

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA  
INFLUENZA A SUÍNA, BRASIL, 2009-2010

TATIANE TERUMI NEGRÃO WATANABE

PORTO ALEGRE  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA  
INFLUENZA A SUÍNA, BRASIL, 2009-2010

TATIANE TERUMI NEGRÃO WATANABE

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE  
2012

### CIP - Catalogação na Publicação

Negrão Watanabe, Tatiane Terumi  
Caracterização histológica e imuno-histoquímica da  
influenza A suína, Brasil, 2009-2010 / Tatiane Terumi  
Negrão Watanabe. -- 2012.  
51 f.

Orientador: David Driemeier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Revisão Bibliográfica. 2. Artigo. 3. Discussão  
Geral. 4. Figuras Adicionais. 5. Conclusões. I.  
Driemeier, David , orient. II. Título.

TATIANE TERUMI NEGRÃO WATANABE

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA  
INFLUENZA A SUÍNA, BRASIL, 2009-2010

Aprovado em 10 de fevereiro de 2012

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. David Driemeier  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Cláudio Estevão Farias da Cruz  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Glaucia Denise Kommers  
Membro da Comissão

## **DEDICATÓRIA**

“Dedico este estudo a todas as pessoas que um dia possam usufruir da melhor maneira possível de todas as informações nele contido”



dificuldade. Por terem me dado a oportunidade de aprender a lidar com a individualidade de cada um, o que é uma das maiores virtudes para o ser humano.

À Prof. Elsa Mundstock e sua equipe, pelas análises estatísticas do “Núcleo de Assessoria Estatística” da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos amigos de longe, mas que sempre ficaram por perto, Guilherme Dias de Melo e Rafael Costa, por todas as palavras de conforto e alegria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para meu aprendizado.

“E que a adversidade seja contrariada com um sorriso verdadeiro do esclarecimento e da humildade de espírito”.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>9</b>
<b><i>ABSTRACT</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Etiologia .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Epidemiologia .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Patogenia.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Sinais clínicos.....</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Achados de necropsia e histológicos .....</b>	<b>17</b>
<b>2.6 Diagnóstico.....</b>	<b>18</b>
<b>3. ARTIGO.....</b>	<b>20</b>
<b>4. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>40</b>
<b>5. FIGURAS ADICIONAIS .....</b>	<b>444</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA INFLUENZA A SUÍNA NO BRASIL, 2009-2010

A influenza suína (IS) é uma doença altamente contagiosa, de curso rápido e pronta recuperação, causada pelo vírus Influenza tipo A (VIS). Os principais sinais clínicos são tosse, febre, anorexia e baixo desenvolvimento. A doença está presente em outros países e, geralmente, está associada com outros agentes infecciosos. Porém, no Brasil, a sua primeira descrição ocorreu em 2011 e foi associada ao vírus H1N1 pandêmico (pH1N1). O principal objetivo deste estudo foi caracterizar as alterações histológicas mais importantes em casos de doença respiratória suína sugestiva de IS e estudar a associação dessas alterações com os resultados de imuno-histoquímica (IHQ) anti-vírus da influenza A (VIA), anti-circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e anti-vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV). Para tanto, foram estudadas 60 amostras de pulmões suínos selecionadas dos materiais do arquivo do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), de casos de doença respiratória remetidos no período de 2009 a 2010 e que apresentavam alterações histopatológicas compatíveis com pneumonia viral causada pelo VIS. Trinta e uma amostras (52%) foram provenientes do estado do Rio Grande do Sul, 14 (23%) do Paraná, 11 (18%) de Santa Catarina e quatro (7%) do Mato Grosso do Sul. A IHQ para IA confirmou a presença do agente viral em 45% das amostras analisadas. Os achados histológicos mais significativos associados à IHQ positiva para IA foram bronquiolite necrótica, atelectasia, broncopneumonia purulenta e hiperemia. Por outro lado, as alterações histológicas dos pulmões estudados mais significativamente associadas à IHQ negativa para IA foram hiperplasia dos pneumócitos tipo II, estruturas alveolares e bronquiolares similares a pólipos, hiperplasia de tecido linfoide associado a brônquios (BALT) e pleurite, que são alterações associadas a processos crônicos. Somente dois casos apresentaram marcação positiva na IHQ para PCV2 e nenhum pulmão foi positivo para PRRSV. Esses resultados sugerem que as lesões histológicas encontradas no presente estudo foram compatíveis com as causadas pelo VIS. Os casos negativos de IHQ para IA (55%) podem ser explicados pela baixa frequência do antígeno viral nos tecidos estudados. Como o curso da doença é muito rápido, o teste de IHQ é mais indicado para diagnóstico no início da infecção. Este estudo evidenciou novas alterações em amostras de pulmões de suínos com problemas respiratórios enviadas para o SPV-

UFRGS a partir de 2009, com ênfase para bronquiolite necrótica, e reforça a importância do estudo histopatológico dos casos de campo para auxiliar na monitoria da sanidade dos rebanhos.

**Palavras-chave:** Suínos, vírus influenza A, bronquiolite necrótica, histopatologia, imunohistoquímica.

## ***ABSTRACT***

### HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SWINE INFLUENZA A IN BRAZIL, 2009-2010

Swine influenza is caused by swine influenza type A virus (SIV). It is a highly contagious disease with a rapid course and recovery. The main clinical signs are cough, fever, anorexia and poor performance. Usually, it is associated with other infectious agents in many countries; however, it has not been described yet in Brazil. The first report of pandemic H1N1 influenza A virus in Brazilian swine herd occurred in 2011. The main aim of this study was to characterize histological features in association with immunohistochemical (IHC) results for influenza A (IA), porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from lung samples from 60 pigs with lesions suggestive of viral pneumonia and collected during the period 2009-2010 and diagnosed at the Setor de Patologia Veterinária of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), Brazil. All the pigs in this study had clinical respiratory disease. Sample distribution was 31 (52%) from Rio Grande do Sul, 14 (23%) Paraná, 11 (18%) from Santa Catarina State and four (7%) from Mato Grosso do Sul State. Positive anti-IA IHC was observed in 45% of the cases and was associated with necrotizing bronchiolitis, atelectasia, purulent bronchopneumonia and hyperemia. Moreover, type II pneumocyte hyperplasia, alveolar and bronchiole polyp-like structures, BALT (bronchus-associated lymphoid tissue) hyperplasia and pleuritis were the significant features of negative samples by anti-IA IHC, which were associated with chronic lesions. Only two cases were positive to PCV2 and none to PRRSV, supports the hypothesis that SIV was the viral agent infecting swine's lungs. Negative IHC to IA (55%) cases could be explained due to the absence of viral antigens associated with the rapid progress of SI; hence, IHC should be requested in the beginning of the infection. This work has shown how important a careful histological evaluation should be done in order to give the diagnosis. Since 2009, a new histological feature of swine pneumonia from animals with respiratory clinical sign has been observed at samples submitted to SPV-UFRGS. In addition, these results described here proved the importance of histological evaluation in swine herd health management.

**Key words:** Swine, influenza A virus, necrotizing bronchiolitis, histopathology, immunohistochemistry.

## INTRODUÇÃO

Influenza suína (IS) é uma doença viral, altamente contagiosa, diagnosticada em todo o mundo. É induzida pelo vírus da influenza suína tipo A (VIS) e determina problemas respiratórios agudos em suínos.

IS se espalha rapidamente pelo rebanho, com isto pode acometer animais de todas as idades e toda a granja ficar infectada. O curso da doença é rápido e os animais infectados se restabelecem em poucos dias. A morbidade é alta, porém a mortalidade é baixa quando não existem complicações. Dada a patogenia do VIS, ocorre predisposição a infecções bacterianas secundárias e, desta forma, elevação nos índices de mortalidade.

Pelo potencial zoonótico, a IS se torna uma das doenças de maior preocupação nos últimos tempos, tendo em vista a pandemia que ocorreu em 2009. Desta forma, torna-se necessária a inclusão de programas de controle e de prevenção.

A importância econômica se dá principalmente por perda de peso apresentada pelos suínos afetados, como também pela baixa eficiência alimentar e gastos com medicamentos para o tratamento de infecções secundárias.

Os principais sinais clínicos incluem tosse, dispneia, exsudação nasal, febre, anorexia.

A severidade dos sinais clínicos e das lesões é dependente da amostra viral envolvida, da ocorrência de infecções secundárias, da idade do animal, de condições imunológica e climáticas e de fatores estressantes.

IS tem sido associada a outros agentes infecciosos, como vírus da síndrome reprodutiva suína (PRRSV), circovírus suíno tipo 2 (PCV-2), vírus da Doença de Aujeszky, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, agentes envolvidos no Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS), já diagnosticado nos EUA e em países da Europa.

O primeiro relato no Brasil de influenza suína pandêmica (pH1N1) ocorreu em 2011, com um surto em 2010. Anteriormente, a presença do vírus foi comprovada somente por teste sorológico, quando foram detectados anticorpos anti-H1 e anti-H2 nos rebanhos brasileiros, todavia com ausência de sinais clínicos ou lesões macroscópicas e microscópicas significativas.

Os objetivos do presente estudo foram (a) descrever as principais alterações histológicas encontradas em pulmões de suínos analisados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 2009 e 2010, com o diagnóstico compatível com pneumonia viral; (b) investigar, por imunohistoquímica (IHQ), a presença de possíveis agentes virais envolvidos na pneumonia identificada e (c) estudar a associação das alterações histológicas encontradas com os resultados da IHQ. As conclusões obtidas visam contribuir para o diagnóstico morfológico da IS no Brasil.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Etiologia

A influenza suína (IS) é causada pelo vírus da influenza suína (VIS), o qual pertence ao gênero *Influenzavírus A* (IA), família *Orthomyxoviridae*. Os outros gêneros dessa família são *Influenzavírus B* (IB), *Influenzavírus C* (IC) e *Thogotovírus* (THOMSOM & EASTERDAY, 2004; MACLACHLAN & DUBOVI, 2011).

Há diferença nos hospedeiros acometidos por cada um dos gêneros; suínos, equinos, focas, baleias, aves e seres humanos se infectam com IA; IB é patógeno somente para os humanos, enquanto o IC acomete tanto humanos como suínos, porém sem gravidade. Os vírus do gênero *Thogotovírus* são transmitidos por insetos (arbovírus) (OLSEN *et al.* 2006).

O genoma viral é constituído por 7 a 8 segmentos de RNA fita simples de orientação negativa, que são interligados e protegidos por nucleoproteína. Por essas características próprias, o vírus apresenta grande variabilidade genética e antigênica. As variações genéticas ocorrem por *shift* e *drift* (SCHNITZLER & SCHNITZLER, 2009).

Dentre as proteínas produzidas pelo material genômico viral está a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (N), as quais são utilizadas como base para a nomenclatura dos subtipos, conforme as características antigênicas por elas expressas (CASWELL & WILLIAMS, 2007).

Os IA apresentam ampla variabilidade antigênica e podem ser classificados em subtipos, dependendo da reatividade sorológica das glicoproteínas HA e N. Existem 16 variantes de HA e 9 de N; em vista disso elas são identificadas como H1, H2, ..., H16 e N1, N2, ..., N9 (MACLACHLAN & DUBOVI, 2011). Além dessa variabilidade, ocorrem também modificações ao longo do tempo, características de vírus RNA de cadeia simples. As mais suscetíveis são HA e N.

*Drift* é a ocorrência de mutações pontuais e menores. Ocorre maior alteração na produção das proteínas HA e N, portanto, podem alterar os epítomos de reconhecimento viral e, conseqüentemente, favorecer o escape imunológico (SCHNITZLER & SCHNITZLER, 2009).

Outro fenômeno conhecido é *shift* ou rearranjo genético (*genetic reassortment*). Os dois acontecimentos são os maiores responsáveis pela variabilidade genética e contribuem para o aparecimento de novo tipos virais e, conseqüentemente, possíveis

pandemias, como no caso pH1N1. O novo vírus causou grande calamidade em humanos e foi associado a problemas respiratórios tanto em humanos como em suínos, o qual foi primeiramente relatado em abril e maio de 2009, respectivamente (EVANS, 2009).

No Brasil, o primeiro surto em rebanho suíno ocorreu em 2010 associado ao pH1N1 (SCHAEFER *et al.* 2011). Até então, embora trabalhos de soroprevalência confirmassem a presença de anticorpos anti-VIS (BRENTANO *et al.* 2002), nenhum suíno havia sido diagnosticado efetivamente como doente por infecção pelo VIS e não havia registro de quaisquer lesões macroscópica e/ou microscópica.

## **Epidemiologia**

IS tem distribuição mundial. Existem relatos em pelo menos 25 países, como por exemplo, nos EUA, no Reino Unido, na Alemanha, na França, na Polônia, no Japão e no Brasil. Os subtipos virais circulantes nos EUA são H1N1, H3N2 e H1N2 (REETH *et al.* 2008).

A via de transmissão mais importante do vírus é o contato direto (focinho-focinho) de suínos infectados com suínos suscetíveis. Gotículas ou partículas de aerossóis com vírus também podem entrar via nasofaringeana. Fômites e secreções ressecadas contaminadas também podem servir de fontes de infecção (CASWELL & WILLIAMS, 2007). Embora seja pouco comum, foi demonstrado que humanos infectados com pH1N1 podem transmitir VIS para os suínos (FORGIE *et al.* 2011).

A forma endêmica da doença pode afetar tanto animais de creche como os de terminação, mas toda a cadeia produtiva poderá infectar-se. Animais na faixa etária de 50 a 150 dias são os mais suscetíveis (SANTOS & GUEDES, 2011).

IS apresenta mortalidade baixa ou ausente quando atua sozinha. Por outro lado, ocorre alta mortalidade quando está associada a outros agentes infecciosos, tanto por co-infecção formando o CDRS, termos muito utilizados nos EUA e Europa, ou por consequência de infecções bacterianas secundárias (CASWELL & WILLIAMS, 2007; FABLET *et al.* 2010).

No Brasil, o primeiro relato que identificou este vírus emergente nos rebanhos ocorreu em um surto em 2010 (SCHAEFER *et al.* 2011).

VIS, vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV), circovírus suíno tipo 2 (PCV2), *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma hyopneumoniae* são os

agentes mais importantes isolados no CDRS nos EUA, o qual afeta principalmente suínos de terminação de 14 a 22 semanas de idade. Como consequência, significativas perdas econômicas são relatadas (GRAU-ROMA & SEGALÉS, 2007; VINCENT *et al.* 2008).

A associação do VIS com CDRS não havia sido relatada no Brasil, diferente de outros países. Apesar de estudos sorológicos terem demonstrado a circulação viral em rebanhos suínos brasileiros, os animais não apresentavam sinal clínico ou lesão significativa (BRENTANO *et al.* 2002).

Rebanhos suínos comerciais em países como Canadá, EUA, México, Cuba, Argentina, Itália, Dinamarca, Reino Unido, Noruega, Singapura já confirmaram animais infectados pelo vírus da influenza A pandêmico (pH1N1) (CDC, 2009; BROOKES & BROWN, 2011; KIM *et al.* 2011).

## **Patogenia**

Infecções por VIS geralmente são limitadas ao trato respiratório dos suínos. A proteína HA presente no envelope viral está envolvida na adesão do vírus no epitélio respiratório. Após a entrada na célula, ocorre rápida replicação viral. O vírus replica principalmente nos pulmões, mas também podem ser identificado em mucosa nasal, tonsilas, traqueia e linfonodos traqueobrônquios de animais doentes. Desta forma, a maior excreção viral ocorre por exsudação nasal (THOMSON & ESTERDAY, 2004).

Estudo sugere que ocorre produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) e interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), as quais contribuem para o efeito inflamatório no tecido pulmonar (SRETA *et al.* 2009).

Aproximadamente 24h após infecção ocorre o pico de replicação viral e consequentes produção e liberação de citocinas. A seguir observam-se inflamação pulmonar e episódio de febre e anorexia (FLORES *et al.* 2007).

O vírus pode ser encontrado em células de brônquios, bronquíolos, pneumócitos e macrófagos alveolares e intersticiais (SRETA *et al.* 2009).

Uma vez que a replicação viral ocorre no epitélio respiratório, a proteção mucociliar fica comprometida e, desta forma, outros agentes infecciosos podem atuar, como PRRSV, *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus*

*pleuropneumoniae* e *Arcanobacterium pyogenes* (YAZAWA *et al.* 2004; OLSEN *et al.* 2006; CASWELL & WILLIAMS, 2007).

Os anticorpos maternos contra VIS podem permanecer até quatro meses nos leitões (FLORES *et al.* 2007; LINHARES & VANNUCCI, 2011).

Mães imunizadas desenvolvem imunidade e a transferem para sua progênie. Assim, filhotes de mães previamente imunizadas apresentam proteção conferida pela imunidade materna transferida e é improvável que desenvolvam quadros agudos nos primeiros dias de vida (OLSEN *et al.* 2006).

Todavia, a manifestação da doença associada a VIS está relacionada ao tipo viral envolvido, ao hospedeiro (imunidade e idade, condição corporal) e à imunidade do rebanho ao agente viral envolvido (ZANELLA, 2007).

Leitões lactentes podem se infectar e excretar material viral, porém a gravidade dos sinais clínicos e a quantidade de vírus excretada serão menores se tiverem sido pré-imunizados (FLORES *et al.* 2007).

### **Sinais clínicos**

Os principais sinais clínicos apresentados por suínos infectados por VIS são febre, tosse, dispneia, anorexia e prostração, geralmente após um período de incubação (PI) de 24-72h (MACLACHLAN & DUBOVI, 2011); embora haja descrição de 2 a 7 dias (ZANELLA, 2007). O aparecimento dos sinais é súbito e é afetada a maioria dos animais do rebanho. Posteriormente existe rápida recuperação; a maioria dos animais evolui para a cura em até sete dias, a partir do primeiro sinal clínico (THOMSON & EASTERDAY, 2004).

### **Achados de necropsia e histológicos**

As lesões macroscópicas são principalmente pulmonares, com de distribuição lobular, atelectasia, enfisema e consistência firme. Geralmente essas alterações se restringem aos lobos apicais e cardíaco, porém podem ser difusas. As vias respiratórias podem conter exsudato sanguinolento. Linfonodos regionais e mediastinais podem estar moderadamente aumentados de volume e avermelhados (CASWELL & WILLIAMS, 2007).

Alterações histológicas como degeneração e necrose do epitélio respiratório, com obstrução das vias aéreas pelo exsudato, são as alterações mais significativas. Pode ocorrer também pneumonia intersticial difusa, a qual inicia principalmente com infiltrado inflamatório neutrofílico, sucedido por infiltrado macrofágico. Com isto, a barreira alveolar pode ficar espessada em 85% dentro de 96h do início da infecção, o que pode prejudicar ainda mais as trocas gasosas. O lúmen bronquiolar pode ficar obstruído por exsudato, com formação de atelectasia obstrutiva (LÓPEZ, 2012).

Hiperemia e edema pulmonares difusos acentuados podem ocorrer em casos mais graves. É importante salientar que, na observação de bronquiolite necrótica em suínos, IS é importante suspeita diagnóstica (CASWELL & WILLIAMS, 2007).

### **Diagnóstico**

Doença respiratória aguda e disseminada, com aparecimento súbito, pode ser Influenza. A confirmação laboratorial é necessária para confirmação definitiva do VIS estar infectando o rebanho, pois infecções subclínicas ou aparecimento de sinais clínicos menos típicos podem ocorrer. A maior frequência de casos descrita ocorre nos meses mais frios do ano (MARKS & CANAL 2010).

Para detecção dos antígenos do IA em amostras fixadas em formol tamponado, incluídas em parafina, o teste de IHQ mostrou ser uma ferramenta eficiente com sensibilidade igual ao teste de isolamento viral e melhor que o exame de imunofluorescência (HAINES *et al.* 1993; VINCENT *et al.* 1997). Uma grande vantagem é a possibilidade de associar a presença viral com as lesões histológicas encontradas nos tecidos; é possível associar o agente às lesões.

As limitações da utilização da IHQ estão relacionadas ao tempo da coleta dos pulmões; como a doença tem curso rápido e o antígeno viral só fica até 72h no tecido pulmonar, há risco de não ocorrer marcação pelo fato de não haver mais vírus no tecido. Além disto, é importante fazer a coleta do tecido corretamente, além de fixação adequada, que deve ser realizada em solução de formol a 10% tamponado (CASWELL & WILLIAMS, 2007). Históricos clínico e sanitário da granja são de especial importância para o diagnóstico correto.

O diagnóstico também pode ser feito por ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) com amostras de soro, PCR (Reação em Cadeia da

Polimerase), ou isolamento viral, no qual o material de escolha pode ser muco ou exsudato nasal ou faringeal, colhido no início do período febril (ZANELLA, 2007).

Os diagnósticos diferenciais incluem investigação para pneumonia enzoótica suína, pasteurelose, peste suína clássica, septicemia por infecções bacterianas, doença de Aujeszky, PRRSV e PCV2 (CASWELL & WILLIAMS, 2007).

## **ARTIGO**

**Neste item é apresentado o artigo intitulado “Histopathological and immunohistochemical characterization of swine influenza A in Brazil, 2009-2010”, o qual foi redigido segundo as normas do periódico Pesquisa Veterinária Brasileira ao qual deve ser submetido.**

Trabalho.....

**Histopathological and immunohistochemical characterization  
of swine influenza A in Brazil, 2009-2010<sup>1</sup>**

Tatiane T. N. Watanabe<sup>2</sup>, Laura L.de Almeida<sup>2</sup>, Flademir Wouters<sup>2</sup>, Angelica T. B. Wouters<sup>2</sup>, Priscila Zlotowski<sup>2</sup> and David Driemeier<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.**-Watanabe T.N.W., Almeida L.L., Wouters F., Wouters A.T.B., Zlotowski P. & Driemeier D.2012.[**Histopathological and immunohistochemical characterization of swine influenza A in Brazil, 2009-2010.**] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(00):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

Swine influenza is caused by the type A swine influenza virus (SIV). It is a highly contagious disease with a rapid course and recovery. The major clinical signs and symptoms are cough, fever, anorexia and poor performance. The disease has been associated with other co-infections in many countries, but not in Brazil, where, however, the first outbreak has been reported in 2011. The main aim of this study was to characterize the histological features in association with the immunohistochemical (IHC) results for influenza A (IA), porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in lung samples from 60 pigs affected with lesions suggestive of viral pneumonia and submitted to Setor de Patologia Veterinária at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), Brazil, during 2009-2010. Pigs in this study had showed clinical signs of a respiratory infection. Swine samples originated from Rio Grande do Sul (31-52%), Santa Catarina (14-23%), Paraná (11-18%), and Mato Grosso do Sul (4-7%). Positive anti-IA IHC labelling was observed in 45% of the cases, which were associated with necrotizing bronchiolitis, atelectasis, purulent bronchopneumonia and hyperemia. Moreover, type II pneumocyte hyperplasia, alveolar and bronchiolar polyp-like structures, bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) hyperplasia and pleuritis were the significant features in negative anti-IA IHC, which were also associated with chronic lesions.

There were only two cases with positive anti-PCV2 IHC and none to PRRSV. Therefore, SIV was the predominant infectious agent in the lung samples studied. The viral antigen is often absent due to the rapid progress of SI, which may explain the negative IHC results for IA (55%); therefore, IHC should be performed at the beginning of the disease. This study has shown how important a careful histological evaluation is for the diagnosis. Since 2009, a new histological feature of swine pneumonia in animals with respiratory clinical signs has been observed in samples from pigs with clinical respiratory disease submitted to SPV-UFRGS. In addition, the results proved the importance of histological evaluation for swine herd health management.

INDEX TERMS: Swine, influenza A virus, necrotizing bronchiolitis, histopathology, immunohistochemistry.

**RESUMO.**-Influenza suína (IS) é uma doença altamente contagiosa, de curso rápido e pronta recuperação, causada pelo vírus influenza tipo A (SIV). Os principais sinais clínicos são tosse, febre, anorexia e baixo desenvolvimento. A doença está presente em outros países e, geralmente, está associada com outros agentes infecciosos. Porém no Brasil, a sua primeira descrição ocorreu em 2011 e foi associada ao vírus H1N1 pandêmico (pH1N1). O principal objetivo deste estudo foi caracterizar as principais alterações histológicas em casos de doença respiratória suína sugestiva de IS e estudar a associação dessas alterações com os resultados de imuno-histoquímica (IHQ) anti-vírus da influenza A (VIA), anti-circovírus suíno tipo 2 (PVC2) e anti-vírus da síndrome reprodutiva e respiratória (PRRSV). Para tanto, foram estudadas 60 amostras de pulmões suínos selecionadas dos materiais do arquivo do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), de casos de doença respiratória remetidos no período de 2009 a 2010 e que apresentavam alterações histopatológicas compatíveis com pneumonia viral causada pelo SIV. Trinta e uma amostras (52%) tiveram origem no estado do Rio Grande do Sul, 14 (23%) do Paraná, 11 (18%) de Santa Catarina e quatro (7%) do Mato Grosso do Sul. A IHQ para IA confirmou a presença do agente viral em 45% das amostras analisadas. Os achados histológicos mais significativos associados à IHQ positiva para IA foram bronquiolite necrótica, atelectasia, broncopneumonia purulenta e hiperemia. Por outro lado, as alterações histológicas dos pulmões estudados, mais significativamente associadas às

IHQ negativa para IA foram hiperplasia dos pneumócitos tipo II, estruturas similares a pólipos em alvéolo e bronquíolo, hiperplasia de tecido linfoide associado a brônquios (BALT) e pleurite, que são alterações associadas a processos crônicos. Somente dois casos apresentaram marcação positiva na IHQ para PCV2 e nenhum pulmão foi positivo para PRRSV. Esses resultados sugerem que as lesões histológicas encontradas no presente estudo foram, predominantemente, causadas pelo SIV. Os casos negativos de IHQ para IA (55%) podem ser explicados pela ausência do antígeno viral nos tecidos estudados. Como o curso da doença é muito rápido, o teste de IHQ é mais indicado para diagnóstico no início da doença. Com este estudo foi possível demonstrar que um conjunto de novas alterações histológicas pulmonares de suínos com problemas respiratórios foi observado em amostras enviadas para SPV-UFRGS a partir de 2009. O presente trabalho também reforça a importância de estudos histopatológicos dos casos de campo para auxiliar na monitoria da sanidade dos rebanhos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Suínos, vírus influenza A, bronquiolite necrótica, histopatologia, imuno-histoquímica.

## INTRODUCTION

Swine influenza (SI) is a highly contagious and acute respiratory disease of pigs caused by swine influenza type A virus (SIV) (Thomsom & Easterday 2004, MacLachlan & Dubovi 2011). The virus has a short incubation period of 1-3 days and a rapid recovery of 5-7 days (Olsen et al. 2006). SI has a low mortality that occurs only in uncomplicated outbreaks. Economic losses are due to severe weight loss or a reduced weight gain in the affected animals of the herd (Olsen et al. 2006, Torremorell 2011, López 2012).

SI has been described in many countries with swine respiratory disease or porcine respiratory disease complex (PRDC) (Reeth et al. 2008) but has not been reported in Brazil yet. Economic losses and the zoonotic potential are important concerns when SIV affects pigs in the herd (Schnitzler & Schnitzler 2009, Belser et al. 2010, Zanella 2011).

Gathering accurate data from a serological survey demonstrated that different influenza virus strains were circulating around the pig herds of Brazil without any clinical signs (Brentano et al. 2002, Zanella et al. 2011). In 2010, the first outbreak of an

acute respiratory disease in pigs associated with SIV was registered, which was isolated from the pandemic H1N1 influenza virus (pH1N1) was reordereed (Schaefer et al. 2011).

Pulmonary lobular atelectasis with a cranioventral distribution without any secondary infection is the main finding of SI (Thomsom & Easterday 2004). The most important histologic finding is the epithelial necrosis in the bronchi and bronchioles, which represents cell lysis due to influenza A (IA) infection (Caswell & Williams 2007).

Immunohistochemistry (IHC) demonstrates the association between the virus and tissue lesions (López 2012); therefore, it associates cause with effect and has been shown to be a useful tool for detecting IA (Haines et al. 1993, Vincent 1997). The antigen of IA could be demonstrated in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Furthermore, IHC appears to have nearly equal sensitivity with the virus isolation and is better than immunofluorescence (Vincent et al. 1997).

Moreover, IHC does not require virus manipulation; therefore, the process is more secure than viral isolation. In addition, samples fixed in a formalin solution are much easier to work with than fresh or frozen materials (Silveira et al. 2011).

This study aimed to describe the main histological features associated with IHC findings in porcine pneumonia due to SIV and to investigate the occurrence of co-infections between SIV and others viral agents causing pneumonia in Brazilian pigs. In addition, whether there was a co-infection with different viral agents was investigated.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sample selection**

From July 2009 to December 2010, 124 pig lung samples with a previous histological diagnosis of viral pneumonia, likely previous SIV infection were studied. Samples originated from different farms in different states from Brazil. Sixty samples (40 from anatomopathological tests and 20 from necropsies) were retrieved from the archives of the Setor de Patologia Veterinária of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Data regarding the origin of the herd and the age of the affected animals were collected.

Four porcine categories were used to standardize the affected pigs by age. The pigs were classified into the following categories: farrowing (< 21 days old), nursery

(21-60 days old), growing-finishing (> 60 days old), and information not provided (IN) when there was no data available.

### **Histopathological studies**

The lung samples were fixed in a 10% phosphate-buffered formalin solution, embedded in paraffin wax, cut into 3-5- $\mu$ m-thick sections, and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological examination.

The sections were systematically examined by evaluating all of the lung tissue structures (bronchi, bronchioli, alveoli and pleura) (Hansen et al. 2010). The inflammatory infiltrate was evaluated in the alveolar exudates (Bochsler & Slauson, 2002), within the mucosa of the bronchi and bronchioles, vessels and surrounding tissue. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) changes were graded according to Ross (1999). Hyperplasia of type II pneumocytes was reported if more than 3% of the alveolar surface area was lined by these cells (Plopper & Adams, 2006).

A Masson's trichrome stain was performed to elucidate the connective tissue proliferation (Hansen et al. 2010). The histological features were classified into the following two groups: negative (-) when there was a lack of or a weak intensity, or positive (+) with a moderate or marked intensity.

The BALT evaluation was considered negative for grades (0), (+) and (++); grades (+++) and (+++++) were considered positive.

### **Immunohistochemistry to detect IA, PCV-2, PRRSV and cytokeratin**

The sample sections were placed on poly-L-lysine-coated glass slides and heated in a heater at 57°C until completely dry for the IHC procedures.

A biotin-streptavidin-peroxidase kit (LSAB kit + System-HRP, Dako®, Carpinteria, CA) was used to demonstrate SIV, PCV2, and PRRSV and identify possible associated viral pathogens. To confirm the presence of type II pneumocyte hyperplasia, IHC for cytokeratin (CK) was applied.

Endogenous peroxidase activity was inhibited by immersing the tissue sections in a 10% hydrogen peroxide methanol solution for 10 minutes. Antigen retrieval was performed with an enzymatic treatment using 0.05% protease XIV Sigma® for 25 minutes at 37°C for IA, 15 minutes at room temperature for PCV2, proteinase K *ready-to-use* (Dako®, Carpinteria, CA) for 3 minutes at room temperature for PRRSV and citrate buffer, pH 6.0, at 125°C, for 3 minutes for CK.

The slides were incubated with primary antibodies overnight at 4°C with polyclonal antibodies, including anti-IA (Millipore, dilution 1:800) and anti-PCV2 (Sorden et al. 1999, dilution 1:1000). Monoclonal antibodies to anti-PRRSV (Rural Technologies, SDOW17, Nelson et al., 1993, dilution 1:800) and anti-CK (Dako, clone AE1/AE3, dilution 1:80) were made. The chromogen used was 3,3-diaminobenzidine (Dako®, Carpinteria, CA) with Harris' hematoxylin as the counterstain.

Positive immunostaining to SIV was evaluated according to the structure. In this case, the immunostaining was classified into the epithelium of bronchi and/or bronchioles, and/or macrophages. Antigens to PRRSV and PCV2 detected by IHC were negative (-) or positive (+).

### **Statistical analyses**

To verify the significance between the histological features and IHC results, the data were statistically analyzed using a Chi-squared test or a Fisher's exact test when needed due to a small sample size. In addition, the adjusted residuals were analyzed when necessary. All analyses were performed with SPSS version 18.  $P < 0.005$  was considered significant.

## **RESULTS**

The animal age categories were correlated with the Brazilian States for each herd, according to their geographic origin (Table 1). The evaluated samples included four states. Rio Grande do Sul had the highest prevalence of SIV-affected pig samples in the study. Possibly this predominance was linked to the greater number of samples in comparison with other states. The percentages from Parana, Santa Catarina, and Mato Grosso do Sul were 23, 18, and 7%, respectively (Table 1). The affected animals according their age-category-production stage are shown in Table 2.

IA antigens were detected by IHC in the lung tissues of 45% of the cases studied (Table 2). This represents every single case that had at least one bronchiolar epithelial cell marked. The positive immunostaining was divided into the following categories: solely bronchioles, bronchi and bronchioles, bronchioles and macrophages, and positive on all structures (bronchi, bronchioles and macrophages). In the bronchioles only, 22% (6/27) of the samples were positive; 18% (5/27) in the bronchi and bronchioles; and 4% (1/27) in the bronchioles and macrophages. However, in the of majority cases (15/27-

56%), positive immunostaining was observed in the bronchi, bronchioles and macrophages.

An IHC-positive stain for anti-IA was often observed in the nucleus, and, in some cases, the entire cytoplasm was noted to be diffusely brown (Fig. 2a). The difference between the positive cells of the bronchi and bronchioles was well marked. A large number of positive-stained cells were observed in the bronchiolar epithelium, as compared to the bronchial epithelium. Within the age categories, 67% of the farrowing pigs had a positive IHC to IA in at least the bronchioles. Animals from the completed growth and nursery groups had a similar frequency of positive IHC, 44% and 43%, respectively (Table 2).

One out of six piglets from the farrowing group was only three days of age. The others were an average of 13 days old.

The histological findings are summarized in Tables 3 and 4. The most frequent histologic lesions observed in association with positive IHC for IA were necrotizing bronchiolitis 93% (25/27) (Fig. 1a), atelectasia 85.2% (23/27) and purulent bronchopneumonia 66.7% (18/27) (Fig. 1b). However, the least frequently associated histologic lesions were pleuritis 11.1% (3/27), BALT hyperplasia 7.4% (2/27) and alveolar or bronchiolar polyp-like structures 0% (0/27), all of which had a *P* value < 0.05. In addition, hyperemia 51.9% (14/27) and type II pneumocyte hyperplasia 37% (10/27) were also statistically significant (Table 3).

The most frequent histological findings of the IHC negative cases were interstitial pneumonia 72.7% (24/33) and emphysema 69.7% (23/33), followed by type II pneumocyte hyperplasia 63.6% (21/33) (Figs. 1d and 2b). Alveolar edema 27.3% (9/33), hyperemia 18.2% (6/33) and alveolar neutrophilic inflammatory infiltrate 0% (0/33) were less frequently observed.

Although histologic features, such as necrotizing bronchiolitis 57.6% (19/33), alveolar or bronchiolar polyp-like structures 51.5% (17/33) (Figs. 1c and 2d), atelectasis 48.9% (16/33), BALT hyperplasia (14/33), pleuritis (11/33) and purulent bronchopneumonia (19/33), had an average frequency, all of which were of significance under statistic tests (Table 4). As shown by statistical analysis, the positive anti-IA by IHC result has a positive association with necrotizing bronchiolitis, atelectasia, purulent bronchopneumonia and hyperemia. However, pleuritis, BALT hyperplasia, alveolar or bronchiolar polyp-like structures, and type II pneumocyte hyperplasia have a positive association with negative IHC results for IA, according to the adjusted values.

The IHC results for the other agents showed no positive results for PRRSV; however, only two cases 3% (2/60) had positive immunostaining to PCV2 in the lung macrophages (Fig. 2c), but no immunoreaction to IA was detected.

## DISCUSSION

During 2009-2010, SI was diagnosed in 124 lungs at SPV-UFRGS based on a histological evaluation, and 60 of these were reported in this study. SI is not restricted to only one Brazilian state. These samples originated from four different Brazilian states. It seems that large commercial swine herds have been affected.

Furthermore, in almost the same period (2009), the first case of infection by the pH1N1 virus was reported in pigs (Evans 2009). In Brazil, the infection occurred almost one year later, after the virus isolation and the disease characterization in symptomatic pigs (Schaefer et al. 2011). Since this time, a histological pattern (according to the SPV-UFRGS database) of necrotizing bronchiolitis has been observed more frequently in swine lungs.

These lesions were caused by a new virus, and the absence of immunity could explain why an acute disease was observed in each herd (Flores et al. 2007, Linhares & Vannucci 2011, Torremorell 2011). SI affected animals in all age categories, from farrowing until the end of the production cycle.

SIV transmission occurs directly from pig-to-pig by infectious droplets, aerosolization, or contact with infected secretions (Caswell & Williams 2007, López 2012). The three-day-old piglet in the farrowing group may be infected soon after birth. Studies show that the incubation period is 2-3 days (MacLachlan & Dubovi 2011), 1-4 days (Sreta et al. 2009), or even 1-3 days (Canal 2006, Olsen et al. 2006). These data show that even after a few moments of birth, piglets could be infected.

Although the severity of SI may be enhanced by viral co-infections (Yazawa 2004, Olsen et al. 2006, Grau-Roma 2007), very few cases had a positive immunoreaction to PCV-2. Preventative methods used in most commercial Brazilian herds, such as vaccinations used in other countries (Grau-Roma et al. 2011), may explain why there was a low frequency of this finding. None of the studied samples were PRRSV positive, which further proves that there are no episodes of this disease in Brazil (Ciacci-Zanella et al. 2002, Ciacci-Zanella 2004, Ciacci-Zanella 2006).

Aujeszky's disease was not investigated in this study. Serological research of swine herds has produced negative results (Souza et al. 2002, Groff et al. 2005, Schaefer et al. 2006, Ciacci-Zanella et al. 2008). Moreover, there were no reports of neurologic or reproductive clinical signs in these studied cases.

Although some samples had BAL hyperplasia and purulent bronchopneumonia that could be associated with *Mycoplasma hyopneumoniae*, necrotizing bronchiolitis were the most frequent features observed, which is not typical of swine enzootic pneumonia.

Other factors, such as stress, climate changes, or another concurrent disease, could complicate the SI clinical signs (Flores et al. 2007, Zanella 2007, Vincent et al. 2008); however, these factors were not studied in this report (with the exception of PCV2 and PRRSV).

Moreover, a great number of cases had purulent bronchopneumonia, meaning that secondary bacterial infections increased the lung lesions.

An endemic form of SI is increasingly common in other countries. Furthermore, bacterial secondary bronchopneumonia has been described frequently with a range in severity (Caswell & Williams 2007). This complication is more important in the beginning of the disease course, as the frequency decreases by half when the IHC is negative for IA.

In many studied cases, positive immunostaining for IA was not demonstrated; nevertheless, there were histological features of SIV infection. These cases could also be associated with the absence of the viral antigen, sometimes, as early as 72 hours after the infection (Caswell & Williams 2007). In addition, prolonged formalin fixation could decrease antigen marker by IHC (Webster et al 2009 and 2010).

According to this study, the severity of the histological lesions might be explained by the lack an immune response to a new virus type, as observed in other countries (Kim et al. 2011, Schnitzler & Schnitzler 2009, Marks & Canal 2010, Brookes & Brown 2011). Collectively, these results suggest that SIV antigens detected by IHC could be better detected in the acute phase of the disease; specifically, there are more antigens during the first few hours or days of infection. Necrotizing bronchiolitis, atelectasis, purulent bronchopneumonia and hyperemia are histologically associated, whereas the chronic form of the disease has a negative IHC for the viral antigen. Furthermore, type II pneumocyte hyperplasia, alveolar or bronchiolar polyp-like

structures, BALT hyperplasia and pleuritis are the main histological lesions observed, all of which suggest a chronic lesion (López 2012).

All of the historical features that were identified in this study are indicative of SI, and IHC confirms the real presence of IA (Olsen 2006, Caswell & Williams 2007, López 2012); however, for achieving better results, the lung tissue must be collected at the first appearance of clinical signs and must be well fixed with 10% buffered formalin to avoid any kind of artifact (Haines et al. 1993). Samples that are collected after this period may have a false negative result, which makes the diagnosis of the herd a challenge.

As this study has shown, a new histological feature of swine pneumonia from animals with respiratory clinical signs has been observed in the samples submitted to SPV-UFRGS since 2009.

**Acknowledgements.** The authors wish to thank Prof. Elsa Mundstock and her team for the statistical analysis from “Núcleo de Assessoria Estatística” of Universidade Federal do Rio Grande do Sul. This study was supported by Grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

## REFERENCES

- Belser J.A., Wadford D.A., Pappas C., Gustin K.M., Maines T.R., Pearce M.B., Zeng H., Swayne D.E., Pantin-Jackwood M., Katz J. M. & Tumpey T.M. 2010. Pathogenesis of pandemic influenza A (H1N1) and triple-reassortant swine influenza A (H1) viruses in mice. *J. Virol.* 84(9):4194-4203.
- Bochsler P.N. & Slauson D.O. 2002. Inflammation and repair tissue, p.140-245. In: Slauson D.O. & Cooper B.J. (Eds.), *Mechanisms of Disease. A Textbook of Comparative General Pathology*. 3rd ed. Mosby Inc.
- Brentano L., Zanella J.R.C., Mores N. & Piffer I. A. 2002. Levantamento soroepidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus da influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. Comunicado técnico, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC, p.1-6.
- Brookes S.M. & Brown. 2011. A/H1N1/pdm09 virus: dynamics of infection in pigs and people. *Vet. Rec.* 151-152.
- Caswell J.L. & Williams K.J. 2007. Respiratory system, p.579-587. In: Maxie M.G. (Ed.), *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.

Ciacchi-Zanella J.R., Brentano L., Bassi S., Flores S., Schiochet M., Mocelim A.C., Costa D.E. M., Vargas I. & Nemoto S.M.L. 2002. Estudo de prevalência de anticorpos para o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS) em granjas de suínos no Brasil. Comunicado Técnico nº 295, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC.

Ciacchi-Zanella J.R., Trombetta C., Vargas I. & Costa D.E.M. 2004. Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. *Cienc.Rural*. 34(2):449-455.

Ciacchi-Zanella J.R. 2006. PRRSV-Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos “Situação da infecção no Brasil e como evitar a doença nos nossos rebanhos”. Anais I Simpósio UFRGS sobre produção, reprodução e sanidade suína, Porto Alegre, RS.

Ciacchi-Zanella J.R., Amaral A. L., Ventura L. V., Morés N. & Bortoluzzi. 2008. Erradicação da doença de Aujeszky em Santa Catarina: importância da condição sanitária das leitoas de reposição. *Cienc. Rural*. 38(3):749-754.

Evans B. 02/05/2009: A/H1N1 influenza, Canada (immediate notification).IE/World Animal Health Information Database Weekly Disease Information 2009; 22(19); Available at: [http://www.oie.int/wahis/public.php?page=weekly\\_report\\_index](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=weekly_report_index). Accessed 03 September 2010.

Flores E.F., Lovato L.T., Silva M.S., Dezengrini R. & Diel D.G. 2007. Orthomyxoviridae, p.723-754. In: Flores E.F. (Ed), *Virologia Veterinária*. 1st ed. Editora da UFSM, Santa Maria.

Grau-Roma L. & Segalés J. 2007. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet. Microbiol*. 119:144-151.

Grau-Roma L., Fraile L. & Segalés J. 2011. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet. J*. 187:23-32.

Groff F.H., Merlo M.A., Stoll P.A., Stepan A.L., Weiblen R. & Flores E.F. 2005. Epidemiologia e controle dos focos da doença de Aujeszky no Rio Grande do Sul, em 2003. *Pesq. Vet. Bras*. 25(1):25-30.

Haines D.M., Waters E.H. & Clark E.G. 1993. Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Can. J. Vet. Res*. 57:33-36.

Hansen M.S., Pors S.E., Jensen H.E., Bille-Hansen V., Bisgaard M., Flachs E.M. & Nielsen. 2010. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J. Comp. Path*. 143:120-131.

Kim S-H., Moon O-K., Lee K-K., Song Y-K., Yeo C-L., Bae C-W., Yoon H., Lee O-S., Lee J-H. & Park C-K. 2011. Outbreak of pandemic influenza (H1N1) 2009 in pigs in Korea. *Vet. Rec*. 169:155.

Linhares D. & Vannucci F. 2011. Atualização e futuras perspectivas no diagnóstico e controle da influenza suína no Brasil. *Suínos & Cia*. 39:24-28.

López A. 2012. Respiratory system, p. 458-538. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. Mosby Elsevier, St Louis.

MacLachlan N. J. & Dubovi E. J. 2011. Orthomyxoviridae, p.353-370. In: Fenner's *Veterinary Virology*. 4th ed. Elsevier Inc.

- Marks F.S. & Canal C.W. 2010. Etiologia e diagnóstico da infecção causada pelo vírus da influenza (novo vírus e vírus da gripe estacional humana) em suínos. *Acta Sci.Vet.*38 (Supl 1): s37-s43.
- Olsen C.W., Brown I.H., Easterday B.C. & Reeth K.V. 2006. Swine influenza, p.469-482. In: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S. & Taylor D.J. (Eds), *Diseases of Swine*. 9th ed. Blackwell Publishing, Iowa.
- Plopper C. G. & Adams D. R. 2006. Respiratory system, p153-169. In: Eurell J. A. & Frappier B. L. (Eds), *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. 6th ed. Blackwell Publishing, Iowa.
- Reeth K.V., Brown I.H., Dürrwald R., Foni E., Labarque G., Lenihan P., Maldonado J., Markowska-Daniel I., Pensaert M., POspisil Z. & Koch G. 2008. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. *Influenza Other Respi. Viruses*. 2(3):99-105.
- Ross R. F. 1999. Mycoplasmal disease, p.495-509. In: Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W. L. & Taylor D.J. (Eds), *Diseases of Swine*. 8th ed. Blackwell Publishing, Iowa.
- Schaefer R., Ciacci-Zanella J., Mores N., Pan K.A., Dambros R.M.F. Schiochet M.F. & Coldebella M. 2006. Characterization of Aujeszky's disease virus isolated from South Brazil in the last twenty years by restriction enzyme analysis. *Braz. J. Microbiol.* 37:390-394.
- Schaefer R., Zanella J.R.C., Brentano L., Vincent A.L., Ritterbusch G.A., Silveira S., Caron L. & Mores N. 2011. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. *Pesq.Vet. Bras.* 31(9):761-767.
- Schnitzler S.U. & Schnitzler P. 2009. An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review. *Virus Genes*. 39:279:292.
- Silveira S., Schiochet M. F., Simon N., Gava D., Rocha C. S., Schaefer R. & Ciacci-Zanella J.R. 2011. Isolamento do vírus influenza A em suínos. *Anais I Mostra de Iniciação Científica, Concórdia-SC*.
- Souza C. M., Sobestiansky J., Matos M. P. C. & Caiado K. L. 2002. Prevalência da infecção pelo vírus da doença de Aujeszky em matrizes de sistemas de produção que abastecem o mercado consumidor da Goiânia. *Cien. Anim. Bras.* 3(2):53-56.
- Sreta D., Kedkovid R., Tuamsang S., Kitikoon P. & Thanawongnuwech R. 2009. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. *Virol J.* 6(34).
- Thomsom G.R. & Easterday B.C. 2004. Swine influenza, p.775-783. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. Vol.2. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town.
- Torremorell M. 2011. New developments on the infection with influenza virus in pigs. *Anais VI Simpósio internacional de suinocultura (SINSUI)*, Porto Alegre, RS, p.95-100.
- Vincent L.L., Janke B.H., Saul P.S. & Halbur P.G. 1997. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:191-195.
- Vincent A.L., Ma W., Larger K. M., Janke B. H. & Richt J. A. 2008. Swine influenza viruses a North American perspective. *Adv. Virus Res.* 72:127-157.

Yazawa S., Okada M., Ono M., Fujii S., Okuda Y., Shibata I. & Kida H. 2004. Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus (A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 98:221-228.

Webster J.D., Miller M.A., DuSold D. & Ramos-Vara J. 2009. Effects of prolonged fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. J. Histochem. Cytochem. 57(8):753-761.

Webster J.D., Miller M.A., DuSold D. & Ramos-Vara J. 2010. Effects of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical detection of infectious agents in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Vet. Pathol. 74(3):529-535.

Zanella C.J. 2007. Gripe suína. In: Sobestiansky J. & Barcellos D. (Eds). Doenças dos suínos.. Cânone Editorial, Gôiania.

Zanella J.R.C., Vincent A.L., Schaefer R. & Caron L. 2011. Influenza em suínos no Brasil: o problema e o que pode ser feito para manter a infecção controlada nas granjas afetadas. Anais VI Simpósio internacional de suinocultura (SINSUI), Porto Alegre, RS, p.85-92.

### Figure Legends

Fig. 1. Histopathologic changes of the lung samples due to swine influenza A virus infection. Images of the hematoxylin- and eosin-stained lung sections are shown. (A) Severe necrotizing bronchiolitis. The bronchiolar lumen is occluded by exudate. Intense hyperemia. Obj. 40x. (B) Severe suppurative bronchopneumonia, a secondary infection. Obj. 10x. (C) Bronchiolar polyp-like structures, covered by type II pneumocytes, bronchiolitis obliterans. Obj 40x. (D) Marked hyperplasia of the type II pneumocytes. Obj 40x.

Fig. 2. Pig lung tissue section. (A) The immunohistochemical (IHC) streptavidin-biotin-peroxidase complex, with 3,3-diaminobenzidine (DAB) as the chromogen and Harris hematoxylin (counterstain). The goat polyclonal antibody, anti-influenza A. Positive immunostaining of the influenza A virus antigens. There is dark brown staining in many nuclei and the cytoplasm of the bronchiolar epithelial cells. Obj. 40x. (B) IHC of the monoclonal mouse anti-cytokeratin, AE1/AE3. There is intense positive cytoplasmic immunostaining to type II pneumocytes, which shows hyperplasia. The internal positive control was the bronchiolar epithelium. Obj. 20x. (C) IHC of the polyclonal antibody, anti-PCV-2. There is a strong positive cytoplasmic immunoreaction into the macrophage surrounding the bronchiole. Obj. 20x. (D) A bronchiolar polyp-like structure with a collagenous core is shown in blue. Masson's trichrome. Obj. 40x.

## Tables

**Table 1. The distribution and absolute and relative frequencies of the pig lungs studied at Setor de Patologia Veterinária of Universidade Federal do Rio Grande do Sul during 2009-2010 infected by the swine influenza A virus. The samples are divided into the geographic origin and age category.**

Geographic origin (State)	Porcine category/age				Total	Affected animals/state (%)
	Farrowing	Nursery	Growing-finishing	IN*		
MS	0	0	4	0	4	7%
PR	2	8	3	1	14	23%
RS	2	22	5	2	31	52%
SC	2	5	4	0	11	18%
Total	6	35	16	3	60	100%

MS: Mato Grosso do Sul State, PR: Paraná State, RS: Rio Grande do Sul State, SC: Santa Catarina State.

\* IN: information not provided.

**Table 2. The distribution and absolute and relative frequencies of 60 swine lungs studied during 2009-2010 at Setor de Patologia Veterinária of Universidade Federal do Rio Grande do Sul infected with the swine influenza A virus, as determined by IHC.**

Age category	IHC to influenza A virus			Positive animals by IHC/age category (%)
	Positive	Negative	Total	
Farrowing	4	2	6	67%
Nursery	15	20	35	43%
Growing-finishing	7	9	16	44%
IN*	1	2	3	33%
Total	27	33	60	45%

IHC: immunohistochemistry.

\* IN: information not provided.

**Table 3. Frequencies of the main histological lesions observed and associated with a positive IHC to the influenza A virus in 27 swine lungs studied during 2009-2010 at Setor de Patologia Veterinária of Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

Histological findings*	Positive IHC to	
	Influenza A virus (%)	<i>P</i> value**
Necrotizing bronchiolitis	93 (25/27)	0.002
Atelectasia	85.2 (23/27)	0.003
Purulent bronchopneumonia	66.7 (18/27)	0.005
Interstitial pneumonia	66.7 (18/27)	NS
Emphysema	33 (9/27)	NS
Alveolar mixed inflammatory infiltrate	59.3 (16/27)	NS
Hyperemia	51.9 (14/27)	0.006
Bronchiolar ectasia	51.9 (14/27)	NS
Vasculitis	48.1 (13/27)	NS
Attenuation of bronchiolar epithelial cells	48.1 (13/27)	NS
Type II pneumocyte hyperplasia	37 (10/27)	0.04
Alveolar edema	33.3 (9/27)	NS
Mixed inflammatory infiltrate of bronchiolar mucosa	18.5 (5/27)	NS
Bronchus e/or bronchiole epithelium hyperplasia	14.8 (4/27)	NS
Mononuclear inflammatory infiltrate of bronchiolar mucosa	14.8 (4/27)	NS
Pleuritis	11.1 (3/27)	0.04
BALT hyperplasia	7.4 (2/27)	0.002
Alveolar or bronchiole polyp-like structures	0 (0/27)	<0.001

IHC: immunohistochemistry

\*Considered when the score was moderate (++) or marked (+++).

\*\* *P* values were calculated by either the Chi-squared or Fisher's exact test, as appropriate, for the association between the histological findings and positive IHC for influenza A; *P* value<0.05.

NS: not significant; *P* value greater than 0.05.

**Table 4. Frequencies of the main histological features observed in 33 swine lungs that were associated with a negative IHC to the influenza A virus analyzed during 2009-2010 at Setor de Patologia Veterinária of Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

Histological findings*	Negative IHC to the influenza A	
	virus (%)	<i>P</i> value**
Interstitial pneumonia	72.7 (24/33)	NS
Emphysema	69.7 (23/33)	NS
Type II pneumocyte hyperplasia	63.6 (21/33)	0.040
Alveolar mixed inflammatory infiltrate	60.6 (20/33)	NS
Necrotizing bronchiolitis	57.6 (19/33)	0.002
Vasculitis	54.5 (18/33)	NS
Bronchiolar ectasia	54.5 (18/33)	NS
Alveolar or bronchiole polyp-like structures	51.5 (17/33)	<0.001
Atelectasis	48.9 (16/33)	0.003
BALT hyperplasia	42.4 (14/33)	0.002
Bronchus e/or bronchiole epithelium hyperplasia	36.4 (12/33)	NS
Mononuclear inflammatory infiltrate of bronchiolar mucosa	36.4 (12/33)	NS
Pleuritis	33.3 (11/33)	0.040
Attenuation of bronchiolar epithelial cells	33.3 (11/33)	NS
Purulent bronchopneumonia	30.3 (19/33)	0.005
Alveolar edema	27.3 (9/33)	NS
Hyperemia	18.2 (6/33)	0.006
Alveolar neutrophilic inflammatory infiltrate	0 (0/33)	NS

IHC: immunohistochemistry.

\*Considered when the score was moderate (++) or marked (+++).

\*\* *P* values were calculated by either the Chi-squared or Fisher's exact test, as appropriate, for the association between the histological findings and positive IHC for influenza A; *P* value<0.05.

NS: not significant; *P* value greater than 0.05.

Figures

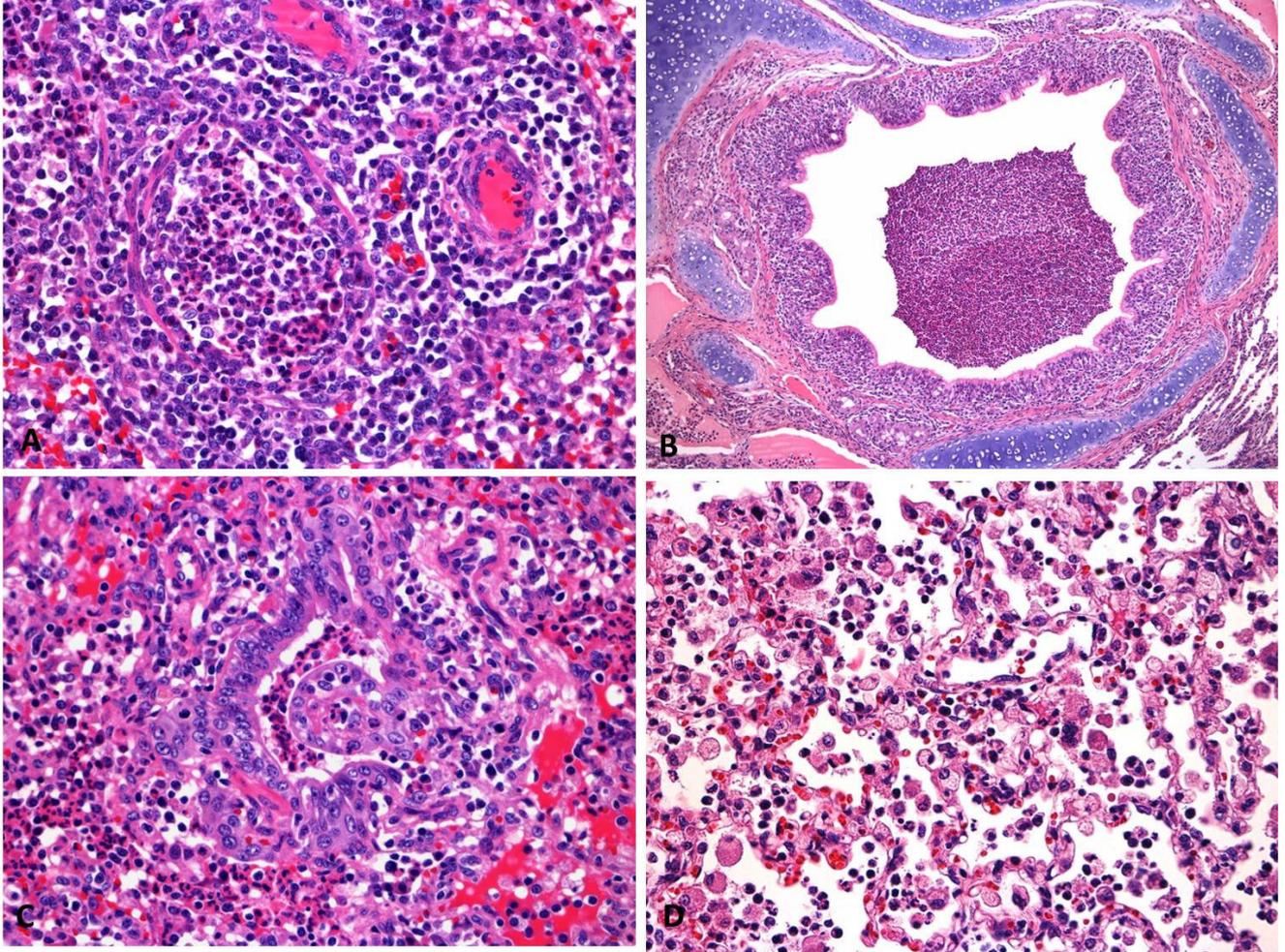


Figure 1

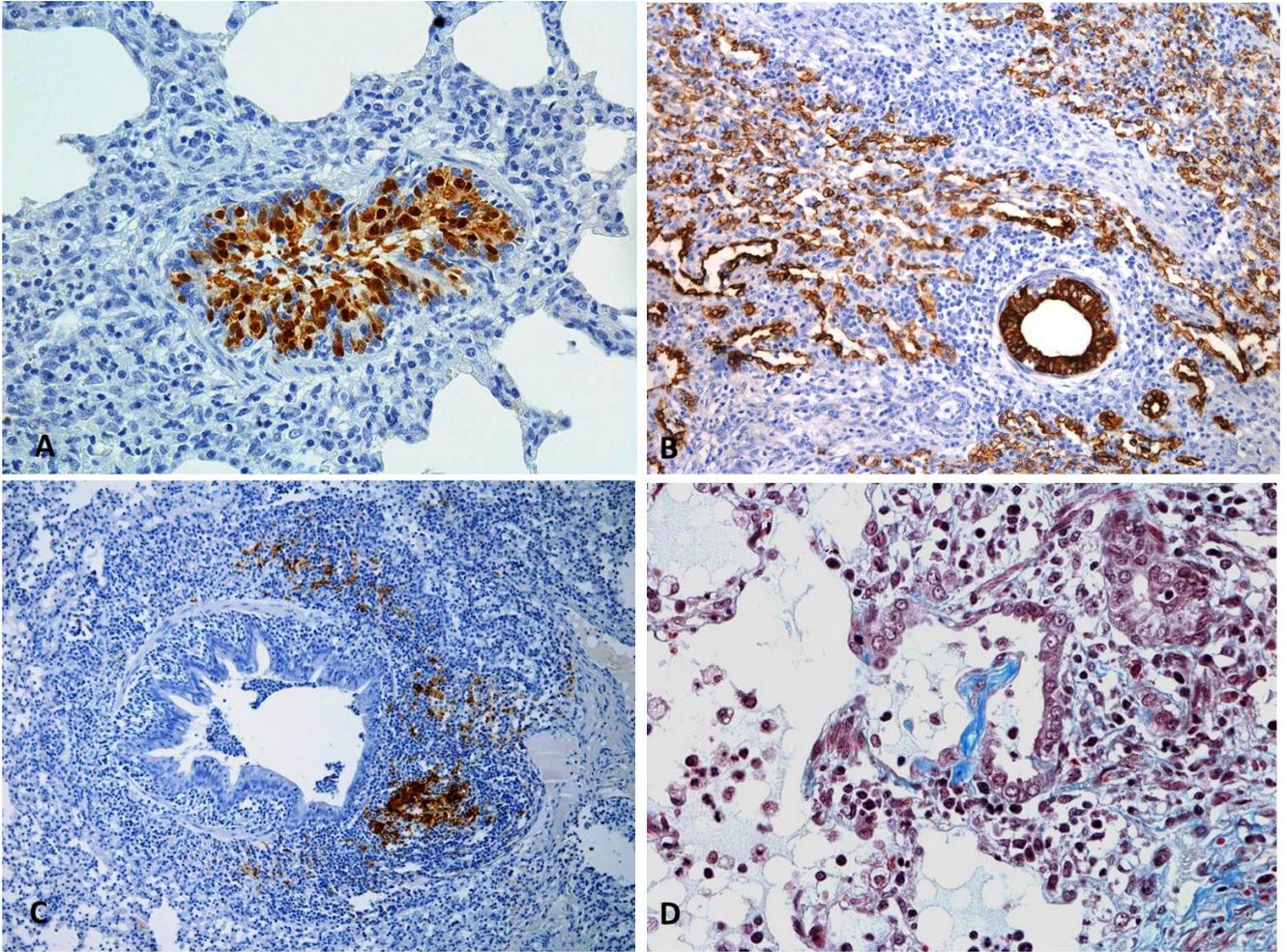


Figure 2

## 1. DISCUSSÃO GERAL

Os problemas respiratórios em suínos causam grandes prejuízos na suinocultura, principalmente pela baixa eficiência alimentar e pela perda de peso dos animais (TORREMORELL, 2011).

Quando os problemas são de origem infecciosa, a capacidade de transmissão da doença se eleva (LÓPEZ, 2012). Dentre elas, a IS está entre as de maior destaque nos últimos anos (CDC, 2009). Embora a infecção tenha sido diagnosticada anteriormente no Brasil por pesquisa de anticorpos contra os antígenos do VIS em exame sorológico (BRENTANO *et al.* 2002), o primeiro relato de doença suína respiratória associada a VIS, com caracterização e isolamento viral da espécie pH1N1 de VIS, ocorreu em 2011 (SCHAEFER *et al.* 2011).

A partir de 2009, as criações de suínos foram acometidas por doença respiratória aguda, com recuperação em poucos dias e os achados histológicos apresentaram bronquiolite necrótica, broncopneumonia purulenta, atelectasia, hiperplasia dos pneumócitos tipo II, hiperplasia de BALT e hiperemia, de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

Esse novo quadro ou padrão foi compatível com infecção por VIS e é possível que, como em outros países do mundo, as criações brasileiras de suínos tenham sido expostas ao novo vírus influenza (pH1N1) por contato com humanos infectados (BROOKES & BROWN, 2011; CORBELLINI *et al.* 2010; ZANELLA *et al.* 2011).

Suínos de todas as idades são suscetíveis ao VIS. Quando diagnosticado em um animal, todo o rebanho é supostamente positivo, pois a doença é altamente contagiosa (OLSEN *et al.* 2006).

Uma grande preocupação é o fato da doença apresentar caráter zoonótico (OLSEN *et al.* 2006; CARON & KLEIN, 2010; TORREMORELL, 2011). Como surtos de pessoas infectadas pelo VIS já foram descritos em países do mundo todo e já foi comprovado que humanos também podem transmitir pH1N1 para suínos (FORGIE *et al.* 2011), existe hoje a necessidade de adoção de medidas de controle e prevenção da infecção por pH1N1 nos rebanhos suínos (TORREMORELL, 2011). Também é importante a confirmação laboratorial da etiologia da doença respiratória em suínos e a identificação dos tipos virais circulantes nas criações brasileiras (SILVEIRA *et al.* 2011).

VIS apresenta grande variabilidade genética e, como as células do trato respiratório de suínos tem receptores para os influenzavírus de origem humana e aviária, suínos são considerados potenciais “hospedeiros de mixagem” do vírus (SCHNITZLER & SCHNITZLER 2009). Assim, a replicação viral em suínos proporciona maiores chances para os rearranjos genéticos de influenzavírus de diferentes origens e a possível formação de novos tipos virais. Desse modo, a monitoria dos tipos de influenzavírus em criações de suínos é também uma questão de saúde pública (MARKS & CANAL, 2010).

Os resultados obtidos no estudo “Caracterização histológica e imuno-histoquímica da influenza A em suínos no período de 2009-2010” demonstram a importância da avaliação detalhada (estudo histopatológico da doença respiratória aguda de suínos compatível com Influenza) em pulmões de animais com problemas respiratórios, uma vez que apresentam as lesões mais significativas da IS.

A ocorrência de leitões da maternidade diagnosticados com VIS, o mais novo deles com apenas três dias de vida, provavelmente é explicada pelo fato da mãe e dos leitões serem totalmente suscetíveis ao tipo viral para o qual foram expostos e, muito provável, a ausência da imunidade contra VIS e, hipoteticamente, contra pH1N1, pois ocorreram na mesma época (OLSEN et al. 2006).

As principais alterações histológicas associadas à IHQ VIS positiva foram bronquiolite necrótica, atelectasia e broncopneumonia purulenta e, conforme descrito na literatura, foram altamente indicativas da infecção por VIS, com possível envolvimento bacteriano secundário (CASWELL & WILLIAMS, 2007; BELSER *et al.* 2010).

A inflamação nas paredes bronquiolares, identificada nos casos de IS como bronquiolite necrótica, resulta da ação do VIS (GRAU-ROMA & SEGALÉS, 2007).

A IHQ foi utilizada para confirmação laboratorial de IS. Foi capaz de confirmar o envolvimento do agente viral em 45% dos casos estudados. Todavia, a sensibilidade relativamente baixa da técnica no presente trabalho pode ser explicada pelo rápido curso da infecção. É provável que aproximadamente um pouco mais da metade dos pulmões tenham sido coletados em um estágio mais avançado da doença, depois de 72h pós-infecção quando os antígenos virais já não estavam mais presentes no tecido avaliado (CASWELL & WILLIAMS, 2007). Outro aspecto é a inativação dos epítomos dada por exposição prolongada em solução de formalina. Portanto, o tempo de fixação também pode contribuir para uma menor positividade da marcação na técnica de IHQ (WEBSTER et al. 2009 e 2010). Neste estudo, no entanto, esta variável provavelmente

teve menor influência, devida à urgência de diagnóstico para os veterinários de campo, bem como o período reduzido entre a chegada do material no laboratório e seu processamento histológico.

Estes achados corroboram para a hipótese de associação das alterações encontradas; de que hiperplasia dos pneumócitos tipo II, formação de estruturas polipoides alveolares e bronquiolares e hiperplasia de BALT sejam achados histológicos de aparecimento mais tardio ou em processos de reorganização após infecção (LÓPEZ, 2012). Portanto, baseado neste estudo, o diagnóstico de VIS pode ser feito por avaliação histológica detalhada e teste de IHQ, com a coleta de pulmões de animais afetados principalmente no início dos sinais clínicos (HAINES *et al.* 1993; VINCENT *et al.* 1997).

Houve observação de formação de tecido granular organizado composto, nas paredes bronquiolares, em sua maioria, por tecido conjuntivo. A coloração de Tricrômio de Masson foi ferramenta interessante para a demonstração desse tecido conjuntivo neoformado, o que é mencionado também por HANSEN *et al.* (2010).

Hiperplasia de BALT, observada nos casos do estudo realizado, é um achado histológico frequente em cortes histológicos de pulmão nos casos de bronquiolite crônica (LÓPEZ, 2012).

Além de VIS aderir às células epiteliais do trato respiratório, o vírus adere também em pneumócitos tipos I e II (THOMSON & EASTERDAY, 2004) o que ajuda a explicar a acentuada hiperplasia de pneumócitos tipo II observada nos casos estudados. A alteração pode interferir nas trocas gasosas, de forma a induzir hipoxemia. Para agravar a situação, as estruturas polipoides observadas em alvéolos, assim como em bronquíolos acometidos, podem também contribuir para a perda da função pulmonar (LÓPEZ, 2012). Nos casos estudados, os suínos tinham histórico de sinais respiratórios, principalmente tosse.

Embora a ocorrência de hiperplasia de pneumócitos tipo II esteja correlacionada a processos alérgicos ou por ação de substâncias tóxicas (LÓPEZ, 2012), este achado histológico foi muito significativo neste estudo, o que sugere ser a alteração induzida por ação do VIS.

A infecção viral, independente da espécie acometida, causa deficiência na proteção exercida pela barreira mucociliar, o que predispõe à ocorrência de pneumonia bacteriana (CASWELL & WILLIAMS, 2007; LÓPEZ, 2012). Cultivos e exames

bacteriológicos de tecido pulmonar dos suínos estudados não foram realizados, pois na maioria dos casos foram enviados materiais já fixados em solução de formol.

Um estudo experimental foi realizado em suínos com depleção em macrófagos alveolares e infectados pelo vírus humano H1N1 para elucidar qual a real importância da ação de macrófagos alveolares. Os sinais clínicos respiratórios apresentados por estes animais foram mais acentuados e houve elevação da mortalidade em 40% (KIM *et al.* 2008).

PRRSV tem mostrado ser um importante agente causador de bronquiolite necrótica, bem como de hiperplasia de pneumócitos tipo II, o que justifica a realização de IHQ para detecção desse antígeno viral, bem como levantar a possibilidade de infecção por PRRSV nos casos avaliados e/ou de interação deste patógeno com o VIS (OLSEN *et al.* 2006; CASWELL & WILLIAMS, 2007). Os resultados das análises de IHQ comprovaram a ausência de marcação positiva contra os antígenos de PRRSV e houve somente dois casos positivos para PCV-2, o que difere de trabalhos realizados nos EUA e na Europa (GRAU-ROMA & SEGALÉZ, 2007; HANSEN *et al.* 2010).

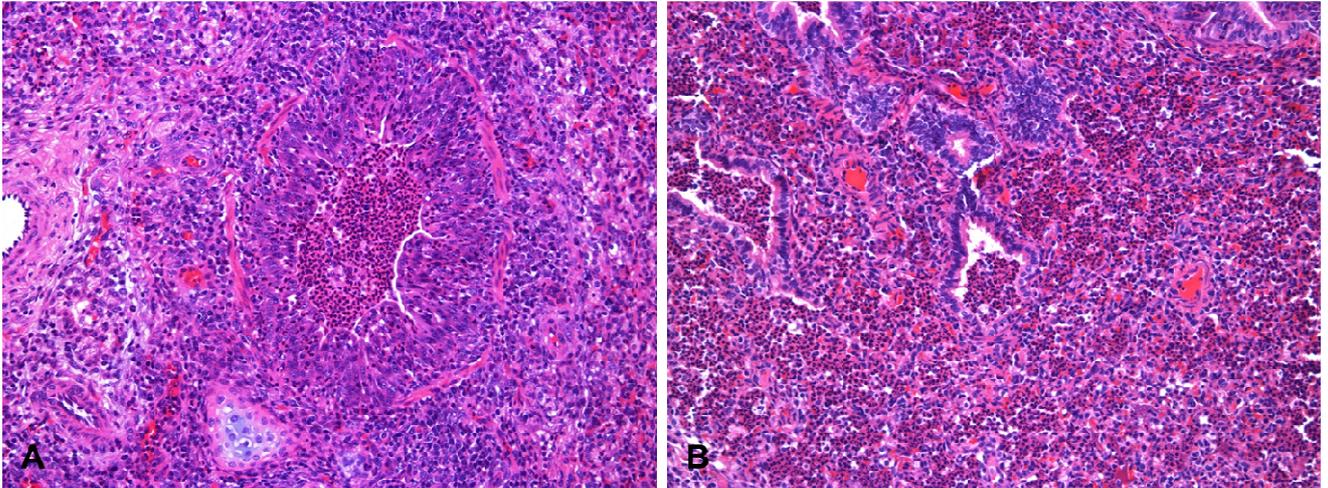
Muitos casos do arquivo do SPV-UFRGS não puderam ser incluídos no trabalho pelo fato de muitas das amostras pulmonares de suínos enviadas com problema respiratório não terem sido adequadamente colhidas e/ou conservadas, e, em outros casos, não havia histórico e/ou dados referentes à idade.

Surtos detectados em seis propriedades dos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul com criação de suínos e que apresentavam problemas respiratórios causados pelo VIS durante o ano de 2011 serão abordados em um novo artigo.

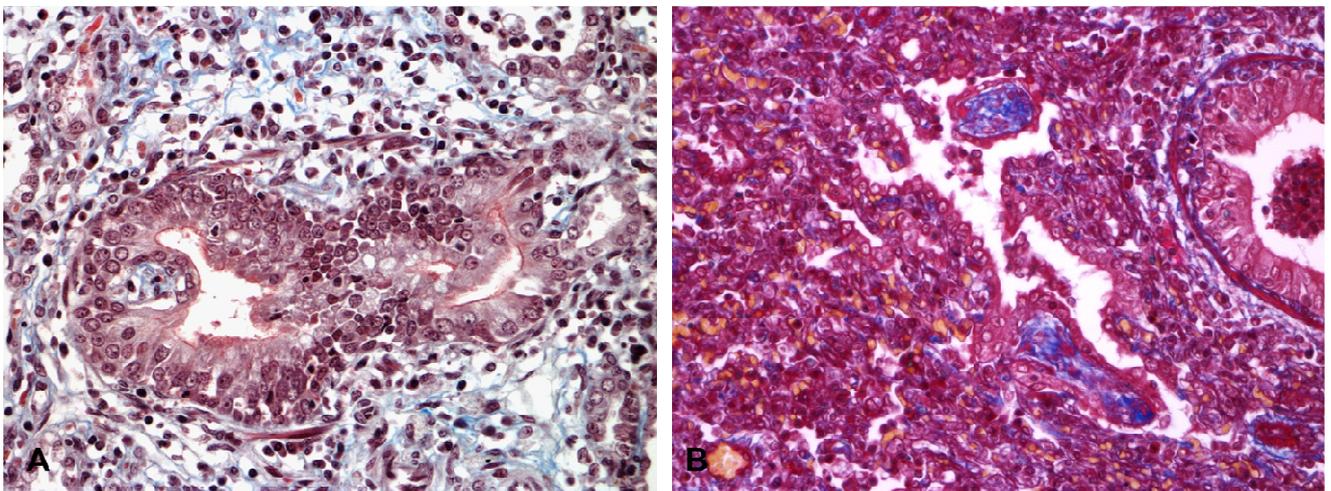
Achados clínicos, macroscópicos, histológicos, imuno-histoquímicos, de exames bacteriológicos e moleculares com uso da técnica de PCR serão discutidos, o que visa à identificação e à caracterização do subtipo viral envolvido. Outra meta é a associação dos resultados de IHQ (positivo ou negativo para IA) com PCR e sua correlação com o período de infecção.

Estudos moleculares e virológicos são necessários para identificar e caracterizar VIS presentes em criações de suínos do Brasil, como também uma investigação mais aprofundada é necessária para descobrir as interações entre os diversos agentes infecciosos pulmonares com o VIS.

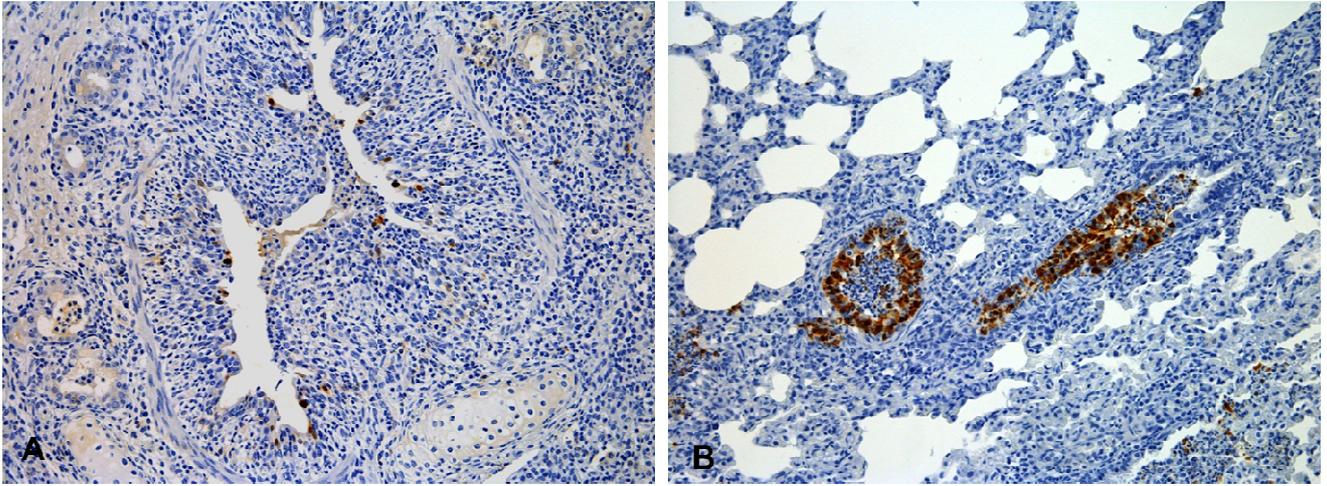
## 2. FIGURAS ADICIONAIS



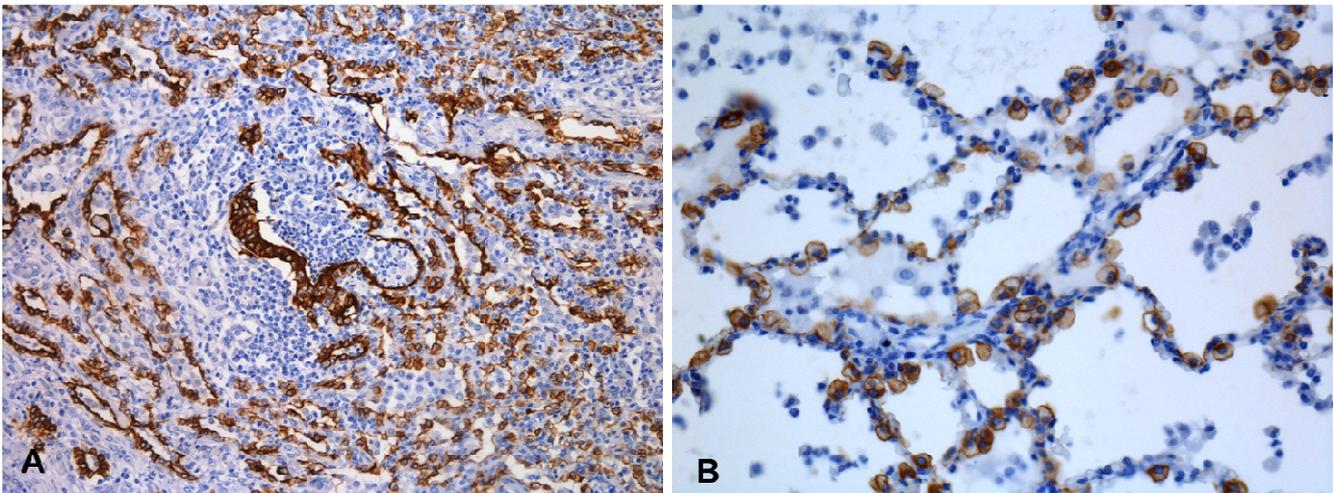
**Figura 1.** Pulmão de suíno. Influenza suína tipo A em casos diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 2009-2010. A broncopneumonia purulenta acentuada. Grande quantidade de infiltrado inflamatório neutrofílico na luz de brônquio (A) e na luz alveolar (B). HE. Obj. 5x.



**Figura 2.** Pulmão de suíno. Influenza suína tipo A em casos diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 2009-2010. Estruturas polipoides que estão evidenciadas em azul em bronquíolo e resulta em bronquiolite obliterante (A), e em alvéolos. (B). Tricrômio de Masson. Obj. 40x.



**Figura 3.** Pulmão de suíno. Influenza suína tipo A em casos diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade do Rio Grande do Sul, no período de 2009-2010. Imuno-histoquímica para antígenos do vírus da influenza A, detectados com o kit biotina-estreptavina-peroxidase (LSAB-HRP, Dako) e contracolorados com hematoxilina de Harris. (A) Epitélio bronquial com raras células marcadas em marrom no citoplasma e no núcleo. Obj. 5x. (B) Grande quantidade de células epiteliais bronquiolares, com intensa marcação nuclear e citoplasmática. Obj. 5x.



**Figura 4.** Pulmão de suíno. Influenza suína tipo A em casos diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de 2009-2010. Imuno-histoquímica anti-citoqueratina (clone AE1/AE3, Dako), detectados com o kit biotina-estreptavina-peroxidase (LSAB-HRP, Dako) e contracolorados com hematoxilina de Harris. (A) Hiperplasia dos pneumócitos tipo II com marcação membrano-citoplasmática. Controle interno negativo com marcação intensa difusa citoplasmática em epitélio bronquiolar. Obj. 20x. (B) Acentuada hiperplasia dos pneumócitos II que recobre a superfície alveolar. Obj. 40x.

### 3. CONCLUSÕES

No presente estudo, bronquiolite necrótica, atelectasia, broncopneumonia purulenta, hiperplasia de pneumócitos tipo II, hiperplasia de BALT e estruturas semelhantes a pólipos em alvéolos e bronquíolos foram os achados histológicos de pulmões de suínos com doença respiratória causada pela influenza tipo A mais significativos, consideradas as lesões de intensidade moderada a acentuada.

O teste de imuno-histoquímica (IHQ) para os antígenos da Influenza A (IA) se mostrou positivo em 45% (27/60) dos casos estudados.

Bronquiolite necrótica, atelectasia, broncopneumonia purulenta estão associados positivamente com a IHQ para antígenos da IA positiva.

Os achados histológicos compatíveis ou sugestivos de quadros avançados ou crônicos de hiperplasia dos pneumócitos tipo II, estruturas polipoides em alvéolo e bronquíolo, hiperplasia de BALT e pleurite tiveram associação positiva ao teste de IHQ para IA negativo.

Não houve nenhum caso positivo para PRRSV.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELSER, J.A.; WADFORD, D.A.; PAPPAS, C.; GUSTIN, 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.
- BRENTANO, L.; ZANELLA, J.R.C.; MORES, N.; PIFFER, I. A. 2002. Levantamento soroepidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus da influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. Comunicado técnico, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC, p.1-6.
- BROOKES, S. M.; BROWN, I.H. A/H1N1/pdm09 virus: dynamics of infection in pigs and people. **Veterinary Record**, p. 151-152, 2011.
- CARON, L.; KLEIN, C. Recomendações para o controle da Gripe A na suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. Supl 1, p. s53-s59, 2010.
- CASWELL, J.L.; WILLIAMS, K.J. Respiratory system. In: MAXIE M.G. (ed.). **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, 5. ed. vol. 2. Saunders Elsevier, Philadelphia, pp. 523-653. 2007.
- CORBELLINI, L.G.; MARKS, F.; TODESCHINI, B. Panorama da influenza A pandêmica H1N1 em suínos: situação atual e avaliação dos riscos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. Supl 1, p. s45-s52, 2010.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Keys facts about Swine Influenza (Swine Flu). In: **Department of Health and Human Services**, p.3. 2009.
- EVANS B. 02/05/2009: A/H1N1 influenza, Canada (immediate notification).IE/World Animal Health Information Database Weekly Disease Information 2009; 22(19); Available at: [http://www.oie.int/wahis/public.php?page=weekly\\_report\\_index](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=weekly_report_index). Acessado em 03 de setembro de 2010.
- FLABET, C.; MAROIS, C.; KUNTZ-SIMON, G.; ROSE, N.; DORENLOR, V.; EONO, F.; EVENO, E.; JOLLY, J.P.; LE DEVENDEC, L.; TOCQUEVILLE, V.; QUÉGUINER, S.; GORIN, S.; KOBISCH, M.; MADEC F. Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. **Veterinary Microbiology**, v.147, n. 3-4, p. 329-339, 2011.
- FLORES, E.F.; LOVATO, L.T.; SILVA, M.S.; DEZENGRINI, R.; DIEL D.G. Orthomyxoviridae. In: FLORES E.F. (ed), **Virologia Veterinária**, . Santa Maria: UFSM, p.723-754. 2007.
- FORGIE, A.R.; KEENLISIDE, J.; WILKINSON, C.; WEBBY, R.; LU, P.; SORENSEN, O.; FONSECA, K.; BARMN, S.; RUBRUM, A.; STIGGER, E.; MARRIE, T.J.; MARSHALL, F; SPADY, D.W.; HU, J.; LOEB, M.; RUSSELL, M.; BABIUK, L.A. Swine outbreak of pandemic influenza A virus on a Canadian

research farm supports human-to-swine transmission. **Clinical Infectious Disease**, v.52, n. 1, p. 10-18, 2011.

- GRAU-ROMA, L.; SEGALÉS, J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 119, p. 144-151, 2007.
- HAINES, D.M.; WATERS, E.H.; CLARK, E.G. Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p.33-36, 1993.
- HANSEN, M.S.; PORS, S.E.; JENSEN, H.E.; BILLE-HANSEN, V.; BISGAARD, M.; FLACHS E.M.; NIELSEN O.L. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**, v.143, p. 120-131, 2010.
- KIM, H.M.; LEE, Y.; LEE, K.; KIM, H.S.; CHO, S.W.; ROOIJEN, N.V.; GUAN, Y.; SEO, S.H. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. **Journal of Virology**, v. 82, n. 5, p. 4265-4274, 2008.
- KIM, S-H.; MOON, O-K.; LEE, K-K.; SONG, Y-K.; YEO, C-L.; BAE, C-W.; YOON, H.; LEE, O-S.; LEE, J-H.; PARK, C-K. Outbreak of pandemic influenza (H1N1) 2009 in pigs in Korea. **Veterinary Record**, v. 169, p. 155, 2011.
- LINHARES, D.; VANNUCCI, F. Atualização e futuras perspectivas no diagnóstico e controle da influenza suína no Brasil. **Suínos & Cia**, v. 39, p. 24-28, 2011.
- LÓPEZ, A. Respiratory system. In: McGAVIN M.D. & ZACHARY J.F. (ed), **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 5 ed. Mosby Elsevier, St Louis. p. 5538-558. 2012.
- MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. Orthomyxoviridae, p.353-370. In: **Fenner's Veterinary Virology**. 4th ed. Elsevier Inc. 2011.
- MARKS, F.S.; CANAL, C.W. Etiologia e diagnóstico da infecção causada pelo vírus da influenza (novo vírus e vírus da gripe estacional humana) em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. Supl 1, p. s37-s43. 2010.
- OLSEN, C.W.; BROWN, I.H.; EASTERDAY, B.C.; REETH, K.V. Swine influenza. In: STRAW B.E.; ZIMMERMAN J.J.; D'ALLAIRE S. & TAYLOR D.J. (eds), **Diseases of Swine**. 9 ed. Iowa, Blackwell Publishing, pp.469-482. 2006.
- REETH, K.V.; BROWN, I.H.; DÜRRWALD, R.; FONI, E.; LABARQUE, G.; LENIHAN, P.; MALDONADO, J.; MARKOWSKA-DANIEL, I.; PENSAERT, M.; POSPISIL, Z.; KOCH, G. 2008. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. **Influenza Other Respiratory Viruses**, v. 2, n. 3, p. 99-105.

- SANTOS, R.L.; GUEDES, R.M.C. Sistema respiratório. In: SANTOS R.L. & ALESSI A.C. (eds), **Patologia Veterinária**, São Paulo: Roca, p.01-50. 2011.
- SCHAEFER, R.; ZANELLA, J.R.C.; BRENTANO, L.; VINCENT, A.L.; RITTERBUSCH, G.A.; SILVEIRA, S.; CARON L.; MORES, N. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 761-767, 2011.
- SCHNITZLER, S.U.; SCHNITZLER, P. An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review. **Virus Genes**, v. 39, n. 279-292, 2009.
- SILVEIRA, S.; SCHIOCHET, M. F.; SIMON, N.; GAVA, D.; ROCHA, C. S.; SCHAEFER, R.; CIACCI-ZANELLA, J.R. Isolamento do vírus influenza A em suínos. In: I Mostra de Iniciação Científica, Concórdia-SC. **Resumos...** 2011
- SRETA, D.; KEDKOVID, R.; TUAMSANG, S.; KITIKOON, P.; THANAWONGNUWECH R. 2009. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. **Journal of Virology**, v. 6, n. 34.
- THOMSOM, G.R.; EASTERDAY, B.C. Swine influenza, IN: COETZER J.A.W. & TUSTIN R.C. (eds), **Infectious Diseases of Livestock**. 2 ed. Cape Town: Oxford University Press, vol.2. p.775-783. 2004.
- TORREMORELL, M. New developments on the infection with influenza virus in pigs. In: VI SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA (SINSUI), Porto Alegre, RS. **Resumos...** 2011. p. 95-100.
- VINCENT, L.L.; JANKE, B.H.; SAUL, P.S.; HALBUR, P.G. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p.191-195, 1997.
- VINCENT, A.L., MA, W.; LARGER, K.M.; JANKE B.H.; RICHT J. A. Swine influenza viroses a North American perspective. **Advances in Virus Research**, v 72, p.127-157, 2008.
- WEBSTER, J.D.; MILLER, M.A.; DuSOLD, D.; RAMOS-VARA, J. Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.57, n.8, p.753-761, 2009.
- WEBSTER, J.D.; MILLER, M.A.; DuSOLD, D.; RAMOS-VARA, J. Effects of prolonged formalina fixation on the immunohistochemical detection of infectious agentes in formalina-fixed, paraffin-embedded tissues. **Veterinary Pathology**, v. 47, n.3, p.529-535, 2010.
- YAZAWA, S.; OKADA, M.; ONO, M.; FUJII, S.; OKUDA, Y.; SHIBATA, I.; KIDA, H. Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus

(A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 221-228, 2004.

ZANELLA, C.J. Gripe suína. In: SOBESTIANSKY J.; BARCELLOS D. (eds), **Doenças dos Suínos**, Goiânia: Cãnone Editorial, p.268-270. 2007.

ZANELLA, J.R.C.; VINCENT, A.L.; SCHAEFER, R.; CARON, L. Influenza em suínos no Brasil: o problema e o que pode ser feito para manter a infecção controlada nas granjas afetadas. In: VI SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA (SINSUI), Porto Alegre, RS. **Resumos...** 2011. p. 85-92.