

² Embrapa Suínos e Aves, BR 153 Km 110, Concórdia, SC 89700-000, Brasil. *Autor para correspondência: rejane.schaefer@embrapa.br

³ Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal (CEDISA), BR 153 Km 110, Concórdia, SC 89700-000.

tico, as amostras devem ser colhidas de suínos que estão preferencialmente na fase aguda da doença, para aumentar as chances de detecção viral. As melhores opções para o diagnóstico de influenza A em suínos vivos são RT-PCR e isolamento viral de amostras de *swab* nasal ou fluido oral. Pulmão para análise por RT-PCR, isolamento viral ou IHQ é a amostra de escolha em suínos mortos. Testes sorológicos têm valor diagnóstico limitado e são utilizados apenas para determinar o estado imune do rebanho, não indicando doença clínica, pois os Acs são detectados 7-10 dias pós-infecção (fase subaguda). O diagnóstico de influenza é importante para avaliar o envolvimento desse agente no complexo de doença respiratória suína. Além disso, o isolamento do vírus influenza é essencial para o monitoramento dos principais subtipos circulantes em uma determinada região ou país, assim como para a detecção de novos rearranjos virais, já que influenza é considerada uma zoonose.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Vírus influenza A, fluido oral, colheita de amostras, testes diagnósticos, doenças respiratórias, suínos.

INTRODUÇÃO

Influenza em suínos

A influenza é uma doença respiratória viral aguda, altamente contagiosa, que afeta suínos e outras espécies, incluindo humanos. Em suínos, a doença é causada pelo vírus influenza A. Quando introduzida pela primeira vez na granja, a doença é caracterizada pelo aparecimento súbito, acometendo um grande número de suínos (até 100%) de várias faixas etárias. Isto ocorre porque os suínos não foram expostos ao vírus influenza previamente; assim, a doença aparece na sua forma epidêmica (Van Reeth et al. 2012). Uma vez estabelecida na granja (forma endêmica), a doença geralmente aparece na fase de creche em rebanhos não vacinados, pois os anticorpos maternos persistem até a sexta semana de vida (Janke 2000). Quando as matrizes são vacinadas, os anticorpos persistem por até 14 semanas de idade e assim a doença aparece mais tarde no rebanho. Surtos podem ocorrer durante todo o ano e fatores como a idade do suíno, estado imunitário, pressão de infecção, condições climáticas, manejo, reposição ou entrada de suínos de outros rebanhos e doenças concomitantes podem influenciar o número de casos da doença (Van Reeth et al. 2012).

O vírus replica no epitélio respiratório e é excretado nas secreções nasais dentro das 24 horas após a infecção. A excreção viral diminui por volta de seis a oito dias pós-infecção (Detmer et al. 2012). A transmissão ocorre por contato direto entre os suínos por meio das secreções nasais de suínos infectados/doentes. Os sinais clínicos frequentemente observados são febre (40,5-41,5°C), anorexia, prostração, relutância em levantar-se, taquipneia e, após alguns dias, tosse (Van Reeth et al. 2012). Geralmente a mortalidade é baixa ($\leq 1\%$) e a recuperação clínica dos suínos é rápida, entre cinco e sete dias após o início dos sinais clínicos, desde que não ocorram complicações devido a infecções secundárias. Reinfecções podem ocorrer uma vez que a imunidade cruzada entre subtipos virais é parcial (Vincent et al. 2010). A infecção pelo vírus influenza em suínos é restrita ao trato respiratório e o vírus não está presente em outros tecidos,

como o tecido muscular (Vincent et al. 2009). Desta forma, a carne suína é segura para o consumo humano e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a presença de influenza A em suínos não deve ser considerada barreira para o comércio internacional da carne suína.

O objetivo deste trabalho é orientar os médicos veterinários em reconhecer a influenza em rebanhos suínos, colher o material adequado para a análise laboratorial e realizar a correta interpretação dos resultados. As orientações compiladas neste trabalho pretendem auxiliar no sucesso do diagnóstico, reforçando o elo de conexão do campo com o laboratório de diagnóstico.

Seleção do suíno

A obtenção da melhor amostra para o diagnóstico de influenza começa com a seleção correta dos suínos para a colheita de material (Janke 1995). Devem-se selecionar suínos que estejam na fase aguda da doença, febris, com ou sem tosse. Um método impreciso de avaliar se os suínos estão com febre é observar se estão amontoados na baia, entretanto, o método recomendado é o uso do termômetro para aferir a temperatura retal. Suínos refugos não devem ser enviados para o diagnóstico, uma vez que podem representar leitões que já nasceram com peso abaixo do adequado, fracos e/ou que adquiriram essa condição devido a problemas de manejo, nutrição, sanidade, ambiência etc. Da mesma forma, evitar selecionar suínos que morreram espontaneamente, porque os tecidos apresentam autólise (auto-destruição celular após a morte) que prejudica a qualidade das amostras. Preferencialmente, não selecionar suínos que já tenham sido medicados. Embora o uso de antibióticos não interfira nos testes virológicos, diminui ou anula as chances de isolamento de agentes bacterianos. Realizar a eutanásia dos suínos de modo a atender as exigências de bem-estar animal (National Pork Board 2009).

Colheita, acondicionamento e envio das amostras ao laboratório

Para teste virológico e molecular são colhidas amostras de secreção nasal, pulmão e fluido oral. Para o diagnóstico anátomo-histopatológico e imuno-histoquímico, colhe-se pulmão. Embora a traqueia também seja um sítio de replicação viral, é pouco utilizada no diagnóstico de rotina de influenza. Para o diagnóstico sorológico são colhidos sangue e fluido oral. Suínos vivos não medicados e com sinais típicos de doença aguda podem ser enviados ao laboratório de diagnóstico para necropsia e colheita de amostras.

A secreção nasal é a amostra de escolha para o diagnóstico de influenza em suínos vivos. Para a colheita de secreção nasal devem ser utilizados *swabs* sintéticos (dracon ou rayon; não utilizar *swabs* de algodão ou alginatados) com aproximadamente 15cm de comprimento, e meio de transporte de vírus (meio de cultura ou solução salina de fosfatos - PBS), suplementado com antibióticos e albumina sérica bovina (OIE 2010). No momento da colheita, o suíno deve ser contido adequadamente com a cabeça posicionada para cima, afim de permitir um fácil acesso a cavidade nasal. O *swab* é umedecido no meio de transporte e introduzido suavemente na narina, seguindo a direção dorso-medial



Fig.1. Colheita de secreção nasal. (A) Introdução de swab na direção dorso-medial acompanhando o septo nasal. (B) Hemiseção da cabeça mostrando a profundidade de inserção e o posicionamento de swab na cavidade nasal em um suíno de quatro semanas. (C) Acondicionamento de swab no meio de transporte.

(acompanhando o septo nasal) (Fig.1A). Realizar um movimento circular com swab para cobrir a maior parte da superfície da mucosa nasal. A profundidade aproximada de inserção de swab para uma ótima amostragem depende da idade do suíno (em geral, de 3-10cm; Fig.1B). A introdução de swab na narina não deve oferecer resistência e, o material colhido preferencialmente não deve conter sangue. Utilizar um swab por animal; não colocar swabs de mais de um suíno no mesmo frasco contendo o meio de transporte. Caso haja necessidade de colher secreção nasal para o diagnóstico bacteriológico, introduzir outro swab na outra narina. Após a colheita, a haste do swab deve ser cortada e o swab mantido dentro do frasco, identificado apropriadamente, e armazenado a 4°C até o envio ao laboratório (Fig.1C). Os swabs nasais devem ser mantidos refrigerados, nunca congelados, e enviados ao laboratório no mesmo dia da colheita (chegando ao laboratório, no máximo, em 48 horas). As chances de isolamento viral diminuem com o passar dos dias (Kim & Pedersen 2009).

Para a colheita de sangue e obtenção de soro, utilizam-se os seguintes materiais: seringas de 10mL e agulhas descartáveis e estéreis ou tubos Vacutainer®. Para leitões de creche usar agulhas com tamanho de 25x8 ou 25x10. Para suínos em crescimento e terminação, usar agulhas 40x12 ou 40x16. Durante a colheita, conter o suíno adequadamente. Colher sangue da fossa jugular direita (Ramirez & Karriker 2012) (Fig.2), movimentando a agulha para cima ou para baixo, não lateralmente, para evitar ruptura de vasos ou nervos. Após a colheita, manter o sangue na seringa (identificada) em temperatura ambiente (21-23°C) por pelo menos duas horas para que ocorra a formação do coágulo e separação do soro. Após, a seringa deve ser armazenada a 4°C, pois a baixa temperatura facilita a retração do coágulo e formação do soro. Caso as seringas não possam ser encaminhadas ao laboratório em 24 horas, retirar o soro do contato com o coágulo, para evitar a hemólise, que diminui a qualidade do soro. Caso haja a disponibilidade de uma centrífuga, centrifugar as amostras de sangue após a formação do coágulo, a 3.000rpm por 10 minutos. Identificar as amostras e congelar o soro (Muirhead 1981, Ramirez & Karriker 2012).

O fluido oral é uma mistura de saliva e transudato mucoso oral que tem sido utilizado na medicina veterinária

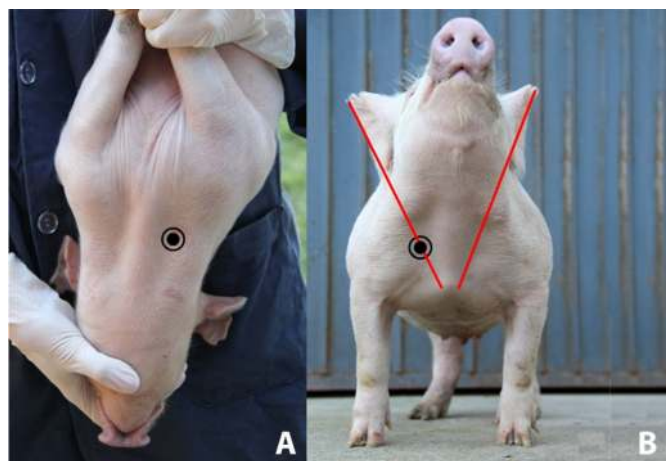


Fig.2. Métodos de contenção de suínos para colheita de sangue.

(A) Suínos de até 30kg na posição vertical com leve tração da cabeça para baixo. O círculo indica o local onde a agulha é inserida na fossa jugular direita. (B) Suíno com mais de 30 kg em estação com a cabeça tracionada para cima em ângulo de 30°. Para localizar a fossa jugular, duas linhas imaginárias (vermelhas) são traçadas da ponta de cada orelha até o esterno, para localização da fossa jugular. A agulha é inserida no ponto preto do círculo, preferencialmente do lado direito do suíno, a fim de evitar lesão do nervo vago esquerdo.

para detecção de anticorpos e agentes infecciosos (Prickett et al. 2008, Prickett & Zimmerman 2010). O processo de colheita do fluido oral é simples, não invasivo e muito prático, uma vez que leva em conta o comportamento natural curioso dos suínos, os quais interagem e brincam com a corda de algodão utilizada na colheita e com isso depositam o fluido oral na mesma. Como a colheita do fluido oral é realizada por grupo, um maior número de suínos é amostrado, reduzindo o custo da mão-de-obra. A utilização de fluido oral para o diagnóstico de influenza foi considerado um método sensível para a detecção do vírus (Detmer et al. 2011), mesmo quando há baixa prevalência de influenza nas baias estudadas (Romagosa et al. 2011). Amostras de fluido oral têm sido também utilizadas para o diagnóstico do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV) e circovírus suíno tipo 2 (PCV2), bem como detecção de anticorpos para PRRS (Prickett et al. 2008).

Os materiais necessários e os procedimentos de colheita e envio do fluido oral são:

a) Cordas 100% algodão, com diâmetro sugerido de 1,3cm para colheita de fluido oral de leitões de creche e 1,6cm para suínos em crescimento-terminação. As cordas devem ser cortadas de tal forma que elas atinjam o topo dos ombros dos suínos e devem ter as pontas desfiadas para facilitar a apreensão da mesma. As cordas devem ser amarradas firmemente na baia, com o auxílio de arames ou outro material, para que não tenham contato com o piso, comedouros ou bebedouros.

b) Utiliza-se uma corda para cada 10 suínos ou uma corda por baia, as quais são expostas aos suínos para mastigação por 20-30 minutos (Fig.3A).

c) A parte molhada da corda é colocada em um saco plástico limpo e resistente de 3,7L (por exemplo, ziploc®) (Fig.3B) e o fluido oral é extraído da corda através de compressão manual, acumulando-se em um dos cantos do saco plástico (Fig.3C). O saco é fechado, o canto inferior do mesmo é cortado e o fluido oral é coletado para um tubo plástico de 5mL (Fig.3D). Geralmente são obtidos 4 a 8mL da amostra de fluido oral. Caso não seja possível centrifugar os fluidos orais coletados, é importante deixar os tubos em repouso a 4°C durante 8-12 horas para permitir a sedimentação dos debris celulares presentes no fluido oral.

d) As amostras devem ser identificadas como fluido oral no momento da submissão ao laboratório (Fig.3D), uma vez que protocolos especiais são utilizados na análise destas amostras.

e) Para o transporte até o laboratório as amostras de fluido oral devem ser mantidas refrigeradas (Prickett et al. 2008, Romagosa et al. 2011, Ramirez & Karriker 2012).

O pulmão é a amostra de escolha para o diagnóstico de influenza em suínos necropsiados. A melhor forma de observar as lesões de pneumonia em suínos é realizar a necropsia em decúbito lateral. A necropsia deve ser realizada logo após a eutanásia. Após a retirada das costelas, cortando próximo às junções costocodrais com faca ou costótomo, pode-se observar o aspecto lateral de um dos pulmões. O aspecto macroscópico típico de pneumonia por influenza em suínos é de áreas vermelhas, ligeiramente deprimidas (atelectasia) e mais firmes (consolidação), afetando áreas extensas da região cranioventral do pulmão (Gauger et al. 2012a), podendo se estender às áreas caudais em lóbulos isolados, dando o aspecto de “tabuleiro de xadrez” (Pereda et al. 2010) (Fig.4A). Essa lesão macroscópica pode ser indistinguível da causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* (López 2012). Muitas vezes, as lesões induzidas pelo vírus influenza estão mascaradas por broncopneumonias bacterianas (Van Reeth et al. 2012). Então, tanto as amostras de pulmão refrigeradas como as fixadas em formol são úteis para o diagnóstico de outras doenças respiratórias em suínos.

Para a realização de testes virológicos e moleculares, colher fragmentos de pulmão dos lobos afetados, contendo brônquios e bronquíolos (Fig.4B). Fragmentos das extremidades do pulmão não são ideais para o isolamento do vírus influenza, porque nessas áreas existem poucos bronquíolos. Os fragmentos de pulmão devem ser embalados em saco plástico devidamente identificado e mantidos

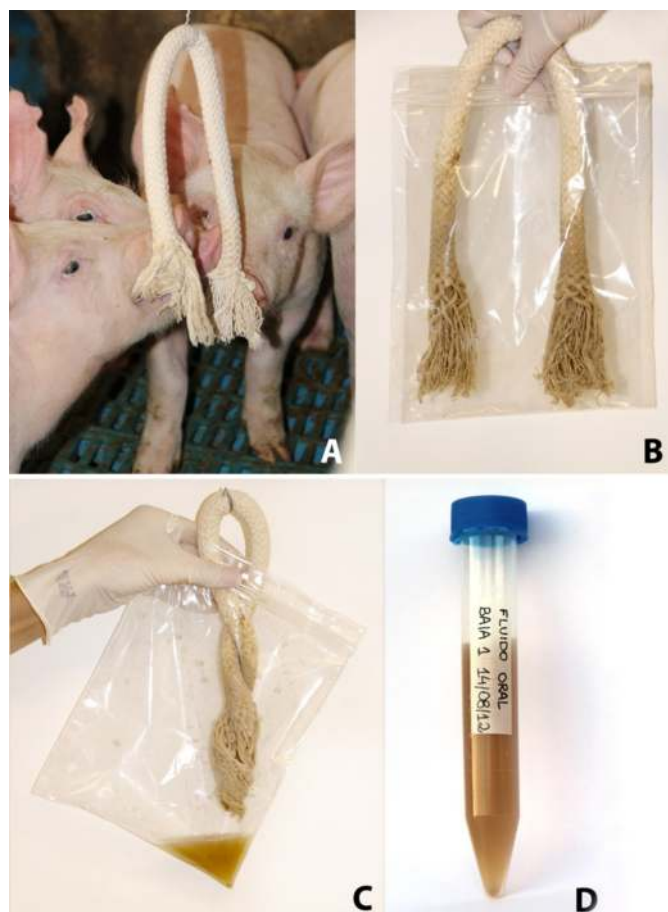


Fig.3. Colheita de fluido oral. (A) Posicionamento da corda na baia na altura do ombro dos suínos para facilitar a apreensão. (B) Parte molhada da corda contendo fluido oral dentro do saco plástico. (C) Acúmulo do fluido oral em um dos cantos do saco plástico após compressão manual da corda para extração do fluido oral. (D) Armazenamento do fluido oral em frasco de transporte devidamente identificado.

sob refrigeração para o envio ao laboratório. Não congelar as amostras em freezer convencional, pois o congelamento a -20°C inativa o vírus influenza (Van Reeth et al. 2012). As amostras de diferentes suínos ou diferentes tecidos do mesmo animal devem ser acondicionadas separadamente para que não haja contaminação entre as amostras. Identificar o saco plástico com o tipo de amostra (nesse caso, pulmão) e moça ou brinco do suíno usando caneta de marcação permanente. Se necessário, identificar o lote.

Para os exames histopatológico e imuno-histoquímicos devem-se colher fragmentos do pulmão afetado de aproximadamente 1,0cm de espessura (Fig.4C). A faca deve estar bem afiada para não amassar o pulmão durante o corte, evitando artefatos no tecido ao exame microscópico. Os fragmentos devem ser colocados imediatamente em frascos de boca larga e tampa com excelente vedação, já contendo formol a 10%, caso contrário podem grudar no fundo do frasco e prejudicar a fixação. A função do formol é interromper o processo de autólise do tecido. Para uma correta fixação é necessário respeitar a relação de uma parte de tecido para 10 ou mais partes de formol. Não há necessidade de colocar algodão hidrofóbico com o objetivo de manter

o fragmento em contato com o formol, pois quando há lesão (inflamação) o pulmão está pesado e afunda; em casos de pulmão sadio, o fragmento flutua e o formol ocupa os espaços aéreos, permitindo a fixação completa (Fig.4D). O tempo mínimo de fixação em formol é de 24 horas. O ideal é não deixar as amostras fixadas por um período superior a cinco dias, pois se o pulmão fixado for utilizado para a técnica de imuno-histoquímica (IHQ), períodos longos no formol formarão ligações proteicas que dificultam a exposição do antígeno no tecido, tornando-o não acessível para a ligação de anticorpos antígeno-específicos (Ramos-Vara et al. 1999). O material em formol deve ser mantido em temperatura ambiente (21-23°C) ou superior. Em períodos de clima frio, recomenda-se manter o material em formol em caixas isotérmicas, pois as baixas temperaturas dificultam a penetração do mesmo nos tecidos. Dar preferência ao uso de frascos de plástico rígido para evitar quebra durante o transporte. Se a única opção é o uso de recipientes de vidro, recomenda-se embalá-los com um saco plástico para que, em caso de quebra, não haja vazamento de formol. Para evitar que os frascos quebrem, recomenda-se protegê-los com papel amassado (ex. jornal). Enviar o material em formol separado das demais amostras coletadas para outros exames laboratoriais, pois se houver vazamento durante o transporte, as amostras para exame microbiológico podem ser inativadas pelo formol, e a refrigeração necessária para as outras amostras diminui a fixação dos tecidos pelo formol.

Todos os tubos/frascos das amostras devem ser corretamente identificados com caneta permanente ou etiqueta. As amostras devem ser identificadas com as seguintes informações: tipo de amostra (ex. fluido oral), identificação do suíno (mossa ou brinco) para amostras de *swab* nasal, soro e tecidos em formol e identificação da baía para amostras de fluido oral. Para as amostras em formol deve-se ainda informar a data e hora da morte e data e hora da colheita dos tecidos. As amostras devem ser enviadas ao laboratório juntamente com o formulário de submissão devidamente preenchido (seguir o modelo do laboratório para onde a amostra será enviada). Os formulários preenchidos devem ser acondicionados em sacos plásticos para que não fiquem em contato com o material refrigerado ou formolizado, im-

pedindo a leitura dos mesmos na chegada ao laboratório. Além disso, há sempre a possibilidade de telefonar para o laboratório de diagnóstico para esclarecer dúvidas com o médico veterinário responsável, bem como se informar sobre o horário de funcionamento para o envio das amostras.

Testes diagnósticos e interpretação dos resultados

Para entender os diferentes testes diagnósticos de influenza, é necessária uma breve informação sobre o vírus. Os vírus influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae* e são classificados em tipo A, B e C de acordo com as propriedades antigênicas das proteínas internas: nucleoproteína (NP) e da proteína da matriz (M). Os vírus influenza A possuem um genoma segmentado constituído por oito moléculas lineares de RNA de polaridade negativa, as quais codificam 10 a 12 proteínas virais. A existência de um genoma segmentado permite que trocas de genes entre vírus originários de espécies animais distintas aconteça quando uma célula do hospedeiro é infectada por dois vírus diferentes. Esta capacidade de permuta de segmentos do genoma (*antigenic shift*) e mutações intragênicas (*antigenic drift*) permite uma adaptação evolutiva eficiente dos vírus influenza, sendo estes, os dois principais mecanismos responsáveis pela grande variabilidade genética dos vírus influenza A. Os vírus influenza A infectam humanos e várias outras espécies de mamíferos e aves. Em suínos, o vírus influenza A é considerado o tipo viral mais importante associado com doença (Van Reeth et al. 2012).

As proteínas mais importantes para o diagnóstico são: duas proteínas internas - a nucleoproteína (NP) e a proteína da matriz (M); geralmente as mais conservadas, sendo muito utilizadas em testes de triagem de amostras visando à identificação de vírus influenza A; e duas glicoproteínas de superfície, que fazem parte do envelope lipídico chamadas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). As proteínas HA e NA possuem propriedades antigênicas e sequências gênicas distintas e por isso são utilizadas para subtipar os vírus influenza A em 16 tipos de HA (1 a 16) e nove tipos de NA (1 a 9) (Lamb et al. 2001). Em suínos, os subtipos virais mais prevalentes são H1N1, H3N2 e H1N2. Para uma maior compreensão sobre a origem e evolução dos vírus influenza A circulantes em suínos, além da subtipagem (H,

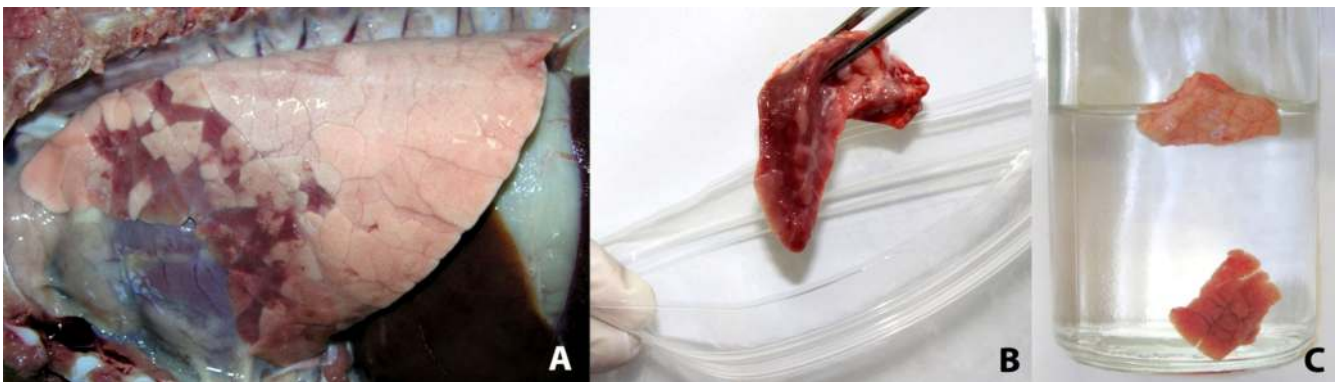


Fig.4. Colheita de fragmentos de pulmão. (A) Consolidação cranial do pulmão com aspecto de tabuleiro de xadrez. (B) Fragmento de pulmão com consolidação contendo brônquio e bronquíolos para exame virológico. (C) Fragmentos de pulmão com 1cm de espessura em formol para exame histopatológico. Pulmão consolidado no fundo do frasco e pulmão normal flutuando.

N), é necessário realizar a genotipagem viral. Para isso, faz-se o sequenciamento dos oito genes do vírus e a submissão destas sequências à análise filogenética. Com os dados gerados por essa análise, é possível identificar o hospedeiro e a origem geográfica de cada gene viral, detectar mutações e eventos de recombinação viral (Christopher-Hennings et al. 2012). Por meio da genotipagem foi possível determinar a origem do vírus H1N1 que causou a pandemia de influenza humana em 2009 [A(H1N1)pdm09]. Este novo vírus surgiu como resultado de recombinação de genes entre vírus influenza suína (hospedeiro) de origem Norte-Americana e da Eurásia (origem geográfica) e vírus influenza de origem humana e aviária, indicando a ocorrência de rearranjos entre vírus influenza de várias origens ao longo do tempo (Garten et al. 2009, Smith et al. 2009).

A nomenclatura dos vírus influenza A segue um padrão universal e contem as seguintes informações: tipo de vírus, hospedeiro (caso o vírus não tenha sido isolado de humanos), local de isolamento, número da amostra, ano de isolamento e subtipo antigênico (HA e NA). Por exemplo: o vírus influenza pandêmico H1N1 isolado em humanos na Califórnia em 2009 foi designado: A/Califórnia/04/2009(H1N1): Influenza tipo A, isolado primeiramente na Califórnia, número da amostra 04, ano de isolamento 2009 e subtipo H1N1 (Fig.5).

O diagnóstico definitivo de influenza só é possível por meio de análise laboratorial das amostras coletadas, uma vez que os achados clínico-patológicos são presuntivos, mas não confirmatórios da doença (Janke 1995, Detmer et al. 2012). Os testes laboratoriais comumente usados para o diagnóstico de influenza A são: a) isolamento viral para a detecção do agente, b) testes moleculares para a detecção de material genético viral, c) testes sorológicos para a demonstração de anticorpos específicos para o vírus, e d) análise histopatológica e IHQ para a identificação de lesões microscópicas e detecção do antígeno viral, respectivamente (Van Reeth et al. 2012).

Isolamento viral

O isolamento viral (VI) é utilizado para a multiplicação

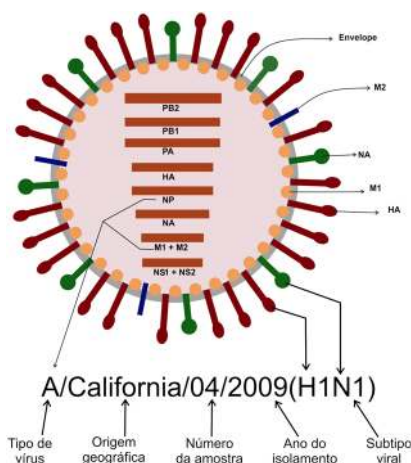


Fig.5. Diagrama do vírus influenza A mostrando o envelope viral e os oito genes virais bem como a nomenclatura utilizada. (Adaptado de Vincent et al. 2008)

e identificação de vírus a partir de secreção nasal, fluido oral ou pulmão (Christopher-Hennings et al. 2012). O VI acusa a presença de partículas virais viáveis, com capacidade de replicação (Yeolekar & Dhare 2012). As amostras são inoculadas em cultura de células suscetíveis (ex. células de rim de cão ou *Madin-Darby Canine kidney cells*, MDCK) e monitoradas quanto ao desenvolvimento de efeito citopático (CPE), que são mudanças nas características morfológicas da célula induzida pela presença do vírus. Como o CPE produzido pelo vírus influenza muitas vezes é difícil de ser visualizado, a confirmação da presença do vírus nos cultivos celulares é realizada pelo teste de imunofluorescência (FA) direta ou indireta, ou pelo teste de imunocitoquímica (ICC), que utiliza como anticorpo primário um anticorpo monoclonal produzido contra a nucleoproteína do vírus influenza A (Vincent et al. 1997). Para o isolamento do vírus influenza também são utilizados ovos embrionados de galinhas SPF (*Specific Pathogen Free* ou livre de patógenos específicos), com 9 a 11 dias de incubação. Em geral são realizadas duas passagens virais, em células ou em ovos, para minimizar a ocorrência de possíveis alterações antigênicas no isolado original (Schild et al. 1983).

O VI é um método muito sensível para a detecção do vírus influenza. Além disso, disponibiliza o isolado viral para outras análises, como o sequenciamento de DNA, ou para a produção de vacinas autógenas (Christopher-Hennings et al. 2012). Entretanto, cerca de duas ou mais semanas são necessárias para chegar ao resultado final. Além disto, para a confirmação do VI são necessários equipamentos especializados, pessoal treinado e reagentes de alta qualidade (Christopher-Hennings et al. 2012). Embora as células de linhagem para o isolamento viral sejam amplamente utilizadas pela possibilidade de produção de células em grande escala e pela alta homogeneidade das mesmas (Ferrari et al. 2003, Lombardo et al. 2012), os ovos SPF ainda são muito utilizados para o isolamento do vírus influenza, por permitirem a replicação eficiente de certas amostras de vírus, induzindo títulos virais maiores (Hussain et al. 2010).

Após o isolamento, a presença de vírus tanto no fluido cório-alantoide dos ovos inoculados como no sobrenadante de cultivo celular, precisa ser confirmada pelo teste de ICC, FA, RT-PCR (transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase) ou RT-PCR em tempo real.

Testes moleculares

Os testes moleculares mais utilizados para o diagnóstico de influenza A são a RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real. Estas técnicas detectam o ácido nucleico viral em amostras de secreção nasal, fluido oral ou pulmão, indicando infecção recente pelo vírus influenza A. Em suínos experimentalmente infectados pelo vírus influenza, a detecção do ácido nucleico viral por RT-PCR pode ser feita até 11 dias pós-infecção (Lange et al. 2009). A RT-PCR convencional para o diagnóstico de influenza A é uma técnica qualitativa, a qual permite amplificar fragmentos específicos de ácido nucleico viral na amostra testada. Geralmente o gene-alvo para este teste é o gene que codifica a proteína da matriz (M) do vírus influenza A, devido ao nível de conservação deste gene entre diferentes amostras de vírus

(Fouchier et al. 2000). O resultado do teste é positivo ou negativo para o vírus influenza A, não determinando qual a carga viral presente na amostra, e nem se o vírus é infeccioso. Portanto, a RT-PCR convencional geralmente é usada para triagem das amostras e o resultado é obtido dentro de 18 horas. Já na RT-PCR em tempo real a detecção do ácido nucleico viral é feita à medida que o mesmo é amplificado (detecção “em tempo real”), por isso a obtenção do resultado é mais rápida, em cerca de duas horas. Além disso, a RT-PCR em tempo real pode quantificar a carga viral na amostra (Christopher-Hennings et al. 2012). Os genes-alvo para a RT-PCR em tempo real são os genes mais conservados do vírus influenza A (genes NP e M) (Spackman & Suarez 2008). A RT-PCR em tempo real também pode ser padronizada para detectar um tipo específico do vírus influenza, como no caso do A(H1N1)pdm09, no qual a RT-PCR em tempo real foi desenvolvida visando à detecção do gene M do vírus pandêmico, que é diferente do gene M dos vírus influenza que já circulavam em suínos (Lorusso et al. 2010). Outro teste disponível é a RT-PCR *multiplex*, que se baseia na amplificação concomitante de mais de um fragmento gênico. Este método pode ser utilizado na subtipagem do vírus influenza A, identificando os vírus mais prevalentes em suínos: H1, H3, N1 e N2 (Choi et al. 2002).

A realização dos testes de RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real para determinação do tipo de vírus (influenza A) ou subtipo viral (H1N1, H1N2) não gera dados suficientes para a epidemiologia molecular dos vírus influenza em determinada região ou País. Em caráter de pesquisa, é importante realizar a genotipagem viral dos isolados de campo, pois a ocorrência de infecções interespecíficas tem sido documentada, especialmente entre humanos e suínos (Lindstrom et al. 2012, Nelson et al. 2012), bem como o surgimento de novos vírus influenza como o A(H1N1)pdm09 (Garten et al. 2009). Após a introdução do vírus A(H1N1)pdm09 em suínos, recombinações entre esse vírus e vírus endêmicos em suínos começaram a ser detectadas (Ducatez et al. 2011). Por exemplo, a análise filogenética de uma amostra do vírus influenza isolada em suínos na Itália demonstrou o surgimento de um novo vírus H1N2 que continha os genes PB2, PB1, PA, HA, NP, M e NS do vírus A(H1N1)pdm09 e o gene NA originário do vírus influenza suína H3N2 da linhagem da Eurásia (Moreno et al. 2011).

Testes sorológicos para detecção de anticorpos

As amostras utilizadas para o diagnóstico sorológico são o fluido oral e o soro sanguíneo. Os testes sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos específicos contra o vírus influenza A. Desta forma, os testes determinam se o suíno foi exposto a este agente em algum momento de sua vida, seja por infecção prévia ou vacinação. A produção de anticorpos (predominantemente IgG) em suínos infectados pelo vírus influenza é detectável a partir dos sete dias pós-infecção, com pico de produção entre 2-3 semanas pós-infecção, com declínio em 8-10 semanas pós-infecção (Van Reeth et al. 2012).

Existem dois testes sorológicos disponíveis para a detecção de anticorpos contra o vírus influenza, o teste de

ELISA indireto (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e o teste de inibição da hemaglutinação (HI). O teste de ELISA indireto identifica anticorpos contra a proteína NP do vírus, tanto em amostras de soro como em amostras de fluido oral. Este teste apresenta uma boa sensibilidade (Ciacci-Zanella et al. 2010), sendo útil para determinar o estado imune do rebanho. O resultado positivo no teste de ELISA indica que os suínos foram infectados pelo vírus influenza A, porém o teste não diferencia os subtipos virais. O tempo médio para o resultado do teste de ELISA é de três horas. No Brasil, até o momento, apenas um teste de ELISA está disponível comercialmente.

Para o teste de HI são utilizadas amostras de soro suíno. O teste de HI baseia-se na capacidade do vírus influenza (hemaglutinina-HA viral) de ligar-se a receptores existentes na superfície dos eritrócitos, provocando a hemaglutinação. Desta forma, o anticorpo (presente no soro do suíno a ser testado) liga-se ao vírus de referência do teste inibindo a capacidade da proteína HA em aglutinar eritrócitos, resultando na inibição da hemaglutinação. Para a realização do teste são utilizadas diluições seriadas do soro a ser testado, uma quantidade padrão do vírus de referência (4-8 unidades hemaglutinantes) e eritrócitos de galinha ou peru. Utilizam-se como vírus de referência os subtipos virais mais prevalentes em determinada região ou País. O resultado com títulos de HI iguais ou maiores que 1:40 indica que há proteção contra o subtipo viral testado (Detmer et al. 2012). Por exemplo, no Brasil os subtipos de influenza encontrados em suínos são H1N1, H3N2 (Brentano et al. 2002), H1N2 (Schaefer et al. 2012) e A(H1N1)pdm09 (Schaefer et al. 2011), sendo todos esses subtipos utilizados como vírus de referência no teste de HI. O tempo médio para o resultado do teste de HI é de 48 horas. Para identificar infecção recente de influenza em um rebanho, os soros devem ser coletados durante a fase aguda da infecção e após 3-4 semanas (fase de convalescência) (Van Reeth et al. 2012). O objetivo da coleta pareada de soro é identificar sorroconversão, ou seja, um aumento no título de anticorpos de pelo menos quatro vezes (Janke 2000). Se, por exemplo, no primeiro teste (fase aguda) um soro apresentar título HI de 1:80 para o vírus H3N2 e 1:80 para o vírus A(H1N1)pdm09 e em um segundo teste (fase de convalescência) o soro tiver um título de 1:80 para o vírus H3N2 e de 1:1024 para o vírus A(H1N1)pdm09, conclui-se que no rebanho testado houve uma infecção recente pelo vírus A(H1N1)pdm09.

Como no Brasil os suínos não são vacinados contra o vírus influenza, a análise sorológica traz informações sobre a dinâmica da influenza nas granjas. Por exemplo, em 63% das granjas analisadas, um alto percentual de soros testados ($\geq 75\%$) pelo teste de ELISA foi positivo para o vírus influenza A. Já o teste de HI revelou anticorpos no soro dos suínos contra os subtipos virais H1N1, H3N2, A(H1N1)pdm09 e H1N2 (Zanella et al. 2012). Entretanto, se os suínos forem vacinados, o resultado dos testes sorológicos é de difícil interpretação, uma vez que os mesmos não diferenciam anticorpos vacinais de anticorpos induzidos pela infecção. Para identificar se o vírus influenza é o agente causal de doença respiratória em uma granja, os testes so-

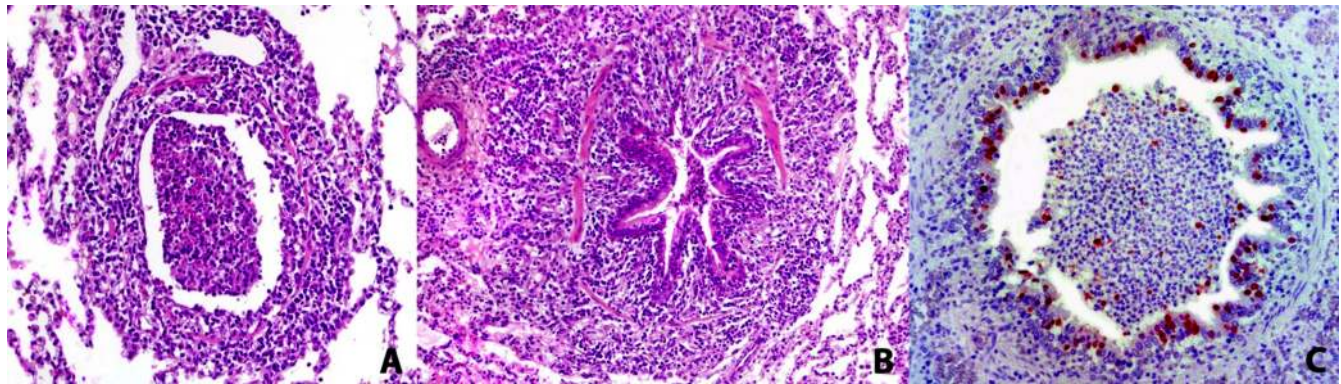


Fig.6. Pulmão suíno com lesão microscópica de influenza A. (A) Bronquiolite necrosante. HE, obj.10x. (B) Pneumonia broncointersticial. HE, obj.10x. (C) Marcação do antígeno viral (nucleoproteína) no núcleo das células epiteliais bronquiolares íntegras e descamadas dentro do lúmen. O lúmen do bronquíolo está parcialmente obliterado por neutrófilos degenerados. Imuno-histoquímica, obj.20x.

rológicos possuem valor diagnóstico limitado, uma vez que identificam anticorpos (fase subaguda até recuperação da doença) e não o agente. Desta forma, os testes mais recomendados para identificar o vírus são RT-PCR, isolamento viral e IHQ.

Histopatologia e imuno-histoquímica

A amostra mais adequada para avaliar as lesões causadas pelo vírus influenza é o pulmão. Após a inalação do vírus, a lesão típica de influenza da fase aguda (1-3 dias pós-infecção) é de bronquiolite e bronquite necrosante (Fig.6A), já que o vírus replica no epitélio do trato respiratório e causa necrose do epitélio bronquiolar e bronquial (Gauger et al. 2012a). À medida que a lesão progride, as células epiteliais necróticas descamam para o lúmen e atraem células inflamatórias, especialmente neutrófilos (bronquite e bronquiolite neutrofilica). A obliteração dos bronquíolos causa atelectasia (colapso) das porções distais do parênquima pulmonar daquele bronquíolo, que corresponde às áreas vermelhas e deprimidas na macroscopia. Se essas áreas forem extensas com grande acúmulo de células inflamatórias, na macroscopia observa-se consolidação pulmonar, geralmente nas regiões cranioventrais. O vírus influenza também estimula o acúmulo de linfócitos ao redor de brônquios e bronquíolos (peribronquiolite linfocítica) e vasos sanguíneos, mas em proporções menores do que é visto na infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae*, assim como acúmulo de macrófagos e neutrófilos nos septos alveolares e alvéolos adjacentes (pneumonia broncointersticial). Em casos subagudos, o epitélio bronquiolar necrosado é substituído por camadas de células epiteliais novas (bronquite e bronquiolite epitelial proliferativa) indicando regeneração (Fig.6B). Nessa fase, o infiltrado linfocítico pode ser observado em padrão folicular. As lesões causadas pelo vírus influenza podem ser observadas até duas semanas após a infecção, e desaparecem por completo três semanas pós-infecção (Janke 2000). O tempo necessário para o resultado do exame histopatológico é variável (geralmente cinco dias úteis) dependendo de cada laboratório, pois o material precisa ser processado para a confecção de lâminas histológicas.

Como as lesões observadas na histopatologia são características, mas não confirmatórias da infecção pelo vírus

influenza, faz-se uso da IHQ para demonstrar antígenos específicos (nesse caso, proteínas virais) associados com as lesões características do pulmão. Como o vírus replica no epitélio respiratório, usando anticorpos específicos (por exemplo, contra a nucleoproteína viral - NP), detecta-se o antígeno viral nas células epiteliais dos bronquíolos e brônquios (Fig.6C), e em menor escala, nos pneumócitos tipo II dos septos alveolares ou células dentro do lúmen alveolar (pneumócitos descamados ou macrófagos alveolares) (Gauger et al. 2012a). O antígeno NP é detectado principalmente no núcleo, e em menor expressão no citoplasma (Vincent et al. 1997, Jung et al. 2002, Gauger et al. 2012a). O resultado positivo geralmente está associado à fase aguda da doença, ou seja, até 5-7 dias pós-infecção (Weingartl et al. 2010, Gauger et al. 2012a), embora marcação de poucas células infectadas é observada até 13 dias pós-infecção (Weingartl et al. 2010). Então, na fase pós-aguda da doença o resultado é geralmente negativo, pois não há quantidade suficiente de antígeno viral para ser detectado por esta técnica. O resultado da IHQ é obtido em dois dias, além do período de tempo destinado à histopatologia de rotina.

Os principais testes para o diagnóstico de influenza em suínos e seus respectivos resultados estão sumarizados na Figura 7.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Por se tratar de uma doença respiratória viral aguda que cursa com febre, tosse, letargia e anorexia, a influenza A em suínos causa impacto negativo na produção, pela diminuição do ganho de peso dos suínos afetados e pelo aumento do gasto com medicamentos para o controle das infecções bacterianas secundárias (Allerson & Odland 2012). O vírus influenza é considerado um dos agentes primários e de grande relevância no complexo de doença respiratória suína (*porcine respiratory disease complex* - PRDC), atualmente um dos maiores problemas sanitários da suinocultura. A infecção leva a destruição do aparelho mucociliar respiratório, predispõe à colonização de bactérias e potencializa a doença respiratória causada por outros agentes infecciosos (Opriessnig et al. 2011), agravando o quadro clínico.

Contudo, a importância do diagnóstico de influenza vai além do impacto econômico negativo que essa doença cau-

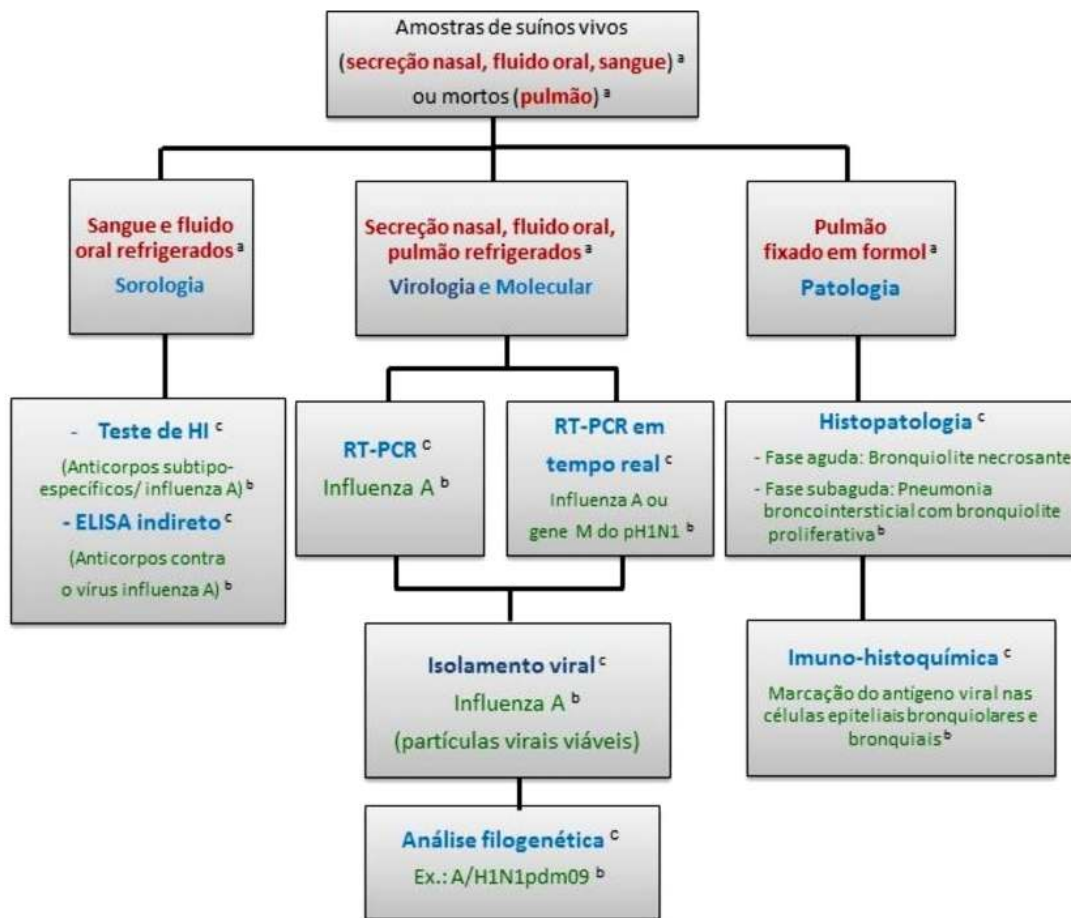


Fig.7. Amostras (a) e resultados (b) das principais técnicas laboratoriais (c) para o diagnóstico de influenza em suínos.

sa na produção de suínos. Os vírus influenza A infectam suínos e outras espécies, incluindo o homem e por isso a influenza é considerada uma zoonose. A influenza em suínos não é uma doença de notificação obrigatória da lista da OIE, porque causa doença de sinais clínicos leves em suínos e a transmissão para pessoas é infrequente (OIE 2012). Além disso, durante a pandemia de influenza em humanos em 2009 [A(H1N1)pdm09] ocorreu concomitantemente a infecção em suínos com o mesmo vírus no mundo inteiro (Hofshagen et al. 2009, Howden et al. 2009, Pasma & Joseph 2009, Moreno et al. 2010, Pereda et al. 2010, Njabo et al. 2012, Holyoake et al. 2011), inclusive no Brasil (Schaefer et al. 2011), comprovando a transmissão do vírus A(H1N1)pdm09 de humanos para suínos (Forgie et al. 2011). Naquela ocasião, a pandemia pelo vírus A(H1N1)pdm09 foi erroneamente designada como influenza suína (Gauger et al. 2012b), trazendo prejuízos ao comércio de carne suína. Embora os genes do vírus A(H1N1)pdm09 serem provenientes de linhagens de vírus da influenza suína da América do Norte e Eurásia (Garten et al. 2009, Smith et al. 2009), não há evidências que esse vírus estivesse circulando em suínos antes de ocorrer a pandemia em humanos (Yoon 2012). A grande preocupação é que os suínos são considerados a espécie onde o vírus influenza sofre rearranjos ou trocas de genes virais com maior facilidade, originando novos vírus influenza, como tem sido

observado recentemente (Ducatez et al. 2011, Moreno et al. 2011, Liu et al. 2012, Schaefer et al. 2012). A grande diversidade genética encontrada nos vírus influenza em diferentes regiões geográficas, aliado ao fato da influenza ser uma zoonose, torna muito importante a obtenção de dados genéticos dos vírus isolados de suínos para monitorar possíveis mutações e rearranjos gênicos. Os dados gerados com a monitoria dos diferentes subtipos de vírus influenza circulantes são úteis para estudos sobre a evolução genética dos vírus encontrados, seleção de amostras de vírus para a produção de vacinas para essa espécie e para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos e/ou novos reagentes visando identificar novos vírus emergentes (OFFLU 2011).

Até recentemente, a influenza não era considerada uma doença com perdas econômicas consideráveis na produção brasileira de suínos. Embora o primeiro relato da infecção de suínos com o vírus influenza no Brasil datar de 1978 (Cunha et al. 1978), poucos trabalhos foram realizados até então, os quais identificaram anticorpos contra vírus influenza dos subtipos H1N1 e H3N2 em soros de suínos (Brentano et al. 2002, Mancini et al. 2006, Caron et al. 2010, Rajão et al. 2012). Após a entrada do vírus A(H1N1)pdm09, a doença foi caracterizada por um quadro clínico respiratório agudo, acometendo grande número de suínos de várias faixas etárias (Schaefer et al. 2011). Atualmente, a preva-

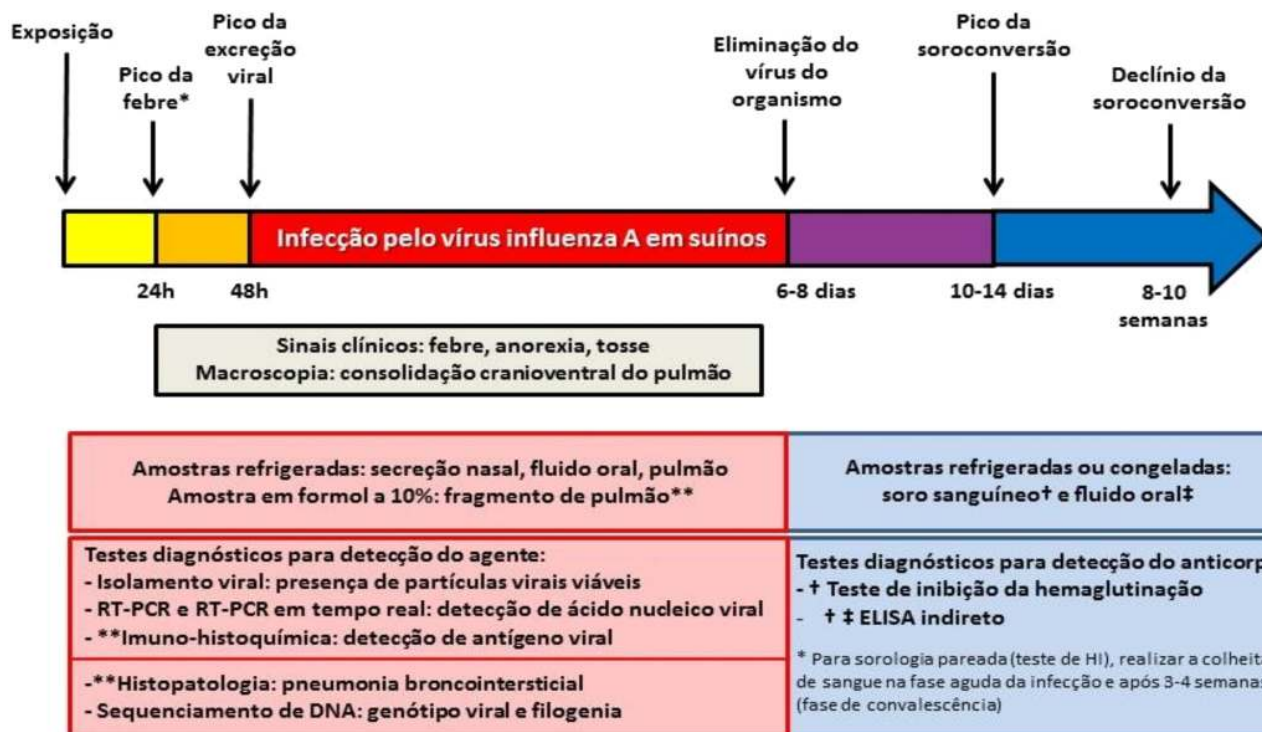


Fig.8. Linha do tempo da infecção por influenza A em suínos associada aos sinais clínico-patológicos, às amostras de escolha e respectivos testes diagnósticos.

lência de influenza em rebanhos brasileiros é de 60% (Zanella et al. 2012) e o vírus influenza é considerado como o principal agente etiológico associado ao PRDC (Mores et al. 2011). Para contribuir com o conhecimento sobre os vírus influenza A circulantes em suínos no Brasil e adaptar técnicas de diagnóstico, a Embrapa Suínos e Aves tem uma linha de pesquisa com projetos focados no diagnóstico virológico e molecular visando sequenciar o genoma dos vírus isolados e com isso realizar estudos de filogenia viral. O grupo de pesquisa está padronizando métodos de diagnóstico para análise de fluido oral de suínos para detectar vírus e anticorpos. Além disso, o Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal (CEDISA) oferece os serviços de análise histopatológica e IHQ para detecção de influenza A em amostras de pulmão.

No Brasil, ainda não existe vacina contra o vírus influenza para suínos. Apesar da vacinação contra o vírus influenza ser eficaz para o controle da doença nos rebanhos, deve-se levar em conta a grande variabilidade genética entre as diferentes amostras do vírus para a fabricação das vacinas. Por exemplo, nos Estados Unidos, existem sete diferentes vacinas contra o vírus influenza licenciadas pelo USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) que representam os diferentes grupos de vírus circulantes em suínos naquele País (Van Reeth et al. 2012). O conhecimento dos principais vírus influenza circulantes no Brasil ainda é escasso, pois não há um sistema de monitoria oficial para essa doença. Dessa forma, uma alternativa para o controle de influenza em rebanhos brasileiros seria a utilização de vacinas autógenas, tendência também observada atualmente nos Estados Unidos, devido ao surgimento de novos vírus como o A(H1N1)pdm09 e vírus endêmicos de suínos

(Liu et al. 2012). Estas vacinas são preparadas a partir de amostra do vírus influenza isolada de um animal ou de uma população, e aplicadas na mesma população.

Medidas de biossegurança são as mais importantes para o controle da influenza no rebanho e para diminuição do impacto econômico negativo na produção de suínos; uma vez a doença estabelecida em um plantel é difícil de ser erradicada sem a depopulação completa. Depopulação parcial, segregação de suínos recém-desmamados, sistema todos dentro-todos fora, associadas a boas práticas de produção como higiene e ventilação adequada das instalações são extremamente importantes para evitar a disseminação do vírus influenza (FAO 2010). A oferta constante de suínos suscetíveis de várias origens, em contato com suínos infectados, mantém a doença circulando no rebanho e, em um pior cenário, o surgimento de um novo vírus pela facilidade do rearranjo viral em suínos e transmissão do vírus entre eles. Devido à possibilidade de pessoas transmitirem o vírus influenza para suínos (Nelson et al. 2012) e vice-versa (Lindstrom et al. 2012), recomenda-se a vacinação das pessoas que trabalham na cadeia produtiva de suínos. A vacinação visa evitar uma infecção dupla com vírus influenza suíno e humano para possível fonte de rearranjo viral, e conseqüentemente a emergência de um novo vírus influenza A (Beaudoin et al. 2012, Nelson et al. 2012). Outras medidas importantes para evitar a transmissão viral inter-espécies são: lavar bem as mãos com água corrente e sabão antes e após o contato com os suínos e evitar o contato com os suínos se a pessoa estiver com sintomas de gripe (CNPSA 2009. Gripe A: recomendações para a prevenção na suinocultura. Embrapa Suínos e Aves, Concórdia. <<http://www.cnpsa.embrapa.br/influenza/cartilhagripev1.pdf>>).

Como conclusão, salienta-se que o sucesso do diagnóstico de influenza A em suínos depende da colheita correta de amostras na fase febril da doença, preferencialmente na fase de creche, do acondicionamento e envio apropriado dessas amostras para o laboratório aliada à escolha de testes diagnósticos e sua interpretação em relação à situação observada no campo (Fig.8). As melhores opções para o diagnóstico de influenza A são RT-PCR convencional ou em tempo real e isolamento viral de amostras de *swab* nasal ou fluido oral em suínos vivos. Pulmão para análise por RT-PCR, isolamento viral ou IHQ é a amostra de escolha em suínos mortos. As principais orientações para o sucesso do diagnóstico estão sumarizadas no Quadro 1. Embora influenza em suínos não é considerada doença de notificação obrigatória pela OIE, a constante observação/monitoria dos vírus influenza em rebanhos suínos, aliada à análise molecular desses isolados virais é extremamente importante, uma vez que o suíno é considerado espécie sentinela para a ocorrência de epidemias de influenza.

Quadro 1. Pontos-chave para o sucesso do diagnóstico de influenza A em suínos

Etapa	Orientações
Seleção do suíno	1. Escolher um suíno com febre, na fase aguda da doença
	2. Evitar suínos refugos, medicados ou que morreram espontaneamente
Colheita da amostra	1. Secreção nasal: colheita profunda da cavidade nasal com o uso de <i>swab</i> sintético
	2. Contenção correta do suíno para retirada de sangue
	3. Aguardar a retração do coágulo para obtenção do soro
	4. Posição correta da corda de algodão na baía para obtenção de fluido oral
	5. Amostras de pulmão com lesão, de suínos mortos recentemente
Acondicionamento e envio das amostras ao laboratório	1. Amostras identificadas
	2. Amostras refrigeradas para o exame virológico
	3. Amostras em formol a 10% para exame histopatológico e imuno-histoquímico
	4. Embalagens que evitem vazamento ou compressão dos tecidos
	5. Formulário de submissão da amostra devidamente preenchido
	6. Envio rápido ao laboratório

REFERÊNCIAS

Allerson M. & Odland C. 2012. Pigs and flu: What to do. Proc. Annual American Association of Swine Veterinarians, Denver, Colorado, p.467-468. (Resumo)

Beaudoin A., Johnson S., Davies P., Bender J. & Gramer M. 2012. Characterization of influenza A outbreaks in Minnesota swine herds and measures taken to reduce the risk of zoonotic transmission. *Zoonoses and Public Health* 59:96-106.

Brentano L., Ciacci-Zanella J.R., Mores N. & Piffer I.A. 2002. Levantamento soroepidemiológico para Coronavírus Respiratório e da Gastroenterite Transmissível e dos Vírus de Influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. *Comum. Téc., Embrapa Suínos e Aves, Concórdia*, p.1-6.

Caron L.F., Joineau M.E.G., Santin E., Richartz R.R.T.B., Patricio M.A.C. & Soccol V.T. 2010. Seroprevalence of H3N2 influenza A virus in pigs from Paraná (South Brazil): Interference of the animal management and climatic conditions. *Virus Res.* 15:63-73.

Choi Y.K., Goyal S.M., Kang S.W., Farnham M.W. & Joo H.S. 2002. Detection

and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J. Virol. Methods* 102 (1/2):53-59.

Christopher-Hennings J., Erickson G.A., Hesse R.A., Nelson E.A. & Oliveira S. 2012. Diagnostic tests, test performance, and considerations for interpretation, p.77-93. In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. (Eds), *Diseases of Swine*. 10th ed. Iowa State University Press, Ames.

Ciacchi-Zanella J.R., Vincent A.L., Prickett J.R., Zimmerman S.M. & Zimmerman J.J. 2010. Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22:3-9.

CNPISA 2009. Gripe A: recomendações para a prevenção na suinocultura. Embrapa Suínos e Aves, Concórdia. <<http://www.cnpisa.embrapa.br/influenza/cartilhagripev1.pdf>>

Cunha R.G., Vinha V.R. & Passos W.D. 1978. Isolation of a strain of Myxovirus influenzae-A suis from swine slaughtered in Rio de Janeiro. *Revta Bras. Biol.* 38:13-17.

Detmer S.E., Patnayak D.P., Jiang Y., Gramer M.R. & Goyal S.M. 2011. Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23:241-247.

Detmer S., Gramer M., Goyal S., Torremorell M. & Torrison J. 2012. Diagnostics and surveillance for swine influenza. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* DOI: 10.1007/82_2012_220. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 28p.

Ducatez M.F., Hause B., Stigger-Rosser E., Darnell D., Corzo C., Juleen K., Simonson R., Brocwell-Staats C., Rubrum A., Wang D., Webb A., Crumpton J.C., Lowe J., Gramer M. & Webby R.J. 2011. Multiple reassortment between pandemic (H1N1) 2009 and endemic Influenza viruses in pigs, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1624-1629.

Ferrari M., Scalvini A., Losio M.N., Corradi A., Soncini M., Bignotti E., Milanese E., Ajmone-Marsan P., Barlati S., Bellotti D. & Tonelli M. 2003. Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. *J. Virol. Methods* 107(2):205-212.

FAO 2010. Good practices for biosecurity in the pig sector: Issues and options in developing and transition countries. FAO Animal Production and Health Paper no.169, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Organisation for Animal Health/World Bank, Rome.

Forgie S.E., Keenlside J., Wilkinson C., Webby R., Lu P., Sorensen O., Fonseca K., Barman S., Rubrum A., Stigger E., Marrie T.J., Marshall F., Spady D.W., Hu J., Loeb M., Russel M.L. & Babiuk L.A. 2011. Swine outbreak of pandemic influenza A virus on a Canadian research farm supports human-to-swine transmission. *Clin. Infect. Dis.* 52:10-18.

Fouchier R.A., Bestebroer T.M., Herfst S., Van der Kemp L., Rimmelzwaan G.F. & Osterhaus A.D. 2000. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.* 38:4096-4101.

Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W.M., Xu X., Skepner E., Deyde V., Okomo-Adhiambo M., Gubareva L., Barnes J., Smith C.B., Emery S.L., Hillman M.J., Rivailier P., Smagala J., De Graaf M., Burke D.F., Fouchier R.A., Pappas C., Alpuche-Aranda C.M., Lopez-Gatell H., Olivera H., Lopez 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., St George K., Bannerman T., Moore A.L., Stringer D.J., Blevins P., Demmlerharrison G.J., Ginsberg M., Kriner P., Waterman 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., Jernigan D.B., Uyeki T.M., Smith D.J., Klimov A.I. & Cox N.J. 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325:197-201.

Gauger P.C., Vincent A.L., Loving C.L., Henningson J.N., Lager K.M., Janke B.H., Kehrlijr M.E. & Roth J.A. 2012a. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. *Vet. Pathol.*, publicado em Março 28, 2012, como doi:10.1177/0300985812439724. [Epubaheadofprint]

Gauger P., Zhang J. & Vincent A.L. 2012b. Flu Virus Continues to Evolve in

- Swine. National Hog Farmer. Acesso em 28 jun. 2012. <<http://nationalhogfarmer.com/health/flu-virus-continues-evolve-swine>>
- Hofshagen M., Gjerset B., Er C., Tarpai A., Brun E., Dannevig B., Bruheim T., Fostad I.G., Iversen B., Hungnes O. & Lium B. 2009. Pandemic influenza A(H1N1)v: Human to pig transmission in Norway? *Euro Surveill*, p.1-3. Disponível em <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19406>>
- Holyoake P.H., Kirkland P.D., Davis R.J., Arzey K.E., Watson J., Lunt R.A., Wang J., Wong F., Moloney B.J. & Dunn S.E. 2011. The first identified case of pandemic H1N1 influenza in pigs in Australia. *Aust. Vet. J.* 89:427-431.
- Howden K.J., Brockhoff E.J., Caya F.D., McLeod L.J., Lavoie M., Ing J.D., Bystrom J.M., Alexandersen S., Pasick J.M., Berhane Y., Morrison M.E., Keenlside J.M., Laurendeau S. & Rohonczy E.B. 2009. An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. *Can. Vet. J.* 50:1153-1161.
- Hussain A.I., Cordeiro M., Sevilla E. & Liu J. 2010. Comparison of egg and high yielding MDCK cell-derived live attenuated influenza virus for commercial production of trivalent influenza vaccine: in vitro cell susceptibility and influenza virus replication kinetics in permissive and semi-permissive cells. *Vaccine* 28 (22):3848-3855.
- Janke B.H. 1995. Diagnosis of viral respiratory disease in swine. *Swine Health Prod.* 3:116-120.
- Janke B.H. 2000. Diagnosis of swine influenza. *Swine Health Prod.* 8:79-83.
- Jung T., Choi C. & Chae C. 2002. Localization of swine influenza in naturally infected pigs. *Vet. Pathol.* 39:10-16.
- Kim M. & Pedersen J. 2009. Collection of Specimens for Detection of Influenza from Swine. Disponível em <<http://www.offlu.net/index.php?id=184>> Acesso em 5 jul. 2012.
- Lamb R.A. & Krug R.M. 2001. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication, p.1487-1532. In: Fields B.N., Knipe D.M. & Howley P.M. (Eds), *Fields Virology*. 4th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Lange E., Kalthoff D., Blohm U., Teifke J.P., Breithaupt A., Maresch C., Starick E., Fereidouni S., Hoffmann B., Mettenleiter T.C., Beer M. & Vahlenkamp T.W. 2009. Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs (Short communication). *J. General Virol.* 90:2119-2123.
- Lindstrom S., Garten R., Baish A., Shu B., Emery S., Berman L., Barnes N., Sleeman K., Gubareva L., Villanueva J. & Klimov A. 2012. Human infectious with novel reassortant influenza A (H3N2)v viruses, United States, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 18:834-837.
- Liu Q., Ma J., Liu H., Qi W., Anderson J., Henry S.C., Hesse R.A., Richt J.A. & Ma W. 2012. Emergence of novel reassortant H3N2 swine influenza viruses with the 2009 pandemic H1N1 genes in the United States. *Arch. Virol.* 157:555-562.
- Lombardo T., Dotti S., Renzi S. & Ferrari M. 2012. Susceptibility of different cell lines to Avian and Swine Influenza viruses. *J. Virol. Methods*. [In publication].
- López A. 2012. Respiratory system, mediastinum, and pleurae, p.458-538. In: Zachary J.F. & McGavin M.D. (Eds), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. Mosby Elsevier, St Louis.
- Lorusso A., Faaberg K.S., Killian M.L., Kosterb L. & Vincent A.L. 2010. One-step real-time RT-PCR for pandemic influenza A virus (H1N1) 2009 matrix gene detection in swine samples. *J. Virol. Methods* 164:83-87.
- Mancini D.A.P., Cunha E.M.S., Mendonça R.M.Z., Dias A.L.F., Castro A.F., Pinto J.R. & Mendonça R.Z. 2006. Evidence of swine respiratory infection by influenza viruses in Brazil. *Virus Rev. Res.* 11:39-43.
- Moreno A., Di Trani L., Alborali L., Vaccari G., Barbieri I., Falcone E., Sozzi E., Puzelli S., Ferri G. & Cordioli P. 2010. First pandemic H1N1 outbreak from a pig farm in Italy. *Open Virol. J.* 4:52-56. doi: 10.2174/1874357901004010052.
- Moreno A., Di Trani L., Faccini S., Vaccari G., Nigrelli D., Boniotti M.B., Falcone E., Boni A., Chiapponi C., Sozzi E. & Cordioli P. 2011. Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus. *Vet. Microbiol.* 149:472-477.
- Mores M.A.Z., Kuchiishi S.S., Ascoli K.R. & Morés N. 2011. Etiologia de problemas respiratórios em suínos enviados ao CEDISA para diagnóstico no ano de 2010. XV Congresso da Abraves, Fortaleza, CE. Pasta E, CD ROM. (Resumo)
- Muirhead M.R. 1981. Blood sampling in pigs. In *Practice* 3:16-20.
- National Pork Board 2009. Eutanásia em la Granja: recomendaciones para el productor. Disponível em <<http://www.aasv.org/aasv/documents/SwineEuthanasiaSP.pdf>> Acesso em 5 jul. 2012.
- Nelson M.I., Gramer M.R., Vincent A.L. & Holmes E.C. 2012. Global transmission of influenza viruses from humans to swine. *J. Gen. Virol.* publicado em Julho 18, 2012 como doi:10.1099/vir.0.044974-0. [Epubaheadofprint]
- Njabo K.Y., Fuller T.L., Chasar A., Pollinger J.P., Cattoli G., Terregino C., Monne I., Reynes J.M., Njoum R. & Smith T.B. 2012. Pandemic A/H1N1/2009 influenza virus in swine, Cameroon, 2010. *Vet. Microbiol.* 156:189-192.
- OFFLU (OIE/FAO Network of Expertise on Animal Influenza). Disponível em <<http://www.offlu.net/>>. Acesso em 13 maio 2012.
- OIE Terrestrial Manual 2010. Swine Influenza, chapter 2.8.8.p.1-11.
- OIE General Disease Information Sheets: Swine influenza. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/SI-EN.pdf> Acesso em 2 set. 2012.
- Opriessnig T., Giménez-Lirola L.G. & Halbur P.G. 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim. Health Res. Rev.* 12:133-148.
- Pasma T. & Joseph T. 2009. Pandemic (H1N1) 2009 infection in swine herds, Manitoba, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 16:706-708.
- Pereda A., Cappuccio J., Quiroga M.A., Baumeister E., Insarralde L., Ibar M., Sanguinetti R., Cannilla M.L., Franzese D., Escobar Cabrera O.E., Craig M.I., Rimondi A., Machuca M., Debenedetti R.T., Zenobi C., Barral L., Balzano R., Capalbo S., Risso A. & Perfumo C.J. 2010. Pandemic (H1N1) 2009 outbreak on pig farm, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 16:304-307.
- Prickett J.R., Kim W., Simer R., Yoon K.-J. & Zimmerman J. 2008. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J. Swine Health Prod.* 16:86-91.
- Prickett J.R. & Zimmerman J.J. 2010. The development of oral fluidbased diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim. Health Res. Rev.* 11:207-216.
- Rajão D.S., Alves F., Del Puerto H.L., Braz G.F., Oliveira F.G., Ciacci-Zanella J.R., Schaefer R., Dos Reis J.K., Guedes R.M., Lobato Z.I. & Leite R.C. 2012. Serological evidence of swine influenza in Brazil. *Influenza Other Resp. Viruses*, published on April 6, 2012 como doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00366.x. [Epub ahead of print]
- Ramirez A. & Karriker L.A. 2012. Herd Evaluation, p.5-17. In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwart K.J. & Stevenson G.W. (Eds), *Diseases of Swine*. 10th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Ramos-Vara J.A., Segalés J., Duran C.O., Campbell K. & Domingo M. 1999. Diagnosing infectious porcine diseases using immunohistochemistry. *Swine Health Prod.* 7:85-91.
- Romagosa A., Gramer M., Soojoo H. & Torremorell M. 2011. Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Influenza Other Resp. Viruses*. DOI:10.1111/j.1750-2659.2011.00276.x
- Schaefer R., Zanella J.R.C., Brentano L., Vincent A.L., Ritterbusch G.A., Silveira S., Caron L. & Mores N. 2011. Isolation and characterization of a Pandemic H1N1 Influenza Virus in pigs in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 31:761-767.
- Schaefer R., Ritterbusch G.A., Silveira S., Schiochet M.F., Simon N.L., Brentano L., Gava D., Rocha C.S., Silva A.D., Caron L., Caron L.F. & Zanella J.R.C. 2012. Genetic characterization of influenza viruses isolated from pigs in Brazil in 2009-2011. *Proc. 22nd International Pig Veterinary Society Congress*, Jeju, Korea, p.417. (Resumo)
- Schild G.C., Oxford J.S., De Jong J.C. & Webster R.G. 1983. Evidence for host cell selection of influenza virus antigenic variants. *Nature* 303(5919): 706-709.
- Smith G.J., Vijaykrishna D., Bahl J., Lycett S.J., Worobey M., Pybus O.G., Ma

- S.K., Cheung C.L., Raghwan J., BhattS., Peiris J.S., Guan Y. & Rambaut A. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459:1122-1125.
- Spackman E. & Suarez D.L. 2008. Type A influenza virus detection and quantification by Real-Time RT-PCR. In: Spackman E. (Ed.), *Methods in Molecular Biology. Avian Influenza Virus* 436:19-26.
- Van Reeth K., Brown I.H. & Olsen C.W. 2012. Influenza virus, p.557-571. In: Zimmerman J.J., Karkiker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. (Eds), *Diseases of Swine*. 10th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Vincent A.L., Ma W., Lager K.M., Janke B.H. & Richt J.A. 2008. Swine influenza viruses: A North American perspective. *Adv. Virus Res.* 72:127-154.
- Vincent A.L., Lager K.M., Harland M., Lorusso A., Zanella E., Ciacci-Zanella J.R., Kehrl M.E. & Klimov A. 2009. Absence of 2009 Pandemic H1N1 Influenza A Virus in fresh Pork. *PLoS One* 4(12):e8367. Doi:10.1371/journal.pone.0008367.
- Vincent A.L., Ciacci-Zanella J.R., Lorusso A., Gauger P.C., Zanella E.L., Kehrl Jr M.E., Janke B.H. & Lager K.M. 2010. Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs. *Vaccine* 28:2782-2787.
- Vincent L.L., Janke B.H., Paul P.S. & Halbur P.G. 1997. A monoclonal-antibody based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:191-195.
- Yeolekar L.R. & Dhere R.M. 2012. Development and validation of an egg-based potency assay for a trivalent live attenuated influenza vaccine. *Biologicals* 40:146-150.
- Yoon K.J. 2012. Genetic assessment of VDL SIV isolate pool for evidence of the swine flu strain reported to be infecting people and development of a high-throughput differential test for the novel strain. National Pork Board, Des Moines, IA. Acesso em 29 jun. 2012, <<http://www.pork.org/ResearchDetail/1526/GeneticassessmentofV.aspx#.T-z9HrXVtOG>>
- Weingartl H.M., Berhane Y., Hisanaga T., Neufeld J., Kehler H., Emburrry-Hyatt C., Hooper-Mcgreavy K., Kasloff S., Dalman B., Bystrom J., Alexandersen S., Li Y. & Pasick J. 2010. Genetic and pathobiologic characterization of pandemic H1N1 2009 influenza viruses from a naturally infected swine herd. *J. Virol.* 84:2245-2256.
- World Health Organization 1980. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: A WHO memorandum. *Bull. World Health Organ.* 58:585-591.
- Zanella J.R.C., Gava D., Schaefer R., Silveira S., Schiochet M.F., Simon N.L., Rocha C.S., Silva V.S., Schwartz P., Zimmermann S. & Coldebella A. 2012. Prevalence of influenza viruses infection in swine herds in Brazil in 2011. *Proc. 22nd International Pig Veterinary Society Congress, Jeju, Korea*, p.412. (Resumo)