PATRÍCIA FILIPPSEN

Pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o vírus da influenza equina (subtipos: H7N7 e H3N8) em equídeos provenientes do Estado de São Paulo

São Paulo

2013

PATRÍCIA FILIPPSEN

Pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o vírus da influenza equina (subtipos: H7N7 e H3N8) em equídeos provenientes do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do titulo de Mestre em Ciências

Departamento
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador
Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2913
FMVZ

Filippsen, Patrícia
Pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o vírus da influenza equina (subtipos: H7N7 e H3N8) em equídeos provenientes do Estado de São Paulo / Patrícia Filippsen. -- 2013.
107 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Influenza A. 2. Influenza equina. 3. Inibição da hemaglutinação. 4. Inibidores inespecíficos da hemaglutinação. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o vírus da influenza equina (subtipos: H7N7 e H3N8) em equídeos provenientes do Estado de São Paulo", protocolado sob o nº 2365/2011, utilizando 100 (cem) cavalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/11/2011.

We certify that the Research "Research for hemagglutination inhibition antibodies against equine influenza viruses (subtypes: H7N7 and H3N8) in equines from the state of São Paulo", protocol number 2365/2011, utilizing 100 (one hundred) horses, under the responsibility Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/23/2011.

São Paulo, 6 de dezembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FILIPPSEN, Patrícia

Titulo: Pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o vírus da influenza equina (subtipos: H7N7 e H3N8) em equídeos provenientes do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Mestre em Ciências

Data:_____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição: _____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____Julgamento:_____

Agradecimentos

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo) pela bolsa de mestrado (processo 2011/06236-0) e pelo Auxilio Pesquisa (processo 2011/03234-7) concedidos fazendo possível a realização deste projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, pela oportunidade concedida, pela paciência e ensinamentos.

À minha família, que me fez e faz acreditar que com o mais árduo trabalho os sonhos são possíveis de serem realizados.

À amiga Graziella Ülbricht Benvenga, pela amizade, auxílio e colaboração com o projeto.

Agradecimentos aos pesquisadores: Dra. Eliane Monteforte Villalobos, Dra. Elenice Maria Sequetin Cunha e Dra. Maria Custódio do Carmo Lara (Instituto Biológico de São Paulo), Dr. Enio Mori (Instituto Pasteur), pelo apoio, treinamento de técnicas laboratoriais e colaboração ao projeto.

Aos professores: Dr. Paulo Eduardo Brandão (FMVZ-USP), Dr. Fábio Gregori (FMVZ-USP), Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto (UFRSA/FMVZ-USP), pela ajuda, ensinamentos e colaboração.

À Dra. Cláudia Madalena Cabrera Mori, pelo auxílio e colaboração com o projeto.

Aos professores do Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística (VPS/FMVZ/USP) pela ajuda e colaboração com as análises estatísticas.

Aos amigos do VPS, pelo convívio, colaboração e amizade: Fernanda Dornelas, Cintia Maria Favero, Dilmara Reischak, Sheila, Iracema, Aline, Carolina, Giselle, Katya, Luis, Nara, Laila, Andrea e Sueli, pela ajuda e carinho dedicados.

Agradeço à Sheila pelo auxílio nas práticas laboratoriais e atividades de biotério.

Aos professores e funcionários do VPS São Paulo, pelo auxílio e convívio.

A paz não pode ser mantida à força. Somente pode ser atingida pelo entendimento.

Albert Einstein (SBG, 2013).

RESUMO

FILIPPSEN, P. **Pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o vírus da influenza equina (subtipos: H7N7 e H3N8) em equídeos provenientes do Estado de São Paulo.** [Detection of hemagglutination inhibition antibodies against equine influenza viruses (subtypes: H7N7 and H3N8) in horses from São Paulo State]. 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os vírus da Influenza Equina (EIV) (H3N8 e H7N7) pertencem à família *Orthomyxoviridae*, gênero Influenza A. Apesar de existirem poucos relatos de infecção humana pelo EIV, é conhecido o risco zoonótico e infecção interespécies. Serviços de vigilância epidemiológica da OIE e WHO informam que o subtipo H3N8 é isolado de surtos que ocorrem mundialmente, enquanto o subtipo H7N7, menos patogênico, não é isolado desde 1980, sendo então considerado um vírus extinto. Embora o EIV seja endêmico em nosso meio, há poucos trabalhos nacionais que tenham versado sobre a avaliação atual de anticorpos (Ac) anti-EIV presentes nos equídeos do Estado de São Paulo, o que motivou a realização do presente estudo. Os objetivos do presente trabalho foram: 1) avaliar a ação de diferentes tratamentos de soro descritos pela OIE e WHO para a remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação em soros de 10 equinos vacinados (H3N8 – A/Equi/Kentucky/1/1997), sendo eles: a) TPH: tripsina, metaperiodato de potássio seguido de adsorção de hemácias; b) KH: kaolin 20% seguido de adsorção de hemácias; e c) RDEH: RDE seguido de adsorção de hemácias; 2) avaliar a presença de Ac contra os vírus H3N8 e H7N7, em 84 equídeos não vacinados do Estado de São Paulo; 3) comparar a frequência de Ac contra H3N8 entre equídeos amostrados do estado de SP e de um painel de soros de equídeos do município de Mossoró - RN, região onde não há estudos sobre a circulação do EIV. Constatou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos de soro para a remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação ($p>0,05$; confiança de 95%), todavia o tratamento RDEH apresentou resultados mais consistentes, corroborando a recomendação da OIE e da WHO de utilizar preferencialmente este tratamento. O perfil sorológico dos animais amostrados de SP sugere que circule o subtipo H3N8 e que o subtipo H7N7 circule de forma subclínica nos equídeos, o que é sustentado por outros trabalhos realizados no Brasil. Há evidências no Brasil sobre a detecção

de anticorpos em equinos contra o subtipo H7N7, mesmo não havendo o isolamento deste no mundo desde 1980. No painel de soros do RN, onde a espécie *Equus asinus* era maioria, verificou-se a igualdade estatística entre as frequências de *Equus caballus* e *Equus asinus* positivos no teste de HI para o subtipo H3N8 ($p>0,05$; confiança de 95%), dado inédito em nosso meio. A frequência dos equídeos positivos no teste de HI para o subtipo H3N8 foi estatisticamente maior ($p<0,05$; confiança de 95%) em SP do que em RN.

Palavras-chave: Influenza A. Influenza equina. Inibição da hemaglutinação. Inibidores inespecíficos da hemaglutinação.

ABSTRACT

FILIPPSEN, P. **Detection of hemagglutination inhibition antibodies against equine influenza viruses (subtypes: H7N7 and H3N8) in horses from São Paulo State**. [Pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o vírus da influenza equina (subtipos: H7N7 e H3N8) em equídeos provenientes do Estado de São Paulo]. 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The Equine influenza Virus (EIV) (H3N8 and H7N7) belong to *Orthomyxoviridae* family and Influenza A genus. Although there are few reports of human infection with EIV zoonotic and interspecies infection risk is known. OIE and WHO services on epidemiological surveillance report that H3N8 subtypes are isolated and characterized from worldwide outbreaks while H7N7 subtype less pathogenic has not being isolated since 1980 considered an extinct virus. Although the EIV is endemic in our country there are few national studies that had versed on the current evaluation of horses antibodies (Ab) from São Paulo State which motivated the present study. The study objectives were: 1) to evaluate the effects of different serum treatments described by OIE and WHO for the removal of nonspecific inhibitors of hemagglutination in 10 vaccinated (H3N8 - A/Equi/Kentucky/1/1997) horses sera being: a) TPH: trypsin, potassium metaperiodate followed by adsorption of erythrocytes b) KH: kaolin 20% followed by adsorption of erythrocytes and c) RDEH: RDE followed by adsorption of erythrocytes; 2) investigate the presence of antibodies against H3N8 and H7N7 viruses in 84 unvaccinated equines in São Paulo State; 3) compare the frequency of antibodies against H3N8 sampled between São Paulo State and a panel of equines sera from Mossoró - RN where there are no studies on EIV circulation. There was no statistical difference between the treatments for serum nonspecific inhibitors of hemagglutination removal ($p>0.05$; 95% confidence) however RDEH treatment showed results more consistent confirming OIE and WHO recommendation to use this treatment with priority. The serological profile of SP samples suggests H3N8 subtype circulates in those animals and H7N7 subtype might circulate in a subclinical form in equines, which is supported by other studies conducted in Brazil. There is evidence of antibodies detection against equine H7N7 subtype in Brazil, even without since 1980 isolation in the world. In animals from RN State which had *Equus asinus* representing a major fraction there was statistical equal frequencies of *Equus caballus* and *Equus asinus* positivity in HI test against

H3N8 subtype ($p>0.05$; 95% of confidence), as unprecedented in the world. The frequency of positive equine against H3N8 subtype on HI test in SP was statistically higher ($p<0.05$; 95% of confidence) than in RN.

Keywords: Influenza A. Equine influenza. Hemagglutination inhibition test. Nonspecific hemagglutination inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética formulada com sequências do gene HA de diferentes estirpes representando os seis gêneros da família *Orthomyxoviridae* 26
Figura 2 - Esquematização da transmissão interespécie dos vírus Influenza A 29
Figura 3 - Reassortiments ocorridos para a formação dos vírus pandêmicos do subtipo H1N1 (Spanish - Espanhol), H2N2 (Asian - Asiático), H3N2 (Hong Kong) e o vírus epidêmico H1N1 (Russian - Russo) 30
Figura 4 - Estrutura viral esquemática dos vírus Influenza A 32
Figura 5 - Estrutura do genoma do virus Influenza A H1N1 (A/Puerto Rico/8/34) 32
Figura 6 - Árvore filogenética dos 17 subtipos de HA formando dois distintos grupos 35
Figura 7 - Árvore filogenética dos 9 subtipos de NA, formando dois distintos grupos 35
Figura 8 - Diagrama em fita de uma hemaglutinina não clivada de um vírus influenza A (H1N1) de 1918, causador da Gripe pandêmica Espanhola 38
Figura 9 - Ácido siálico presente na proteína de membrana celular 39
Figura 10 - Ácidos siálicos mais comumente encontrados de acordo com o tipo de substituição no carbono 5 39
Figura 11 - Estrutura do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) 40
Figura 12 - Estrutura e localização dos ácidos siálicos nas células 40
Figura 13 - Pontos de ataque de tratamentos químicos e enzimáticos sobre a estrutura do ácido 4-O-acetil-N-acetil-neuramínico (4-O-Ac-NeuAc) 53
Figura 14 - Esquema da via de inoculação do EIV em cavidade alantóide em ovos embrionados de galinha..... 58
Figura 15 - Procedimento de coleta de líquido alantóide de ovo embrionado de galinha inoculado com EIV..... 59
Figura 16 - Esquematização para a realização do teste da hemaglutinação para o vírus Influenza A..... 61
Figura 17 - Esquematização para a realização do teste da hemaglutinação para o EIV H3N8 62
Figura 18 - Esquematização da placa para realizar o teste de HI 67
Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR para o gene de matriz dos vírus H3N8 e H7N7 (fragmento de aproximado de 245 pb).... 71
Figura 20 - Distribuição dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra os vírus H3N8 e H7N7 gerados de soros de equídeos amostrados no Estado de São Paulo 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos segmentos e os respectivos genes e proteínas do virus Influenza A H1N1 (A/Puerto Rico/8/34) 34

Tabela 3 - Pesquisa internacional sobre a evidência do vírus influenza H7N7, a partir de dados fornecidos por centros de vigilância internacionais nos anos de 1985 e 1990 44

Tabela 4 - Efetivo de equinos em 5 Estados brasileiros com maior número de equinos no Brasil 45

Tabela 5 - Levantamentos sorológicos para pesquisa de anticorpos inibidores inibidores da hemaglutinação do EiV em equídeos no Brasil 47

Tabela 6 - Características de inibidores inespecíficos da hemaglutinação 51

Tabela 7 - Diferentes métodos para remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação 52

Tabela 8 - Tratamentos recomendados para a remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação em soros prévios para o teste de HI contra o EIV . 54

Tabela 9 - Banco de soros de equídeos utilizados para análise do perfil sorológico de Ac contra o vírus da influenza equina (subtipos H7N7 e H3N8) 65

Tabela 10 - Soros de equídeos utilizados para análise da presença de Ac contra o vírus da influenza equina subtipo H3N8 66

Tabela 11 - Títulos de anticorpos gerados no teste de HI para o vírus da influenza equina, H3N8 (A/Equi/SP/1/2012), com 4UHA/25µL, em soros de cavalos previamente vacinados 72

Tabela 12 - Títulos de anticorpos de soros de equídeos de Pirassununga (P), Mairiporã (M), Águas de Lindóia (AL) e Bragança Paulista (BP), do Estado de São Paulo, gerados no teste de HI para o vírus da influenza equina, H3N8 A/Eq/SP/2012 e H7N7 A/Eq/SP/1956, com 4UHA/25µL 74

Tabela 13 - Frequências de equídeos do estado de São Paulo sororreagentes no teste de HI para os subtipos virais H3N8 e H7N7 76

Tabela 14 - Títulos obtidos no teste de HI para os subtipos H3N8 e H7N7 em um mesmo animal, nos equídeos amostrados no Estado de São Paulo ... 78

Tabela 15 - Títulos de anticorpos de soros de equinos e asininos de Mossoró-RN gerados no teste de HI para o vírus da influenza equina H3N8 A/Eq/SP/2012, com 4UHA/25µL 79

Tabela 16 - Frequências de equídeos do município de Mossoró - RN soro-reagentes no teste de HI para o subtipo viral H3N8 79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Boxplot para os títulos de anticorpos contra H3N8 e H7N7 de equídeos de Pirassununga (P), Mairiporã (M), Águas de Lindóia (AL) e Bragança Paulista (BP), do Estado de São Paulo, gerados no teste de HI para o vírus da influenza equina, H3N8 (A/Equi/SP/1/2012) e H7N7 (A/Equi/SP/1/1956) 75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
dNTP	Deoxinucleosídeo-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EIV	*Equine Influenza Virus* - Vírus da Influenza Equina
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Grama
x g	Força centrífuga relativa
HA	Hemaglutinina
HA	*Hemagglutination Test* - Teste da hemaglutinação
HI	*Hemagglutination Inhibition Test* - Teste da inibição da hemaglutinação
HPAI	*Highly Pathogenic*
IE	Influenza Equina
IIH	Inibidores Inespecíficos da Hemaglutinação
kDa	QuiloDalton
LABMAS	Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia
LPAI	*Low Pathogenic*
M	Molar
M	Gene de matriz
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDCK	*Madin Darby Canine Kidney*
min	Minuto de hora
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mM	Milimolar
NA	Neuraminidase
NP	Nucleoproteína
PA	Polimerase ácida
pb	Pares de base
PB1	Polimerase básica 1
PB2	Polimerase básica 2
PCR	*Polymerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomoles
PNSE	Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos
RDE	*Receptor Destroying Enzyme*
RT-PCR	*Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction*
SPF	*Specific Pathogen Free*
UHA	Unidade hemaglutinante
VIC	Vírus da Influenza Canina
µL	Microlitro
α	Alfa
α-2M	Alfa - 2 macroglobulina
°C	Graus Celsius

Obs.: Algumas abreviaturas, dada a sua consagração na literatura científica, seguem a sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **23**
2 REVISÃO DE LITERATURA **25**
2.1 O GÊNERO INFLUENZA A 25
2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E ESTRUTURAL DOS VÍRUS INFLUENZA A 31
2.2.1 O fenômeno da hemaglutinação viral e sua inibição por anticorpos específicos 37
2.3 A INFLUENZA EQUINA 41
2.3.1 A influenza equina no Brasil 45
2.4 DIAGNÓSTICO DA INFLUENZA EQUINA 48
2.4.1 Diagnóstico direto 48
2.4.2 Diagnóstico indireto 49
3 OBJETIVOS **55**
4 MATERIAL E MÉTODOS **57**
4.1 OBTENÇÃO DOS SUBTIPOS VIRAIS DE EIV 57
4.2 CULTIVO DOS VÍRUS H3N8 E H7N7 57
4.3 PESQUISA DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE NOS CULTIVOS VIRAIS 59
4.3.1 Obtenção de hemácias de galo 59
4.3.2 Lavagem das hemácias de galo 60
4.3.3 Preparo da solução de hemácias 0,5% 60
4.3.4 Teste da hemaglutinação 61
4.4 PESQUISA DO GENE M POR RT-PCR 62
4.4.1 Extração de RNA 62
4.4.2 Reação de Transcrição Reversa (RT) 63
4.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) 63
4.4.4 Visualização dos produtos da PCR mediante eletroforese 63
4.5 FORMAÇÃO DO BANCO DE SOROS DE EQUÍDEOS 64
4.5.1 Grupo de cavalos vacinados 64
4.5.2 Grupo de equídeos do Estado de São Paulo 64
4.5.3 Grupo de equídeos do município de Mossoró - RN *65*
4.6 TESTE DA INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO 66
4.7 TRATAMENTOS DE SOROS PARA A REMOÇÃO DE INIBIDORES INESPECÍFICOS DA HEMAGLUTINAÇÃO 67

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....71
5.1 DETECÇÃO DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE NOS VÍRUS H3N8 E H7N7 71
5.2 DETECÇÃO DO GENE DE MATRIZ DO EIV POR RT-PCR.....71
5.3 TRATAMENTOS DE SOROS PARA A REMOÇÃO DE INIBIDORES INESPECÍFICOS DA HEMAGLUTINAÇÃO (IIH) 72
5.4 PESQUISA DE ANTICORPOS INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO CONTRA OS VÍRUS H3N8 E H7N7 EM EQUÍDEOS DO ESTADO DE SÃO PAULO 73
2.3 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-H3N8 EM EQUÍDEOS NO MUNICÍPIO DE MOSSORÓ - RN 79
7 CONCLUSÕES 81
REFERÊNCIAS.....83
APÊNDICE.....95
ANEXOS 97

1 INTRODUÇÃO

A influenza equina (IE), ou gripe equina, é uma enfermidade viral, causada pelo vírus da influenza equina (EIV – *Equine Influenza Virus*) que acomete equídeos de todas as idades, causando perda dos cílios da superfície epitelial, estase do muco e consequente predisposição às infecções bacterianas secundárias (p.ex. *Streptococcus zooepidemicus* e *Pasteurella spp*.) levando a quadros clínicos mais graves (FLORES, 2007).

A infecção ocorre por via respiratória e a disseminação entre os animais é de forma epidêmica, mediante condições de aglomerações, como em exposições, competições e vendas dos equídeos (OLUSA et al., 2010).

Existem dois subtipos virais causadores da IE: H3N8, mundialmente distribuído; e o H7N7, sem isolamento viral confirmado desde 1980, é considerado extinto (WEBSTER, 1993).

A severidade dos sintomas varia de acordo com a imunidade do animal, virulência e estirpe viral, manejo e condições ambientais. O H3N8 causa doença mais severa por sua característica epiteliotrópica, enquanto o H7N7 causa doença mais branda (FLORES, 2007).

Trata-se de uma das enfermidades respiratórias mais importantes dessa espécie devido aos prejuízos econômicos causados, principalmente em animais de competição em surtos epizoóticos (OLUSA et al., 2010).

A IE possui distribuição mundial e pode ser fatal para equinos não vacinados, asnos, potros desmamados, sobreanos, lactentes, potros que não ingeriram colostro e animais mantidos em más condições sanitárias e de manejo (MILLER, 1965).

Embora a IE seja uma enfermidade de notificação obrigatória no Brasil e ser de grande importância econômica, poucos são os estudos sobre o perfil sorológico de cavalos, asininos e muares frente às estirpes atuais do EIV no Brasil, e em estados brasileiros.

Assim, o presente estudo teve por objetivos: a) avaliar diferentes tratamentos para a remoção de inibidores inespecíficos da hemalgutinação (IIH), visto que os IIH podem gerar resultados falso positivos no teste de HI; b) avaliar a presença de anticorpos (Ac) contra os vírus H3N8 e H7N7 em 85 equídeos não vacinados no Estado de São Paulo; c) comparar a frequência e o título de Ac contra H3N8 entre

equídeos amostrados do Estado de SP e de um painel de soros de equídeos do município de Mossoró - RN, cidade onde não há estudos sobre a circulação do EIV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os vírus do gênero Influenza A causam doença respiratória contagiosa em aves e mamíferos, que em casos graves podem levar à morte. O agente é mundialmente distribuído, causando epidemias sazonais e pandemias com altas taxas de infecção (WRIGHT et al., 2007).

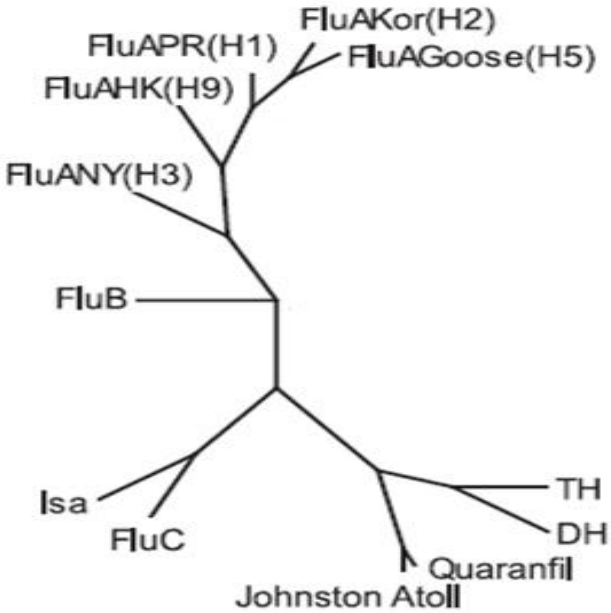
A epidemiologia, taxonomia, estrutura viral e situação atual dos vírus Influenza A são descritos a seguir.

2.1 O GÊNERO INFLUENZA A

Os vírus da influenza A pertencem à família *Orthomyxoviridae,* que compõe seis diferentes gêneros: *Influenzavirus A* (espécie: vírus Influenza A), *Influenzavirus B* (espécie: vírus Influenza B), *Influenzavirus C* (espécie: vírus Influenza C), *Isavirus* (espécie: vírus da Anemia Infecciosa do Salmão), *Thogotovirus* (espécies: vírus Dhori e vírus Thogoto) e *Quaranjavirus* (espécies: vírus Quaranfil e vírus Johnston Atoll) (ICTV, 2013).

Presti et al. (2009) estudaram filogeneticamente os seis gêneros da família *Orthomyxoviridae*, gerando uma árvore filogenética a partir de sequências do gene da hemaglutinina de algumas estirpes, de forma a representar os seis gêneros, como demonstrado na figura 1.

Figura 1 - Árvore filogenética formulada com sequências do gene HA de diferentes estirpes representando os seis gêneros da família *Orthomyxoviridae*



Fonte: Presti et al., (2009).
Legenda: FluAKor(H2): A/Korea/426/68 (H2N2); FluAGoose(H5): A/Goose/ Guangdong/1/96(H5N1); FluAPR(H1): A/Puerto Rico/8/34 (H1N1); FluAHK (H9): A/Hong Kong/1073/99 (H9N2); FluANY(H3): A/New York/392/2004 (H3N2); FluB: B/Lee/40; Isa: *Infectious salmon anemia vírus*; FluC: C/Ann Arbor/1/50; Johnston Atoll: JAV - *South Pacific strain*; Quaranfil: QRFV (EGT377); DH: Dhori (Indian/1313/61); TH: Thogoto (SiAr126).

Os vírus Influenza B e C acometem somente os humanos, raramente afetando outras espécies (PALESE; SHAW, 2007).

O gênero *Isavirus* contém uma espécie viral, causadora da anemia infecciosa do salmão. O gênero *Thogotovirus* é composto por duas espécies: vírus Dhori, que causa doença febril e neurológica em humanos, e o vírus Thogoto, que causa doença febril e encefalite em humanos, ambos transmitidos por carrapatos (FRESE et al., 1995).

O gênero *Quaranjavirus* foi recentemente aceito pelo ICTV no ano 2012 e contém duas espécies: vírus Johnston Atoll e vírus Quaranfil (PRESTI et al., 2009; ICTV, 2013).

O vírus Johnston Atoll foi isolado pela primeira vez de carrapatos (*Ornithodoros capensis*) coletados de um ninho de andorinha-do-mar-preta (*Anous stolidus),* nas Ilhas Sand e Johnston Atoll, no centro do Oceano Pacífico e não é esclarecido se o vírus pode causar doenças em humanos (CLIFFORD et al., 1968).

O vírus Quaranfil, que causa doença febril em humanos, foi isolado de aves marinhas e de carrapatos (*Argas [Pessicargus] arboreus*) na Arábia Saudita (AL-KHALIFA et al., 2007), África do Sul (SANG et al., 2006), Afeganistão, Nigéria (KEMP et al., 1975), Iraque, Iémen, Kuwait (CONVERSE et al., 1982) e Irã (SUREAU et al., 1980).

A influenza, ou gripe, classicamente causa a destruição do epitélio do trato respiratório superior, podendo atingir o trato respiratório inferior. Os sintomas são: febre, tosse, secreção nasal, podendo evoluir para pneumonias severas devido à lesão viral e às infecções bacterianas secundárias (WRIGHT et al., 2007; OLUSA et al., 2010).

A primeira associação e reconhecimento de que a enfermidade respiratória, até então chamada por “influenza”, seria causada por um vírus ocorreu em 1931, quando Richard Shope, nos EUA, reproduziu uma doença respiratória que acometia suínos de forma similar à doença em humanos, a partir de filtrados de muco nasal de outros suínos doentes e conseguindo assim isolar o agente (A/swine/Iowa/30) (SHOPE, 1931).

Em 1933, pela primeira vez o vírus da influenza humana foi isolado por pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisa Médica em Londres, através da inoculação de lavados nasofaringeais de doentes em *ferrets,* via intranasal, reproduzindo a enfermidade (SMITH; ANDREWES; LAIDLAW, 1933). O agente foi nomeado Influenza A em razão de ter sido o primeiro vírus influenza a ser isolado (WRIGHT et al., 2007).

Em 1940 e 1947 outros dois vírus antigenicamente diferentes da Influenza A, responsáveis por causar doença respiratória em humanos foram isolados e identificados, sendo eles: o vírus da Influenza B (B/Lee/40) e o vírus da Influenza C respectivamente (WRIGHT et al., 2007).

As enfermidades são mundialmente classificadas de acordo com a maneira em que estão dispersas em uma população, podendo a ocorrência ser chamada de surto, endêmica, epidêmica e pandêmica (CDC, 2012).

São classificadas como endemias aqueles agentes infecciosos ou determinadas doenças que estão presentes constantemente ou usualmente ocorrem na população de uma região geográfica específica (CDC, 2012).

Ocasionalmente os casos de uma doença em uma determinada população de uma área geográfica aumentam, ficando acima da média esperada para aquela população, são chamados de epidemias (CDC, 2012).

O conceito de surto é usualmente utilizado da mesma forma de epidemia, porém em área geográfica menor (CDC, 2012).

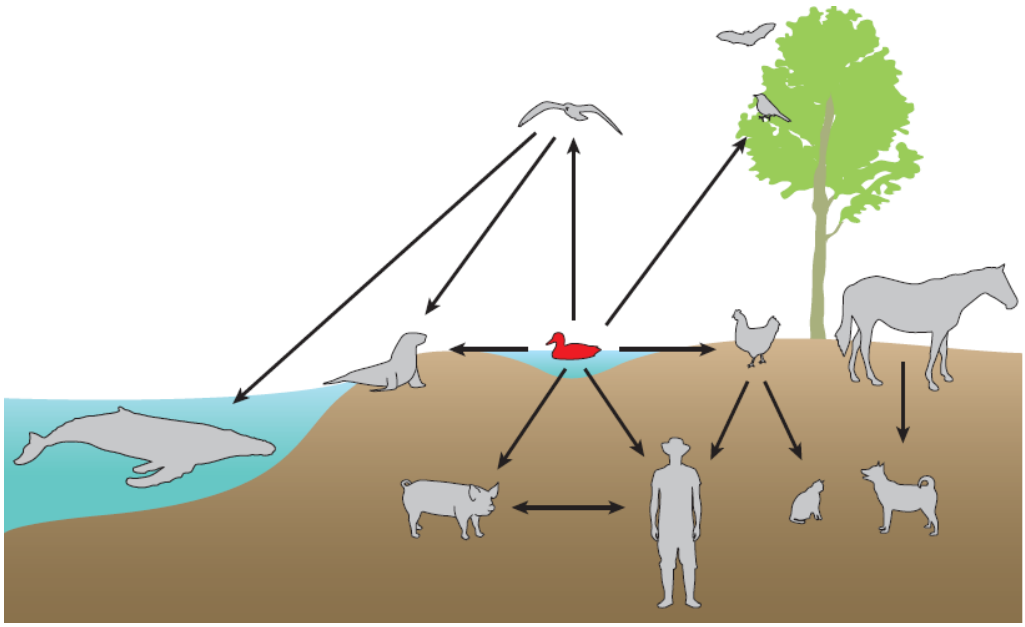
As pandemias são classificadas como casos de epidemias que se disseminaram para diversos países ou continentes, usualmente com números maiores de ocorrência da doença (CDC, 2012).

Quando os termos de dispersão de doenças são referentes a doenças que acometem os animais utiliza-se o sufixo “zootia”, sendo: enzootia, epizootia e panzootia (SANTOS, 2008).

A maior pandemia mundial foi a de 1918-1919, conhecida como a Gripe Espanhola, causada por uma estirpe H1N1, gerando a morte de mais de 20 milhões de pessoas no mundo (MEDINA; GARCIA-SASTRE, 2011). O subtipo H1N1 persiste na população humana, e contribui com seus genes para a formação de novos vírus (MORENS; TAUBENBERGER; FAUCI, 2009).

As aves, principalmente as migratórias, representam grande importância epidemiológica no ciclo viral, visto serem reservatórios e haver a possibilidade de rearranjos e mutações virais, além da dispersão do vírus para outros hospedeiros (Figura 2).

Figura 2 - Esquematização da transmissão interespécie dos vírus Influenza A



Fonte: Ozawa e Kawaoka (2013).

As aves contem receptores para os vírus Influenza A e são capazes de transmitir o agente para outras aves e mamíferos, mesmo que a linhagem viral não esteja estabelecida nesses novos hospedeiros (WEBSTER, 2002).

Os vírus aviários são classificados em duas categorias: altamente patogênico (HPAI - do inglês: *Highly Pathogenic*) e pouco patogênico (LPAI – do inglês: *Low Pathogenic*), devido à habilidade de causar doença severa e à capacidade de causar morte em aves em condições experimentais (CDC, 2013).

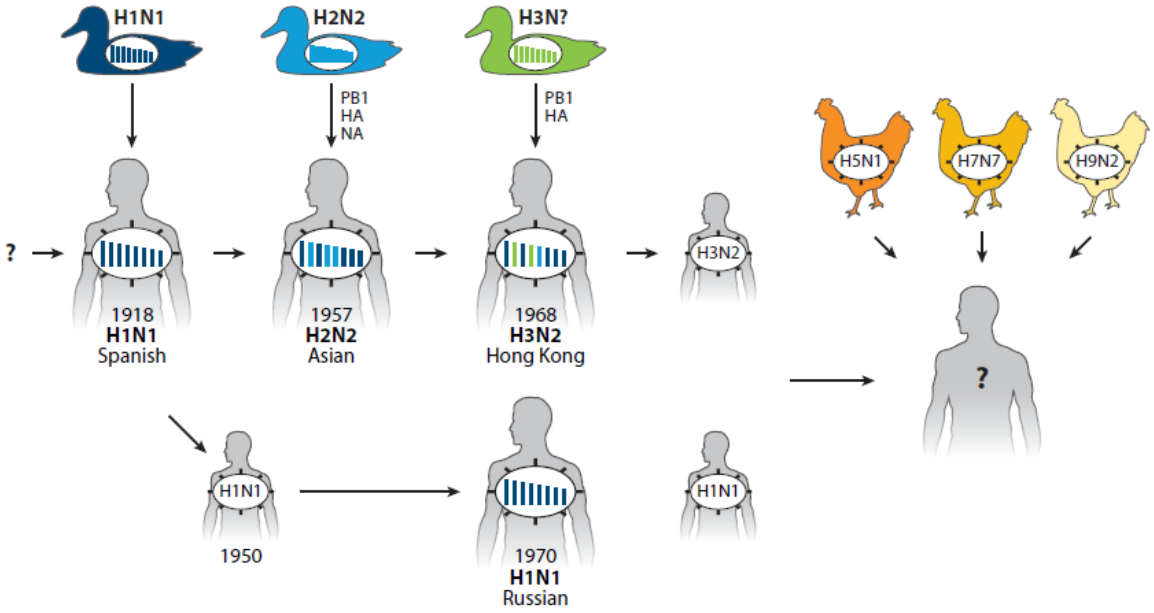
Infecções causadas por vírus aviário LPAI causam doença branda ou subclínica. Os vírus HPAI causam doença severa com alta mortalidade. Ambos tem dispersão rápida entre as aves (CDC, 2013).

São três subtipos predominantes de influenza aviária conhecidos por afetar humanos de forma esporádica ou rara: H5 (N1-N9) - causando pneumonia severa, H7 (N1-N9) - causando doença moderada no trato respiratório superior, e H9 (N1-N9) - causando doença moderada no trato respiratório superior (CDC, 2013).

Evidências genéticas sugerem que o vírus pandêmico Espanhol originou de um vírus aviário do subtipo H1N1 em 1918. Em 1957, houve o *reassortment* com os genes HA, NA e PB1 do subtipo H2N2 aviário ao H1N1, levando à emergência do vírus pandêmico Asiático. O H2N2 pandêmico Asiático sofreu *reassortment* em 1968 com outro vírus aviário, recebendo os genes H3 e PB1, além de o restante dos

genes de um vírus humano, gerando o vírus pandêmico H3N2 HongKong (OZAWA; KAWAOKA, 2013) (Figura 3).

Figura 3 - *Reassortiments* ocorridos para a formação dos vírus pandêmicos do subtipo H1N1 (*Spanish* - Espanhol), H2N2 (*Asian* - Asiático), H3N2 (Hong Kong) e o vírus epidêmico H1N1 (*Russian* - Russo)



Fonte: Ozawa e Kawaoka (2013)

Os suínos tem grande importância na epidemiologia dos vírus Influenza A por possuírem receptores nas células (descrito no item 2.2.1) que permitem a coinfecção por diferentes vírus Influenza A, com afinidades a diferentes receptores (TREBBIEN; LARSEN; VIUFF, 2011).

Em 2009, um vírus pandêmico (H1N1), originado do triplo-*reassortment* de vírus aviário, suíno e humano, causou mortes em humanos no mundo todo (BELSER et al., 2010).

Relatos sobre a ocorrência concomitante de epidemias de doenças respiratórias sugestivas de influenza em equinos e humanos na Europa, durante o período pré-era virológica, remontam a importância epidemiológica existente entre os vírus influenza de origem animal e humano (MORENS; TAUBENBERGER, 2010).

Recentemente o vírus H3N8 equino rompeu as barreiras entre hospedeiros, causando infecções em cães (CRAWFORD et al., 2005) e suínos (TU et al., 2009).

Em 2004, nos Estados Unidos, foi descoberto que um H3N8 equino foi o vírus responsável por uma epidemia de doença respiratória severa em cães, que até o

momento eram conhecidos por serem refratários aos vírus influenza (CRAWFORD et al., 2005).

Desde a ocorrência do surto de gripe canina em 2004, mutações foram ocorrendo até que o vírus da Influenza Canina (VIC) H3N8 fosse estabelecido, e assim, formando novas linhagens do VIC (GIBBS; ANDERSON, 2010).

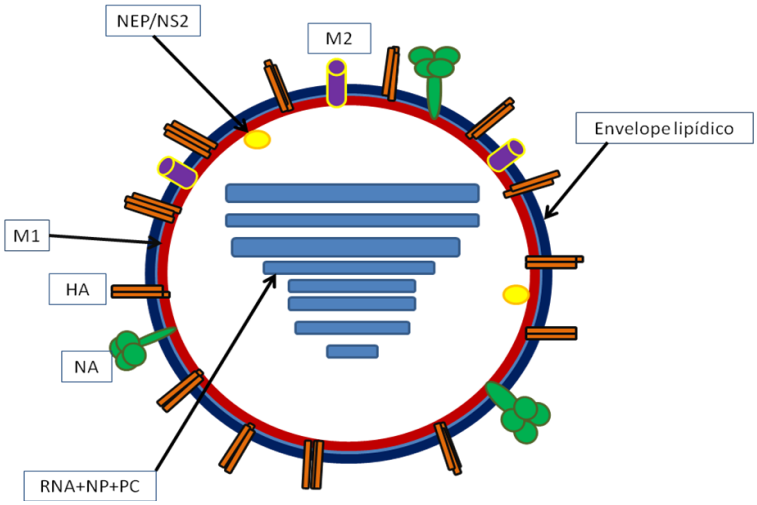
Recentemente foram identificados dois novos subtipos virais, o H17N10, de morcegos (*Sturnira lilium)* na Guatemala, e o H18N11, de morcegos (*Artibeus planirostris*) em um rio Amazônico no Peru, divergentes de todos os vírus Influenza A conhecidos, que tem potencial para rearranjos genéticos e assim pode contribuir para o surgimento de novos vírus Influenza pandêmicos capazes de infectar seres humanos (TONG et al., 2012; TONG et al., 2013).

2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E ESTRUTURAL DOS VÍRUS INFLUENZA A

Todos os vírus Influenza A possuem genoma de RNA segmentado, fita simples, polaridade negativa e são envelopados (WRIGHT et al., 2007).

Os oito segmentos do RNA genômico dos vírus influenza A codificam pelo menos 10 polipeptídeos: duas glicoproteínas de envelope (HA e NA), duas proteínas estruturais (de matriz M1 e de canal iônico M2), uma proteína não estrutural (NS1), uma proteína estrutural de exportação nuclear (NEP, antigo NS2), a nucleoproteína (NP), e três proteínas que compõem o complexo RNA-polimerase viral: polimerase ácida (PA), polimerase básica 1 (PB1) e polimerase básica 2 (PB2) (WRIGHT et al., 2007; LU et al., 2009) (Figuras 4 e 5).

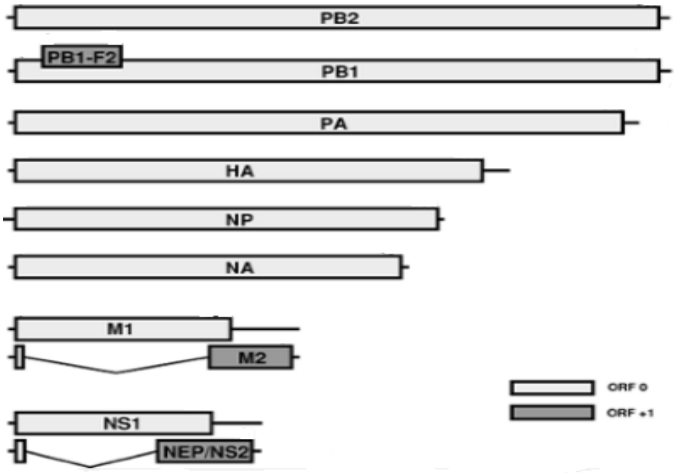
Figura 4 - Estrutura viral esquemática dos vírus Influenza A



Fonte: Medina e García-Sastre (2011) com adaptações de Filippsen, P. (2013).

Legenda: HA: glicoproteína de envelope hemaglutinina; NA: glicoproteína de envelope neuraminidase; M1: proteína de matriz; M2: proteína de matriz - canal de cálcio; NS: proteína não-estrutural; NEP: proteína exportadora nuclear; RNA+NP+PC: complexo entre RNA genômico viral, NP: nucleoproteína e PC: complexo polimerase viral (composto por: PA – polimerase ácida, PB1 – polimerase básica 1 e PB2 – polimerase básica 2).

Figura 5 - Estrutura do genoma do virus Influenza A H1N1 (A/Puerto Rico/8/34)



Fonte: Palese e Shaw (2007) com adaptações de Filippsen, P. (2013).

Legenda: ORF: Open Reading Frame; ORF+1: ORF no *frame* 1.

A combinação do genoma viral e a nucleoproteína viral é chamada de ribonucleoproteína (RNP) que é associada ao complexo polimerase viral (CP) durante a formação de novos vírions (ELTON et al., 2005).

Cada um dos oito segmentos se comporta de forma independente durante a transcrição e replicação viral. Esta é a base da ocorrência da alta taxa de *reassortment* dos vírus influenza durante infecções múltiplas nas células do hospedeiro (WEBSTER; BEAN, 1978).

O gene NS1 é conhecido por ter ação multifuncional, dentre eles o controle temporal de síntese de mRNA e vRNA (FALCON et al., 2004), interação celular levando a célula hospedeira à apoptose (ZHIRNOV; KLENK, 2007), bloqueio da ativação de RNases (MIN; KRUG, 2006), limitação da produção de IFN - β (WANG et al., 2000) e outras interações com as células do hospedeiro (BERGMANN et al., 2000; GUO et al., 2007; MIBAYASHI et al., 2007).

Durante a replicação viral, a NA remove os ácidos siálicos das glicoproteínas e glicolipídios celulares e das glicoproteínas virais para inibir a ligação das novas partículas virais nesses receptores. Como resultado, as novas partículas virais são liberadas das células para infectar novas células e disseminar a infecção (WEBSTER; LAVER, 1967). Anticorpos contra a neuraminidase são capazes de bloquear essa ação enzimática (de destruir receptores de ácido siálico) e consequentemente limitar a infecção (MONTO; KENDAL, 1973).

Os inibidores da neuraminidase, Relenza® (zanamivir) e Tamiflu® (oseltamivir), são substâncias análogas aos ácidos siálicos que se ligam ao sítio ativo da enzima, bloqueando sua atividade e prevenindo a liberação de novos vírus da célula infectada (COLMAN, 2009).

As descrições dos genes codificados a partir dos oito segmentos do genoma dos vírus Influenza A e suas funcionalidades, utilizando como exemplo o vírus Influenza A H1N1 (A/Puerto Rico/8/34) estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos segmentos e os respectivos genes e proteínas do virus Influenza A H1N1 (A/Puerto Rico/8/34)

Segmento	Genes	Tamanho (nt)	Proteínas	Tamanho (aa)	Funções
1	PB2	2341	PB2	759	Componente da RNA polimerase Responsável pela ligação do *cap* no pré-mRNA
2	PB1	2341	PB1	757	Componente da RNA polimerase Atividade de endonuclease Responsável por adicionar nucleotídeos no alongamento do vRNA
			PB1-F2	87	Atividade pró-apoptótica
3	PA	2233	PA	716	Componente da RNA polimerase Papel na transcrição e replicação Protease
4	HA	1778	HA	550	Glicoproteína de superfície Ligação a receptores celulares Fusão do vírus com a membrana endossomal para atingir o citoplasma Aglutinação do muco do sistema respiratório Imunogênica Alvo de anticorpos neutralizantes
5	NP	1565	NP	498	Principal componente do capsídeo Reveste o vRNA Ligação, síntese e importação nuclear do vRNA
6	NA	1413	NA	454	Glicoproteína de superfície Atividade de neuraminidase Imunogênica
7	M	1027	M1	252	Proteína de matriz (face interna da camada lipídica) Interação com RNP e glicoproteínas de superfície Exportação nuclear
			M2	97	Proteína de membrana Conduz prótons do endossomo para o interior do vírus permitindo a liberação da RNP dos componentes virais
8	NS	890	NS1	230	Proteína multifuncional Antagonista de IFN
			NEP	121	Direcionamento da exportação nuclear das RNPs para o citoplasma juntamente com a M1

Fonte: Palese e Shaw (2007) e Martins (2001) com adaptadações de Filippsen, P. (2013).

Legenda: Nt: nucleotídeos; aa: aminoácidos; RNP: complexo ribonucleoproteína viral; IFN: Interferon.

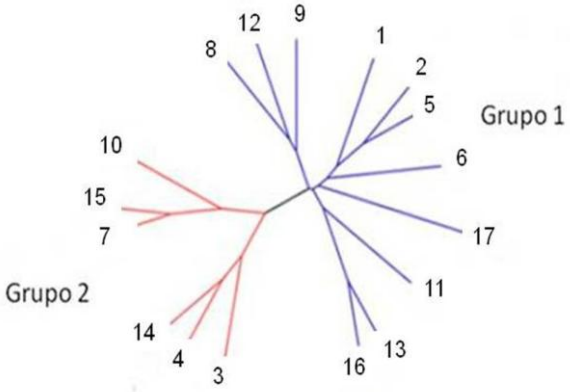
Os vírus Influenza A sofrem mudanças antigênicas constantes. Esporadicamente o vírus passa por mudanças antigênicas maiores, ou *shifts* antigênicos, nos antígenos de superfície, sendo mais comum a ocorrência de mudanças antigênicas pequenas, referidas como *drifts* antigênicos (WILSON; COX, 1990).

O *drift* antigênico consiste na acumulação de substituição de aminoácidos devido a mutações pontuais randômicas ocorridas na HA e NA, que podem levar à formação de estirpes que não são mais reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro. O *drift* antigênico é um dos maiores motivos da necessidade de se atualizar as estirpes vacinais em humanos (CDC, 2011).

O *shift* antigênico ocorre quando há mudanças abruptas no genoma, resultando na emergência de novas glicoproteínas HA e/ou NA, como ocorreu em 2009 com a gripe pandêmica H1N1 (CDC, 2011).

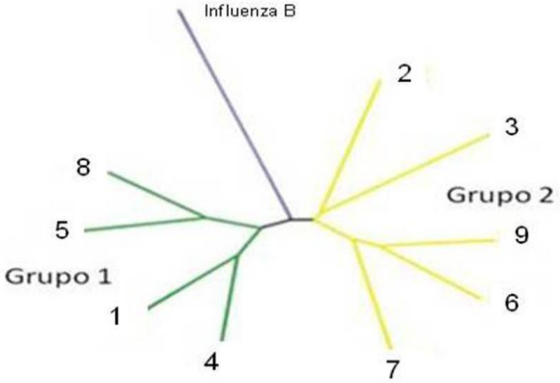
Por classificação filogenética, os subtipos de HA e NA são agrupados em dois grupos (GAMBLIN; SKEHEL, 2010; SUN et al., 2013) (Figuras 6 e 7), com exceção dos novos subtipos H18, N10 e N11 (TONG et al., 2013) que ainda não foram agrupados filogeneticamente.

Figura 6 - Árvore filogenética dos 17 subtipos de HA formando dois distintos grupos



Fonte: Sun et al., (2013) com adaptações de Filippsen, P. (2013).

Figura 7 - Árvore filogenética dos 9 subtipos de NA, formando dois distintos grupos



Fonte: Gamblin; Skehel (2010) com adaptações de Filippsen, P. (2013).

A maioria dos anticorpos neutralizantes virais tem como alvo a parte globular da hemaglutinina, região que sofre constantes mutações devido à pressão imunológica sofrida no hospedeiro (YEWDELL et al., 1979).

Recentemente foram identificados Ac naturais capazes de fazer reação cruzada e neutralizar os subtipos de hemaglutininas do mesmo grupo filogenético (grupo 1 ou grupo 2). Essa reação cruzada é possível devido à semelhança em uma região estrutural das HAs do mesmo grupo filogenético (WANG et al., 2010).

Essa descoberta permitirá que novas tecnologias possam ser pesquisadas e exploradas visando à produção de vacinas grupo-filogenético-específicas contra os subtipos de hemaglutininas (MARGINE et al., 2013).

A não ocorrência de reação cruzada no teste de HI entre os subtipos H3 e H7 é descrita por Tumová e Pereira (1968), Cunha et al. (1986) e por Lee, Senne e Suarez (2006), porém a reação com outros subtipos de influenza A pode ocorrer (Quadro 1).

Quadro 1 - Agrupamentos de amostras virais de Influenza A que apresentam reatividade cruzada no teste da inibição da hemaglutinação

Agrupamento com reatividade cruzada	Amostras virais
1	A/Equi/Prague/1/56 (H7N7) A/Fowl plague/Dutch/27(H7N7) A/Turkey/England/1/63 (H7N3)
2	A/Equi/Miami/1/63 (H3N8) A/Quail/Italy/1117/65 (H10N8) A/Pheasant/Italy/647/66 (H10N2) A/Duck/England/1/62 (H4N6) A/Turkey/Canada/1/63 (H6N2)
3	A/Singapure/1/57 (H6N2) A/Turkey/Massachussets/65 (H6N2)
4	A/Swine/S15/30 (H1N1) A/Chicken/Scotland/1/59 (H5N1)

Fonte: Tumová e Pereira (1968) com adaptações de Filippsen, P. (2013).

2.2.1 O fenômeno da hemaglutinação viral e sua inibição por anticorpos específicos

A primeira descrição do fenômeno da hemaglutinação pelo vírus da Influenza tipo A foi feita por Hirst, em 1941. O líquido alantóide de ovos inoculados com uma estirpe de Influenza tipo A promoveu a aglutinação de hemácias quando liberadas do ovo durante a coleta do líquido (HIRST, 1941).

A partir do ocorrido, foram desenvolvidos os testes de hemaglutinação (HA), para evidenciar a presença de vírus hemaglutinantes e o de inibição da hemaglutinação (HI), para determinar presença ou ausência de anticorpos inibidores da hemaglutinação viral (HIRST, 1942).

O uso dos testes de HA e HI em estudos com os vírus Influenza foram inicialmente descritos por Hirst (1942), sofrendo diversas modificações posteriores.

O vírus da Influenza é caracterizado em subtipos de acordo com duas glicoproteínas presentes em sua superfície do envelope viral: a hemaglutinina (HA), com 18 subtipos conhecidos (H1-H18), e a neuraminidase (NA), com 11 subtipos descritos (N1-N11). As duas glicoproteínas estão dispostas na proporção 4:1 na superfície do envelope viral (BOUVIER; PALESE, 2008; TONG et al., 2012; TONG et al., 2013).

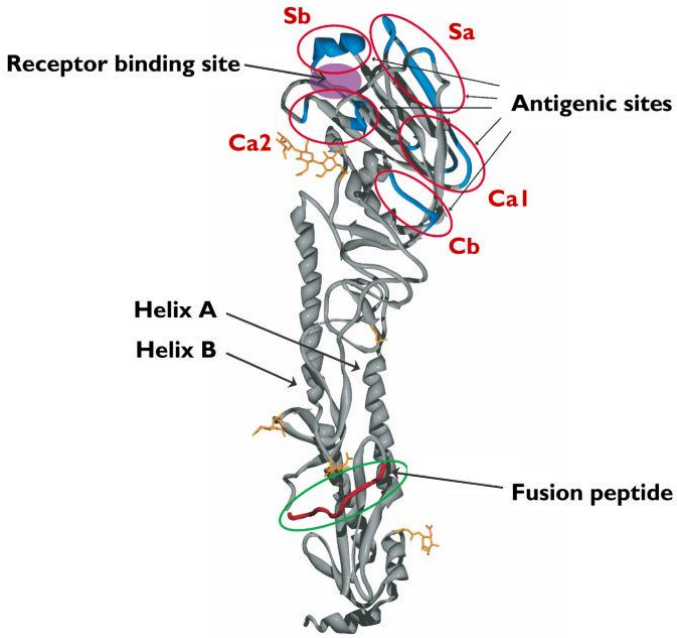
A glicoproteína HA é o principal antígeno viral e tem função de ligação e fusão celular (exceto H17), enquanto a NA, com exceção da recém-descoberta N10, tem atividade de sialidase, rompendo a ligação entre a hemaglutinina e o ácido siálico presente em receptores da membrana celular, promovendo a liberação viral.

Os subtipos H17, H18, N10 e N11 tem ação completamente distintas das HAs e NAs dos vírus Influenza A, e seus mecanismos de entrada e de saída da célula ainda são desconhecidos (SUN et al., 2013; TONG et al., 2013).

A HA é formada por um trímero com duas regiões estruturalmente distintas: uma haste compreendendo uma cadeia tripla espiral com α –hélices, e uma parte globular no topo (BOUVIER; PALESE, 2008). A parte globular contém o sítio de ligação ao ácido siálico que é circundado por sítios antigênicos, que no subtipo H1 foram designados Sb, As, Ca1, Ca2 e Cb (Figura 8). A haste é formada por duas hélices, A e B, e o peptídeo de fusão, que participa da fusão da membrana do envelope viral com a membrana endossomal durante a replicação viral. A ligação de

anticorpos específicos com a porção globular da HA promove a neutralização da infectividade viral (BOUVIER; PALESE, 2008).

Figura 8 - Diagrama em fita de uma hemaglutinina não clivada de um vírus influenza A (H1N1) de 1918, causador da Gripe pandêmica Espanhola

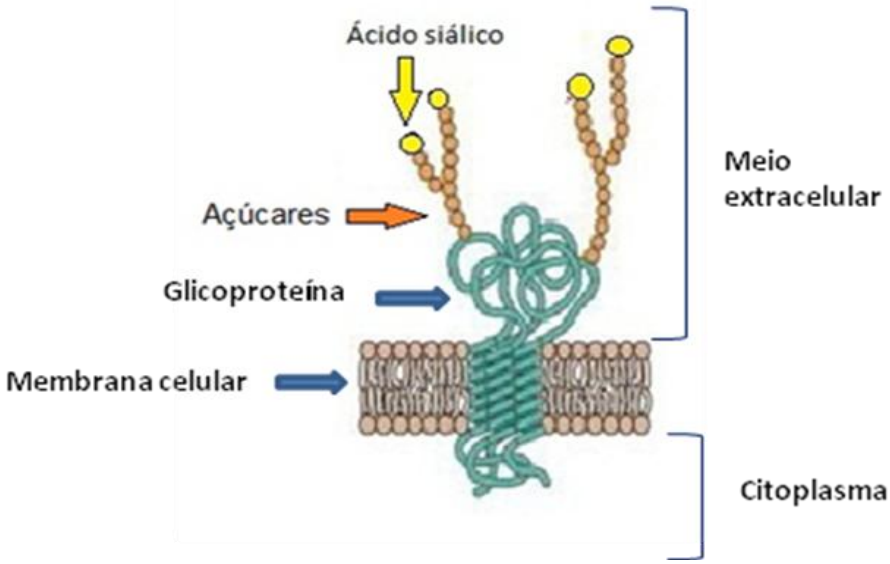


Fonte: Bouvier e Palese (2008).

Legenda: No topo há o sítio de ligação ao ácido siálico que é circundado por cinco sítios antigênicos (As,Sb,Ca1,Ca2 e Cb). A haste é formada por duas hélices, A e B, e um peptídeo de fusão.

O sítio de ligação ao receptor da molécula de HA tem afinidade com os receptores de ácido siálico (AS), que é o nome geral de uma família de açúcares carboxilados com 9 carbonos que encontram-se na parte terminal dos açúcares de glicoproteínas ancoradas em membranas celulares (Figura 9).

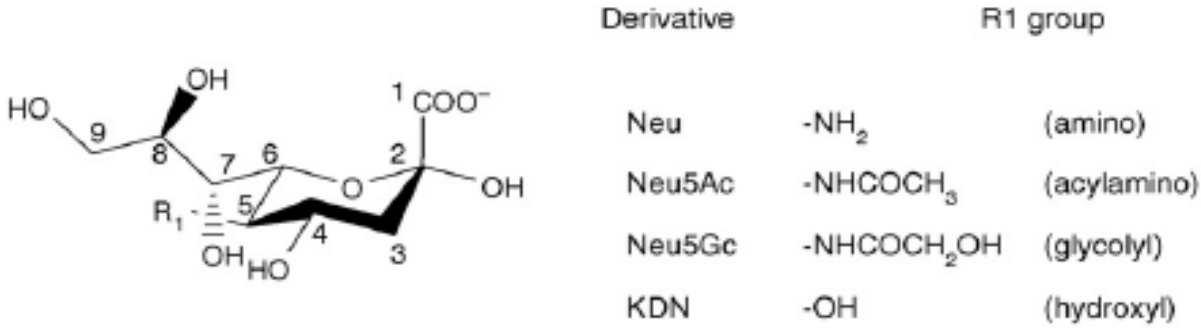
Figura 9 - Ácido siálico presente na proteína de membrana celular



Fonte: Racaniello (2009) com adaptações de Filippsen, P. (2013).

Esta família tem mais de 50 tipos de carboidratos, que diferem entre si pelo grau de substituição e oxidação no esqueleto carbônico de uma molécula precursora, a N-acetil-D Manosamina (ManAc). Os ácidos siálicos mais comuns encontrados são aqueles derivados de substituições no carbono 5 (Figura 10).

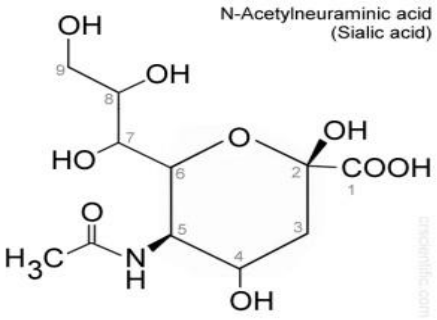
Figura 10 - Ácidos siálicos mais comumente encontrados de acordo com o tipo de substituição no carbono 5



Fonte: Byrne et al., (2007).

O membro mais comum desses ácidos siálicos é o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) amplamente encontrado em células de diferentes espécies de animais. (Figura 11).

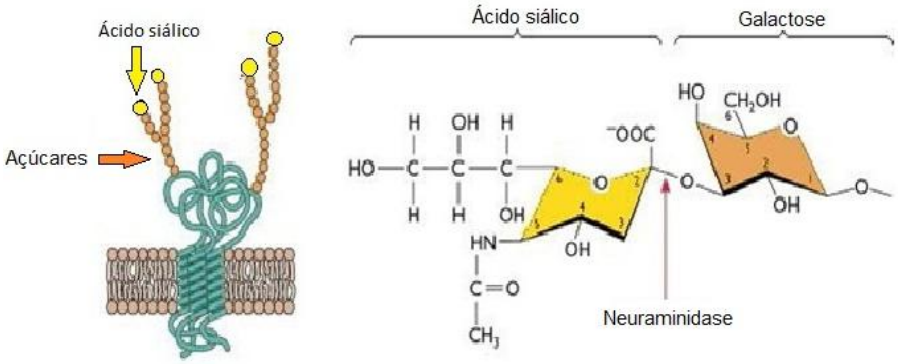
Figura 11 - Estrutura do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac)



Fonte: Suzuki et al., (2000).

O carbono 2 do ácido siálico pode se ligar ao carbono 3 ou 6 da galactose presente nas glicoproteínas, formando ligações do tipo α 2,3 e α 2,6 (Figura 12) (BOUVIER; PALESE, 2008).

Figura 12 - Estrutura e localização dos ácidos siálicos nas células



Fonte: Racaniello (2009) com adaptações de Filippsen, P. (2013).

Legenda: Esfera amarela: ácido siálico presente na proteína de membrana celular; esfera marrom: polímeros de açúcar ligados à membrana celular.

Em células epiteliais traqueais de humanos há a predominância de ligações do tipo α2,6, enquanto ligações do tipo α2,3 são mais abundantes em epitélio intestinal de patos/aves (TREBBIEN; LARSEN; VIUFF, 2011) e em células epiteliais nasais e traqueais de equinos (SUZUKI et al., 2000).

Os suínos contem ligações do tipo α2,3 e α2,6, o que permite serem suscetíveis aos subtipos de vírus influenza de diferentes hospedeiros (TREBBIEN; LARSEN; VIUFF, 2011).

2.3 A INFLUENZA EQUINA

Em 1956, pela primeira vez durante uma epizootia na Europa central, o vírus A/equi/Prague/1/56 (H7N7) foi isolado de cavalos em Praga (SOVINOVÁ et al., 1958[1] apud SHERMAN et al., 1977, p. 285). Estudos filogenéticos dão base à teoria que indicam que este subtipo de influenza é a mais antiga linhagem de vírus influenza estabelecida em mamíferos (WEBSTER et al., 1992).

Posteriormente, em 1963, um segundo vírus foi isolado nos Estados Unidos da América e foi classificado como H3N8 (A/equi/Miami/1/63) (WADDELL; TEIGLAND; SIGEL, 1963).

Ambos os subtipos costumam causar sintomas parecidos, como tosse, febre, perda de apetite, dores musculares, traqueobronquite e pneumonia secundária, porém o subtipo H3N8 usualmente produz doença mais severa (BEVERIDGE, 1965), inclusive causando miocardite intersticial (GERBER, 1969).

Há evidências que os dois subtipos de EIV originaram-se de um vírus influenza aviário (OIE, 2012).

O EIV tem a capacidade de sofrer mutações genéticas, com mudanças lentas e acumulativas pontuais, ou *drift* antigênico (item 2.2). Os *shifts* antigênicos (item 2.2) podem ocorrer com os vírus equinos, porém com menor frequência. (OXBURGH; HAGSTRÖM, 1999).

O maior *shift* antigênico sofrido pelo EIV ocorreu em 1963, quando a HA e a NA sofreram mudanças significativas. Até então os isolados de influenza equina eram similares ao subtipo H7 das hemaglutininas e designados de H7N7, enquanto o subtipo emergido a partir do *shift* antigênico foi chamado de H3N8 (A/equi/Miami/1/63) (WADDELL; TEIGLAND; SIGEL, 1963).

---

[1] SINOVÁ, O.; TUMOVÁ, B.; POUTSKA, F.; NEMEC, J. Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. **Acta Virologica**, v. 2, n. 1, p. 52-61, 1958.

Nos tempos antes da era virológica, no ano de 1299, epizootias respiratórias em equinos eram altamente sugestivos de serem causados por influenza e comumente acompanhados por epidemias de influenza em humanos (LAW, 1874[2] apud: MORENS; TAUBENBERGUER, 2009, p. 4). Nesta epizootia, existe a descrição de que os cavalos andavam com a cabeça baixa, apresentavam anorexia e tinham lacrimejamento (RUSII, 1532[3] apud: MORENS; TAUBENBERGUER, 2009, p. 4).

Em 1328 (FLEMING, 1871) e 1404 (ZEVIANI 1804[4] apud: MORENS; TAUBENBERGUER, 2009, p. 4; CLEMOW, 1889), outras duas epizootias ocorreram em cavalos com sintomatologia sugestiva de influenza enquanto ocorriam duas grandes epidemias de doença respiratória em humanos na Europa.

Em 1647 houve a descrição de um surto de influenza em soldados franceses e na respectiva cavalaria durante a passagem pela Alemanha (FLEMING, 1871).

A maior panzootia equina registrada foi reconhecida em Toronto, em 1872 que se disseminou para a América do Norte e América Central. O acometimento dos animais foi massivo, causando fatalidade entre 20 e 50%. Os animais apresentaram sintomatologia clínica severa, com achados de pneumonia viral e pneumonia bacteriana secundária (MORENS; TAUBENBERGUER, 2009).

A panzootia de 1872 afetou profundamente os Estados Unidos por semanas, devido à falta de animais para transportes, viagem, entrega de cartas, transporte de alimentos, médicos e inclusive de bombeiros. Um incêndio em Boston não pôde ser controlado, levando a cidade em chamas (SAMMARCO, 1997).

Epidemias em equinos foram descritas nos 30 anos seguintes nos Estados Unidos (MORENS; TAUBENBERGUER, 2009).

A Austrália sofreu o primeiro e importante surto de influenza equina (H3N8) em agosto de 2007, que se disseminou para diversas regiões geográficas, atingindo o nível de epizootia. A epizootia causou severos impactos econômicos no ramo equestre no país. O controle sanitário rigoroso e medidas tomadas pelas autoridades de saúde animal conduziram à erradicação da doença em 5 meses (SCHEMANN et al., 2012).

---

[2] LAW, J. Influenza in horses. In: Agriculture Commission. **Report of the Commissioner of Agriculture for the Year 1872**. Washington: 1874, p. 203-248.

[3] RUSII, L. Hippiatria Sive Mareschalia. Christianum Wechelum, Basiliensi, 1532.

[4] ZEVIANI, G. V. Sul catarrho epidêmico opuscolo. **Memorie di Matematica e di Fisica**. Societa Italiana dele scienze, v. 11, p. 476-530, 1840.

No ano de 2007, a maioria dos surtos de EIV ocorridos no mundo foi no Japão e na Austrália, afetando em torno de 2000 e 75 mil cavalos respectivamente. No mesmo ano o surto chegou à China e Mongólia, afetando mais de 50 mil cavalos (OIE, 2008).

Apesar de existirem poucos relatos de infecção humana pelo EIV, o risco zoonótico e infecção interespécies existentes são conhecidos (KASEL; COUCH, 1969; BERRÍOS, 2005; CRAWFORD et al., 2005).

A inoculação experimental do H3N8 equino (A/equi/Miami/1963) em humanos voluntários em 1969 resultou em febre e acometimento do trato respiratório superior e/ou inferior (KASEL; COUCH, 1969).

De acordo com a OIE (2013), em 2012, o subtipo viral H3N8 equino foi isolado e/ou caracterizado de surtos ocorridos na Argentina, no Chile, na França, na Alemanha, na Irlanda, no Reino Unido, no Uruguai e nos EUA, inclusive causando mortes na França e no Uruguai. Em estações de quarentena, o EIV (H3N8) foi isolado e/ou caracterizado a partir de cavalos recentemente importados do Uruguai para Dubai e da Bélgica para o Japão. Os surtos ocorreram em cavalos com e sem vacinação. Em torno de 150 cavalos vacinados foram afetados em três surtos interligados na área de Calvados, na França. Todos os vírus identificados nos surtos de 2012 pertencem à linhagem Flórida, *clade* 1 e *clade* 2 (OIE, 2013).

Em levantamento de dados sobre isolamentos e evidências sorológicas sobre o subtipo H7N7, realizado por Webster em 1993, evidenciou que o último isolamento deste vírus foi confirmado em 1980, na Iugoslávia.

A ocorrência de Ac no teste de HI em um levantamento sorológico em cavalos não vacinados em algumas partes do mundo (Tabela 2) leva a crer que existe a possibilidade de ou o vírus H7N7 estar circulando nos equinos causando doença subclínica, ou a existência de inibidores inespecíficos da hemaglutinação e estarem mimetizando a presença de Ac específicos contra o vírus (WEBSTER, 1993).

Tabela 2 - Pesquisa internacional sobre a evidência do vírus influenza H7N7, a partir de dados fornecidos por centros de vigilância internacionais nos anos de 1985 e 1990

País	Ano do último isolamento do H7N7 equino conhecido	Último ano em que anticorpos contra H7N7 equino foram detectados (teste de HI)
Áustria	1973	1973
Bélgica	Nunca detectado	1990
Tchecoslováquia	1978	1989
Dinamarca	Não conhecido	Não conhecido
Inglaterra	1977	1984
França	1971	1983
Alemanha	Nunca detectado	Nunca detectado
Holanda	Nunca detectado	Não conhecido
Hungria	Nunca detectado	1985 (cavalos originados de outros países)
Irlanda	1979	1981
Itália	1976	1981
Polônia	Não conhecido	1984
Suécia	1974	1974
Suíça	1973	1990 (cavalos originados de outros países)
Iugoslávia	1980	1983
Israel	Nunca detectado	1983
Marrocos	Não conhecido	1985
Nigéria	Nunca detectado	Não conhecido
África do Sul	Nunca detectado	Nunca detectado
Turquia	Não conhecido	Não conhecido
Hong Kong	Nunca detectado	Nunca detectado
Japão	Nunca detectado	Nunca detectado
Mongólia	1978	1985
China	1974	1974
Rússia	1974	1989
Argentina	1976	1986
Canadá	Nunca detectado	Não conhecido
Estados Unidos	1977	1990
Austrália	Nunca detectado	Não conhecido
Nova Zelândia	Nunca detectado	Nunca detectado

Fonte: Webster (1993) com tradução de Filippsen, P. (2013).

Estudos detectaram anticorpos contra o subtipo H7 equino em cavalos na Croácia (MADIC et al., 1996), Nigéria (OLUSA et al., 2010), Canadá (DIAZ-MENDEZ et al., 2010) e no Brasil (MANCINI et al., 2004; AGUIAR et al., 2008; CUNHA et al., 2009; HEINEMANN et al., 2009).

O subtipo H7N7 equino nunca foi isolado de cavalos da Nigéria, e desde 1991 não há relatos de surtos pelo H3N8, porém pesquisadores detectaram anticorpos inibidores da hemaglutinação e anticorpos neutralizantes contra H7 em soros de equinos (OLUSA et al., 2010). Os cavalos podem ter entrado em contato com vírus H7N7 equino ou com um vírus influenza visto que os equinos do estudo tem contato direto com patos e aves selvagens (OLUSA et al., 2010).

Em 2009 a OIE retirou a recomendação da inclusão do subtipo H7N7 nas vacinas de influenza equina, considerando a não ocorrência do subtipo nos equinos desde 1980 (OIE, 2009).

2.3.1 A influenza equina no Brasil

A equinocultura constitui um importante segmento do agronegócio brasileiro. Estima-se que esse complexo mobilize cerca de R$ 7,3 bilhões anuais com a produção de cavalos e gere aproximadamente 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (BRASIL, 2013).

Segundo dados do IBGE (2012a), o Brasil possui a terceira maior população de equinos do mundo com aproximadamente 5,5 milhões de cabeças. O Estado de São Paulo ocupa a quinta posição do país possuindo 379 mil cavalos representando 6,9% do efetivo. Somados os equinos, asininos e muares, estima-se que haja 8 milhões de cabeças (BRASIL, 2013) (Tabela 3).

Tabela 3 - Efetivo de equinos em 5 Estados brasileiros com maior número de equinos no Brasil

Estado	N° equinos	%	Ranking
Minas Gerais	802 049	14,5	1°
Bahia	586 643	10,6	2°
Rio Grande do Sul	470 199	8,5	3°
Goiás	428 367	7,8	4°
São Paulo	379 379	6,9	5°

Fonte: IBGE (2012a)

Segundo o Regulamento Veterinário da Confederação Brasileira de Hipismo (CBH), edição de 2013, para a participação em qualquer modalidade competitiva, os animais devem ter exame negativo para Anemia Infecciosa Equina (AIE) e Mormo, e comprovante de vacinação atualizado para Encefalomielite Equina, Influenza Equina e Tétano.

A fim de promover a vigilância e controle de doenças de importância sanitária no meio equestre, em 08 de maio de 2008, pela IN n°17, foi instituído o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

De acordo com a Instrução de Serviço DDA n°17, de 16 de novembro de 2001, em todo território nacional, a participação de equídeos em eventos equestres e outras aglomerações é condicionada à apresentação de atestado de vacinação

contra gripe equina ou à apresentação de certificação sanitária emitida por um médico veterinário oficial ou credenciado, informando que os animais procedem de estabelecimentos onde não houve ocorrência clínica da doença nos 30 (trinta) dias que antecederam a emissão do documento de trânsito.

O primeiro relato do subtipo H3N8 do EIV no Brasil foi em 1963, no Estado de São Paulo, em um surto causado pelo subtipo (A/equi/SP/63) em cavalos (ANDREWS; PEREIRA; WILDY, 1978).

Em 1976, o subtipo H7N7 foi isolado em amostras de secreção nasal de equinos em São Paulo (A/equi/SP/76) (CUNHA, 1978) e no Rio de Janeiro (A/equi/RJ/76) (PIEGAS et al., 1976[5] apud MANCINI; GERALDES; PINTO, 1991, p. 1).

O subtipo H3N8 é endêmico em várias regiões do Brasil. Mancini e colaboradores descreveram o relato de caso do subtipo H3N8 em uma fazenda em São Roque - SP no ano de 1988 (MANCINI et al., 1988).

Foram descritos surtos pelo subtipo H3N8 em 1969 (CUNHA et al., 1970) e 2001 (LOUREIRO, 2004) no Estado do Rio de Janeiro, e em São Paulo no ano de 1985 (CUNHA et al., 1986).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), nos anos de 2008 e 2010, surtos de EIV ocorreram no Brasil, causados pelo subtipo H3N8. Os vírus foram isolados, porém, não foram descritas às quais linhagens virais pertenciam. (OIE, 2009; OIE, 2011).

Aguiar e colaboradores, em estudo de soroprevalência do EIV (H7N7 e H3N8), visando detectar Ac inibidores da hemaglutinação em equídeos do município de Monte Negro, Estado de Rondônia, Amazônia ocidental brasileira, analisaram o soro de 176 equídeos (equinos e muares), observando a prevalência de 19,9% de soro-reativos para o H7N7 e de 42% para o H3N8, sendo este estatisticamente maior.

Frequências de soro-reatividade no teste de HI entre 30 e 65% foram obtidas em trabalhos anteriores no Rio Grande do Sul (DIEL et al., 2006), no Pantanal nos

---

[5] PIEGAS, N. S.; TAKIMOTO, S.; BARBOSA, H. C.; LACERDA, J. P.; GUARNIERI, R.; ISHIMARU, T. **Isolamento do virus influenza de surto de gripe equina em São Paulo.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 15., 1976, Rio de Janeiro, RJ. **Resumos...** 1976.

anos 1990 a 1995 (SILVA et al., 1999), Rio de Janeiro (OLIVEIRA et al., 2005) e Pará (HEINEMANN et al., 2009).

Levantamentos sorológicos realizados nos últimos anos em populações de equídeos assintomáticos, em diversas localidades no Brasil, sugerem que a infecção pelo EIV apresenta-se de modo endêmico (Tabela 4).

Tabela 4 - Levantamentos sorológicos para pesquisa de anticorpos inibidores inibidores da hemaglutinação do EiV em equídeos no Brasil

N	Autoria	Tratamento para remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação	Subtipo	Pesquisa de anticorpos no teste de HI (%)	n	Estado	Tipo	Histórico de vacinação
1	Pagano et al. (1985)	AQ/P/D	H7N7[f] H3N8[g]	77,75 41,22	13 44	AP, PA, RR, AM, AC e RO	AC	nv
			H7N7[f] H3N8[g]	30,64 24,79	71 8	CE, PB e PE	AC	nv
			H7N7 H3N8[g]	61,72 42,06	13 43	RJ	AC	nd
			H7N7[f] H3N8[g]	31,68 42,91	14 33	PR e RS	AC	nd
	Loureiro et al. (2002)	K/H	H3N8[a]	29,7	24 2	RJ	AC	nv
1	Silva et al. (1999)	ND	H3N8[a] H3N8[e]	30 42	50	MT/MS	AC	nd
2	Mancini et al. (2004)	AQ/K/H	H3N8[d] H7N7[c]	33,33 55,55	9	SP	AC	nv
3	Oliveira et al. (2005)	K/H	H3N8[a]	35,9	11 06	RJ	AC	nv
4	Diel et al. (2006)	AQ/K	H3N8[b]	65,4	15 06	RS	AC	nd
5	Pena et al. (2006)	AQ/K/H	H3N8[b]	35,79	51 4	PA	AC	nv
6	Aguiar et al. 2008	ND	H7N7[c] H3N8[d]	19,9 42	17 6 17 6	RO	SPr	nv
7	Heinemann et al. 2009	AQ/K/H	H7N7[c] H3N8[d]	55,6 76,5	81	PA	SPr	nv
8	Cunha et al. 2009	I	H7N7[c] H3N8[d]	2,7 11	16 3	SP	SPr	nv
9	Filippsen et al., 2012	K/H	H3N8[d]	54	37	PA/RN/SP	AC	nd

Fonte: Mori et al., (2012) com adaptações de Filippsen, P. (2013).

Legenda: a: A/eq/2/Miami/63, b: A/eq/Santa Maria/2/88, c: A/eq/SP/56, d: A/eq/SP/1/85; e: A/eq/Fontainbleau/2/1989, f: A/eq/RJ/76, g: A/eq/GB/69, AC: amostragem de conveniência; P: Periodato de potássio; D: Dextrose; SPr: Amostragem programada para estimativa de soroprevalência; I: descrito como preconizado pela OIE. AQ: aquecimento 56°C por 30 min.; K: kaolin; H: adsorção com hemácias. ND: não descrito; nv: não vacinado; nd: não disponível.

Em uma estimativa de soroprevalência no município de Uruará – PA, foram analisados 81 soros de equídeos no ano de 1998, para quantificar anticorpos

inibidores da hemaglutinação para as estirpes virais H3N8 (SP/1/1985) e H7N7 (SP/1/1956), sendo encontradas prevalências de 55,6% e 76,55% (HEINEMANN et al., 2009).

No trabalho realizado por Pagano et al. (1985), foram encontrados títulos inibidores da hemaglutinação contra H3N8 e H7N7 em soros de equídeos não vacinados, provenientes das regiões Norte e Nordeste do Brasil, compondo em 1344 e 718 animais respectivamente. Foram encontrados 41,22% (H3N8) e 77,75% (H7N7) de soros positivos na região Norte e 24,79% (H3N8) e 30,64% (H7N7) na região Nordeste (PAGANO et al., 1985).

2.4 DIAGNÓSTICO DA INFLUENZA EQUINA

Os métodos de diagnóstico direto visam detectar o agente, ou a presença ativa do agente, como o material genético ou a presença de proteínas estruturais e não estruturais.

Os métodos de diagnóstico indiretos visam detectar a presença de anticorpos específicos contra o agente.

2.4.1 Diagnóstico direto

Os métodos diretos preconizados pela OIE (influenza equina) e WHO (influenza animal) para o diagnóstico são:

a) Isolamento viral em líquido alantóide/amniótico de ovos embrionados de galinha ou em células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), ambos a partir de *swabs* nasais/nasofaringeais ou de lavados traqueais (WHO, 2011; OIE, 2012).

b) Teste da hemaglutinação viral seguido de inibição da hemaglutinação, para sorotipificação da HA, com um painel de soros específicos contra os subtipos de hemaglutininas (H1-H16) (OIE, 2012; WHO, 2011).

c) Ensaio da Neuraminidase e teste inibição da neuraminidase: realizado com antisoros específicos para sorotipificação da NA (WHO, 2011).

d) Teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) direto para detecção de nucleoproteína viral (WHO, 2011; OIE, 2012).

f) Identificação molecular por RT-PCR (*Reverse Transcription* e *Polymerase Chain Reaction* - Transcrição Reversa seguido de Reação em Cadeia da Polimerase) (WHO, 2011; OIE, 2012).

g) Imunofluorescência direta (WHO, 2011).

h) qRT-PCR: RT-PCR quantitativa ou em tempo real (OIE, 2012).

2.4.2 Diagnóstico indireto

Os métodos indiretos, para a detecção de anticorpos anti-influenza, preconizados pela OIE e WHO são:

a) Teste da inibição da hemaglutinação (HI).

Obs.: Para o diagnóstico de doença, devem ser coletadas amostras de soros pareadas (dia da detecção dos sintomas e 15 dias após). A soroconversão, quando o título aumenta em no mínimo quatro vezes em relação à primeira colheita do soro, é o indicativo de que o animal teve a enfermidade (WHO, 2011; OIE, 2012).

b) Hemólise simples radial (SRH - *Single Radial Haemolysis*) (OIE, 2012).

c) Ensaio de microneutralização viral (WHO, 2011).

2.4.2.1 Fatores inespecíficos que podem interferir na reação de Inibição da Hemaglutinação (HI)

Alguns fatores presentes no soro de animais podem interferir nos resultados obtidos no teste de HI, fazendo com que seus resultados não exprimam a real presença ou ausência de anticorpos específicos contra o subtipo de Influenza A.

Estes fatores podem ser divididos em dois grupos:

A) Presença de anticorpos contra o tipo de hemácia utilizada no HI:

A eventual presença de anticorpos contra o tipo de hemácia empregado no teste ocasionaria o fenômeno de hemaglutinação mesmo que o soro contivesse anticorpos contra o vírus, fornecendo resultados falsos negativos.

A fim de contornar este problema, recomenda-se o tratamento prévio dos soros a serem testados com uma suspensão de hemácias do mesmo tipo das utilizadas no teste, o que removeria tais anticorpos (WHO, 2011).

B) Presença de inibidores inespecíficos da hemaglutinação viral:

A eventual presença de outros fatores de natureza diferente dos anticorpos, mas capazes de inibir o fenômeno de hemaglutinação viral, ocasionaria o fenômeno de inibição inespecífica da hemaglutinação, gerando resultados falsos positivos (BOLIAR et al., 2006).

2.4.2.2 Inibidores inespecíficos da reação de inibição da hemaglutinação para os vírus Influenza A

A primeira descrição da presença de fatores inespecíficos inibidores da hemaglutinação (IIH) contra os vírus influenza do grupo B em soros de humanos, furões e coelhos foi feita por Francis (1947).

Aplicando o teste de HI com o soro de humanos, furões e coelhos (não imunizados) foram observados títulos parecidos com aqueles obtidos com os soros imunes específicos (convalescentes ou vacinados), demonstrando a existência de algum fator inespecífico inibidor da hemaglutinação no soro de humanos e animais não imunizados.

Cohen et al. (1963) descreveram a existência de três tipos de IIH, com base nas suas mobilidades eletroforéticas: α, β e γ (Tabela 5).

Tabela 5 - Características de inibidores inespecíficos da hemaglutinação

Característica do inibidor	**Tipo de inibidor**		
	α	**β**	**γ**
Destruição ao calor	-	+	-
Inibição de Hemaglutinação com vírus vivo	-	+	+
Inibição da hemaglutinação com vírus inativado 56°C/30min.	+	+	+
Inativação do inibidor por neuraminidase	+	-	-
Inativação do inibidor por tripsina	+	+	+-
Inativação do inibidor por periodato	+	-	+
Tipo de vírus inibido	A1,A1,A2,B	A1,A1	A2
Neutraliza infectividade viral	-	+	+
Distribuição	Soro de mamíferos, algumas mucosas	Soro de bovinos, camundongo, coelho e furão	Soro de **equino**, cobaio, suíno, coelho, furão e humano

Fonte: Cohen et al., (1963) com tradução de Filippsen, P. (2013).

Legenda: A1: H1N1; A2: H2N2; B: Influenza tipo B.

Embora os IIH de soros de equinos, suínos e coelhos tenham sido *à priori* agrupados com as mesmas características, a principal atividade IIH do soro de equinos e cobaios sobre os vírus influenza foi ligada à ação de uma α-2 macroglobulina (α-2M) termoestável que se liga à hemaglutinina viral através do

ácido 4-O-acetyil-N-acetilneuramínico (HANAOKA et al., 1989; PRITCHETT; PAULSON, 1989; RAYAN-POIRIER et al., 1991; BOLIAR et al., 2006).

As (α-2M) são um grupo de proteínas presentes no plasma de humanos e animais. Estão presentes nos fluidos corporais e circulam em monômeros, dímeros e tetrâmeros compostos por subunidades idênticas. Seu peso molecular é de aproximadamente 720kDa e contem cinco sítios reativos de ligação, com 180 kDa cada subunidade (BORTH, 1992).

2.4.2.3 Tratamentos para remoção de Inibidores Inespecíficos da Hemaglutinação

Em 1960, Ananthanarayan e colaboradores estudaram os efeitos dos diferentes métodos para remoção de IIH foram comparados em soros de cobaios, equinos, macacos, cães, bovinos, coelhos, ovinos e aves, como descrito na tabela 6.

Tabela 6 - Diferentes métodos para remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação

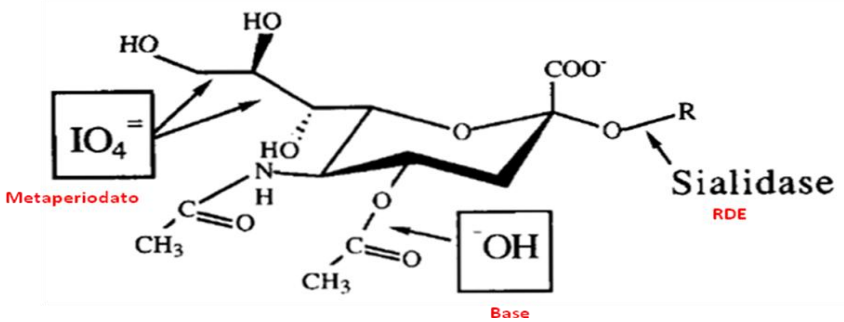
n	Tratamento para remoção/inativação de inibidores inespecíficos da hemaglutinação
1	Aquecimento a 56°C/30 min
2	RDE (*Vibrio cholerae receptor-destroying enzyme*) e 56°C/30min
3	Periodato de potássio e 56°C/30min
4	Tripsina, 56°C/30min e periodato de potássio (método Alabama)
5	Tripsina

Fonte: Ananthanarayan et al., (1960) com adaptação e tradução de Filippsen, P. (2013).

Nenhum tratamento sozinho foi eficaz na inativação concomitante de inibidores inespecíficos contra Influenza tipo A e tipo B.

Os pontos de ataque dos tratamentos com periodato, base (NaOH 0,1M) e RDE sobre o principal IIH do VIE, o 4-*O*-Ac-NeuAc presente na fração α-2 macroglobulina (PRITCHETT; PAULSON, 1989), encontram-se na figura 13.

Figura 13 - Pontos de ataque de tratamentos químicos e enzimáticos sobre a estrutura do ácido 4-O-acetil-N-acetil-neuramínico (4-O-Ac-NeuAc)



Fonte: Pritchett e Paulson (1989) com modificações de Filippsen, P. (2013).

A forma de ação do kaolin ($Al_2Si_2O_5(OH)_4$ - silicado de alumínio hidratado) sobre os IIH não é bem esclarecido, porém, sabe-se da sua ação adsorvente de toxinas (HODDER-WILLIAMS; RILEY, 1921), e de IIH contra diversos vírus hemaglutinantes (MANN et al., 1967).

A OIE (2012) dispõe em um manual de diagnóstico em que orienta a tratar o soro previamente ao HI. O aquecimento a 56°C por 30 minutos é sempre recomendado juntamente com um dos seguintes tratamentos adicionais: 1) Periodato de potássio; 2) RDE (*Vibrio cholerae receptor-destroying enzyme*); 3) kaolin e adsorção com hemácias. Os tratamentos com periodato de potássio ou com RDE devem ser priorizados.

O Manual de Diagnóstico e Vigilância de Influenza Animal (WHO, 2002, 2011) recomenda o tratamento para remoção de anticorpos contra o tipo de hemácia empregado juntamente com um dos seguintes tratamentos adicionais: 1) RDE (Neuraminidase de *Vibrio cholerae - Receptor-Destroying Enzyme*); 2) tripsina/56°C-30min/periodato de potássio.

Pode-se notar que há concordância na utilização do RDE, porém divergências entre os demais tratamentos recomendados pelas duas instituições (tabela 7).

Tabela 7 - Tratamentos recomendados para a remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação em soros prévios para o teste de HI contra o EIV

Instituição	RDE/AQ	T/AQ/MP	AQ/K/AD	MP/AQ
Manual de diagnóstico e vigilância de Influenza Animal (WHO, 2002; 2011)	X	X	-	-
Manual Terrestre de diagnóstico: Influenza equina 2012 (OIE, 2012)	X	-	X	X

Fonte: Filippsen, P. (2013).

Legenda: RDE: Neuraminidase de *Vibrio Cholerae* (*Receptor-Destroying Enzyme);* T: Tripsina; AQ: Aquecimento a 56°C/30 min; MP: Metaperiodato de Potássio; K: Kaolin.; AD: Adsorção de hemácias.

3 OBJETIVOS

Considerando que 1) não há trabalhos desenvolvidos que comparam ao mesmo tempo todos os tipos de tratamento para remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação recomendados pela OIE (2012) e WHO (2011); 2) há a escassez de trabalhos sobre o perfil sorológico de equinos, asininos e muares contra os vírus H3N8 e H7N7 equinos no Estado de São Paulo e no Brasil; o presente trabalho teve como objetivos os seguintes:

a) Avaliar os distintos tratamentos recomendados pela OIE e WHO, para remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação em soros de cavalos após vacinação com vacina comercial (H3N8 - A/Equi/Kentucky/1/1997).

b) Pesquisar a presença de anticorpos contra os subtipos H3N8 e H7N7 em 85 soros de equídeos não vacinados, provenientes do Estado de São Paulo.

c) Pesquisar a presença de anticorpos contra H3N8 equino em 231 equídeos do município de Mossoró - RN.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e metodologia empregados no presente estudo são descritos nos itens seguintes.

4.1 OBTENÇÃO DOS SUBTIPOS VIRAIS DE EIV

Para a realização do teste da inibição da hemaglutinação (HI) com os soros de equídeos do Estado de São Paulo, obtivemos os dois subtipos virais do EIV. Os subtipos virais H3N8 (A/Equi/SP/1/2012) e H7N7 (A/Equi/SP/1956), mantidos em ovos embrionados de galinha e em cultura de células MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*), respectivamente, foram cedidos pelo Laboratório de Raiva e Encefalites Virais do Instituto Biológico.

4.2 CULTIVO DOS VÍRUS H3N8 E H7N7

No Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS), os subtipos virais foram inoculados em cavidade alantóide de ovos embrionados SPF (*Specific Pathogen Free*) de galinha com 10 dias de embrião, doados ao projeto pelo Laboratório BIOVET®.

Os ovos foram mantidos em incubadora de ovos a 37°C e 60% de umidade até a utilização para inoculação dos subtipos virais.

Foi realizada a análise da viabilidade dos ovos por meio de ovoscopia, observando a integridade dos vasos sanguíneos e a presença de movimentação embrionária durante a ovoscopia.

A inoculação dos ovos embrionados foi realizada de acordo com protocolo estabelecido da WHO (2011), que segue:

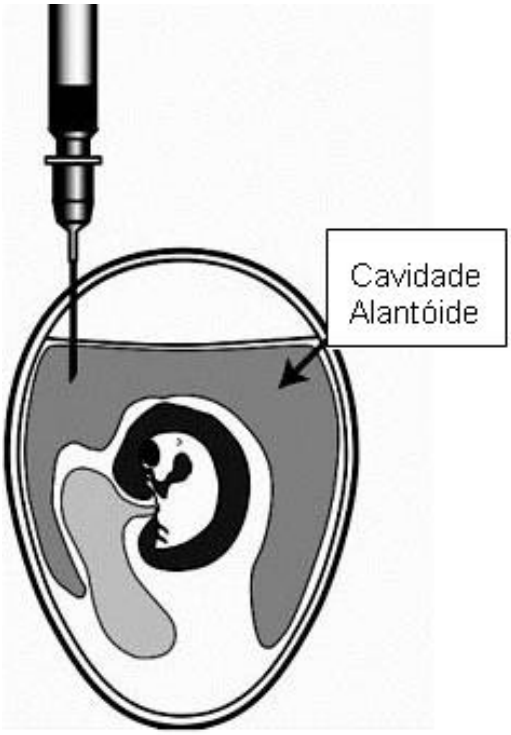
a) Marcação, na casca, do local da inoculação, em cavidade alantóide evitando grandes vasos.

b) Antisepsia da casca dos ovos com álcool 70%.

c) Em uma cabine de biossegurança,com auxílio de uma tesoura aguda estéril, realizou-se um pequeno orifício na casca em região do saco aéreo e um orifício no local demarcado em cavidade alantóide para a inoculação.

d) Com agulhas 0,45 X 13 mm e seringas de 1mL estéreis, inoculou-se 200µL do subtipo viral de forma asséptica em cavidade alantoide. Foram utilizados ovos em triplicata para cada subtipo viral (Figura 14).

Figura 14 - Esquema da via de inoculação do EIV em cavidade alantóide em ovos embrionados de galinha



Fonte: FAO (2013), com tradução de Filippsen, P. (2013).

f) Selou-se os dois orifícios da casca com cola branca.

g) Incubou-se os ovos inoculados a 36°C, com umidade (60%), por 48-72h.

Após o período de incubação, os ovos foram mantidos a 4°C por 12 horas para provocar a morte do embrião (WHO, 2011; OIE, 2012). Em seguida, em cabine de biossegurança, os ovos foram higienizados com álcool 70%, e uma abertura na

casca foi feita com auxílio de pinça cirúrgica na região do saco aéreo. O líquido alantóide foi coletado com seringas de 10 mL e agulhas 40 X 12 mm estéreis, colocado em tubos plásticos, e mantido a -80°C até sua utilização (WHO, 2011) (Figura 15).

Figura 15 - Procedimento de coleta de líquido alantóide de ovo embrionado de galinha inoculado com EIV

Fonte: Filippsen, P. (2013).

4.3 PESQUISA DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE NOS CULTIVOS VIRAIS

4.3.1 Obtenção de hemácias de galo

O sangue utilizado na reação de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (HI) foi obtido de um galo mantido no Biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) – FMVZ/ USP.

As coletas de sangue do galo se limitavam a 5% do peso corpóreo do animal com a frequência máxima de uma vez a cada 7 dias.

Após realizada a contenção mecânica do animal, foi feita a assepsia do local com álcool iodado seguido de punção na veia da asa (veia ulnar), com agulha 0,55 X 20 mm e seringa de 5 ml estéreis. O sangue coletado foi acondicionado em frasco contendo solução Alsever (ANEXO A) na proporção V/V e mantido sob refrigeração à 4 °C por 12 a 24 horas para estabilização das hemácias.

4.3.2 Lavagem das hemácias de galo

Para obter-se o concentrado de hemácias, foi realizada a lavagem da suspensão de sangue e Alsever (WHO, 2011), como segue:

a) Em tubo de ensaio, acrescentou-se 10 mL da suspensão de sangue e Alsever (ANEXO A).

b) Centrifugou-se por 10 minutos a 3.000 X g sob refrigeração a 10°C.

c) Descartou-se o sobrenadante por inversão e adicionou-se 7 mL de PBS 0,01M, pH 7,2 (ANEXO B). Homogeneizou-se levemente.

d) Repetiu-se 3 vezes os passos b e c.

.

4.3.3 Preparo da solução de hemácias 0,5%

Para se obter uma suspensão de hemácias a 0,5% foi utilizado o concentrado de hemácias pré-lavado (item 4.3.2).

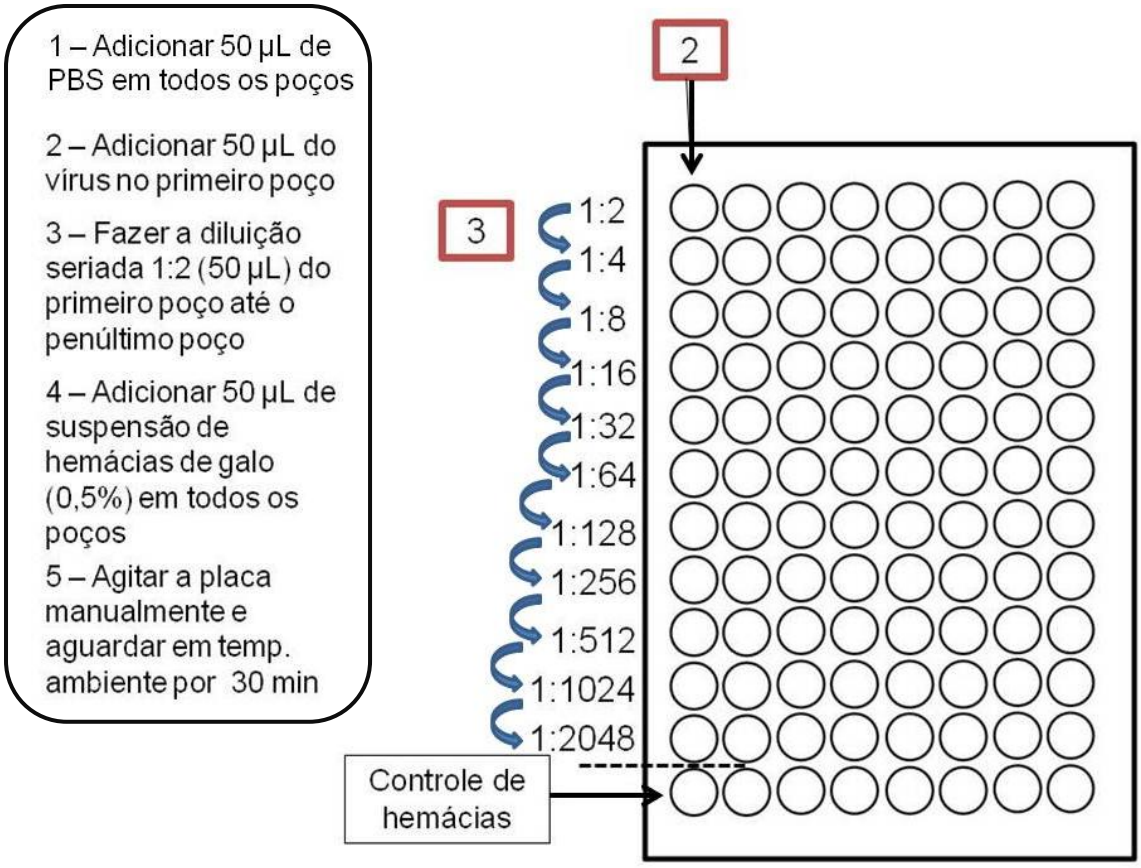
Para cada 19,9 mL de solução PBS 0,01M pH 7,2 (ANEXO B), foram adicionados 100 µL de concentrado de hemácias e acondicionado a 4°C até seu uso.

O período máximo de uso da suspensão de hemácias a 0,5% foi de 5 dias.

4.3.4 Teste da hemaglutinação

A confirmação da atividade hemaglutinante foi realizada de acordo com protocolo estabelecido pelo Manual de Diagnóstico de Influenza Animal da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011), em duplicata, em placas de fundo “v”, com 96 poços, estéreis e suspensão de hemácias de galo a 0,5% (Figuras 16 e 17).

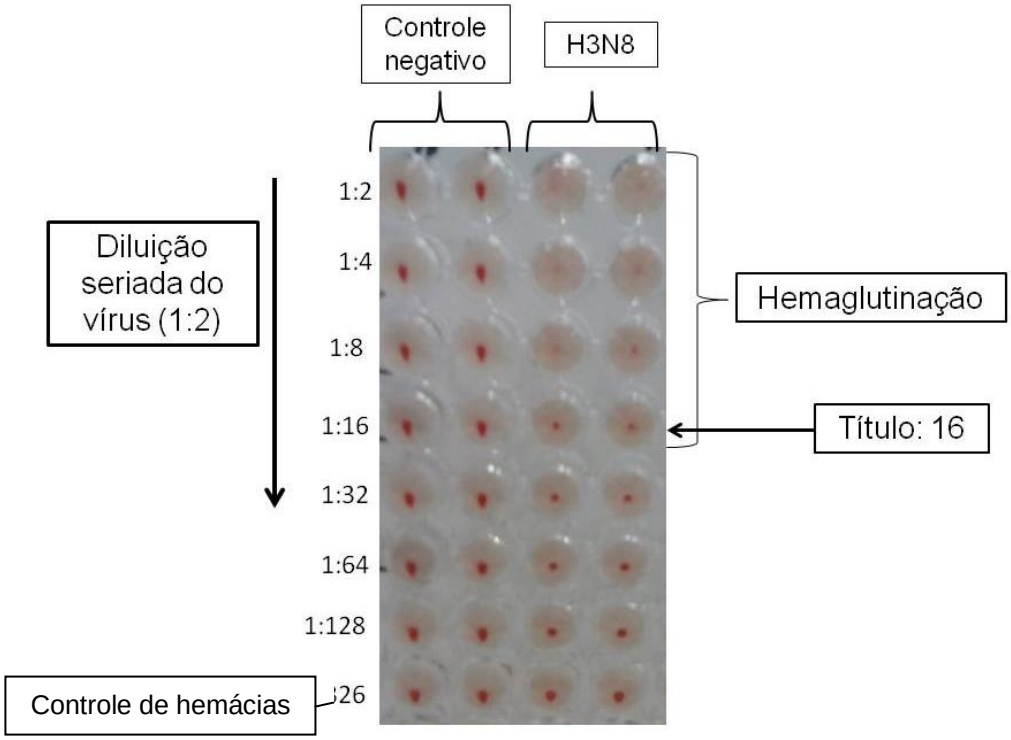
Figura 16 - Esquematização para a realização do teste da hemaglutinação para o vírus Influenza A



Fonte: WHO (2011) com modificações e tradução de.Filippsen, P. (2013).

O título foi considerado como a recíproca da maior diluição em que foi observado malha clara de hemaglutinação sem a sedimentação de hemácias (WHO, 2011).

Figura 17 - Esquematização para a realização do teste da hemaglutinação para o EIV H3N8



Fonte: Filippsen, P (2013).

4.4 PESQUISA DO GENE M POR RT-PCR

Para a confirmação de replicação viral do EIV H3N8 e H7N7, utilizou-se a técnica de RT-PCR dirigida para uma região do gene de matriz (M) conservada entre os subtipos de Influenza A.

4.4.1 Extração de RNA

O líquido alantóide coletado dos ovos inoculados foi utilizado para a extração de RNA total com o método do TRIZOL® (Invitrogen®) - Clorofórmio - Etanol - Propanol (Apêndice A).

4.4.2 Reação de Transcrição Reversa (RT)

A reação de Transcrição Reversa (RT) foi conduzida com os *primers* universais para os vírus Influenza A Uni12F e Uni12R (HOFFMAN et al., 2001), produzindo cDNA para serem empregados na reação de PCR para o gene de matriz.

Para a reação de RT, foram utilizados 1X *First Strand Buffer* (Invitrogen®), 10mM de DTT, 1mM de dNTP, 20 pmol de cada *primer*, 200U de MMLV *reverse transcriptase* (Invitrogen®), 7 µL do RNA extraído previamente desnaturado a 95°C por 5 minutos, e H_2O ultrapura livre de RNAse e DNAse q.s.p 20 µL, em termociclador com as seguintes condições: 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

4.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Visando detectar uma região conservada do gene de matriz, comum entre os vírus Influenza A, foram empregados na reação de PCR os *primers* M52C (5'-CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG-3') e M253R (5'-AGG GCA TTT TGG ACA AAG/T CGT CTA-3') (FOUCHIER et al., 2000).

Na reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados 1X PCR Buffer (Invitrogen®), 1,5mM de $MgCl_2$, 0,023mM de dNTP, 10pmol dos *primers* senso e anti-senso, 2U de *Platinum® Taq* DNA *Polymerase* (Invitrogen®), 2 µL de cDNA obtido na RT, e H_2O ultrapura livre de RNAse e DNAse q.s.p.50 µL, em termociclador com o ciclo: 95°C por 4 minutos, 40 vezes de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 3 minutos e como extensão final 72°C por 7minutos.

4.4.4 Visualização dos produtos da PCR mediante eletroforese

A presença dos produtos de PCR foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose a 1.5% em tampão TBE 0,5X (ANEXO C). Foram utilizados 5 µL de produto da PCR em cada poço do gel dissolvidos em 2 µL de tampão carreador

[glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0.25% (v/v), xileno cianol 0.25% (v/v)]. Como marcador de peso molecular foi utilizado 1kb *plus DNA ladder* (Invitrogen®), aplicando 0.1 ug no poço.

A eletroforese foi executada a 100 mVolts até a migração completa das bandas no gel. Para revelar a presença dos produtos desejados o gel foi corado por imersão numa solução de brometo de etídeo na concentração de 0.005% em H_2O (25 µL brometo de etídeo/ 500 mL H_2O) durante 20 minutos, protegendo da luz e a temperatura ambiente. Para a visualização foi usado um transiluminador com lâmpada U.V.

4.5 FORMAÇÃO DO BANCO DE SOROS DE EQUÍDEOS

4.5.1 Grupo de cavalos vacinados

Com o propósito de estimular a produção de anticorpos (Ac) contra o EIV (H3N8), um grupo experimental foi formado com 10 cavalos hígidos foi vacinado com a vacina FLUVAC Innovator® EWT (FortDodge®) que contém o subtipo H3N8 A/Equi/Kentucky/1/97 (dados do fabricante).

Os soros dos cavalos foram coletados 30 dias após a dose da vacina. Posteriormente, os soros destes animais, que não fizeram parte da análise do perfil sorológico de equídeos do Estado de São Paulo, foram utilizados para a análise dos tratamentos de remoção de IIH e o teste de HI com o vírus H3N8 (A/Equi/SP/1/2012).

4.5.2 Grupo de equídeos do Estado de São Paulo

A fim de verificar a circulação dos vírus H3N8 (A/equi/SP/1/2012) e H7N7 (A/equi/SP/1/1956) em 84 equídeos do Estado de São Paulo, foi estudada a

presença de Ac inibidores da hemaglutinação específicos contra estes vírus em animais não vacinados de diferentes municípios do Estado.

O grupo de equídeos sem sintomas respiratórios foi analisado utilizando uma amostragem de conveniência, composto de soros provenientes de um banco de soros do LABMAS e amostras coletadas durante o estudo.

O banco de soros compõe amostras coletadas de animais provenientes das cidades de Mairiporã - SP, Águas de Lindóia - SP, Pirassununga - SP e Bragança Paulista - SP (Tabela 8).

Tabela 8 - Banco de soros de equídeos utilizados para análise do perfil sorológico de Ac contra o vírus da influenza equina (subtipos H7N7 e H3N8)

Município	Equinos	Asininos	n
Bragança Paulista	12	0	12
Mairiporã	8	0	8
Águas de Lindóia	25	0	25
Pirassununga	35	4	39
Total	80	4	84

Fonte: Filippsen, P. (2013).

4.5.3 Grupo de equídeos do município de Mossoró - RN

A fim de verificar a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o vírus H3N8 (A/Equi/SP/1/2012) em equídeos do município de Mossoró - RN foram utilizados 231 soros de equídeos no teste de HI.

O painel de soros foi formado utilizando uma amostragem de conveniência, composto de soros de equinos e asininos resgatados de rodovias do município de Mossoró - RN pela Polícia Rodoviária Federal e com histórico de vacinação desconhecido.

Foram analisados 57 soros de equinos (57/231), 174 de asininos (174/231) (Tabela 9).

Tabela 9 - Soros de equídeos utilizados para análise da presença de Ac contra o vírus da influenza equina subtipo H3N8

Cidade	Equinos	Asininos	Total	Vacinação
Mossoró-RN	57	174	231	Sem dados disponíveis

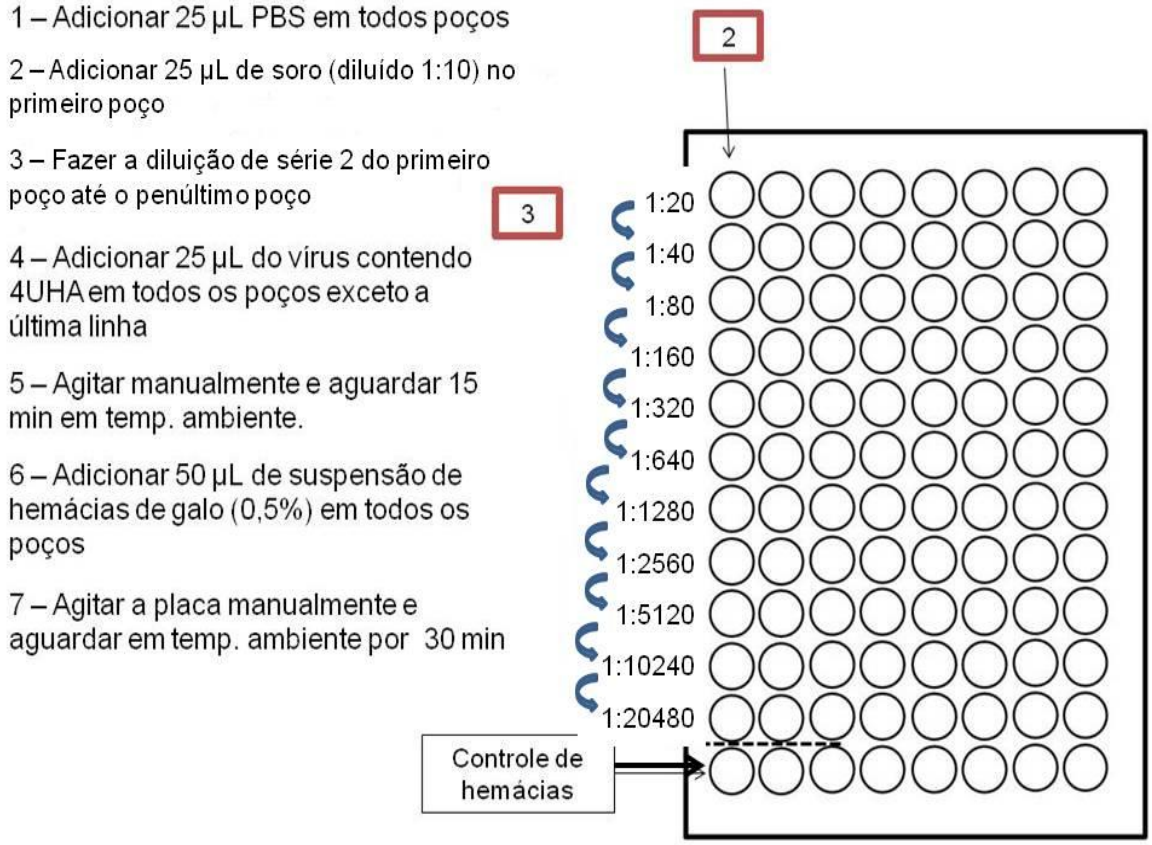
Fonte: Filippsen, P. (2013).

4.6 TESTE DA INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO

Para o teste de HI, realizado como descrito pela Organização Mundial da Saúde – WHO (*World Health Organization*) em 2002/2011, no Manual de Vigilância e Diagnóstico de Influenza Animal, foram utilizadas hemácias de galo a 0,5% e os subtipos do EIV contendo 4UHA (unidades hemaglutinantes)/25µL, em placas estéreis de 96 orifícios, em fundo em “V”.

Os soros após sofrerem o tratamento para a remoção de IIH, apresentaram a diluição final de 1:10. O soro na diluição 1:10 foi utilizado, em duplicata, para a reação de HI, começando a primeira diluição em 1:20, como é demonstrado na figura 18:

Figura 18 - Esquematização da placa para realizar o teste de HI



Fonte: WHO (2011) com modificações e tradução de Filippsen, P. (2013).

O animal foi considerado soro-reativo no teste de HI quando houve inibição da hemaglutinação clara, com a formação do sedimento de hemácias no fundo do poço a partir da primeira diluição (1:20) (HEINEMANN et al., 2008).

4.7 TRATAMENTOS DE SOROS PARA A REMOÇÃO DE INIBIDORES INESPECÍFICOS DA HEMAGLUTINAÇÃO

Os tratamentos de soros realizados foram: S: diluição do soro em PBS; H: adição de papa de hemácias; KH: aquecimento, kaolin e papa de hemácias; TPH: tripsina, aquecimento, metaperiodato de potássio e papa de hemácias; e RDEH: RDE e papa de hemácias.

Os tratamentos estão descritos a seguir:

a) Simples diluição do soro.

Em 20 µL de soro puro acrescentou-se 180 µL de PBS 0,01M pH 7,2 (Anexo B), obtendo-se volume final de 200 µL.

b) Tratamento de soro com hemácias de galo.

Em 20 µL de soro puro:

- Acrescentou-se 180 µL de PBS 0,01M pH 7,2 (Anexo B), obtendo-se volume final de 200 µL.
- Ao volume total de 200 µL acrescentou-se 10 µL de concentrado de hemácias de galo previamente lavadas.
- Incubou-se por 1 hora/4°C, homogeneizando a cada 20 minutos.
- Centrifugação (3000 x g/ 10 minutos)
- Recuperação do sobrenadante.

c) Tratamento de soro com kaolin e hemácias de galo

Utilizar 125 µL de soro puro:

- Aquecer 56°C por 30 minutos
- Adicionar 500 µL de PBS 0,01M pH 7,2 (Anexo B)
- Adicionar 625 µL de kaolin 20% (Anexo D)
- Incubar 20 minutos em geladeira homogeneizando a cada 10 minutos
- Centrifugar 3000 x g/10 minutos
- Recuperar sobrenadante
- Utilizar 200 µL do soro tratado com kaolin para o próximo passo:
- Adicionar 10 µL de papa de hemácias de galo previamente lavados
- Incubar por 1 hora/4°C homogeneizando a cada 20 minutos
- Centrifugar 3000 x g por 10 minutos
- Recuperar o sobrenadante

d) Tratamento de soro com tripsina, metaperiodato de potássio e hemácias de galo

Em 75 µL de soro puro procedeu-se os seguintes passos:

- Adição de 37,5 µL de solução de tripsina (Anexo E)
- Homogeneizar e imediatamente inativar a tripsina a 56°C por 30 minutos
- Esfriar até atingir a temperatura ambiente
- Adicionar 225uL de solução KIO_4 0.011 M (Anexo F)
- Homogeneizar e aguardar 15 minutos em temperatura ambiente
- Adicionar 225 uL de solução glicerol 1% em PBS (Anexo G)
- Homogenizar e aguardar 15 min em temperatura ambiente
- Adicionar 187,5 µL de solução salina 0,85%
- Utilizar 200 µL de soro previamente tratado com tripsina e periodato
- Adicionar 10 µL de papa de hemácias de galo previamente lavadas
- Incubar por 1 hora/4°C homogeneizando a cada 20 minutos
- Centrifugar 3000 x g/10 minutos
- Recuperar sobrenadante

e) Tratamento de soro com RDE e hemácias de galo

Utilizar 3 volumes de RDE (Anexo H) para 1 volume de soro puro.

- Incubar por 12 a 18 horas.
- Aquecer a 56°C por 30 minutos para inativar o RDE remanescente.
- Esfriar o tubo para temperatura ambiente.
- Adicionar 6 volumes de solução salina 0,85% (ANEXO I)
- Utilizar 200 µL do soro tratado com RDE:
- Adicionar 10 µL de papa de hemácias de galo previamente lavadas
- Incubar por 1 hora/4°C homogeneizando a cada 20 minutos
- Centrifugar 3000 x g/10 minutos
- Recuperar sobrenadante

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre os tratamentos de remoção de IIH nos soros de cavalos vacinados foi realizada utilizado o teste estatístico de Friedman com o *software* estatístico GraphPad InStat 3.

A comparação de títulos dos animais amostrados de SP para o vírus H3N8 e H7N7 foi realizada com o teste de Wilcoxon com o auxílio do *software* estatístico Minitab v.16.

O teste de Comparação entre Duas Proporções foi aplicado para analisar: 1) as frequências de animais soro-reativos no teste de HI para os subtipos virais H3N8 e H7N7 no Estado de São Paulo; 2) as frequências de animais de SP e RN soro-reativos para o subtipo H3N8; 3) as frequências de equinos e asininos do RN soro-reativos para o subtipo H3N8 (Minitab v.16).

A fim de comparar os títulos de Ac, contra o subtipo H3N8, dos equinos e asininos do RN, foi empregado o teste de Mann-Whitney (Minitab v.16).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

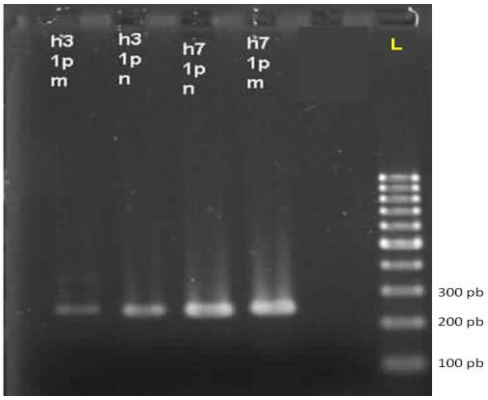
5.1 DETECÇÃO DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE NOS VÍRUS H3N8 E H7N7

Após a inoculação dos vírus H3N8 e H7N7 em ovos embrionados de galinha (item 4.2), o líquido alantóide recolhido foi testado para detectar atividade hemaglutinante com o teste da hemaglutinação (HA). Os títulos de HA obtidos para os vírus variaram entre 16 e 128 UHA/ 25 µL.

5.2 DETECÇÃO DO GENE DE MATRIZ DO EIV POR RT-PCR

Após a RT-PCR, na realização da eletroforese, foram visualizadas as bandas dos tamanhos correspondentes a 245 pb para o gene de matriz, confirmando que nossos padrões H3N8 e H7N7 são realmente influenza A (Figura 19).

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR para o gene de matriz dos vírus H3N8 e H7N7 (fragmento de aproximado de 245 pb)



Fonte: Filippsen, P. (2013).

Legenda: H3: H3N8; m: gene de matriz; L: marcador molecular de 100 pb.

Notas: n: fragmento do gene NP gerado pela reação de RT-PCR (Filippsen, 2013 - *non published*).

5.3 TRATAMENTOS DE SOROS PARA A REMOÇÃO DE INIBIDORES INESPECÍFICOS DA HEMAGLUTINAÇÃO (IIH)

A comparação dos diferentes tratamentos de soro para a retirada de inibidores inespecíficos da hemaglutinação foi realizada empregando animais previamente vacinados com vacina comercial contendo o subtipo H3N8 equino (A/Equi/Kentucky/1/97).

Os títulos obtidos no teste de HI referentes a cada tratamento estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Títulos de anticorpos gerados no teste de HI para o vírus da influenza equina, H3N8 (A/Equi/SP/1/2012), com 4UHA/25µL, em soros de cavalos previamente vacinados

Animal	TPH	KH	RDEH
1	0	0	40
2	0	20	40
3	0	40	80
4	0	80	80
5	80	40	80
6	160	80	80
7	160	160	80
8	160	160	160
9	160	160	160
10	160	320	640

Fonte: Filippsen, P. (2013).

Legenda: TPH: tripsina, aquecimento, periodato de potássio seguido de adsorção com hemácias de galo; KH: aquecimento, kaolin seguido de adsorção com hemácias de galo; RDEH: RDE seguido de adsorção com hemácias de galo.

Caso existam anticorpos (Ac) contra a hemácia do galo, o tratamento prévio de adsorção de hemácias irá removê-los. Não tratar os soros com hemácias leva à aglutinação das hemácias, o que mimetizaria a hemaglutinação viral, levando a crer que os Ac específicos contra o EIV eventualmente existentes não foram capazes de inibir a HA viral, ou seja, mesmo que o animal tenha Ac, não seria capaz de inibir a hemaglutinação.

Na análise estatística realizada com teste de Friedman, através do *software* GraphPad InStat 3, constatou-se que não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos (TPH, KH e RDEH) de remoção de IIH, com confiança de 95%.

Embora não havendo diferença estatística, o tratamento com TPH aparentemente removeu anticorpos dos soros dos equinos n°1, 2, 3 e 4, o que não ocorreu com o KH, que possivelmente removeu Ac somente do n°1. O tratamento com RDEH aparentemente não removeu Ac dos soros de todos os animais vacinados.

A ausência de Ac nos cavalos 1, 2, 3 e 4 pode ter sido motivada pela possível ação deteriorante do TPH e é reforçada pelo fato de que todos os cavalos eram hígidos e foram submetidos à vacinação prévia com o subtipo H3N8.

O tratamento RDEH apresentou resultados mais consistentes, corroborando a recomendação da OIE e da WHO de utilizar preferencialmente este tratamento.

Em estudos anteriores demonstrou-se que o RDE inativava apenas inibidores inespecíficos e que o kaolin associado ao tratamento com hemácias diminui a fração de gamaglobulinas presente no soro (TAURASO et al., 1971) o que corrobora os resultados obtidos no presente estudo.

Assim, considerando que: 1) aparentemente o RDEH teve o menor efeito deletério sobre o soro; 2) a OIE e WHO recomendam o uso do RDEH e 3) há maior facilidade de se tratar o soro e há a possibilidade de ocorrer menores erros durante o trabalho, visto que são menos etapas do processo de tratamento; optamos pelo RDEH para remover inibidores inespecíficos de soros da espécie equina.

5.4 PESQUISA DE ANTICORPOS INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO CONTRA OS VÍRUS H3N8 E H7N7 EM EQUÍDEOS DO ESTADO DE SÃO PAULO

Os títulos obtidos no teste de HI contra os vírus H3N8 A/Equi/SP/1/2012 e H7N7 A/Equi/SP/1/1956, com soros de equídeos do Estado de São Paulo se encontram na tabela 11.

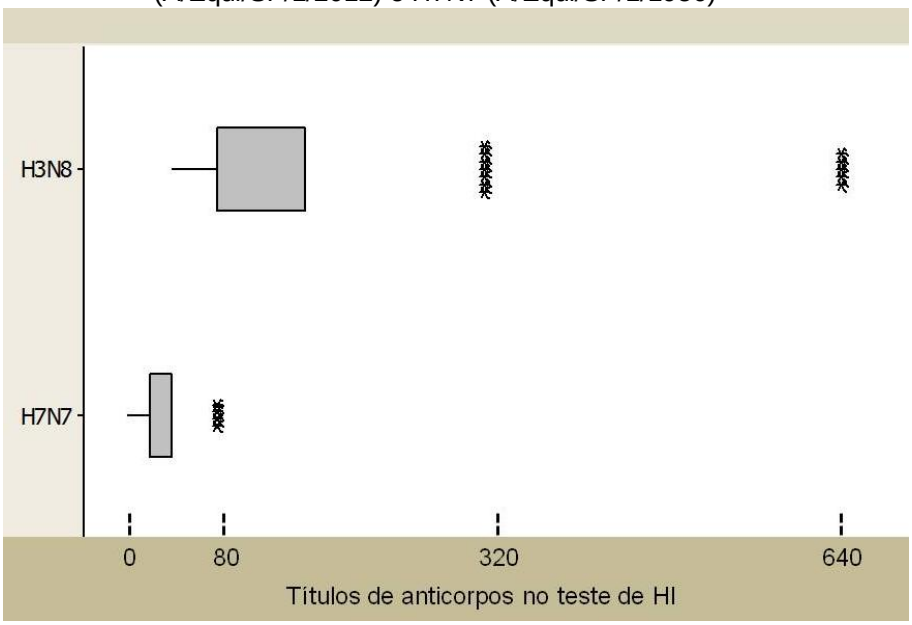
Tabela 11 - Títulos de anticorpos de soros de equídeos de Pirassununga (P), Mairiporã (M), Águas de Lindóia (AL) e Bragança Paulista (BP), do Estado de São Paulo, obtidos no teste de HI para o vírus da influenza equina, H3N8 A/Eq/SP/2012 e H7N7 A/Eq/SP/1956.

Amostra	Município	Espécie	H3N8	H7N7
1	P	Equino	160	40
2	P	Equino	80	40
3	P	Equino	160	20
4	P	Equino	160	40
5	P	Equino	80	40
6	P	**Asinino***	160	40
7	P	Equino	80	20
8	P	Equino	80	40
9	P	Equino	80	40
10	P	Equino	160	20
11	P	Equino	320	20
12	P	Equino	160	20
13	P	Equino	160	20
14	P	Equino	80	20
15	P	Equino	80	20
16	P	Equino	320	20
17	P	Equino	80	40
18	P	Equino	80	20
19	P	Equino	160	20
20	P	Equino	160	20
21	P	Equino	160	20
22	P	Equino	80	20
23	P	Equino	80	20
24	P	Equino	160	20
25	P	Equino	160	40
26	P	Equino	80	40
27	P	Equino	80	40
28	P	Equino	40	20
29	P	Equino	160	20
30	P	Equino	160	20
31	P	Equino	80	20
32	P	Equino	160	20
33	P	Equino	80	20
34	P	**Asinino***	80	80
35	P	**Asinino***	40	20
36	P	Equino	80	40
37	P	**Asinino***	160	40
38	P	Equino	80	40
39	P	Equino	80	40
40	M	Equino	80	20
41	M	Equino	160	20
42	M	Equino	160	20
43	M	Equino	320	40
44	M	Equino	640	20
45	M	Equino	160	40
46	M	Equino	160	20
47	M	Equino	320	40
48	AL	Equino	160	40
49	AL	Equino	80	20
50	AL	Equino	160	40
51	AL	Equino	80	20
52	AL	Equino	320	40
53	AL	Equino	320	80
54	AL	Equino	160	40
55	AL	Equino	160	20
56	AL	Equino	160	40
57	AL	Equino	160	20
58	AL	Equino	640	20
59	AL	Equino	80	0
60	AL	Equino	320	20
61	AL	Equino	80	0
62	AL	Equino	160	0
63	AL	Equino	160	0
64	AL	Equino	160	0
65	AL	Equino	160	0
66	AL	Equino	160	40
67	AL	Equino	80	20
68	AL	Equino	80	40
69	AL	Equino	40	0
70	AL	Equino	80	20
71	AL	Equino	40	20
72	AL	Equino	40	20
73	BP	Equino	640	20
74	BP	Equino	160	40
75	BP	Equino	640	40
76	BP	Equino	160	20
77	BP	Equino	640	40
78	BP	Equino	160	40
79	BP	Equino	80	20
80	BP	Equino	160	80
81	BP	Equino	80	40
82	BP	Equino	80	20
83	BP	Equino	160	80
84	BP	Equino	160	40

Fonte: Filippsen, P. (2013).

Os maiores títulos encontrados contra o subtipo H3N8 em cavalos e asininos foram 640 e 160 respectivamente, e contra o subtipo H7N7 foi de 80 para as duas espécies (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Boxplot para os títulos de anticorpos contra H3N8 e H7N7 de equídeos de Pirassununga (P), Mairiporã (M), Águas de Lindóia (AL) e Bragança Paulista (BP), do Estado de São Paulo, gerados no teste de HI para o vírus da influenza equina, H3N8 (A/Equi/SP/1/2012) e H7N7 (A/Equi/SP/1/1956)



Fonte: Filippsen, P. (2013).

Legenda: *: uma ocorrência de *outlier* para aquele conjunto amostral. Para o subtipo H3N8, 75% dos soros tiveram títulos de até 160; para o subtipo H7N7, 75% dos soros tiveram título de até 40. *Outliers*: H3N8 - cinco soros com título 640 e sete soros com título 320; H7N7 - quatro soros com título 80.

Os títulos de Ac dos equídeos para H3N8 mostraram ser sempre maiores ou iguais aos títulos contra o subtipo H7N7. A verificação da significância estatística desta superioridade de títulos foi realizada por meio do teste de Wilcoxon (Minitab v. 16), confirmando o observado ($p<0,05$), com confiança de 95%.

As frequências de equídeos soro-reagentes (título ≥ 20) amostrados no Estado de São Paulo para o subtipo H3N8 e H7N7 foram de 100% (84/84) e 91,66% (77/84) respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequências de equídeos do estado de São Paulo soro-reagentes (título ≥ 20) no teste de HI para os subtipos virais H3N8 e H7N7

Estirpe viral	n° positivos (%)	n° negativos (%)	n
H3N8	84 (100%)	0 (0%)	84
H7N7	77 (91,66%)	7 (8,33%)	

Fonte: Filippsen, P. (2013).

A fim de comparar as frequências de equídeos soros-reagentes para os subtipos H3N8 e H7N7, foi aplicado o teste de comparação de duas proporções (Minitab v. 16), sendo possível confirmar que a frequência para H3N8 é maior do que para H7N7 ($p<0,05$; confiança de 95%).

O fato de terem sido obtidos maiores títulos de anticorpos e observada a maior frequência de soro-reagentes para o subtipo H3N8 poderia ser explicado devido o vírus ser endêmico em várias regiões brasileiras (PAGANO et al., 1985; LOUREIRO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2005; DIEL et al., 2006; PENA et al., 2006; AGUIAR et al., 2008; HEINEMANN et al., 2009; CUNHA et al., 2009) e ter sido isolado dos surtos notificados do Brasil em 2008 e 2010 pela OIE (OIE, 2009; OIE, 2011). Estes dados sugerem a circulação do vírus H3N8 nos animais amostrados do Estado de São Paulo.

A possibilidade de os títulos contra o subtipo H3N8 equino serem devido à possível reação cruzada com o H7N7 equino é descartada pelos trabalhos realizados por Tumová e Pereira (1968), Cunha et al. (1986) e por Lee, Senne e Suarez (2006), que evidenciaram a ausência da reatividade cruzada entre os dois subtipos no teste de HI.

No Brasil, a detecção simultânea de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra os subtipos H3N8 e H7N7 do EIV também foi descrita por outros autores (PAGANO et al., 1985; MANCINI et al., 2004; AGUIAR et al., 2008; HEINEMANN et al., 2009 e CUNHA et al., 2009) (Tabela 4). Destes trabalhos, somente os de Rondônia (AGUIAR et al., 2008), Pará (HEINEMANN et al., 2009) e São Paulo (CUNHA et al., 2009) adotaram amostragem programada para inferir sobre soroprevalência, revelando diferentes resultados.

Na literatura compulsada, os dois únicos trabalhos de pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra os subtipos H3N8 e H7N7 do EIV realizados no Estado de São Paulo, revelam frequências de soro-reatividade de 11,0% para H3N8 e 2,7% para H7N7 (CUNHA et al., 2009) e de 33,33% para H3N8 e 55,55% para

H7N7 (MANCINI et al., 2004). A discrepância destas frequências com aquelas obtidas no presente estudo podem ser explicadas pelo tipo de amostragem utilizados, que foram do tipo programada para estimativa de prevalência no trabalho de (CUNHA et al., 2009) ou do tipo de conveniência como a deste estudo e o de (MANCINI et al., 2004).

Em relação ao subtipo H7N7, menos patogênico que o H3N8, cabe ressaltar que não tem sido mais isolado no mundo desde 1980 na Iugoslávia (WEBSTER, 1993). Entretanto, apesar da não identificação direta do subtipo H7N7 equino em amostras de animais com doença respiratórias, anticorpos contra H7 são detectados em animais sem vacinação em outros países do mundo (WEBSTER, 1993; MADIC, 1996; OLUSA et al., 2010; DIAZ-MENDEZ et al., 2010).

No Brasil, anticorpos contra H7 também têm sido reportados por diferentes autores (PAGANO et al., 1985; MANCINI et al., 2004; AGUIAR et al., 2008; HEINEMANN et al., 2009; CUNHA et al., 2009), com frequências de positivos entre 2,7% a 77,75% (Tabela 4).

Apesar de não existir reação cruzada entre os subtipos virais H3 e H7, ocorrem reações cruzadas de ambos os subtipos com outros subtipos de influenza A (TUMOVA; PEREIRA, 1968; LEE; SENNE; SOARES, 2006) (Quadro 1). Assim, considerando que os vírus da influenza aviária são capazes de cruzar barreiras entre espécies para infectar novos hospedeiros (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001), inclusive o equino (GUO et al., 1992), permite especular que eventualmente os títulos de Ac obtidos contra o subtipo H7 sejam oriundos da infecção dos cavalos com outros subtipos virais que não o H7N7 equino (OLUSA et al., 2010).

Em 2004, em trabalho descrito por Mancini e colaboradores, 13 cavalos vacinados contra H7N7 e H3N8 e 9 cavalos não vacinados, tiveram títulos de anticorpos (HI) para os vírus humanos H1N1 (A/SP/1/91), H3N2 (A/SP/2/95) e Influenza B, vírus restrito aos humanos, sugerindo a possibilidade de infecção dos cavalos pelos vírus Influenza A e B humanos (MANCINI et al., 2004).

No presente estudo, a análise dos títulos obtidos para cada subtipo viral em um mesmo animal revelou 20,23% (17/ 84) dos animais com títulos 160 para H3 e 20 para H7; 17,85% (15/ 84) com títulos 80 para H3 e 20 para H7; 16,66% (14/ 84) com títulos 160 (H3)/ 40 (H7) e 14,28% com títulos 80 (H3)/ 40 (H7) (Tabela 13).

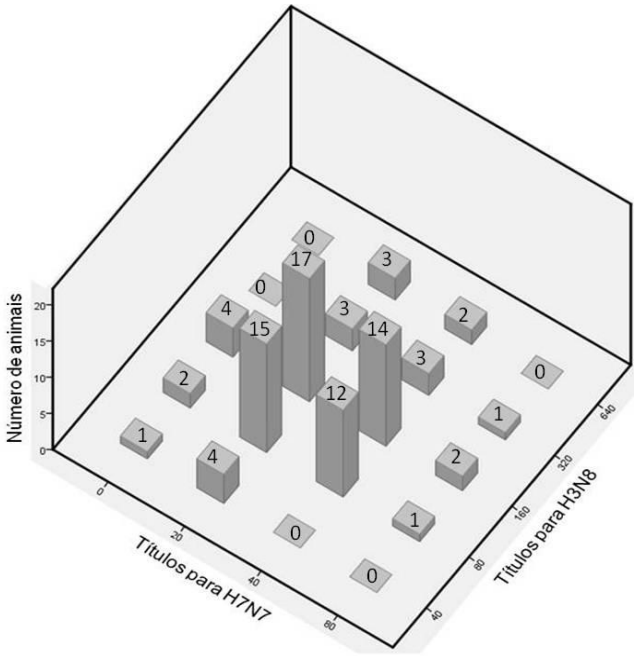
Tabela 13 - Títulos obtidos no teste de HI para os subtipos H3N8 e H7N7 em um mesmo animal, nos equídeos amostrados no Estado de São Paulo

n	%	H3N8	H7N7
1	1,19	40	0
4	4,76	40	40
2	2,38	80	0
1	1,19	80	0
15	17,85	80	20
12	14,28	80	40
4	4,76	160	0
17	20,23	160	20
14	16,66	160	40
2	2,38	160	80
3	3,57	320	20
3	3,57	320	40
3	3,57	640	20
2	2,38	640	40
1	1,19	320	80

Fonte: Filippsen, P. (2013).

Os dados gerados na tabela 14 foram utilizados para a formação de uma matriz e um gráfico 3D correspondente, demonstrado na figura 20.

Figura 20 - Distribuição dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra os vírus H3N8 e H7N7 gerados de soros de equídeos amostrados no Estado de São Paulo



Fonte: Filippsen, P. (2013).

Considerando a inexistência de reatividade cruzada entre os subtipos H3N8 e H7N7 do EIV e descartada a infecção dos animais com um sorotipo de origem aviária, o fato de animais não vacinados do Estado de São Paulo apresentarem títulos para ambos sorotipos sugere a circulação dos dois sorotipos na região.

2.3 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-H3N8 EM EQUÍDEOS NO MUNICÍPIO DE MOSSORÓ - RN

Os títulos obtidos no teste de HI contra o vírus H3N8 (4UHA/25µL), com soros de equídeos da cidade de Mossoró se encontram na tabela 14.

Tabela 14 - Títulos de anticorpos de soros de equinos e asininos de Mossoró-RN gerados no teste de HI para o vírus da influenza equina H3N8 A/Eq/SP/2012, com 4UHA/25µL

Espécie	Títulos de anticorpos no teste de HI							Total
	Zero	20	40	80	160	320	640	
Equino	3	22	18	8	4	1	1	57
Asinino	20	63	61	23	6	1	-	174
Total	23	85	79	31	10	2	1	231

Fonte: Filippsen, P. (2013).

Foram observados 54 (94,74%) equinos soro-reagentes e 154 (88,51%) asininos positivos para o H3N8 (Tabela 15).

Tabela 15 - Frequências de equídeos do município de Mossoró - RN soro-reagentes no teste de HI para o subtipo viral H3N8

Espécie	n positivos (%)	n negativos (%)	Total
Equinos	54 (94,74%)	3 (5,26%)	57
Asininos	154 (88,51%)	20 (11,49%)	174

Fonte: Filippsen, P. (2013).

A frequência de animais soros-reativos não foi estatisticamente diferente entre equinos e asininos pelo teste de comparação entre duas proporções ($p>0,05$) (Minitab v. 16), sugerindo a circulação do vírus nas duas espécies de animais.

Não houve diferença estatística, pelo teste de Mann-Whitney (Minitab v. 16), entre os títulos de Ac no teste de HI para o vírus H3N8 entre equinos e asininos do RN ($p>0,05$; confiança de 95%).

O Estado do Rio Grande do Norte tem o efetivo de mais de 53.500 cabeças de asininos, representando 5,4% da população de asininos do país (IBGE, 2010b).

Este é o primeiro trabalho que descreve a ocorrência de anticorpos contra o H3N8 em equinos e asininos no município de Mossoró - RN. Estudos anteriores na região Nordeste foram desenvolvidos com soros de 92 muares e 262 asininos não vacinados, dos Estados do Pará e Ceará, frente ao teste de HI com os vírus H3N8 (A/Equi2/GB/69) e H7N7 (A/Equi1/RJ/1976) (PAGANO et al., 1985). Pagano et al. (1985) observaram a positividade no teste em 57,60% (H3N8) e 72,82% (H7N7) dos muares e em 17,17% (H3N8) e 19,08% (H7N7) dos asininos analisados, sugerindo a infecção pelos subtipos virais nesses animais.

No contexto da Região Nordeste, a frequencia de equideos soro-reagentes para o subtipo H3N8 no RN encontrada neste estudo (90,04%) foi maior que a frequencia encontrada por Pagano et al. (1985) nos Estados de PE, CE e PB (24,79%). Todavia, inferências sobre a soroprevalência ficam impossibilitadas uma vez que ambos os estudos basearam-se em amostragem de conveniência.

A comparação entre a frequência de equídeos positivos de SP (100%) e de RN (90,04%) para o subtipo H3N8 foi realizada com o teste de comparação entre duas proporções (Minitab v. 16), sendo possível verificar que houve maior frequência de equídeos positivos no grupo de SP do que do RN, ($p<0,05$), com 95% de confiança. Todavia, os presentes resultados devem ser interpretados com o devido cuidado, uma vez que os painéis de soros (SP e RN) utilizados no presente estudo não foram formulados com métodos de amostragem para inferir sobre a prevalência de anticorpos contra o EIV. Adicionalmente, embora pouco provável, não se pode descartar a possibilidade de eventual vacinação dos animais do RN uma vez que eram animais recolhidos de vias públicas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos pelo presente estudo permitem concluir que:

a) Os tratamentos de soro para a remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação (IIH) nos soros dos equinos vacinados experimentalmente não diferiram estatisticamente. A maior simplicidade de execução e o aparente menor efeito deletério do RDEH são fatores que recomendam o uso deste método.

b) Embora o subtipo H7N7 não tenha sido isolado em São Paulo desde 1976, foram detectados anticorpos para H7N7 e H3N8 em equinos não vacinados do Estado de São Paulo.

c) Em que pese o fato de terem sido utilizados painéis de soros de conveniência, observa-se maior frequência de animais soro-reagentes contra o subtipo H3N8 no Estado de São Paulo em relação ao Estado do Rio Grande do Norte.

d) Embora não se tenha os dados do histórico vacinal dos animais do painel de soros do RN, foi possível observar não existir diferença de frequência de soro-reatividade para o subtipo H3N8 entre as espécies equina e asinina.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; LARA, M. C. C. S. H.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; OKUDA, L. H.; STÉFANO, E.; NASSAR, A. F. C.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em eqüídeos do Município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 269-276, 2008.

AL-KHALIFA, M. S.; DIAB, F. M.; KHALIL, G. M. Man-threatening viruses isolated from ticks in Saudi Arabia. **Saudi Medical Journal,** v. 28, n. 12, p.1864-1867, 2007.

ANANTHANARAYAN, R. B. A.; JAYARAM PANIKER, C. K. Non-specific inhibitors of influenza viruses in normal sera. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 22, n. 3-4, p. 409-419, 1960.

ANDREWS, C.; PEREIRA, H. G.; WILDY, P. **Viruses of vertebrates.** 4th ed. London: Balliére Tindall, 1978. 42 p.

BELSER, J. A.; WADFORD, D. A.; PAPPAS, C.; GUTIN, K. M.; MAINES, T. R.; PEARCE, M. B.; ZENG, H.; SWAYNE, D. E.; PANTIN-JACKWOOD, M.; KATZ, J. M.; TUMPEY, T. M. Pathogenesis of pandemic influenza A (H1N1) and triple-reassortant swine Influenza A (H1) viruses in mice. **Journal of Virology**, v. 84, n. 9, p. 4194-4203, 2010.

BERGMANN, M.; GARCIA-SASTRE, A.; CARNERO, E.; PEHAMBERGER, H.; WOLFF, K.; PALESE, P.; MUSTER, T. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. **Journal of Virology**, v. 74, n. 13, p. 6203-6206, 2000.

BERRÍOS, E. P. Influenza equina en Chile (1963-1992). Un posible caso en un ser humano. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 22, n. 1, p. 47-50, 2005.

BEVERIDGE, W. I. Some topical comments on influenza in horses. **Veterinary Research**, v. 77, p. 42, 1965.

BOLIAR, S.; STANISLAWEK, W.; CHAMBERS, T. M. Inability of kaolin treatment to remove nonspecific inhibitors from equine serum for the hemagglutination inhibition test against equine H7N7 influenza virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 3, p. 264-267, 2006.

BORTH, W. Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. **The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, n. 15, p. 3345–3353, 1992.

BOUVIER, N. M.; PALESE, P. The biology of influenza viruses. **Vaccine**, v. 12, n. 26, p.1 - 10, 2008. Suplemento 4, D49–D53.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Equídeos**. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>. Acesso em: 02 nov. 2013.

BYRNE, B.; DONOHOE, G. G.; O'KENNEDY, R. Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 7-8, p. 319-326, 2007.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **How the flu virus can change:** "Drift" and "Shift". Atlanta, GA: CDC, 2011. Disponível em <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>. Acesso em: 01 nov. 2013.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Epidemic Disease. Occurrence. In: _____. **Principles of epidemiology in public health practice.** 3rd ed. Atlanta, GA: CDC, 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/osels/scientific_edu/ss1978/lesson1/section11.html>. Acesso em: 06 nov. 2013.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Influenza type A viruses and subtypes.** Atlanta, GA: CDC, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm>. Acesso em: 23 out. 2013.

CLEMOW, F. Epidemic Influenza. Proceedings of the Society of Medical Officers of Public Health. **Public Health**, v. 2, p. 358-367, 1889.

CLIFFORD, C. M.; THOMAS, L. A.; HUGHES, L. E.; KOHLS, G. M.; PHILIP, C. B. Identification and comparison of two viruses isolated from ticks of the genus Ornithodoros. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 17, n. 6, p. 881-885, 1968.

COHEN, A.; NEWLAND, S. E.; BIDDLE, F. Inhibition of influenza virus haemagglutination: A difference of behavior in sera from a single species. **Virology**, v. 20, n. 3, p. 518-529, 1963.

CONVERSE, J. D.; MOUSSA, M. I. Quaranfil virus from Hyalomma dromedarii (Acari: Ixodoidea) collected in Kuwait, Iraq and Yemen. **Journal of Medical Entomology**, v. 19, n. 2, p. 209-210, 1982.

COLMAN, P. M. New antivirals and drug resistance. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 78, p. 95-118, 2009.

CRAWFORD, P. C.; DUBOVI, E. J.; CASTLEMAN, W. L.; STEPHENSON, I.; GIBBS, E.P.; CHEN, L.; SMITH, C.; HILL, R. C.; FERRO, P.; POMPEY, J.; BRIGHT, R. A.; MEDINA, M. J.; JOHNSON, C. M.; OLSEN, C. W.; COX, N. J.; KLIMOV, A. I.; KATZ, J. M.; DONIS, R. O. Transmission of equine influenza virus to dogs. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 482-485, 2005.

CUNHA, R. G. Isolamento do vírus de influenza A/equi 2 no Estado da Guanabara. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 4, p. 491-498, 1970.

CUNHA, R. G.; PASSOS, W. S.; VALLE, M. C. C. Surto de gripe eqüina produzido por vírus influenza A/Eq1 no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 549-554, 1978.

CUNHA, R. G.; PASSOS, W. S.; PAGANO, M. C. C.; SOUZA, D. M. Surto de gripe eqüina produzido por vírus de influenza A/Equi 2, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária,** v. 8, n. 3, p. 88-91, 1986.

CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; NASSAR, A. F. C.; LARA, M. C. C. S. H.; PERES, N. F.; PALAZZO, J. P. C.; SILVA, A.; STEFANO, E.; PINTO, F. A. Prevalência de anticorpos contra agentes virais em equídeos no sul do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 165-171, 2009.

DIAZ-MENDEZ, A.; VIEL, L.; HEWSON, J.; DOIG, P.; CARMAN, S.; CHAMBERS, T.; TIWARI, A.; DEWEY. Surveillance of equine respiratory viruses in Ontario. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 4, p. 271–278, 2010.

DIEL, D. G.; ALMEIDA, S. R.; WEIBLEN, R.; FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D.; KREUTZ, L. C.; GROFF, H. S.; FLORES, E. F. Prevalência de anticorpos contra os vírus da influenza, da arterite viral e herpesvírus em eqüinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1467-1673, 2006.

ELTON, D; DIGARD, P.; TILEY, L.; ORTÍN, J. Stucture and function of the influenza virus RNP. In: KAWAOKA, Y. (Ed.). **Current topics in influenza virology**. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2005. p. 1- 36.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Inoculation of embryonated eggs by the allantoic cavity rout**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/ac802e/ac802e08.jpg>. Acesso em 25 out. 2013.

FALCON, A. M.; MARION, R. M.; ZURCHER, T.; GOMEZ, P.; PORTELA, A.; NIETO, A.; ORTIN, J. Defective RNA replication and late gene expression in temperature sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. **Journal of Virology**, v. 78, n. 8, p. 3880-3888, 2004.

FILIPPSEN, P.; MORI, E.; MORAES, C. C. G.; SAKAMOTO, S. M.; VILLALOBOS, E. M. C.; LARA, M. C. C. S. H.; CUNHA, E. M. S.; GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E.; KURODA, R. B. S.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparison between two methods to remove serum nonspecific inhibitors of hemagglutination against H3N8. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA, 23; ENCONTRO DE VIROLOGIA DO MERCOSUL,7., 2012, Foz do Iguaçu.

FLEMING, G. **Animal Plagues:** Their history, nature and prevention. Londres: Chapman e Hall, 1871. 548 p.

FLORES, E. F.; LOVATO, L. T.; SILVA, M. S.; DEZENGRINI, R.; DIEL, D. G. Orthomyxoviridae, In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia veterinaria**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. p. 723-754.

FOUCHIER, R. A. M.; BESTEBROER, T. M.; HERFST, S.; KEMP, L. V. D.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4096 - 4101, 2000.

FRANCIS, T. Dissociation of hemagglutination and antibody-measuring capacities of influenza virus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 85, n. 1, p. 1–7, 1947.

FRESE, M.; KOCHS, G.; MEIER-DIETER, U.; SIEBLER, J.; HALLER, O. Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus. **Journal of Virology**, v. 69, n. 6, p. 3904-3909, 1995.

GAMBLIN, S. J.; SKEHEL, J. J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28403–28409, 2010.

GERBER, H. Clinical features, sequelae and epidemiology of equine influenza. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EQUINE INFECTIOUS DISEASES, 2., 1969, Paris. **Proceedings…** 1969. p. 63-80.

GIBBS, E. P. J.; ANDERSON, T. C. Equine and canine influenza: a review of current events. **Animal Health Research Reviews**, v. 11, n. 1, p. 43-51, 2010.

GUO, Y.; WANG, M.; KAWAOKA. Y.; GORMAN, O.; ITO, T.; SAITO, T.; WEBSTER, R. G. Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. **Virology**, v. 188, v. 1, p. 245–255, 1992.

GUO, Z.; CHEN, L. M.; ZENG, H.; GOMEZ, J. A.; PLOWDEN, J.; FUJITA, T.; KATZ, J. M.; DONIS, R. O.; SAMBHARA, S. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. **American Journal Respir Cell Mol Biology**, v. 36, n. 3, p. 263-269, 2007.

HANAOKA, K.; PRITCHETT, T. J.; TAKASAKI, S.; KOCHIBE, N.; SABESAN, S.; PAULSON, J. C.; KOBATA, A. 4-O-acetyl-N-acetylneuraminic Acid in the N-linked carbohydrate structures of equine and guinea pig α2-macroglobulins, potent inhibitors of Influenza virus infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 17, p. 9842-9849, 1989.

HIRST, G. K. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. **Science,** v. 94, n. 2427, p. 22-23, 1941.

HIRST, G. K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. **Journal of Experimental Medicine**, v. 75, n. 1, p. 49-64, 1942.

HEINEMANN, M. C.; CORTEZ, A.; LARA, M. C. C. S. H.; CUNHA, E. M. S.; NASSAR, A. F. C.; VILLALOBOS, E. M. C.; NETO, J. S. F.; FERREIRA, F. Soroprevalência do vírus da influenza equina no Município de Uruará, PA, Brasil, Amazônia oriental. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 697-699, 2009.

HODDER-WILLIAMS, E.; RILEY, J. W. The mode of action of Kaolin, **The Lancet**, v. 198, n. 5110, p. 300, 1921.

HOFFMANN, E.; STECH, J.; GUAN, Y.; WEBSTER, R. G.; PEREZ, D. R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Achives of Virology**, v. 146, n. 12, p. 2275-2289, 2001.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA. Y. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 1, p. 129-149, 2001.

IBGE[a]. FUNDAÇÃO DO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal**. Produção da Pecuária Municipal**, v. 40, 2012. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/tabelas_pdf/tab12.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2013.

IBGE[b]. FUNDAÇÃO DO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal**. 2012. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/tabelas_pdf/tab13.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2013.

ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus taxonomy.** 2012. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 04 nov. 2013.

KASEL, J. A.; COUCH, R. B. Experimental Infection in Man and Horses with Influenza A Viruses. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 41, n. 3, p. 447-452, 1969.

KEMP, G. E.; LEE, V. H.; MOORE, D. L. Isolation of Nyamanini and Quaranfil viruses from Argas (Persicargas) arboreus ticks in Nigeria. **Journal of Medical Entomology**, v. 12, n. 5, p. 535-537, 1975.

LOUREIRO, B.O.; JR, J. G. OLIVEIRA.; SCHIVAGO, P. A.; de OLIVEIRA, G. S.; PORTZ, C.; BRITO, S. N.; BITTERCOURT, A. J.; ANDRADE, C. M. Soroepidemiologia da Influenza eqüina, subtipo A/Eqüino-2 (H3N8) no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 11-13, 2002.

LEE, C. W.; SENNE, D. A.; SUAREZ, D. L. Development and Application of Reference Antisera against 15 Hemagglutinin Subtypes of Influenza Virus by DNA Vaccination of Chickens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 3, p. 395-402, 2006.

LU, Z.; CHAMBERS, T. M.; BOLIAR, S.; BRANSCUM, A. J.; STURGILL, T. L.; TIMONEY, P. J.; REEDY, S. E.; TUDOR, L. R.; DUBOVI, E. J.; VICKERS, M. L.; SELLS, S.; BALASURIYA, U. B. Development and evaluation of one-step TaqMan real-time reverse transcription-PCR assays targeting nucleoprotein, matrix, and hemagglutinin genes of equine influenza virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 3907-3913, 2009.

LOUREIRO, B. O. **Estudo de um surto de influenza eqüina ocorrido em 2001 no Estado do Rio de Janeiro mediante a caracterização do vírus e avaliação do esquema vacinal.** 2004. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Virologia) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

MADIC, J.; MARTINOVIC, S.; NAGLIC, T.; HAJSIG, D.; CVETNIC, S. Serological evidence for the presence of A/equine-1 influenza virus in unvaccinated horses in Croatia. **Veterinary Record,** v. 138, n. 3, p. 68, 1996.

MANN, J. J.; ROSSEN, R. D.; LEHRICH, J. R.; KASEL, J. A. The effect of kaolin on immunoglobulins: an improved technique to remove the nonspecific serum inhibidor of reovirus hemagglutination. **The Journal of Immunology**, v. 98, n. 6, p. 1136-1142, 1967.

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. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 93-100, 1988.

MANCINI, D. A. P.; GERALDES, E. A.; PINTO, J. R. Titulo de anticorpos em cavalos imunizados com vacina contra influenza equina. **Brazilian Journal of Veterinary Research on Animal Science**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 171-177, 1991.

MANCINI, D. A. P.; MENDONÇA, R. M. Z.; PINTO, J. R.; MORI, E.; FERNANDES, W. R. Anti-human protector antibody detected in horses as a zoonotic viruses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 6, p. 379-383, 2004.

MARGINE, I.; KRAMMER, F.; HAI. R.; HEATON, N. S.; TAN, G. S.; ANDREWS, S. A.; RUNSTADLER, A.; WILSON, P. C.; ALBRECHT, R. A.; GARCÍA-SASTRE, A.; PALESE, P. Hemagglutinin stalk-based universal vaccine constructs protect against group 2 Influenza A viruses. **Journal of Virology**, v. 87, n. 19, p. 10435-10446, 2013.

MARTINS, N. R. S. Influenza Aviária: Uma Revisão dos Últimos Dez Anos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 2, p. 97-140, 2001.

MEDINA, R.; GARCÍA-SASTRE, A. Influenza A viruses: new research developments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 590-603, 2011.

MIBAYASHI, M.; MARTINEZ-SOBRIDO, L.; LOO, Y. M.; CARDENAS, W. B.; GALE, M.; GARCIA-SASTRE, A. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated

induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. **Journal of Virology**, v. 81, n. 2, p. 514-524, 2007.

MILLER, W. C. Equine influenza. Further observations on the "coughing" outbreak, 1965. **Veterinary Record**, v. 77, p. 455-456, 1965.

MIN, J. Y.; KRUG, R. M. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway**. Proceeding of the National Academy of Science**, v. 103, n. 18, p. 7100-7105, 2006.

MONTO, A. S.; KENDAL, A. P. Effect of neuraminidase antibody on hong kong influenza. **The Lancet**, v. 301, n. 7804, p. 623-625, 1973.

MORENS, D. M.; TAUBENBERGER, J. K.; FAUCI, A. S. The persistent legacy of the 1918 Influenza virus. **The new England Journal of Medicine**, v. 16, n. 3, p. 225-229, 2009.

MORI, E.; FERREIRA, H. L.; FLORES, E. F. *Orthomyxoviridae*. In: FLORES, E. F. **Virologia veterinária**: virologia geral e doenças virídicas. 2. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2012. 1008 p.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Expert surveillance panel on equine influenza vaccines - conclusions and recommendations.** Reino Unido: National Institute for Medical Research, 2008. Disponível em: < http://www.oie.int/doc/ged/D4908.PDF>. Acesso em 04 dez. 2013.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Expert surveillance panel on equine influenza vaccines - conclusions and recommendations**. Reino Unido: National Institute for Medical Research, 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/doc/ged/D6325.PDF>. Acesso em: 02 dez. 2013.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Expert surveillance panel on equine influenza vaccines - conclusions and recommendations**. Reino Unido: National Institute for Medical Research, 2011. Disponível em: <http://www.oie.int/doc/ged/D10847.PDF>. Acesso em: 10 ago. 2013.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. In: OIE. **Equine influenza.** 2012. cap. 2. 5. 7. Terrestrial Manual. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.05.07_EQ_INF.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2013.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Expert surveillance panel on equine influenza vaccines - conclusions and recommendations**. Reino Unido: National Institute for Medical Research, 2013. Disponível em: <http://www.oie.int/our-scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/equine-influenza/>. Acesso em: 20 nov. 2013.

OLIVEIRA, G. S.; SCHIAVO, P. A.; MAZUR, C.; ANDRADE, C. M. Prevalência de anticorpos para o vírus da influenza equina, subtipo H3N8, em equídeos

apreendidos no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1213-1215, 2005.

OLUSA, T. A. O.; ADEGUNWA, A. K.; ADERONMU, A. A.; ADEYEFA, C. A. O. Serologic evidence of equine H7 Influenza virus in polo horses in Nigeria. **Science World Journal,** v. 5, n. 2, p. 17-19, 2010.

OXBURGH, L.; HAGSTRÖM, A. A PCR based method for the identification of equine influenza virus from clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 161-174, 1999.

OZAWA, M.; KAWAOKA, Y. Cross talk between Animal and human influenza viruses. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, p. 21-42, 2013.

PAGANO, M. C.; PASSOS, W. S.; CUNHA R. G. Anticorpos inibidores de hemoaglutinação para os vírus de influenza eqüina em soros de eqüídeos de várias regiões do Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 7, n. 7, p. 194-198, 1985.

PALESE, P.; SHAW, M. L. *Orthomyxoviridae:* the viruses and their replication. In: KNIPE, D.; HOWLEY, P.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M. **Fields virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. p. 3091.

PENA, L. J.; PENA, D.A.; BARRIOS, P.R.; DALE, R.; LAMÊGO, M. R. A.; MORAES, M. P. Levantamento soro-epidemiológico da infecção pelo vírus da Anemia Infecciosa Eqüina, da Influenza Eqüina-2 e do Herpesvírus Eqüino-1 em rebanhos do sul do Estado do Pará, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 537-542, 2006.

PRESTI, R. M.; ZHAO, G.; BEATTY, W.; MIHINDUKULASURIYA, K. A.; ROSA, A. P. A. T.; POPOV, V. L.; VIRGIN, H. W.; WANG, D. Quaranfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the Family *Orthomyxoviridae*. **Journal of Virology**, v. 83, n. 22, p. 11599-11606, 2009.

PRITCHETT, T. J.; PAULSON, J. C. Basis for the potent inhibition of Influenza Virus infection by equine and guinea pig α2-macroglobulin. **Journal of Biological Chemistry,** v. 264, n. 17, p. 9850-9858, 1989.

RACANIELLO, V. **Introduction to virology**. 2009. Disponível em: <http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/pathophys/id/2009/viruses2Notes.pdf>, Acesso em: 15 ago. 2013.

SAMMARCO, A. M. **Images of america:** the great boston fire of 1872. Carolina do Sul: Ed. Arcadia, 1997. 128 p.

SANG, R.; ONYANGO, C.; GACHOYA, J.; MABINDA, E.; KONONGOI, S.; OFULA, V.; DUNSTER, L.; OKOTH, F.; COLDREN, R.; TESH, R.; DA ROSSA, A. T.; FINKBEINER, S.; WANG, D.; CRABTREE, M.; MILLER, B. Tickborne arbovirus surveillance in market livestock, Nairobi, Kenya. **Emerging Infectious Diseases Journal - CDC**, v. 12, n. 7, p. 1074-1080, 2006.

SANTOS, C. A. **Doenças infecciosas emergentes:** um estudo sociológico sobre a tuberculose como uma zoonose. 2008. 144 f. Dissertação (Mestrado em Sociologia Política) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
SBG. SOCIEDADE BRASILEIRA DE BUGEI. Disponível em: <http://www.bugei.com.br/news/index.asp?id=10688>. Acesso em: 01 dez. 2013

SCHEMANN, K.; FIRESTONE S. M.; TAYLOR, M. R.; TORIBIO, J. A.; WARD, M. P.; DHAND, N. K. From the Horse's Mouth: Perceptions of the Management of the 2007 Equine Influenza Outbreak in Australia. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 6, p. 503 - 516, 2012.

SHERMAN, J.; THORSEN, J.; BARNUM, D. A.; MITCHELL, W. R.; INGRAM, D. G. Infectious causes of equine respiratory disease on Ontario standardbred racetracks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 285-289, 1977.

SHOPE, R. E. Swine influenza: I experimental transmission and pathology. **Journal of Experimental Medicine**, v. 54, n. 3, p. 349-359, 1931.

SILVA, R. A. M. S.; DAVILA, A. M. R.; IVERSSON, L. B.; ABREU, U. P. G. Equine viral diseases in the Pantanal, Brazil. Studies carried out from 1990 to 1995. **Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinarire des Pays Tropicaux**, v. 52, n. 1, p. 9-12, 1999.

SMITH, W.; ANDREWES, C. H.; LAIDLAW, P. P. A virus obtained from influenza patients. **The Lancet**, v. 222, n. 5732, p. 66-68, 1931.

SUN, X.; SHI, YI.; LU, X.; HE, J.; GAO, F.; QI, J.; QI, J.; GAO, G. F. Bat-derived influenza hemagglutinin H17 does not bind canonical avian or human receptors and most likely uses a unique entry mechanism. **Cell Reports**, v. 3, n. 3, p. 769-778, 2013.

SUREAU, P.; KLEIN, J. M. Arboviruses in Iran. **Medecine Tropicale**, v. 40, n. 5, p. 549-554, 1980.

SUZUKI, Y.; ITO, K; SUZUKI, T.; HOLLAND, R. E.; CHAMBERS, T. J.; KISO, M.; ISHIDA, H.; KAWAOKA, Y. Sialic acid species as a determinat of the host range of influenza a viruses. **American Society for Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 11825-11831, 2000.

TAURASO, N. M. T.; PEDREIRA, F. A.; SPECTOR, S. L.; BERNIER, G. M. Effect of Various Methods of Removing Non-Specific Inhibitors to Virus Hemagglutination upon Serum Proteins and Immunoglobulins. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v. 34, n. 3, p. 214-222, 1971.

TONG, S.; LI, Y.; RIVAILLER, P.; CONRARDY, C.; CASTILLO, D. A. A.; CHEN, L. M.; RECUENCO, S.; ELLISON, J. A.; DAVIS, C. T.; YORK, I. A.; TURMELLE, A. S.; ROGERS, S.; SHI, M.; TAO, Y.; WEIL, M. R.; TANG, K.; ROWE, L. A.; SAMMONS, S.; XU, X.; FRACE, M.; LINDBLADE, K. A.; COX, N. J.; ANDERSON, L. J.; RUPPRECHT, C. E.; DONIS, R. O. A distinct lineage of influenza A virus from bats.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v, 109, n. 11, p. 4269-4274, 2012.

TONG, S.; ZHU, X.; LI, Y.; SHI, M.; ZHANG, J.; BOURGEOIS, M.; YANG, H.; CHEN, X.; RECUENCO, S.; GOMEZ, J.; CHEN, L. M.; JOHNSON, A.; TAO, Y.; DREYFUS, C.; YU, W.; MCBRIDE, R.; CARNEY, P. J.; GILBERT, A. T.; CHANG, J.; GUO, Z.; DAVIS, C. T.; PAULSON, J. C.; STEVENS, J.; RUPPRECHT, C. E.; HOLMES, E. C.; WILSON, I. A.; DONIS, R. O. New world bats harbor diverse Influenza A viruses. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 1-12, 2013.

TREBBIEN, R.; LARSEN, L. E; VIUFF, B. M. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. **Virology Journal,** v. 8, n.1, p. 1-14, 2011.

TU, J.; ZHOU, H.; JIANG, T.; LI, C.; ZHANG, A.; GUO, X.; ZOU, W.; CHEN, H.; JIN, M. Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from pigs in China. **Archives of Virology**, v. 154, p. 887-890, 2009.

TUMOVÁ, B.; PEREIRA, H. G. Antigenic relationship between influenza a viruses of human and animal origin. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 38, p. 415-420, 1968.

WADDELL, G. H.; TEIGLAND, M. B.; SIGEL, M. M. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 143, p. 587-590, 1963.

WANG, X.; LI, M.; ZHENG, H.; MUSTER, T.; PALESE, P.; BEG, A. A.; GARCIA-SASTRE, A. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. **Journal of Virology**, v. 74, n. 24, p. 11566-11573, 2000.

WEBSTER, R. G.; LAVER, W. G. Preparation and properties of antibody directed specifically against the neuraminidase of influenza virus. **Journal of Immunology**, v. 99, n. 1, p. 49-55, 1967.

WEBSTER, R. G.; BEAN Jr., W. J. Genetics of influenza virus. **Annual Review of Genetics**, v. 12, p. 425-431, 1978.

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

WEBSTER, R. G. Are equine 1 influenza viruses still present in horses? **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. 6, p. 537–538, 1993.

WEBSTER, R. G. The importance of animal influenza for human disease. **Vaccine,** v.15, n. 20, p.16-20, 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Manual on animal influenza diagnosis and surveillance.** Genebra: WHO, 2002. 105p.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global influenza surveillance network:** Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Genebra: WHO, 2011. 153 p.

WILSON, I. A.; COX, N. J. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. **Annual Review of Immunology,** v. 8, p. 737-771, 1990.

WRIGHT, P.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. ***Orthomyxoviridae:*** the viruses and their replication. In: KNIPE, D.; HOWLEY, P.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2007. 3091 p.

YEWDELL, J. W.; WEBSTER, R. G.; GERHARD, W. U. Antigenic variation in three distinct determinants of an influenza type A haemagglutinin molecule. **Nature**, v. 279, p. 246-248, 1979.

ZHIRNOV, O. P.; KLENK, H. D. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. **Apoptosis**, v. 12, n. 8, p. 1419-1432, 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Extração de RNA viral com TRIZOL® - Clorofórmio - Etanol - Propanol

- A cada 250 µL de amostra, adicionou-se 750 µL de TRIZOL®.
- Agitadação por 15 segundos e incubou-se em temperatura ambiente por 15 min.
- Acrescentou-se 200 µL de clorofórmio absoluto seguido de agitação e incubação em temperatura ambiente por 15 min.
- Centrifugação (12.000 X g/15 min/4°C).
- Observou-se a separação da fase aquosa superior (que contém o RNA total) a qual foi retirada e homogeneizada em proporção 1:1 (v/v) com Propanol Absoluto e incubação em temperatura ambiente por 15 min.
- Centrifugação (12.000 X g/15 min/4°C).
- Descartou-se o sobrenadante por inversão.
- O *pellet* de RNA total foi lavado com 950 µL de etanol (75% em H_2O ultrapura livre de DNase e RNase) e centrifugado novamente.
- O etanol foi descartado por inversão e, para secar o *pellet*, a amostra foi colocada no termobloco a 55°C por 10 minutos
- O RNA extraído foi ressuspendido em 20 µL de H_2O ultrapura livre de DNase e RNase e estocado em freezer -80°C até a utilização.

ANEXOS

ANEXO A **- Solução Alsever (WHO, 2011)**

- Dextrose: 20,5 g
- Citrato de sódio dihidratado ($Na_3C_6H_5O_7$ x $2H_2O$): 8 g
- Cloreto de Sódio (NaCl): 4,2 g
- Ácido Cítrico ($C_6H_8O_7$): 0,55 g
- q.s.p. 1000 mL H_2O
- Filtrar com membrana 0,22 µm para esterilizar
- pH final: 6,1

ANEXO B - **Solução fosfatada (PBS) 0,01M, pH7,2 (WHO, 2011)**

- Cloreto de sódio (NaCl) 8,5 g
- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Na_2HPO x 7 H_2O): 1,8228 g
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH_2PO_4 x H_2O): 0,316 g
- H_2O q.s.p. 1.000 mL
- pH final: entre 7,2 e 7,3
- Autoclavar para esterilizar

ANEXO C **- Solução Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 X**

- 0.1M de Tris,
- 0.09M de ácido bórico e
- 0.001M de EDTA
- H_2O q.s.p 1000 mL

ANEXO D **- Suspensão de kaolin 20% (OIE, 2012)**

- Kaolin em pó: 20 g
- H_2O q.s.p 100 mL

ANEXO E **- Solução de tripsina (WHO, 2002)**

- Tripsina cristalina 1:250: 200 mg
- PBS 0,1M pH8,2 (ANEXO J): 25 mL
- Esterilizar por filtração (0,22 µm)

ANEXO F **- Solução de metaperiodato de potássio (KIO_4) (WHO, 2002)**

- Metaperiodato de potássio (KIO_4): 230 mg
- PBS 0,01M pH7,2 (ANEXO B): 100 mL
- Esterilizar por filtração (0,22 µm)

ANEXO G - **Solução PBS-Glicerol 1%**

- Solução fosfato (PBS) 0,01M pH 7,2 (ANEXO B): 100 mL
- Glicerol: 1 mL

ANEXO H **- Solução de RDE 0,02U/mL**

- Solução fosfatada (PBS) 0,01M, pH7,2 (ANEXO B): 15 mL
- RDE (Sigma cat.6514): 20 µL

ANEXO I **- Solução salina 0.85% (WHO, 2002)**

- Cloreto de Sódio (NaCl): 0,85 g
- H_2O q.s.p 100 mL
- Autoclavar para esterilizar

ANEXO J - **Solução fosfatada (PBS) 0,1M, pH8,2 (WHO 2002)**

- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Na_2HPO x 7 H_2O): 0,7372 g
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH_2PO_4 x H_2O): 0,138 g
- H_2O q.s.p. 41 mL
- pH final: 8,2
- Autoclavar para esterilizar