

OCORRÊNCIA DE INFLUENZA EQUINA
NA FAZENDA SÃO JOAQUIM, SÃO
ROQUE – SP, DO INSTITUTO BUTANTAN

DALVA ASSUNÇÃO PORTARI MANCINI
Pesquisador Científico III
Instituto Butantan

ELAINE APARECIDA GERALDES
Estagiária
Instituto Butantan

JOSE RICARDO PINTO
Pesquisador Científico I
Instituto Butantan

MURILLO ADELINO SOARES
Pesquisador Científico V
Instituto Butantan

MANCINI, D.A.P.; GERALDES, E.A.; PINTO, J.R.; SOARES, M.A. Ocorrência de influenza eqüina na Fazenda São Joaquim, São Roque-SP, do Instituto Butantan. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. S. Paulo, 25(1): 93-100, 1988.

RESUMOS: Foi verificada a incidência de influenza eqüina através da positividade de respostas de anticorpos contra o vírus influenza, cepa A/Eq₁, em soros de cavalos pertencentes ao Setor de Imunizações da Fazenda São Joaquim, do Instituto Butantan. Foi observada pequena diferença nas respostas de anticorpos, tanto no rebanho de produção, como de controle de imunoterápicos; ambos tiveram decréscimo de títulos de anticorpos no período de 80 dias após o surto. A queda de nível de anticorpos protetores verificada na análise sorológica dos cavalos indica a baixa proteção que possuem contra a infecção ou reinfecção.

UNITERMOS: Eqüinos, doenças; Influenza eqüina; Reações imunológicas; Hemoaglutinação; Doenças, ocorrência; São Roque, SP.

INTRODUÇÃO

O controle epidemiológico de influenza eqüina é realizado em diversas partes do mundo, com base nos estudos da ocorrência dos subtipos do vírus influenza: A/Eq /Prague/1/56 (H₂ N₂) e A/Eq /Miami/1/63 (H₃ N₈) isolados respectivamente em Praga, Tchecoslováquia em 1956 (22), em Miami, EUA (24) e, de acordo com a nova classificação para nomenclatura de vírus, atualmente são denominados de A/Eq /Prague/1/56 (H₇ N₇) e A/Eq /Miami/1/63 (H₃ N₈) (20,26).

No Brasil, a ocorrência está relacionada com o isolamento dos subtipos A/Eq₁ e A/Eq₂ de surto de influenza em eqüinos do estado de São Paulo em 1963 e 1969 (19) e Rio de Janeiro em 1969, 1976, 1986 (8,9,10) com observação da variação antigênica da cepa brasileira A/Eq₁, comparada com a cepa referência A/Eq /Miami/1/63 (H₃ N₈) (18).

A relação antigênica entre as cepas do vírus influenza tipo A, isoladas de humanos ou animais (eqüinos, suínos e aves) foi observada através de reação sorológica cruzada, o que indica a existência de um antígeno tipo específico comum entre elas (6,13,17).

Informações atuais sobre propriedades antigênicas do vírus influenza eqüino têm contribuído para melhores esclarecimentos das variantes incidentes e nas medidas de controle da infecção (4). Para tanto, a vacina tem sido indicada como melhor solução, principalmente em locais com alta incidência do vírus (2,15), considerando-se que, durante pesquisa realizada após período epizootico da influenza eqüina, foi observado significativo aumento de anticorpos contra a infecção, em cavalos que haviam sido vacinados (12).

A investigação dos anticorpos contra o vírus influenza tem sido realizada pelas técnicas de Inibição de Hemaglutinação (IH) (3,5,23), Hemólise Radial Simples (HRS) (21) e Teste Imunoenzimático (Eliza) (11), observando-se boa correlação entre as primeiras técnicas (27) e maior sensibilidade da última.

No último período "outono-inverno" houve, em nosso meio, a incidência de um surto epidêmico de infecção respiratória eqüina que atingiu os rebanhos de cavalos pertencentes ao Setor de Imunizações, na Fazenda São Joaquim do Instituto Butantan e, portanto, suscitou o interesse de se desenvolver um trabalho de investigação de anticorpos contra a influenza eqüina, nos soros destes animais, objetivando a verificação da ocor-

REFERÊNCIA

rência desta infecção na referida localidade.

MATERIAL E METODOS

Antígeno Viral:

Os antígenos virais utilizados foram obtidos dos vírus influenza A/Eq₁/SP/56(H₇N₇) e A/Eq₂/SP/1/85(H₃N₈), provenientes do Instituto Adolfo Lutz (SP). Os vírus foram mantidos em passagens sucessivas na cavidade alantóica de ovos embrionados de galinha, com 10 dias de idade. O título antigênico dos vírus foi verificado através da prova de hemaglutinação.

Soros,:

Soros de 165 eqüinos, de propriedade da Fazenda São Joaquim, Instituto Butantan, foram separados em lotes de:

- a) * 54 animais do rebanho de produção de imunoterápicos;
- b) * 41 animais do rebanho de controle de produção dos imunoterápicos (animais normais, ainda não imunizados);
(* animais atingidos pela infecção, sangrados após 40 e 80 dias do surto)
- c) 50 animais do rebanho adquirido após a incidência do surto de infecção respiratória;
- d) 20 potros cujas progenitoras haviam sido portadoras da infecção.

TESTE DE INIBIÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO (IH)

O teste de IH foi realizado de acordo com o método de TAKATSY et alii,

23. Inicialmente as amostras de soro foram inativadas a 56 °C, tratadas com Caolim a 20% em solução tampão fosfato (PBS) e, em seguida, procedeu-se à titulação em microplacas.

TESTE DE HEMOLISE RADIAL SIMPLES (HRS)

O teste de HRS foi efetuado seguindo a técnica de SCHILD et alii, 21. Constatou-se o preparo de placas de poliestireno (12,5 x 8,5cm) com 20ml de agarose a 1%, fundida e resfriada a 43° C adicionada de 4ml de antígeno viral (50 u.h.) previamente absorvido com 4ml de suspensão a 10% de hemácias de galo, em solução DGV (Dextrose, Gelatina, Veronal), sob refrigeração por 30 minutos. Em seguida foi, também, adicionado 1ml de complemento (soro fresco de cobaio) com 125 unidades-CH₅₀. Após a incubação de meia hora, à temperatura ambiente foram realizadas perfurações de 3mm na agarose e adicionados os soros inativados. Após 18 horas de incubação a 37° C em câmara úmida, foi feita a leitura. Os títulos de anticorpos foram baseados nos diâmetros das zonas de hemólise. Na placa controle, o antígeno viral foi substituído por líquido alantóide de ovos embrionados de galinha.

RESULTADOS

Na Tab. 1 estão os resultados obtidos com os eqüinos da produção e controle de anti-soros, dos animais adquiridos após o surto e potros nascidos na localidade estudada.

As Fig. 1,2,3 e 4 apresentam os títulos de anticorpos contra o vírus influenza subtipo A/Eq₂, detectados pelos testes de inibição de hemaglutinação (IH) e hemólise radial simples (HRS).

TABELA 1 – Comparação do nível de anticorpos contra os subtipos A/Eq₁ e A/Eq₂ do vírus influenza em eqüinos do Setor de Imunização do Instituto Butantan, da Fazenda São Joaquim, São Roque – SP, 1986

Eqüinos	IH (≥ 1/40)		HRS (≥ 4,5mm)	
	A/Eq ₁	A/Eq ₂	A/Eq ₁	A/Eq ₂
Produção de anti-soros	54/1 (2%)	54/16 (30%)	54/0 (0%)	54/54 (100%)
Controle de produção	41/0 (0%)	41/17 (41%)	41/0 (0%)	41/41 (100%)
Adquiridos após surto de infecção respiratória	50/0 (0%)	50/6 (12%)	50/0 (0%)	50/37 (74%)
Rotros	20/0 (0%)	20/1 (5%)	20/0 (0%)	20/5 (25%)

IH = Inibição de Hemaglutinação
HRS = Hemólise radial simples

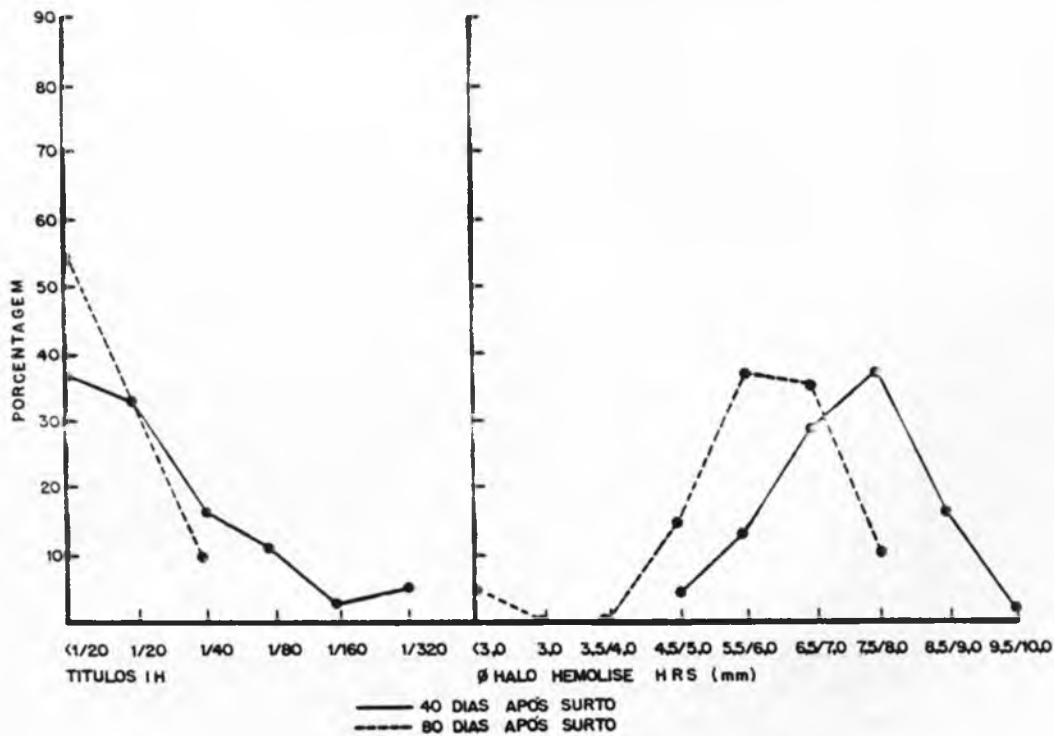


FIGURA 1 – Títulos de anticorpos contra o vírus influenza A/Eq₂. Rebanho de eqüinos da produção de anti-soros da Fazenda São Joaquim, São Roque –SP, do Instituto Butantan, 1986

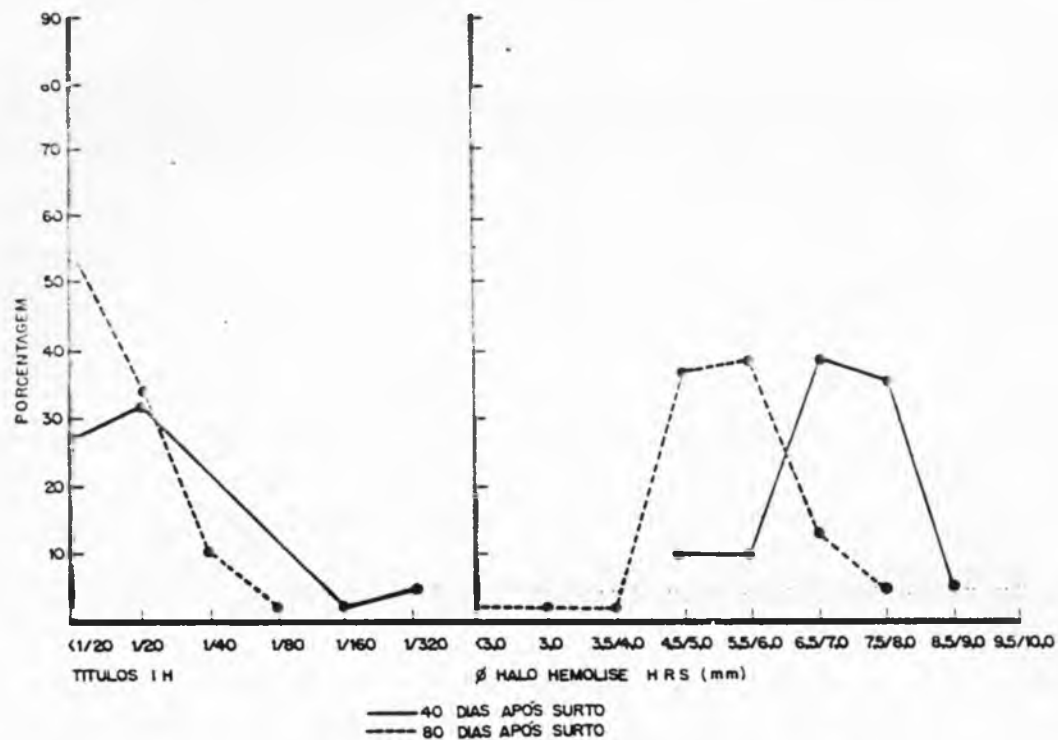


FIGURA 2 – Títulos de anticorpos contra o vírus influenza A/Eq₂. Rebanho de eqüinos do controle da produção de anti-soros da Fazenda São Joaquim, São Roque –SP, do Instituto Butantan, 1986

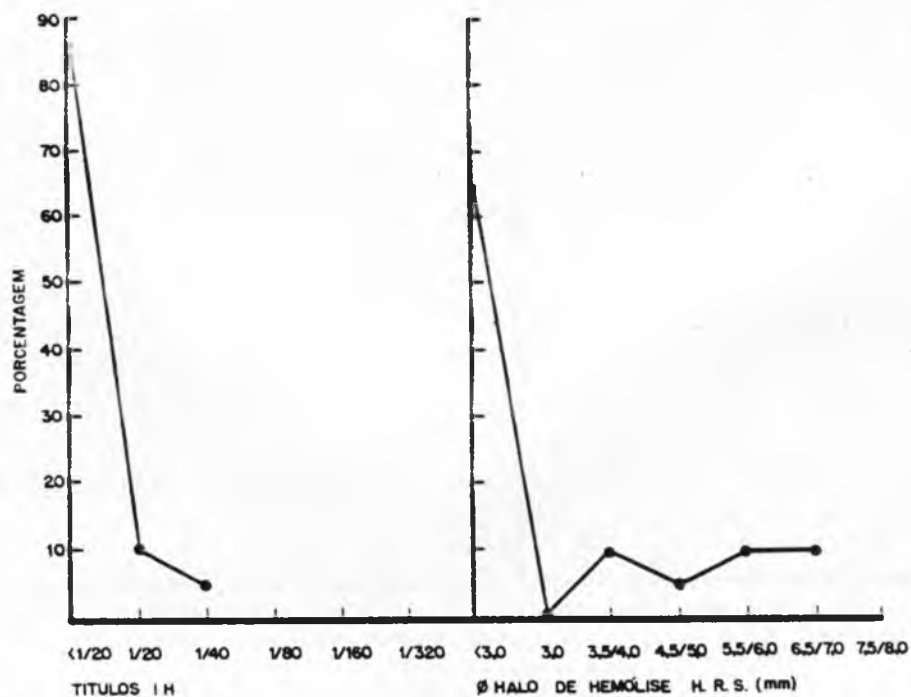


FIGURA 3 – Títulos de anticorpos contra o vírus influenza A/Eq₂. Potros nascidos na Fazenda São Joaquim, São Roque–SP, do Instituto Butantan, em 1986, após o surto de infecção respiratória (faixa etária média 10 meses).

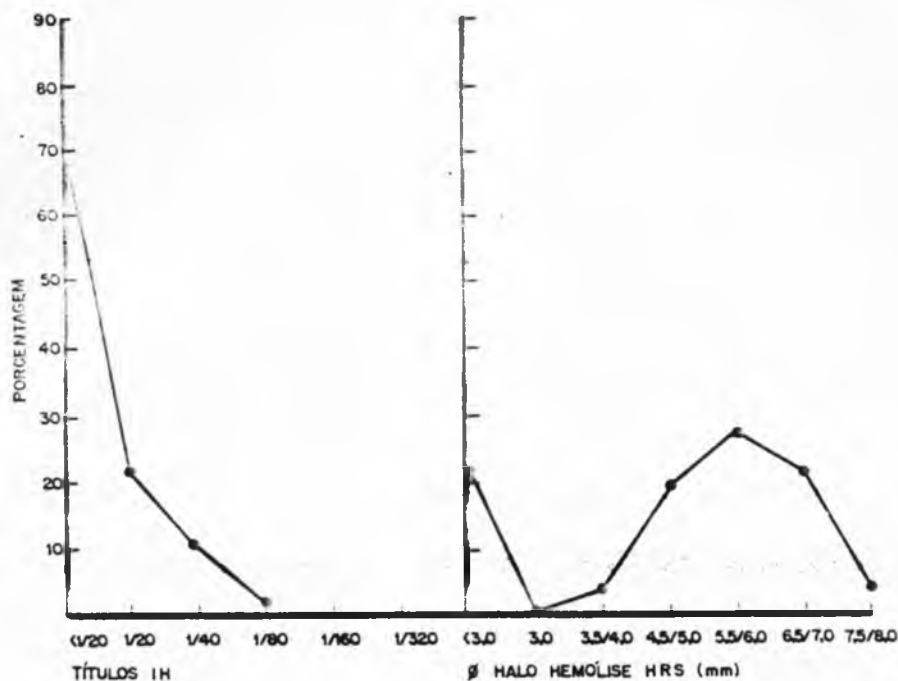


FIGURA 4 - Títulos de anticorpos contra o vírus influenza A/Eq₂. Rebanho de eqüinos adquirido pela Fazenda São Joaquim, São Roque -SP, do Instituto Butantan, em 1986, após o surto de infecção respiratória

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados apresentados na Tab. 1 foram obtidos da análise sorológica de eqüinos do Setor de Imunizações do Instituto Butantan, através dos testes de IH e HRS e revelam que, para o subtipo A/Eq₁ do vírus influenza, os soros não foram reagentes (apenas 1 soro positivo para IH). Porém, contra o subtipo A/Eq₂, verificam-se títulos protetores de IH ($\geq 1/40$) em 30% e 41% dos animais de produção e controle de anti-soros, respectivamente, 12% dos animais adquiridos após o surto e apenas 5% dos potros. Os títulos protetores em HRS ($\geq 4,5$ mm de halo de hemólise) foram encontrados em 100% de ambos os rebanhos da produção e controle, em 74% de animais adquiridos após surto e em 25% de potros.

Verifica-se que animais com histórico de quadro clínico característico da influenza eqüina (7,14), os da produção e

controle, alcançaram maiores porcentagens em títulos anteriores de IH, contra A/Eq₂, do que os demais não atingidos pelo surto de infecção respiratória. Isto indica que o teste IH detecta anticorpos mais recentes e o teste HRS, devido à falta de afinidade por IgM, detecta com muita sensibilidade anticorpos do tipo tardio como IgG (16). Considerando que os animais só puderam ser avaliados sorologicamente na fase de convalescença, é procedente o encontro das porcentagens mais altas de soropositividade, no teste de HRS e, as mais baixas, no teste IH, uma vez que os anticorpos, produzidos imediatamente após a infecção, decrescem após algum tempo.

Na Fig. 1 está a distribuição dos anticorpos contra o vírus influenza A/Eq₂, detectados em eqüinos da produção de anti-soros, podendo-se verificar que alguns animais, após 40 dias do surto, apresentam altos títulos de anticorpos -

1/320(IH) e 9,5 a 10mm(HRS), mas o nível desses anticorpos, após 80 dias, apresentou sensível diminuição.

Na Fig. 2 observam-se resultados semelhantes aos apresentados na Fig. 1, inclusive o mesmo tipo de queda no título de anticorpos, após 80 dias do surto.

Os níveis de anticorpos contra o subtipo A/Eq₂ do vírus influenza, em soros de potros (faixa etária média de 10 meses) nascidos na Fazenda São Joaquim, Instituto Butantan, estão distribuídos na Fig. 3 e demonstraram menor porcentagem de títulos de anticorpos protetores de IH (> 1/40) com relação aos títulos de anticorpos HRS (> 4,5mm de halo de hemólise), também protetores. Considerando que estes animais não foram acometidos pela infecção respiratória, deduz-se que os anticorpos detectados tenham sido transmitidos pelas progenitoras.

Na Fig. 4, onde estão distribuídos os títulos dos anticorpos detectados nos soros dos eqüinos adquiridos pela Fazenda São Joaquim, Instituto Butantan, após surto da infecção respiratória, pode-se verificar baixa reatividade aos vírus influenza A/Eq₂ pelo teste de IH e considerável positividade registrada pelo teste da HRS. Esses dados coincidem com aqueles relatados por WOOD et alii, 25.

Os nossos resultados demonstram que houve reação distinta entre os dois subtipos A/Eq₁ e A/Eq₂ do vírus influenza, fato também observado por PEREIRA, 17, descartando a possibilidade do subtipo A/Eq₁ ter sido o responsável pela primeira infecção dos animais.

A soropositividade dos animais do Setor de Imunizações do Instituto Butantan foi compatível com o quadro clínico que apresentaram da infecção característica de influenza, tal como febre alta, inapetência, tosse, corrimento nasal (mucopurulento) e ocular, com curso benigno da doença (7,14).

A queda do nível de anticorpos protetores contra o vírus influenza A/Eq₂, verificada em nossos resultados, foi também relatada por BEVERIDGE et

alii, 1, que, estudando infecção de eqüinos pelo subtipo A/Eq₁ do vírus influenza, observaram em oito animais, a diminuição do título de anticorpos entre o primeiro e o terceiro mês, seguido por títulos constantes até 24 meses após a infecção.

Os resultados obtidos indicam que a ocorrência do surto de infecção respiratória, no rebanho de cavalos do Setor de Imunizações da Fazenda São Joaquim do Instituto Butantan, tenha sido ocasionada pelo subtipo A/Eq₂ do vírus influenza.

A queda de anticorpos protetores, verificada na análise sorológica dos eqüinos, sugere a realização da administração da vacina contra a gripe, com o propósito de promover o aumento de anticorpos e assegurar maior proteção contra a infecção ou reinfeção dos animais.

MANCINI, D.A.P.; GERALDES, E.A.; PINTO, J.R.; SOARES, M.A. An outbreak of influenza in equines of São Joaquim farm, São Roque, SP - Instituto Butantan. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 25(1): 93-100, 1988.

SUMMARY: The prevalence of equine influenza was verified by means of the positivity of the antibody responses to the influenza virus strain A/Eq₂, on sera taken from horses belonging to São Joaquim Farm, Immunizations Section, of the Instituto Butantan, placed in the State of São Paulo. Little differences were observed in antibody responses between horses designated for production and control of immunotherapeutic agents there was, however, a decrease of antibody titles in the period of 80 days after the outbreak. The drop in the level of the antibodies observed by serologic analysis of those horses, indicates the low protection conferred by the antibodies against infection or reinfection.

UNITERMS: Immunological reactions; Haemagglutination; Equine influenza; Disease surveys; São Roque, SP, Brazil

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1 - BEVERIDGE, W.I.B. & ROSE, M.A. Influenza in horses: persistence

of antibody measured by three methods. Brit.vet.J., 123:8-13,

- 1967.
- A/Eq₁ no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev. bras. Biol., 38:549-554, 1978.
- 2 - BRYANS, J.T.; DOLL, E.R.; WILSON, J.C.; McCOLLUM, W.N. Immunization for equine influenza. J. Amer. Vet. Med. Ass., 148:413-417, 1966.
 - 3 - BURKI, F. & SIBALIN, M. Standardization of haemagglutination inhibition test for two equine influenza viruses. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. A., 223:164-172, 1973.
 - 4 - BURROWS, R. & DENYER, M. Antigenic properties of some equine influenza viruses. Arch. Virol., 73:15-24, 1982.
 - 5 - CHAKRAVERTY, P. Comparison of haemagglutination-inhibition and single-radial-haemolysis techniques for detection of antibodies to influenza B virus. Arch. Virol., 63:285-289, 1980.
 - 6 - COLEMAN, T.M.; DOWDLE, W.R.; PEREIRA, H.G.; SCHILD, G.C.; CHANG, W.K. The Hong Kong/68 Influenza A2-variant. Lancet, 2:1384, 1968.
 - 7 - CORREA, W.M. & CORREA, C.N.M. Enfermidades por Rickettsias e virus In:_____ Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. São Paulo, Varela. 1979. p.555-563.
 - 8 - CUNHA, R.G. Isolamento de amostra de virus da influenza equina, A/Eq₂ no estado da Guanabara. Rev. bras. Biol., 30:491-498, 1970.
 - 9 - CUNHA, R.G.; PASSOS, W.S.; PAGANO, M.C.; SOUZA, D.M. Surto de gripe eqüina produzida por virus influenza A/Eq₂ no estado de Rio de Janeiro, Brasil. Rev. bras. Med. vet., 8:88-91, 1986.
 - 10 - CUNHA, R.G.; PASSOS, W.S., VALLE, M.C.C. Surto de gripe eqüina produzido por virus de influenza A/Eq₁ no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev. bras. Biol., 38:549-554, 1978.
 - 11 - DENYER, M.S.; CROWTHER, J.R.; WARDLEY, R.C.; BURROW, S.R. Development of an enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) for detection of specific antibodies against an H₂N₂ and H₃N₈ equine influenza virus. J. Hyg., London, 93:609-620, 1984.
 - 12 - GOTO, H.; SHIMIZU, K.; TAYA, Y.; NODA, H.; TOKUNAGA, T. Antibodies responses of horses to equine influenza virus during a post epizootic period in Japan. Canad. J. comp. Med., 46:27-32, 1982.
 - 13 - KASEL, J.A. & COUCH, R.B. Experimental infections in humans and horses with A-influenza virus. Bull. Wld. Hlth. Org., 41:447, 1969.
 - 14 - McQUEEN, J.L.; STEELE, J.H.; ROBINSON, R.Q. Equine influenza. Advanc. vet. Sci., 12:285-336, 1968.
 - 15 - NAGAMINE, T.; ASAHARA, T.; HIGASHIHARA, M. Studies on a test vaccine for equine influenza virus. I. Production of a test vaccine. Kitasato Arch. exp. Med., 48:53-67, 1975.
 - 16 - NEUMANN, P.W. & WEBER, J.M. Single radial hemolysis test for rubella immunity and recent infection. J. clin. Microbiol., 17:28-34, 1983.
 - 17 - PEREIRA, H.G. Influenza antigenic spectrum. Progr. med. Virol., 11:46-79, 1969.
 - 18 - PEREIRA, H.G.; TAKIMOTO, S.; PIEGAS, N.S.; VALLE, L.A.R. Antigenic variation of equine (Heq₂, Neq₂) influenza virus. Bull. Wld. Hlth. Org., 47:465-469, 1972.

- 19 - PIEGAS, N.S.; TAKIMOTO, S.; BARBOSA, H.H.G.; LACERDA, J.P.G.; GUARNIERI, R.; ISHIMARU, T. Isolamento de virus influenza de surto de gripe equina em São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 15., Rio de Janeiro, 1976. Anais. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1978. p.122.
- 20 - SCHILD, G.C.; NEUMANN, P.W.; WEBSTER, R.G.; MAJOR, D. HINSHAW, V.S. Antigenic analysis of influenza a virus. Surface antigens: considerations for the nomenclature of influenza virus. Arch. Virol., 63:171-184, 1980.
- 21 - SCHILD, G.C.; PEREIRA, M.S.; CHAKRAVERTY, P. Single radial-haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. Bull. Wld. Hlth. Org., 52:43-50, 1975.
- 22 - SOVINOVA, O.; TUMOVA, B.; POUSKA, F.; NEMEC, J. Isolation of virus causing the respiratory disease of horses. Acta Virol., 2:52-61, 1958.
- 23 - TAKATSY, C. The use of spiral loops in serological and virological micromethods. Acta microbiol. Acad. Sci. Hung., 3:191, 1955.
- 24 - WADDELL, G.H.; TEIGLAND, M.B.; SIGEL, M.M. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. J. Amer. Vet. Med. Ass., 143:587-590, 1963.
- 25 - WOOD, J.M.; MUNFORD, J.; FOLKERS, C.; SCOTT, A.M.; SCHILD, G.C. Studies with inactivated equine influenza vaccine. J. Hyg., London 90:371-384, 1983.
- 26 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. EXPERT COMMITTEE. A revised system of nomenclature for influenza A viruses. Bull. Wld. Hlth. Org., 45:119-123, 1971.
- 27 - YAMAGISHI, H.; NAGAMINE, T.; SHIMODA, K.; SEYA, I.; IGARASHI, Y.; YOSHIOKA, I.; MATUMOTO, M. Comparative measurements of equine influenza virus antibodies in horse sera by SRH, Neutral and HI tests. J. clin. Microb. 15:660-662, 1982.

Recebido para publicação em 28/05/87
Aprovado para publicação em 15/03/88