COMPARAÇÃO ANTIGÊNICA DE TRÊS AMOSTRAS DE VÍRUS DA INFLUENZA EQUINA A/EQUI 2, ISOLADAS NO BRASIL¹

RAYMUNDO G. CUNHA² e MARIA DO CÉU CORREA PAGANO³

ABSTRACT.- Cunha R.G & Pagano M.C.C. 1993. [Antigenic comparison of three strains of equine influenza A/equi 2 virus isolated in Brazil.] Comparação antigênica entre três amostras de vírus A/equi 2 de influenza eqüina isoladas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(1/2):41-44. Depto Patologia e Clínica Veterinária, Fac. Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho 64, Niterói, RJ 24230-340, Brazil.

Three strains of A/equi 2 virus isolated during outbreaks of equine influenza observed in Brazil during 1969, 1985 and 1987 were compared antigenically, performing hemagglutination inhibition (HI) and serum neutralization (SN) tests. Hyperimmune rooster sera and post-infection 21-day-old chicken sera were used. The results of the tests showed minor differences among the strains studied. The two more recent strains (1985 and 1987) are closely related and both equally different from the 1969 one. This strain showed essentially no difference with the prototype strain (A/equi 2/Miami/1/63). The results suggest that a slight antigenic variation occurred in the hemagglutinin of A/equi 2 virus over the years 1969 to 1985.

INDEX TERMS: Equine influenza, hemagglutination, inhibition serum neutralization, brazilian strains.

SINOPSE.- Descreve-se um estudo comparativo das características antigênicas de três amostras de vírus de influenza equina (IE) A/equi 2, isoladas no Brasil em 1969, 1985 e 1987, utilizando-se as provas de inibição de hemoaglutinação (IHA) e soroneutralização (SN) em ovos embrionados. Soros de galos imunizados conforme técnica preconizada pela OMS e soros de pintos que sofreram infecção viral foram empregados. Os resultados dessas provas indicaram existir uma ligeira variação antigênica entre as amostras estudadas. As duas amostras mais recentes (1985 e 1987) estão estreitamente relacionadas e ambas igualmente distanciadas da amostra de 1969 que por sua vez se apresentou mais próxima da cepa protótipo do vírus - A/equi 2/Miami/1/63. Os resultados das provas de IHA são melhor evidenciados com os soros de pintos, sangrados 21 dias pós infecção, que apresentam títulos inibidores mais elevados. As provas de SN confirmaram os achados obtidos com IHA e como seus resultados são expressos em valores maiores, sua análise e interpretação ficam mais fácil de serem demonstradas. Em ambos os tipos de prova, os resultados obtidos sugerem que uma ligeira variação antigênica da hemaglutinina do vírus A/equi 2 ocorreu entre os anos de 1969 e 1985.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Influenza eqüina, inibição de hemoaglutinação, soroneutralização, amostras de vírus autóctones.

INTRODUÇÃO

Os vírus de influenza humana do tipo "A" apresentam alta variação antigênica que influi fortemente em sua epi-

demiologia e no uso preventivo de vacinas (Stuart-Harris & Schild 1976; Murphy & Webster 1985).

Em eqüídeos, dois subtipos já foram evidenciados: A/equi 1 (Sovnova et al. 1957) e A/equi 2 (Waddell et al. 1963), ambos encontrados no Brasil (Cunha 1970, Cunha et al. 1978).

Embora considerados antigenicamente estáveis (Easterday 1976), amostras de vírus isoladas em São Paulo (Pereira et al. 1972) e em Tokio (Kono et al. 1972) mostraram ligeira variação quando comparadas com a amostra protótipo A/equine/Miami/1/63 (H3N8), vírus A/equi 2. Não está esclarecido se esta leve variação poderia prejudicar a eficiência da vacina usada para prevenção da doença.

Julgamos de interesse verificar o comportamento antigênico das três amostras de vírus A/equi 2 que isolamos no Brasil, com vista a uma seleção da amostra mais adequada para elaboração de vacina. As experiências realizadas com esse propósito são apresentadas no presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de Vírus

Três cepas de vírus pertencentes ao subtipo A/equi 2 (H3N8) foram usadas em nossos estudos: A/equi 2/GB/69, A/equi 2/RJ/85 e A/equi 2/MS/87. As duas primeiras, isoladas no atual estado do Rio de Janeiro (Cunha 1970, Cunha et al. 1986). A terceira amostra foi isolada do material coletado por veterinário do Ministério da Agricultura em surto da doença no Município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, em 1987. Estas cepas de vírus, mantidas no Laboratório em congelador a -60°C, sofrem

¹ Aceito para publicação em 6 de janeiro de 1993.

Trabalho realizado no Laboratório da Disciplina de Doenças Infecciosas, Depto Patologia e Clínica Veterinária, CCM, Univ. Fed. Fluminense (UFF), Rua Vital Brazil Filho 64, Niterói, RJ 24230-340.

² Professor Titular da UFF (Aposentado) e Bolsista do CNPq.

³ Bolsista do CNPq.

periodicamente uma passagem em ovo embrionado e o líquido alantóide infeccioso coletado é dividido em pequenos volumes e guardado no congelador para uso posterior.

Ovos embrionados

Ovos embrionados de 10 a 11 dias de incubação, provenientes de galinha Leghorn de criação própria ou granja comercial, com rígido controle sanitário, foram empregados nas experiências aqui relatadas.

Galos e pintos

Para preparo de soro imunes foram utilizados galos da raça Leghorn, com cerca de três quilos de peso, procedentes de granjas similares.

Os pintos eram provenientes dos retrodescritos ovos, eclodidos no Laboratório e criados em gaiola, sem contato com outras aves.

Soros imunes

Foram preparados soros imunes em dois galos para cada amostra de vírus, seguindo-se a técnica recomendada pela OMS (Lepine 1954). Os galos eram inoculados com líquido alantóide (LA) de título hemoaglutinante igual ou superior a 1:320, após centrifugação, recebendo cada ave 15 ml por via endovenosa e 10 ml por via intraperitoneal. Doze dias após a inoculação do vírus, efetuava-se a sangria dos galos para obtenção dos soros imunes. Estes eram inativados em banho-maria a 56°C durante 30 minutos, distribuídos em ampolas de 2 ml e guardados no congelador a -20°C.

Os LA utilizados nas imunizações correspondiam à 38ª passagem em ovo embrionado para a cepa A/equi 2/GB/69, à 17ª para a cepa A/equi 2/RJ/85 e à 14ª para a cepa A/equi 12/MS/87. Foi também utilizado o soro imune padrão A/equi/Miami/1/63, recebido do "Center for Disease Control (C.D.C.), Atlanta, E.U.A., bem como um soro imune conhecido para o subtipo A/equi 1/RJ/76.

Como em trabalho anterior (Cunha et al., no prelo) verificaram que soros de pintos que sofriam infecção por vírus A/equi/RJ/85 apresentavam títulos inibidores mais elevados, utilizamos, também, soros de pintos infectados com as cepas em estudo, inoculados posteriormente com um estímulo de reforço.

Prova de hemoaglutinação (HA)

A capacidade hemoaglutinante do líquido alantóide de ovos infectados com as cepas de vírus conhecidos foi investigada pela prova HA com eritrócitos de galinha a 0,5%. De modo geral, a técnica preconizada pela Organização Mundial de Saúde foi adotada. Diluições duplas do líquido em exame a partir de 1:5 e sucessivamente até 1:2.560 eram preparadas em salina de pH 7,2 - 7,4, com volume de 0,5 ml. A cada tubo agregava-se igual volume da suspensão de hemácias de galinha a 0,5%. Após agitação, os tubos eram mantidos à temperatura ambiente e a leitura final feita em torno de 60 minutos, na dependência dos controles.

Prova de inibição de hemoaglutinação (IHA)

Os soros imunes preparados por nós eram descongelados, colocando-se as ampolas em banho de gelo. O soro padrão, recebido do C.D.C. estava liofilizado e foi reconstituído com água destilada, conforme as indicações que o acompanhavam. De cada soro participante da prova eram preparadas diluições duplas a partir de 1:5 até uma diluição que se antecipava negativa, em volume de 0,25 ml para cada diluição. A cada tubo de diluição de

soro se juntava 0,25 ml de uma diluição de vírus, titulada minutos antes, contendo quatro unidades hemoaglutinantes.

A mistura soro + vírus era agitada algumas vezes no decorrer de 15 minutos, quando se agregava a cada tubo 0,5 ml da suspensão de hemácias de galinha a 0,5%. Tubos controles da suspensão de hemácias e da diluição de vírus eram incluídos em todas as provas e a leitura final feita da mesma maneira que para a prova de HA.

Os diferentes soros imunes foram examinados, em duplicata, frente a uma cepa de vírus na mesma oportunidade, considerando-se válida a prova em que os resultados se mostraram similares nas duas fileiras do mesmo soro.

Soro neutralização (SN)

Em tubos de hemólise estéreis, distribuía-se 0,4 ml de soro diluído a 1:2, empregando-se seis tubos para cada soro. A cada tubo adicionava-se 0,4 ml da diluição de vírus desejada. Para os soros imunes conhecidos usaram-se diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁶ e para soro normal e salina, diluições de 10⁻⁵ a 10⁻¹⁰. Depois de bem agitados os tubos, permanecia a mistura soro + vírus à temperatura ambiente por 15 minutos. Decorrido este período, eram as misturas inoculadas na cavidade alantoideana de ovos embrionados com 10 a 11 dias de incubação, 4 ovos para cada diluição de vírus. Para cada soro usou-se uma seringa, fazendo-se as inoculações da diluição menos concentrada para a mais concentrada em vírus.

Os ovos inoculados eram colocados na estufa a 37°C e examinados duas vezes ao dia, colocando-se em geladeira os encontrados mortos. Após 96 horas de incubação, os ovos restantes eram colocados em geladeira e, após resfriados, coletado o LA de todos os ovos inoculados. Os LA coletados eram examinados, individualmente, pela prova de HA e os resultados positivos considerados indicadores da presença de vírus.

Para cada soro imune, bem como para o controle de vírus em salina e soro normal, foi calculada a Dose Infectante 50% (DI50) pelo método de Reed & Muench, 1938.

A diferença de título infeccioso entre o grupo inoculado com soro imune e vírus e o grupo inoculado com solução salina e vírus proporcionava o índice de neutralização (IN).

RESULTADOS

Os resultados das provas de inibição de hemoaglutinação são apresentados no Quadro 1. Confirmam que as três amostras estudadas pertencem ao subtipo A/equi 2.

Entretanto, os títulos de IHA registrados revelam não existir uma completa identidade entre as amostras estudadas; sugerem que a amostra GB/69 está distanciada das outras duas isoladas respectivamente em 1985 e 1987.

Os resultados obtidos para estas duas últimas, RJ/85 e MS/87, indicam que ambas são mui aproximadas. Como os soros de pintos apresentam títulos mais elevados, esses achados tornam-se mais evidentes.

As provas de soroneutralização (Quadro 2) confirmaram os resultados das IHA, isto é, uma maior aproximação entre RJ/85 e MS/87, as amostras mais recentes, e ambas igualmente distanciadas da cepa GB/69, a mais antiga.

Como os resultados de SN são expressos em valores maiores, variando numa faixa de 1.000 a 1.000.000, essas diferenças tornam-se mais evidentes.

Quadro 1. Resultados das provas de inibição de hemoaglutinação (IHA) entre soros imunes e as amostras nacionais de vírus A/equi 2

Soros imunes	Títulos de IHA de soros imunes frente aos vírus		
	Eq 2/GB/69	Eq 2/RJ/85	Eq 2/MS/87
<i>Soros de galos</i>			
A/equi 2/Miami/63 ^a	320 ^b	80	160
A/equi 2/GB/69	640	320	320
A/equi 2/RJ/85	160	640	640
A/equi 2/MS/87	160	320	640
A/equi 1/RJ/76	0 ^c	0	0
<i>Soros de pintos PJD</i>			
A/equi 2/GB/69	2560	640	640
A/equi 2/RJ/85	320	5120	1280
A/equi 2/NS/87	320	1280	2560

^a Soro Miami/63 recebido do C.D.C. Atlanta, USA.

^b Diluição mais alta de soro inibindo 4 unidades hemoaglutinantes.

^c A/equi 1/RJ/76 (H7N7), resultados negativos na diluição 1:10 e superiores.

^d Soro de pintos pós-infecção e hiperimunização.

Quadro 2. Resultados das provas de soroneutralização (SN) realizadas com soros imunes e as amostras nacionais de vírus A/equi 2

Soros imunes	Índices de neutralização conferidos pelos soros imunes de galos frente às amostras de vírus		
	Eq 2/GB/69	Eq 2/RJ/85	Eq 2/MS/87
A/equi 2/Miami/63	5,00 ^a	3,00	3,34
A/equi 2/GB/69	5,33	3,50	3,00
A/equi 2/RJ/85	3,33	5,50	5,0
A/equi 2/MS/87	3,67	5,00	6,0

^a Valor logarítmico do n° de DI50% neutralizadas.

DISCUSSÃO

Tanto na influenza humana como na suína e aviária, produzidas por vírus de tipo "A", registra-se uma alta variação antigênica dos vírus atuantes. Esta variação antigênica está assentada em duas glicoproteínas que o virion possui na membrana externa: a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA). Até o presente foram reconhecidas 13 distintas HAs e 9 diferentes NAs (Murphy & Webster 1985; Easterday & Hinshaw 1990).

Os vírus de influenza equina (A/equi 1 e A/equi 2) foram considerados estáveis (Easterday 1975). Pereira et al. (1972) encontraram ligeira variação antigênica entre as amostras recém-isoladas e a cepa protótipo A/equi 2/Miami/1/63. Esta diferença foi evidenciada pelo uso de soro imune de furão, infectado com uma amostra de vírus autóctone. Soros imunes de galos não mostraram essa variação. No surto do Japão, Kono et al. (1972) verificaram que as amostras isoladas eram estreitamente relacionadas com a cepa Miami, mas não idênticas. Soros de cavalos convalescentes, bem como soros imunes de galos, dão títulos de inibição mais altos com as amostras homólogas, autóctones, do que com a cepa Miami. Não dispusemos de furão, mas os soros de pintos que sofreram infecção pelo vírus, e que usamos, apresentaram altos títulos inibidores, sugerindo que o importante é a replicação viral nas células do animal infectado, o que aumentaria o estímulo antigênico.

No presente trabalho, não tivemos como objetivo verificar a semelhança das amostras nacionais com o protótipo A/equi 2/Miami/1/63 e sim investigar se as amostras que isolamos em 1969, 1985 e 1987 eram idênticas ou, se nos 18 anos de intervalo, o vírus atuante havia adquirido outras características antigênicas.

Os resultados que obtivemos nas provas de IHA indicam que as duas últimas amostras (1985 e 1987) estão estreitamente relacionadas e ambas se distanciam, da cepa de 1969 que, por sua vez, se mostra muito próxima da cepa protótipo.

Embora há vários anos tenha sido registrado que os anticorpos inibidores de HA e os neutralizantes do vírus sejam idênticos (Hirst 1942) usamos a prova de soroneutralização como contraprova ou confirmação dos resultados obtidos com IHA na qual inibidores inespecíficos podem mascarar os resultados finais. Contudo, em caráter experimental, ela continua sendo usada, como nas experiências de Maess & Mussgay (1968), para avaliar a proteção de vacinas contra os vírus de IE.

Powell et al. (1974) ao estudarem um surto de IE na Inglaterra, causado pelo subtipo A/equi 1, encontraram uma leve variação antigênica entre as amostras isoladas e o protótipo A/equi 1/Praga/1/56. A despeito de que equinos vacinados tenham se mantido indenes, os autores levantam a questão da conveniência de incluir as amostras recém-isoladas, atuantes, na elaboração de vacinas. Esta dúvida foi também um dos motivos de estudarmos as três amostras nacionais e as mais recentes parecem mais indicadas para serem usadas na preparação de vacinas.

Agradecimentos.— Os autores expressam seus agradecimentos ao Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz, pela gentileza da doação de parte dos ovos embrionados; ao laboratorista Algemiro Rodrigues pela ajuda no preparo do material de laboratório e cuidados dispensados aos animais no decorrer das presentes experiências.

REFERÊNCIAS

- Cunha R.G. 1970. Isolamento de amostras do vírus da influenza equina A/equi 2 no Estado da Guanabara. *Revta Bras. Biol.* 30(4):491-498.
- Cunha R.G., Passos W.S. & Valle M.C.C. 1978. Surto de gripe equina produzido por vírus de influenza A/equi 1 no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revta Bras. Biol.* 38(3):549-554.
- Cunha R.G., Passos, W.S., Pagano, M.C.C. & Souza, D.M. 1986. Surto de gripe equina produzido por vírus de influenza A/equi 2 no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revta Bras. Med. Vet.* 81(3):88-91.
- Easterday B.C. 1975. Animal Influenza, p. 449-481. In: Kilbourne E.D. (ed.) *The Influenza Viruses and Influenza*. Academic Press, New York. 573 p.
- Easterday B.C. & Hinshaw V.S. 1990. Avian Influenza, p. 532-551. In: Chalnek B.W. (ed.) *Diseases of Poultry*. State Univ. Press, Ames, Iowa, USA. 929 p.
- Hirst G.K. 1942. Citado por Smadel, J.E. 1948. Serologic reactions in viral and rickettsial infections, p. 67-76. In: Rivers T.M. (ed.) *Viral and Rickettsial Infections of Man*. J.B. Lipincott, Philadelphia, USA. 587 pp.
- Kono Y., Ishikawa K., Fukunaga Y. & Fujimo M. 1972. The first outbreak of equine influenza in Japan. *Natl Inst. Anim. Hlth Quart.* 12:183-187.
- Lepine P. 1954. Laboratory methods in the study of influenza virus, p. 87-124. In: *Influenza, a review of current research*. Wld Hlth Org. Monogr. Series n° 20, Genève.
- Maess J. & Mussgay M. 1968. Du potentiel antigenique de produits de clivage des virus du type Influenza A-equi. *Bull. Off. Int. Epizooties* 70:123-131.

- Murphy B.R. & Webster R.G. 1985. Influenza viruses, p. 1179-1239. In: **Fields B.N.** (ed.) *Virology*. Raven Press, New York.
- Pereira H.G., Takimoto S., Piegas N.S. & Valle L.A.R. 1972. Antigenic variation of equine (Heq 2 Neq 2) influenza virus. Bull. Wld Hlth Org. 47:465-469.**
- Powell D.G., Thomson G.R., Spooner P., Plowright W., Burrows R. & Schild G.C. 1974. The outbreak of equine influenza in England April/May 1973. *Vet. Rec.* 94:282-287.
- Reed L.J. & Muench H. 1938. A simple method of estimating Fifty Percent Endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497.**
- Sovinova O., Tumova B., Poutska F. & Nemecek J. 1958. Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta virologica, Praga*, 2:52-61.
- Stuart-Harris C.H. & Schild G.C. 1976. *Influenza. The Viruses and the Disease*. Edward Arnold, London. 242 p.
- Waddell G.H., Teighland M.B. & Siegel M.N. 1963. A new influenza virus associate with equine respiratory disease. *J. Am. Vet. Ass.* 143:587-590.