

# Influenza em animais heterotérmicos

## Influenza in heterothermics

Dalva Assunção Portari Mancini<sup>1</sup>, Rita Maria Zucatelli Mendonça<sup>1</sup>, Aurora Marques Cianciarullo<sup>2</sup>, Leonardo Setsuo Kobashi<sup>2</sup>, Hermínio Gomes Trindade<sup>1</sup>, Wilson Fernandes<sup>3</sup> e José Ricardo Pinto<sup>1</sup>

### RESUMO

*O objetivo foi pesquisar Ortomyxovirus em animais heterotérmicos. Coletou-se sangue de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus e de sapo e rãs dos gêneros Bufo e Rana, para a detecção dos receptores de hemácias e anticorpos específicos, ao vírus influenza, pelos testes de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação, respectivamente. Pelo teste de hemaglutinação, verificou-se que serpentes e sapos em cativeiro apresentaram receptores em suas hemácias para o vírus influenza, humano e equino do tipo A e tipo B. O mesmo ocorreu com serpentes recém chegadas. Quanto ao teste de inibição da hemaglutinação dos soros dos répteis observou-se títulos protetores de anticorpos aos vírus influenza tipo A (origens humana e equina) e tipo B. Com soro de sapo não se observou reação de inibição da hemaglutinação porém, 83,3% das rãs obtiveram médias de 40UIH para algumas cepas. Conclui-se que animais heterotérmicos podem oferecer condições de hospedeiros aos vírus influenza, assim como susceptibilidade à infecção.*

**Palavras-chaves:** Ortomyxovirus. Animais heterotérmicos. Receptores. Anticorpos específicos. Vírus influenza.

### ABSTRACT

*The objective was to study Orthomyxovirus in heterothermic animals. Blood samples from snakes (genus Bothrops and Crotalus) and from toads and frogs (genus Bufo and Rana) were collected to evaluate the red cell receptors and antibodies specific to influenza virus by the hemagglutination and hemagglutination inhibition tests, respectively. Both snakes and toads kept in captivity presented receptors in their red cells and antibodies specific to either influenza virus type A (human and equine origin) or influenza type B. The same was observed with recently captured snakes. Concerning the influenza hemagglutination inhibition antibodies protective levels were observed in the reptiles' serum, against influenza type A and type B. Unlike the toads, 83.3% of the frogs presented mean levels of Ab 40HIU for some influenza strains. It was concluded that heterothermic animals could offer host conditions to the influenza virus and also susceptibility to the infection.*

**Key-words:** Orthomyxovirus. Heterothermic animals. Receptors. Specific antibodies. Influenza virus.

Para melhor entendimento sobre a função do receptor celular no reconhecimento do vírus *influenza*, têm sido desenvolvidas pesquisas relacionadas a especificidade de ligação desse vírus isolado de várias espécies animais<sup>7 10 11</sup>.

Bossart e cols<sup>4</sup> verificaram através da microscopia eletrônica, os fenômenos conhecidos de adsorção (através da hemaglutinina) e subsequente eluição (pela neuraminidase) do vírus *influenza* sobre a membrana de eritrócitos de ave e

de humano. Essa interação do vírus à célula vermelha é comparado ao que ocorre às células hospedeiras.

Os vírus *influenza* tipo A mostram habilidade, entre seus subtipos, de ligação aos receptores através dos terminais dos ácidos siálicos, contendo oligossacarídeos, mas, são distintos quanto à especificidade de receptor, o que provavelmente os diferencia quanto à virulência aos hospedeiros<sup>5 6</sup>. Quanto ao tropismo desse vírus, verifica-se que as células receptoras virus

1. Laboratório de Virologia do Instituto Butantan, São Paulo, SP. 2. Laboratório de Genética do Instituto Butantan, São Paulo, SP. 3. Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, São Paulo, SP.

**Endereço para correspondência:** Dra. Dalva Assunção Portari Mancini. Divisão de Desenvolvimento Científico/Laboratório de Virologia/IB. Av. Vital Brasil 1500, 05503-900 São Paulo, SP.

Tel: 55 11 3726-7222 ramal 2152

e-mail: labvirol@bol.com.br - dapmancini@butantan.gov.br.

Recebido para publicação em 8/2/2003

Aceito em 27/2/2004

receptor possessing cells (VRPC) encontradas nos aparelhos digestivo e respiratório, das aves e mamíferos, respectivamente, é que são o fator determinante na especificidade de tecido e da classe de hospedeiros<sup>11,12</sup>.

Matrosovich e cols<sup>15</sup> demonstraram que a especificidade a receptores da célula poderá não restringir a transmissão ave-humano, mas sim a outras espécies, como fito de utilizá-las como hospedeiros intermediários.

De acordo com o conhecimento da ativação proteolítica sobre a atividade de fusão e da infectividade dos vírus envelopados, estudos comprovaram a importância da ação proteolítica sobre receptores destes vírus. A triptase *CLARA* e TL2 são ativadores dos vírus *influenza*, *Sendai*, e do *HIV*, sobre as células do trato respiratório e das células humanas CD4 e T, respectivamente. Inibidores da protease encontrados tanto no muco humano, como no surfactante pulmonar inativaram esses vírus *in vitro*<sup>3</sup>.

As reactive oxygen species (ROS) também são relatadas como participantes no processo de patogenia viral, atuando na ativação dos fagócitos que se associam ao estresse oxidativo<sup>17</sup>.

Esses relatos de estudo sobre a interação da hemaglutinação (HA) do vírus *influenza* aos receptores das células foram verificados em hospedeiro homeotérmicos, mas não foram encontrados esses tipos de relatos com heterotérmicos.

A literatura tem reportado a incidência de vírus respiratórios da família *Paramyxoviridae*, em animais heterotérmicos (répteis)<sup>1,2,9,16</sup>.

Assim, com base na literatura, este trabalho investigou a incidência de vírus da família *Orthomyxoviridae*, do gênero *Influenzavirus* em serpentes e anuros, mantidos em cativeiro ou capturados recentemente do habitat natural, com objetivo de identificação de outros hospedeiros que possam colaborar na ecologia da influenza, por meio da adaptação do vírus aos receptores das células de animais ainda não conhecidos como participantes no processo de transmissão dessa virose.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Animais heterotérmicos.** Serpentes adultas dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* alimentadas com camundongos, sendo 3 mantidas em cativeiro em caixas de madeira teladas e 6 exemplares recém capturados do habitat, originárias de diferentes regiões do Estado de São Paulo.

Anfíbios anuros, 10 animais do gênero *Rana*, *Rana catesbeiana*, popularmente conhecida como rã touro, originários de ranário da região de Mogi das Cruzes, São Paulo, 4 animais da mesma família, originários de ranário da região de São João Novo, São Paulo e um animal do gênero *Bufo*, *Bufo paracnemis*, mantido em cativeiro, todos alimentados com ração própria para a espécie contendo 40% de proteína bruta.

**Coleta de sangue.** As amostras de sangue foram coletadas com seringa e agulha descartável, aproximadamente 0,5mL de cada animal, após prévia desinfecção local e a devida contenção do animal. O sangue foi coletado da veia caudal das serpentes e punção cardíaca dos anfíbios anuros.

Os anfíbios anuros foram anestesiados com benzocaína em dosagem de 4g da droga pré-diluída em 40mL de álcool etílico PA sendo novamente diluída em 20l de água, ficando os animais anestesiados por aproximadamente 10 minutos, quando procedeu-se a coleta, sendo os animais mantidos vivos para outras atividades.

Para pesquisa de anticorpos, o sangue foi coletado sem anticoagulante e para o teste de hemaglutinação, o sangue foi coletado com o anticoagulante ALSEVER na proporção V/V.

**Preparo das hemácias.** Em tubo de centrífuga contendo aproximadamente 1mL de hemácias, foi adicionado aproximadamente 5ml de solução tampão PBS e centrifugado a 700rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionado um mesmo volume de PBS com leve agitação. A operação foi repetida por mais três vezes. No último ciclo foi desprezado o PBS, deixando apenas o sedimento das hemácias. A suspensão de hemácias foi de 0,5% em solução tampão fosfato (PBS).

**Remoção de anticorpos inespecíficos do soro.** **Preparo do caolim:** foi feita uma suspensão de Caolim 20% em água bidestilada, e após homogeneização foi deixada em repouso a 4°C por 24h. Passado este período, descartou-se o sobrenadante sendo substituído por igual volume de água bidestilada, com nova homogeneização e mantida em repouso por 24h a 4°C. Repetiu-se esta operação por mais uma vez, sendo que nesta última desprezou-se o sobrenadante, ficando a suspensão sob refrigeração até o momento do uso.

**Tratamento do soro.** Amostra de soro diluída a 1:5 em tampão fosfato (PBS), pH 7,0, foi adicionada de igual volume de suspensão de Caolim 20%, que permaneceu por 20 minutos à temperatura ambiente com agitação forte a cada 5 minutos. Procedeu-se centrifugação a 2000rpm por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 50µl de suspensão de hemácias de galo 50%, permanecendo a 4°C por 60 minutos com agitação suave a cada 5 minutos. Procedeu-se a centrifugação do soro a 2000rpm por 30 minutos e separou-se o sobrenadante (soro tratado) sendo desprezado o sedimento.

**Vírus.** Cepas do vírus *influenza* humano e equino, isoladas na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil, foram mantidas em células MDCK, através de passagens sucessivas.

A/SP/1/91 (H1N1) = (A/Singapore/6/86)

A/SP/2/95 (H3N2) = (A/Beijing/353/89)

B- B/SP/1/91 = (B/Panamá/45/90)

A/Eq1/SP/56 (H7N7) = (A/Eq1/Prague/1/56)

A/Eq2/1/SP/85 (H3N8) = (A/Eq2/Miami/1/63)

**Técnica da hemaglutinação**<sup>18</sup>. Foram feitas diluições seriadas na razão dois, em duplicata, das cepas virais em solução tampão fosfato (PBS), pH 7, em microplacas de fundo em "V", no volume de 25µl, a partir da diluição 1:2, utilizando microdiluidores de 25µl de capacidade. Após a diluição, em cada orifício, foram adicionados 25µl de suspensão de hemácias 0,5% de cada uma das espécies animais, concomitantemente com as hemácias de galo para controle da reação. As microplacas permaneceram à temperatura ambiente durante 30 minutos, até que as hemácias adicionadas no orifício controle (sem antígeno), depositaram no fundo do orifício. O título hemaglutinante viral é o inverso da maior diluição capaz de aglutinar as hemácias em 25µl de diluente.

**Ensaio com fitohemaglutinina**<sup>11</sup>. Utilizou-se o ensaio Lectin Phitoemaglutinina (Difco Laboratories- 3110-56) para identificação dos receptores (glicoproteínas) das células vermelhas do sangue de homotérmicos (as de ave/galo) e heterotérmicos (serpentes e anfíbios anuros), através do teste de hemaglutinação. Foram realizadas diluições seriadas, em duplicata, da solução de fitohemaglutinina em PBS, em volume de 25µl, iniciando-se com diluição 1:2 em placas com fundo em "V". Adicionou-se o mesmo volume de suspensão de hemácias, de cada uma das espécies, na concentração de 0,5%, em cada diluição.

**Teste da inibição da hemaglutinação**<sup>18 14</sup>. Amostras de soros dos animais previamente inativadas pelo calor a 56°C por 20 minutos e posteriormente tratadas pelo Caolim 20% foram em seguida diluídas, em diluições seriadas, razão dois, a partir de 1:20, em 25µl de PBS, em placas de fundo em V de 96 orifícios. Em cada diluição de soro foram adicionados 25µL das cepas virais a serem testadas, previamente tituladas em HA e contendo 4 unidades hemaglutinantes (4UHA). Depois de agitadas, as placas foram mantidas em geladeira a 4°C por 60 minutos. Depois deste tempo, foi adicionado em cada escavação da placa, 50µl de uma suspensão de hemácias de galo 0,5%. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos. O título do anticorpo inibidor da hemaglutinação foi determinado pelo inverso da maior diluição do soro capaz de inibir completamente a hemaglutinação das hemácias. Como controle negativo foram utilizados 25µl de PBS, 25µl de soro a 1:10 e 25µl de hemácias e como controle positivo foi empregado soro antiinfluenza padrão (humano e equino).

**Imunomicroscopia eletrônica**<sup>14 19</sup>. *Fase líquida*: em tubo de fundo cônico com capacidade para 1,5ml, com tampa, foi adicionado 0,1ml de anticorpo diluído a 1:10 (soro de serpentes tratado pelo Caolim) juntamente com 1,0ml de suspensão viral sendo mantido em repouso a 4°C por 18 h. Centrifugou-se a 12.000rpm por 60 minutos e o sobrenadante esgotado em câmara úmida por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em solução tampão PBS, pH 7,0, sendo colocado 10µl da suspensão sobre grade metálica previamente revestida com colódio 2% durante 1 minuto. Após remoção do excesso de material, adicionou-se 10µl de PTA 2%, pH 6,0, por 1 minuto para contrastação. Após

remoção do excesso, as grades foram deixadas em repouso por uma noite para secagem. As preparações foram examinadas ao microscópio eletrônico Marca Zeiss, modelo EM109.

**RESULTADOS**

De acordo com a técnica de hemaglutinação utilizada neste trabalho, verifica-se que 4 amostras de hemácias de serpentes foram reativas ao vírus *influenza* com títulos de hemaglutinação igual ou maior do que 4UHA. Destes animais, um era mantido em cativeiro e 3 eram recém chegados do habitat natural (Tabela 1). Com relação aos anuros (rãs e sapo), verificou-se títulos de hemaglutinação de 4UHA para o vírus com hemácias de 6 rãs da região de Mogi das Cruzes, SP (Tabela 2) e para 4 rãs de São João Novo, SP (Tabela 3). As duas amostras de hemácias de sapo em cativeiro, foram reativas ao vírus no teste de HA, com os respectivos títulos médios: 64UHA A (H1N1), 160UHA A (H3N2) e 512UHA para o tipo B. Com relação ao vírus *influenza* equino, essas amostras apresentaram: <2UHA ao A/Eq1 (H7N7) e 24UHA ao A/Eq2 (H3N8) (Tabela 4).

Através do teste sorológico de inibição da hemaglutinação (IH) observa-se que os soros das serpentes em cativeiro apresentaram títulos médios inibidores da hemaglutinação para as cepas do vírus *influenza* de: 173,3UIH à cepa A (H1N1), 24,4UIH para A (H3N2), e 119,9UIH ao tipo B. Quanto aos subtipos do vírus *influenza* equino, as mesmas serpentes

Tabela 1 - Nível de hemaglutinação de diferentes cepas do vírus *influenza* com hemácias de animais heterotérmicos (serpentes).

Cepas virais	Animais					média	controle
	hemaglutinação-títulos médios em UHA						
	1* <i>Bothrops jararaca</i>	5** <i>Crotalus durissus terrificus</i>	6** <i>Bothrops jararacussu</i>	9** <i>Bothrops jararacussu</i>	total		
A (H1N1)	20	8	2	4	8,5	16	
A (H3N2)	10	>32	8	32	20,5	128	
B	64	512	128	>128	208	128	
Eq1 (H7N7)	10	>4	2	2	4,5	128	
Eq2 (H3N8)	20	>64	16	16	29	128	
Fitohemaglutinina	64	128	NR	64	85,3	>1024	

\* em cativeiro; \*\*recém chegados do habitat natural; NR= não realizado

Tabela 2 - Nível de hemaglutinação de diferentes cepas do vírus *influenza* com hemácias de anfíbios anuros (rãs) da região de Mogi das Cruzes, SP

Cepas virais	Animais							média	controle
	hemaglutinação-títulos médios em UHA								
	1	2	4	8	10	11	total		
A (H1N1)	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	28	
A (H3N2)	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	64	
B	6	13,3	8	14	9	6	9,3	341	
Eq1 (H7N7)	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	68	
Eq2 (H3N8)	2	<2	3	3,3	2	2	2	277	
Fitohemaglutinina	128	NR	NR	128	128	NR	128	>1024	

NR=não realizado

**Tabela 3 - Nível de hemaglutinação de diferentes cepas do vírus influenza com hemácias de anfíbios anuros (rãs) da região de São João Novo, SP.**

Cepas virais	Animais					
	hemaglutinação-títulos médios em UHA					controle
	13	14	15	16	média total	ave (galo)
A (H1N1)	<2	<2	<2	<2	<2	8
A (H3N2)	<2	<2	<2	<2	<2	38
B	32	>32	4	16	21	384
Eq1 (H7N7)	<2	<2	<2	<2	<2	32
Eq2 (H3N8)	<2	<2	<2	<2	<2	69
Fitohemaglutina	32	64	64	64	56	128

**Tabela 4 - Nível de hemaglutinação de diferentes cepas do vírus influenza com hemácias de anfíbio anuro (sapo) mantido em cativeiro.**

Cepas virais	Amostra/animal			
	hemaglutinação títulos médios em UHA			controle ave (galo)
	1	2	média total	
A (H1N1)	64	64	64	128
A (H3N2)	256	64	160	128
B	512	512	512	1024
Eq1 (H7N7)	<2	<2	<2	256
Eq2 (H3N8)	16	32	24	128

obtiveram: 55,5UIH ao A/Eq1 (H7N7) e 244,4UIH ao A/Eq2 (H3N8). Aquelas serpentes recém-chegadas do habitat natural, apresentaram os seguintes títulos médios de HI aos subtipos A (H1N1): 23,3UIH, 43,3UIH ao A (H3N2), 36,6 UIH ao A/Eq1 (H7N7), 130 UIH ao A/Eq2 (H3N8) e 44,6UIH ao tipo B (Tabelas 5 e 6).

Das dezoito amostras de soros, de 12 exemplares de anfíbios anuros (rãs), foram obtidos títulos protetores de

IH  $\geq$ 40. Sendo que, na região de Mogi das Cruzes, 3 rãs obtiveram títulos médios de IH= 120, 360 e 50 ao subtipo A (H1N1); 3 obtiveram títulos médios de IH= 60, 40 e 180 ao subtipo A (H3N2) e 2 alcançaram títulos médios de IH= 40 ao subtipo equino A/Eq1 (H7N7). Não obtiveram títulos ao tipo B e nem ao subtipo A/Eq2 (H3N8). Na região de São João Novo, observou-se que 5 animais obtiveram títulos médios de IH= 640, >80, 160, 80 e >160 para o subtipo A (H1N1). Apenas uma das rãs apresentou título médio de IH= 80 ao subtipo A (H3N2), 160 ao tipo B e 40 ao subtipo A/Eq2 (H3N8). Outras duas rãs apresentaram títulos médios de IH= 40 ao subtipo A/Eq1 (H7N7) (Tabelas 7 e 8). As duas amostras de soro do anfíbio anuro (sapo) não puderam ser avaliadas pelo teste de IH.

A visualização do complexo de antígeno e anticorpo obtido pelo soro da serpente com título médio de IH =173,3 contra o antígeno viral da cepa do influenza A (H1N1) com título HA= 32UHA revelou reconhecimento do vírus *influenza* pelo sistema imune da serpente. Complexo do antígeno e

**Tabela 5 - Nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação aos diferentes vírus influenza em soros de serpentes mantidas em cativeiro.**

Cepas virais	Animais					soro padrão antiinfluenza
	inibição da hemaglutinação-títulos médios em UIH				média total	
	1	2	3			
	<i>Bothrops jararaca</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	<i>Bothrops jararaca</i>			
A (H1N1)	293,3	133,3	93,3	173,3	1320	
A (H3N2)	33,3	40	<20	24,4	1280	
B	93,3	80	186,6	119,9	160	
Eq1 (H7N7)	66,6	80	20	55,5	1280	
Eq2 (H3N8)	133,3	533,3	66,6	244,4	1080	

**Tabela 6 - Nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação aos diferentes vírus influenza em soros de serpentes capturadas do habitat natural**

Cepas virais	Animais							Média total	Soro padrão antiinfluenza
	inibição da hemaglutinação-títulos médios em UIH								
	4	5	6	7	8	9			
	<i>Bothrops jararaca</i>	<i>C. durissus terrificus</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	<i>C. durissus terrificus</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>			
A(H1N1)	20	<20	20	>40	40	>20	23,3	76	
A(H3N2)	20	>20	>20	>80	80	>40	43,3	128	
B	148	<20	>20	40	20	>40	44,6	36	
Eq1(H7N7)	20	40	>20	>40	>20	80	36,6	208	
Eq2(H3N8)	100	>320	>80	>80	>160	>40	130	186	

**Tabela 7- Nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação aos diferentes vírus influenza em soros de anfíbios anuros (rãs) da região de Mogi das Cruzes, SP.**

Cepas virais	Animais						
	inibição da hemaglutinação-títulos médios em UIH						soro padrão antiinfluenza
	12	13	14	15	16	média total	
A(H1N1)	640	>80	160	80	>160	165	80
A(H3N2)	<20	>20	80	<20	>20	24	40
B	<20	<20	160	<20	>20	36	800
Eq1 (H7N7)	40	<20	<20	20	40	20	320
Eq2(H3N8)	>20	<20	40	<20	<20	12	160

**Tabela 8 - Nível de anticorpos inibidores da hemaglutinação aos diferentes vírus influenza em soros de anfíbios anuros (rãs) da região de São João Novo, SP.**

Cepas virais	Animais									soro padrão antiinfluenza
	inibição da hemaglutinação-títulos médios em UIH								média total	
	1	2	3	5	6	7	9			
A(H1N1)	20	120	360	20	20	20	50	87,1	40	
A(H3N2)	<20	60	20	10	40	180	33,3	49	320	
B	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	360	
Eq1 (H7N7)	20	40	10	<20	40	20	<20	18,5	453	
Eq2(H3N8)	20	10	<20	<20	10	<20	10	7,1	186	



anticorpo obtido com soro humano e antígeno de influenza tipo A também foi demonstrado como controle positivo. Estes dados estão evidenciados nas Figuras 1 e 2, respectivamente, onde as imagens escuras demonstram a concentração protéica das agregações de partículas virais com o anticorpo, conforme demonstrado por Doane & Anderson<sup>8</sup>.

A Figura 3 apresenta os níveis de anticorpos de IH nas serpentes mantidas em cativeiro ou capturadas do habitat natural. Observa-se que esses animais em cativeiro apresentaram maiores médias de títulos de IH aos subtipos A(H1N1) (173,3 UIH), A/Eq1 (H7N7) (55,5 UIH) e A/Eq2 (H3N8) (244,4 UIH) e ao tipo B (119,9 UIH), comparados àquelas serpentes recém-capturadas, com exceção do subtipo A(H3N2), ao qual essas apresentaram maior média de título IH (43,3 UIH).

### DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos nos experimentos deste trabalho observou-se que a maioria dos animais heterotérmicos avaliados, como os répteis (serpentes) e anfíbios anuros (sapos e rãs), apresentou em suas membranas das células vermelhas receptores específicos aos vírus *influenza* humano e equino. Isto foi observado através

de reconhecimento prévio das células às glicoproteínas da fitohemaglutinina, usada como controle, a qual corresponderia às glicoproteínas da hemaglutinina situada nas espículas do envelope do vírus influenza. Passando-se então a confirmar que os heterotérmicos apresentam receptores específicos para glicoproteínas virais, quando as hemácias também foram aglutinadas pelos vírus *influenza*. O considerável nível de proteção imunológica, verificado nesses animais pelas sorologias (IH e IME), sugere a exposição à influenza que os induziu a resposta de anticorpos à infecção viral.

Observando o menor reconhecimento do vírus *influenza* pelos receptores das hemácias dos anfíbios (rãs) recém capturados do habitat, mas que apresentaram resposta de anticorpos contra esse vírus, é possível conceber que a transmissão viral tenha se processado devido a outros determinantes diferenciados daqueles já relatados aos receptores da superfície das células, como argumentam os autores Carrol et al<sup>5</sup> e Carrol e Paulson<sup>6</sup>. Isto ainda poderá ter se aprimorado com relação aos animais em cativeiro, onde o vírus *influenza* pôde realizar melhor sua adaptação aos receptores das células dos hospedeiros para realização da infecção viral<sup>13</sup>.

Assim, após avaliada a capacidade de reconhecimento, tanto dos receptores das hemácias dos heterotérmicos aos

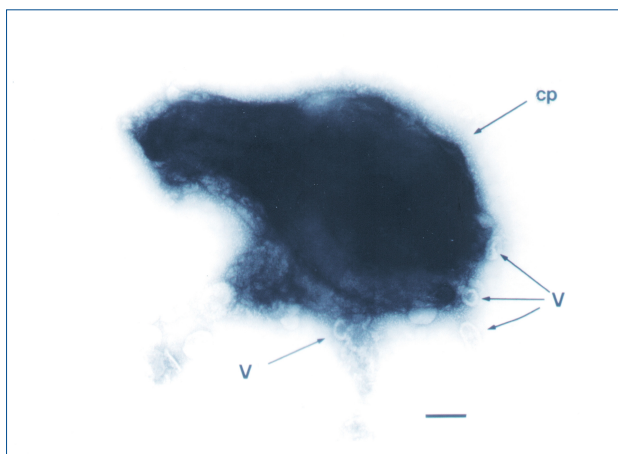


Figura 1 - Complexo antígeno-anticorpo formado pela reação do vírus influenza tipo A (Ag) com o soro de serpente (Ac).

V: Partícula viral; Cp: Complexo protéico antígeno-anticorpo intensamente contrastado pelo PTA. Aumento: 106.200X. Barra: 100nm

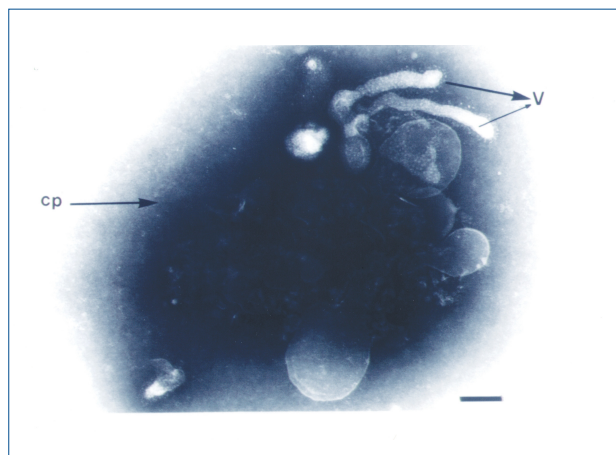


Figura 2 - Controle positivo demonstrando a reação do vírus influenza tipo A (Ag) com o soro humano (Ac).

V: Partícula viral; Cp: Complexo protéico antígeno-anticorpo também intensamente contrastado pelo PTA. Aumento: 150.000X. Barra: 100nm.

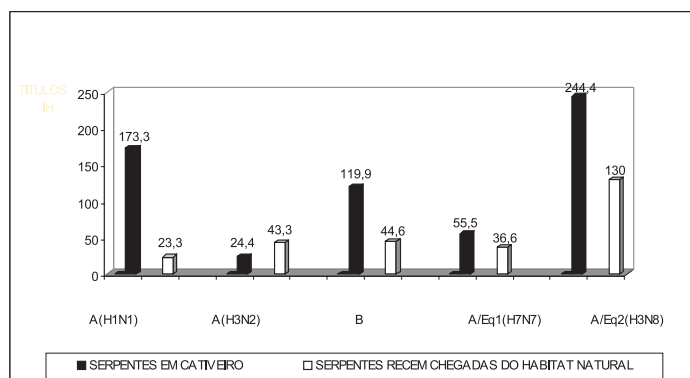


Figura 3 - Níveis de anticorpos contra diferentes cepas do vírus influenza de serpentes mantidas em cativeiro e recém-chegadas do habitat natural.

*vírus influenza*, como dos seus anticorpos específicos a estes vírus, pode-se concluir que esses animais possuem, de alguma forma, susceptibilidade à essa infecção viral. Há maior probabilidade de infectados entre aqueles mantidos em cativeiro, pois submetem-se à transmissão viral direta pelos tratadores. Porém, não se descarta esse tipo de ocorrência àqueles que ficam em habitat natural, devido à exposição a outros transmissores desses vírus, tais como as aves (patos selvagens, aves migratórias e outras), assim como mamíferos selvagens que co-habitam.

O assunto tratado neste trabalho é de muita importância epidemiológica, devido ao vírus *influenza* possuir capacidade potencial para rearranjos e recombinações genéticas, que até então estavam focalizadas em hospedeiros homotérmicos, mas que após estes resultados obtidos, também pode-se suspeitar da inclusão dos heterotérmicos neste processo. Portanto, pode-se considerar que estes animais estariam colaborando para assegurar e aumentar a característica epidêmica do vírus *influenza*, quando atingidos por este agente, o qual se apresenta de modo mais grave que aqueles que ainda não participavam da transmissão interespecífica que este vírus se utiliza para sua potencialização. De acordo com relatos<sup>15</sup>, o vírus *influenza* poderá não se restringir a transmissão ave-mamíferos, mas sim por novas espécies que possam ser os novos hospedeiros intermediários.

Através do exposto, conclui-se que a *influenza* também estaria sendo circulada entre os animais heterotérmicos. Os cuidados com estes animais em contenção ou recém-chegados de seus habitats naturais é de grande validade para ambos, tanto aos tratadores, como aos próprios animais mantidos em cativeiro, visando minimizar os problemas decorrentes do caráter epidêmico do vírus *influenza*.

Este trabalho colaborou com os estudos sobre hospedeiros desconhecidos do vírus *influenza*, entre os animais heterotérmicos, em território Brasileiro.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos às Biólogas Simone Nogueira, Oilita Pereira Ferraz, à Médica Veterinária Kathleen Fernandes Grego e à Luzia da Purificação, pelo apoio técnico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahne W, Batts WN, Kurath G, Winton JR. Comparative sequence analyses of sixteen reptilian paramyxoviruses. *Virus Research* 63: 65-74, 1999.
- Ahne W, Mayr A. Reptilian paramyxoviruses induce cytokine production in human leucocytes. *Comparative Immunology and Microbiology in Infectious Diseases* 23: 9-13, 2000.
- Azevedo IL J, Silva ARP, Carmona E, Ho PL. Characterization of a Paramyxovirus from a Fer de Lance viper (*Bothrops jararaca*): partial nucleotide sequence of the putative fusion protein. *Archives of Virology* 146: 51-57, 2001.
- Bossart W, Meyer J, Bienz K. Electron microscopy study on influenza virus hemagglutination: Pinocytosis of virion by red cells. *Virology* 55: 295-298, 1973.
- Carroll SM, Higa HH, Paulson JC. Different cell-surface receptor determinants of antigenically similar influenza virus hemagglutinins. *The Journal of Biological Chemistry* 256: 8357-8363, 1981.
- Carroll SM, Paulson JC. Differential infection of receptor-modified host cells by receptor-specific influenza viruses. *Virus Research* 3: 165-179, 1985.
- Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 15: 17-23, 1994.
- Doane FW, Anderson N. *Electron Microscopy in Diagnostic Virology. A Practical Guide and Atlas*. 1<sup>st</sup> edition, Cambridge University Press, p.178, 1987.
- Franke J, Essbauer S, Ahne W, Blahak S. Identification and molecular characterization of 18 paramyxoviruses isolated from snakes. *Virus Research* 80: 67-74, 2001.
- Howe C, Lee LF. Virus - erythrocyte interactions. *Advances in Virus Research* 17: 1-50, 1972.
- Ito H, Suzuki Y, Mitnaul L, Vines A, Kida H, Kawaoka T. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology* 227: 493-499, 1997.
- Ito Y, Yamamoto E, Tacaño M, Maeno K, Shimokata K, Inuma M, Hara K, Iijima S. Comparative studies on the distribution mode of orthomyxo - virus and paramyxo - virus receptor possessing cells in mice and birds. *Medical Microbiology and Immunology Berl* 171: 59-68, 1982.
- Kido H, Niwa Y, Beppu Y, Towatari T. Cellular proteases involved in the pathogenicity of enveloped animal viruses, human immunodeficiency virus influenza A and Sendai virus. *Advances in Enzyme-Regulation* 36: 325-342, 1996.
- Mancini DAP, Cianciarullo AM, Mendonça RMZ, Dias ALE, Pinto JR, Beçak W. Antigenic homology between two strains of A-Influenza virus by serological tests and visualization of antigen antibody complex by electron microscopy. *Virus Reviews and Research. Journal of the Brazilian Society of Virology* 7: 31-40, 2002.
- Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens and wild birds have distinguishable properties. *Journal of Virology* 73: 1146-1155, 1999.
- Richter GA, Homer BL, Moyer SA, Williams DS, Scherba G, Tucker SJ, Hall BJ, Pedersen JC, Jacobson ER. Characterization of paramyxoviruses isolated from three snakes. *Virus Research* 43: 77-83, 1996.
- Schwarz K. Oxidative stress during viral infection: A Review. *Free Radical Biology & Medicine* 21: 641-649, 1996.
- Takatsy G. The use of spiral loops in serological and virological micro-methods. *Acta Microbiologica* 3: 191, 1955.
- Ueda M, Hatune T, Kisielius JJ, Pires CM De F, Weigl DR. Importance of electron microscopy and its contribution to viral diagnosis. *Virus Reviews and Research Journal of the Brazilian Society of Virology* 3: 9-36, 1998.