

OTIMIZAÇÃO DE RT-PCR MULTIPLEX PARA SUBTIPAGEM DO VÍRUS INFLUENZA A

Gava, D.; Simon, N.L.; Schaefer, R.; Rocha, C.S.; Ciacci-Zanella, J.R.

Embrapa Suínos e Aves, Laboratório de Sanidade Animal, Concórdia –SC.

E-mail: danielle.gava@cnpa.embrapa.br

PALAVRAS-CHAVE: Influenza A, RT-PCR multiplex, Subtipagem, Hemaglutinina, Neuraminidase.

INTRODUÇÃO

Os vírus Influenza (VIS) são pertencentes à família Orthomyxoviridae, gênero influenzavirus. O genoma viral é composto por oito segmentos de RNA, sendo os vírus subtipados de acordo com a antigenicidade de suas glicoproteínas de superfície: hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) (3, 9). Atualmente, 16 tipos diferentes de HA e 9 de NA são descritos. Em suínos, a doença é considerada endêmica e os animais são portadores dos subtipos A/H1N1, A/H3N2 e A/H1N2 (12, 14).

Na América do Norte, Europa e Ásia, VIS circulantes em suínos são geneticamente diferentes devido a introduções independentes e manutenção de linhagens de influenza de origem aviária, humana e suína. O VIS H1N1 clássico era o principal subtipo de influenza suína nos EUA até 1988. Desde a introdução do gene interno de rearranjo triplo (TRIG) houve um aumento na taxa de mudanças genéticas em isolados do subtipo H1 e *clusters* genéticos diferentes começaram a evoluir nos VIS (13, 14). Na Europa, três subtipos circulam em suínos: H1N1 aviário (*avian-like*), o H3N2 humano (*human-like*) e os vírus H1N2 (1, 7). No Brasil, os dados sorológicos indicaram a presença de anticorpos contra os subtipos H1N1 (2,2%) e H3N2 (16,7%) (2) e quatro anos após, outro estudo determinou a incidência de anticorpos contra o subtipo H1N1 (85,29%) e H3N2 (85,29%) (8). O uso da RT-PCR para a detecção do VIS a partir de amostras de secreção nasal de suínos provenientes do estado de Santa Catarina foi realizado no período de 2005 a 2006, e revelou a presença de material genético viral (10). Mais recentemente, um estudo realizado por Caron et al. (4), analisando soros de suínos do estado do Paraná relatou que 46% das granjas foram consideradas positivas, com 20% dos animais apresentando anticorpos para o subtipo H3N2. Ciacci-Zanella et al. (6) ao avaliar soros coletados de suínos no Brasil no período anterior a 2009 e depois de 2009, mostrou que anticorpos contra o vírus H1N1 pandêmico não foram detectados antes de 2009 no País.

Os principais métodos de diagnóstico de Influenza A, tanto para a detecção do antígeno como para a detecção de anticorpos são: (a) isolamento viral em ovos embrionados, (b) isolamento viral em cultivo celular, (c) inibição da hemaglutinação - HI, (d) teste de ELISA, (e) transcrição reversa-reação da polimerase em cadeia - RT-PCR e (f) imuno-histoquímica - IHQ (9, 11). Devido às dificuldades encontradas para o isolamento viral, decorrente principalmente do momento correto para a coleta da amostra (a excreção viral ocorre somente durante a fase aguda da infecção - primeiros 7 dias), são de grande valor as técnicas laboratoriais que contribuem para um diagnóstico mais rápido, específico e sensível, com ênfase para a RT-PCR. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar uma técnica de RT-PCR multiplex para detectar e subtipar amostras do vírus Influenza A, circulantes em suínos, baseado nas glicoproteínas de superfície H1 e H3, e N1 e N2.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de referência do vírus influenza (H1N1 e H3N2) foram selecionadas para otimização da técnica de RT-PCR multiplex. Foram utilizados pares de primers específicos para cada uma das quatro regiões alvo: H1- (F5'- GGG ACA TGT TAC CCA GGA GAT -3') e (R5'- GCA TTG TAT GTC CAA ATA TCC A -3'); H3- (F5'- TAT GCC TGG TTT TCG CTC AA -3') e (R5'- TTC GGG ATT ACA GTT TGT TG -3'); N1- (F5'- GGT TCC AAA GGA GAC ATT TTT G -3') e (R5'- CTA TCC AAA CAC CAT TGC CAT A -3'); N2- (F5'- TGC GAT CCT GAC AAG TGT TAT C -3') e (R5'- CAG ACA CAT CTG ACA CCA GGA T -3'), descritos por Choi et al. (5). Para a padronização da RT-PCR foi utilizado o kit comercial Invitrogen™ (Taq DNA Polimerase, 10X PCR Buffer, MgCl₂ 50mM), variando as quantidades de magnésio 50mM (1,0; 2,0 e 3,0mM), dNTPs 10mM (0,5 e 1,0μL), primers 10pmol (0,6 e 1,0μL) e temperatura de anelamento dos primers (54°; 56°; 58°; 60° e 62°C). Como controle negativo das reações foi utilizada água

ultrapura. Os produtos da amplificação de foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% e visualizados sob luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação de RT-PCR multiplex foi otimizada com os seguintes parâmetros: 2,0mM de magnésio, 1,0μL de dNTPs 10mM e 0,6 μL de cada um dos primers a 10pmol. A ciclagem foi estabelecida da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos gerados foram: H1 – 1006pb; H3 – 663pb; N1 - 754pb e N2 – 502 pb (Figura 1).

Diferentes métodos têm sido descritos para o diagnóstico de Influenza em suínos. Tradicionalmente, o isolamento viral é realizado em ovos embrionados de galinhas SPF (*Specific Pathogen Free*). Contudo a utilização de linhagens celulares, como a MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), e posterior detecção do antígeno viral por imunocitoquímica, também têm se mostrado eficiente. Outros métodos incluem a detecção de anticorpos no soro pela técnica de HI ou ELISA, bem como a marcação do antígeno em tecidos parafinados através da técnica de IHQ. (9, 11). Contudo, nenhuma destas técnicas pode identificar qual o subtipo de Influenza está presente na amostra. Desta forma, a RT-PCR multiplex otimizada neste trabalho além de ser uma técnica rápida e sensível pode identificar o subtipo viral de influenza presente na amostra isolada de suínos.

CONCLUSÕES

A técnica de RT-PCR multiplex para a subtipagem do vírus influenza A (H1, H3 e N1, N2) foi otimizada. A rápida detecção e subtipagem é extremamente útil pois é capaz de determinar o subtipo do vírus influenza circulante em rebanhos suínos, além de fornecer informações sobre a prevalência do vírus nos plantéis brasileiros, auxiliando nas medidas de controle da infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) BALINT et al. **Viol. Journal**. v.6, n.180, p.1-6, 2009.
- (2) BRENTANO et al. **Comunicado Técnico**. Embrapa Suínos e Aves. p.1-6, 2002.
- (3) BROWN, I.H. **Vet. Microbiol.** v.74, n.1-2, p.29-46, 2000.
- (4) CARON et al. **Virus Rev. Res.** v.15, n.1, p.63-73, 2010.
- (5) CHOI et al. **J. Virol. Methods**. v.102, p.53-59, 2002.
- (6) CIACCI-ZANELLA et al. **Proceedings...** Barcelona, 2011, p.261.
- (7) KYRIAKIS et al. **Zoonoses Public Health**. v.58, n.2, p.93-101, 2009.
- (8) MANCINI et al. **Virus Rev. Res.** v.11, n.1, p.39-43, 2006.
- (9) MURPHY, B.R. e WEBSTER, R.G. 1996. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, N.B. et al. **Virology**. 3.ed. Lippincott-Raven: Philadelphia, PA, pp.1397-1445.
- (10) SCHAEFER et al. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Suínos e Aves. p.1-18, 2008.
- (11) TAKIMOTO et al. **J. Clin. Microbiol.** v.29, p.470-474, 21991.
- (12) VAN REETH et al. **Influenza Other Resp. Viruses**. v.2, p.99-105, 2008.
- (13) VINCENT et al. **Influenza Other Resp. Viruses**. v.28, p.2782-2787, 2010.
- (14) VINCENT et al. **Virus Genes**. v.39, p.176-185, 2009.

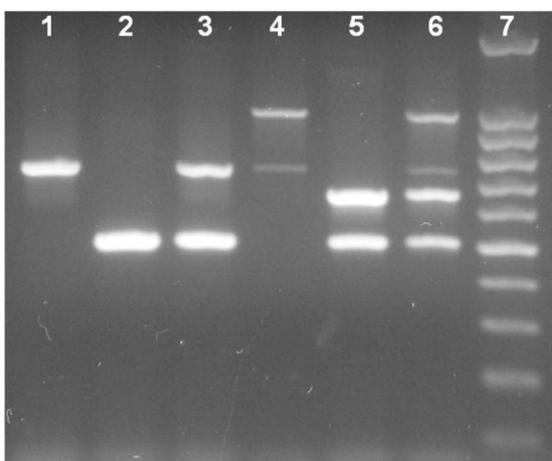


Figura 1- (1) H1N1 com primer N1; (2) H3N2 com primer N2; (3) H1N1 + H3N2 com primers N1 e N2; (4) H1N1 com primers H1 e N1; (5) H3N2 com primers H3 e N2; (6) H1N1 + H3N2 com primers H1, H3, N1, N2; (7) Marcador 100pb.