

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

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VÍRUS INFLUENZA
ISOLADOS EM SUÍNOS NO RIO GRANDE DO SUL**

CANDICE SCHMIDT

Porto Alegre

2016

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

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VÍRUS INFLUENZA
ISOLADOS EM SUÍNOS NO RIO GRANDE DO SUL**

(Tese de doutorado)

Autora: Candice Schmidt

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de concentração em Microbiologia Veterinária – Virologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Paulo Michel Roehle

PORTO ALEGRE

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Schmidt, Candice
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VÍRUS INFLUENZA
ISOLADOS EM SUÍNOS NO RIO GRANDE DO SUL / Candice
Schmidt. -- 2016.
105 f.

Orientador: Paulo Michel Roehe.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2016.

1. Vírus influenza. 2. Suínos. 3. Doença do complexo
respiratório dos suínos. I. Michel Roehe, Paulo ,
orient. II. Título.

CANDICE SCHMIDT

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VÍRUS INFLUENZA
ISOLADOS EM SUÍNOS NO RIO GRANDE DO SUL**

Aprovada em 18 de março de 2016

Aprovada por:

Prof. Dr. Paulo Michel Roehle
Orientador e Presidente da Comissão

Fabiana Quos Mayer
Membro da banca

Cláudio Wageck Canal
Membro da banca

Diógenes Dezen
Membro da banca

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que esta tese fosse realizada. A todos vocês, deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Agradeço inicialmente ao professor Paulo Michel Roehe, orientador desta tese, pelo empenho, sabedoria, ensinamentos durante o desenvolvimento dos projetos, e acima de tudo pela oportunidade de crescimento e pela confiança em mim depositada.

À pesquisadora Rejane Schaefer da Embrapa Suínos e Aves pelos ensinamentos e pelo treinamento em influenza suína realizado na Embrapa. Agradeço também ao Dr. Enric Mateu, professor da Universidade Autônoma de Barcelona e pesquisador do CReSA (Centre de Recerca en Sanitat Animal) pela oportunidade de realizar um treinamento e aprofundar meus conhecimentos na área de diagnóstico de influenza suína.

Em especial, gostaria de agradecer aos meus queridos pais, Rosângela e Geraldo, assim como meu irmão Mateus, por terem me ensinado valores familiares, pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim. Sou muito grata a vocês! Ao meu esposo Gustavo, que sempre esteve do meu lado durante o desenvolvimento desta tese e me manteve sempre muito equilibrada para chegar até o final. Muito obrigada por me fazer ver a vida de outro jeito!

Aos colegas do IPVDF e LABVIR/UFRGS pela amizade, ajuda nos trabalhos de campo e que de uma forma ou outra contribuíram para a construção dessa tese.

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com muito carinho e dedicação.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, que forneceram o apoio necessário para realização desse trabalho.

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VÍRUS INFLUENZA ISOLADOS EM SUÍNOS NO RIO GRANDE DO SUL

RESUMO

O vírus influenza A (IAV) é um agente zoonótico de grande relevância tanto para saúde humana como animal. A influenza suína teve seu primeiro reconhecimento clínico em 1918, em suínos do Meio Oeste dos EUA, coincidindo com a pandemia de influenza em humanos. Desde então, o IAV permanece como um importante patógeno para a indústria suinícola em todo o mundo. A grande variabilidade genética destes vírus é causada por dois principais mecanismos genéticos: mutações pontuais e recombinações genéticas. A influenza é endêmica em muitos países e a emergência de recombinantes tem desafiado o controle e o diagnóstico desta enfermidade. No Brasil, a infecção pelo IAV em suínos (swIAV) não está bem caracterizada; poucos relatos evidenciam a prevalência deste agente antes do ano de 2009, especialmente no Estado do Rio Grande do Sul, que alberga um dos maiores rebanhos de suínos do Brasil. Em vista disso, este trabalho teve como objetivo investigar ocorrência de swIAV em alguns rebanhos suínos comerciais do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 2013-2014, e determinar os tipos e subtipos de vírus circulantes naquelas propriedades. O primeiro capítulo deste estudo reporta os aspectos clínicos, patológicos e virológicos da ocorrência de influenza suína e co-infecções identificadas em seis propriedades suinícolas selecionadas na região do Vale do Taquari. Neste estudo foram analisados suabes nasais coletados de 66 animais e 6 amostras de tecido pulmonar de suínos com sinais de infecção respiratória. A detecção viral foi feita através de uma PCR de triagem e confirmada através do isolamento viral em células MDCK. A identificação dos subtipos virais foi feita através de uma PCR em Tempo Real (rRT-PCR) para o subtipo A(H1N1)pdm09 ou através de uma PCR *multiplex* (RT-PCR) para outros subtipos de swIAV. A detecção de agentes bacterianos foi realizada apenas nas amostras de tecido pulmonar, através da pesquisa de genomas bacterianos por PCR. O subtipo A(H1N1)pdm09 foi identificado em 4/6 granjas e o subtipo H1N2 em 2/6 granjas. Além disso, agentes envolvidos no complexo respiratório dos suínos foram identificados em todas as granjas; *Pasteurella multocida* foi identificada em 5/6 granjas e *Mycoplasma hyopneumoniae* em 3/6 granjas. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (1/6), *Haemophilus parasuis* (1/6) e PCV2 (1/6) também foram detectados. O segundo capítulo deste estudo teve como objetivo o sequenciamento do genoma completo de um novo recombinante H1N2 de origem humana, detectado em suínos. O genoma completo foi gerado através de uma RT-PCR. Os produtos foram purificados e submetidos ao sequenciamento utilizando a plataforma *MiSeq* (illumina). A análise filogenética revelou que as sequências dos genes *HA* e *NA* correspondem a genes de IAV de origem humana, enquanto que as sequências dos genes que codificam as proteínas internas do vírus (*PB1*, *PB2*, *PA*, *NP*, *M* e *NS*) correspondem a genes de amostras do vírus A(H1N1)pdm09. O terceiro capítulo reporta o sequenciamento completo dos genomas de 8 amostras de vírus influenza identificados nas populações de suínos amostradas. Foram identificados dois subtipos virais de origem humana (H1N2 e H3N2), além do vírus A(H1N1)pdm09. Os subtipos de origem humana possuem os genes *HA* e *NA* similares a vírus sazonais de humanos e os genes internos são estreitamente relacionados com o vírus A(H1N1)pdm09.

Palavras-chave: Influenza suína, surtos de doença respiratória, A(H1N1)pdm09, H1N2, H3N2.

GENETIC CHARACTERIZATION OF INFLUENZA VIRUSES RECOVERED FROM PIGS IN RIO GRANDE DO SUL

ABSTRACT

*Influenza A virus (IAV) is a zoonotic agent of great relevance to human and animal health. Swine influenza was first recognized clinically in pigs in the Midwestern U.S., in 1918, coinciding with the human influenza pandemic. Since that time swine influenza has remained of importance to the swine industry throughout the world. The great genetic variability of influenza viruses is caused by two main genetic mechanisms: point mutations (antigenic drift) and gene reassortment (antigenic shift). Influenza is endemic in pigs in many countries and the emergence of new viruses has been challenging its control and diagnostics. Influenza virus (swIAV) infection in Brazilian swine population is not well characterized, and little evidence existed of swIAV circulation before 2009, especially in Rio Grande do Sul State, which hosts one of the largest swine populations in Brazil. Thus, this study aimed to investigate the occurrence of IAV in commercial swine herds in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, between 2013-2014 and to know the types and subtypes of swine influenza viruses that are circulating in these herd. The first chapter of this study reports the clinical, pathological and virological aspects of the occurrence of swine influenza and related co-infections in six pig properties of the Taquari Valley region. In this study were analyzed nasal swabs collected from 66 animals and six lung tissue samples from pigs showing clinical signs of respiratory disease. IAV detection was performed by PCR screening and confirmed by virus isolation in MDCK cells and hemagglutination (HA). Influenza A subtyping was performed by real-time reverse transcription PCR (rRT-PCR) to detect the 2009 H1N1pandemic A(H1N1)pdm09; other swIAV subtypes were identified by multiplex RT-PCR. Bacterial infections were identified through detection of bacterial genomes by PCR, only in lung samples. Influenza A was detected by screening PCR in 46/66 swab samples and from 5/6 lungs. Virus was recovered from pigs of the six herds. Subtype A(H1N1)pdm09 was detected in 4/6 herds and H1N2 in the other 2/6 herds. In lung tissues, further agents involved in porcine respiratory disease complex were detected in all cases; *Pasteurella multocida* was identified in 5/6 samples and *Mycoplasma hyopneumoniae* in 3/6. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (1/6), *Haemophilus parasuis* (1/6) and PCV2 (1/6) were also detected. The aim of the second chapter was to sequence the whole-genome of a novel human-like H1N2 swine influenza virus. Whole-genome sequences were generated by RT-PCR. Amplicons were purified followed by sequencing in the MiSeq sequencing platform (Illumina). Phylogenetic analyses revealed that the HA and NA genes clustered with influenza viruses of human lineage, whereas the internal genes (PB1, PB2, PA, NP, M and NS) clustered with the A(H1N1)pdm09. The third chapter reports the genetic sequencing of the full genomes of eight swine influenza viruses circulating in the sampled pig population. Two swine human-like subtypes (H1N2 and H3N2) and the A(H1N1)pdm09 virus were identified. The human-like subtypes have the HA and NA genes similar to the human seasonal strains and the internal genes are closely related to the virus A(H1N1)pdm09.*

Keywords: Swine influenza, respiratory disease outbreaks, A(H1N1)pdm09, H1N2, H3N2.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

| | | |
|----------|--|----|
| FIGURA 1 | Principais regiões produtoras de suínos no Brasil..... | 11 |
|----------|--|----|

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | | |
|----------|--|----|
| FIGURA 2 | Curva de mortalidade provocada pelo vírus influenza..... | 15 |
| FIGURA 3 | Organização esquemática dos 8 segmentos de RNA do genoma dos vírus influenza A..... | 17 |
| FIGURA 4 | Representação esquemática de uma partícula de vírus influenza A e de seus 8 segmentos genômicos..... | 18 |
| FIGURA 5 | Origem do vírus H1N1 pandêmico de 2009..... | 31 |
| FIGURA 6 | Pulmão suíno com áreas de consolidação nos lobos apicais e cardíaco..... | 34 |

CAPÍTULO 1

| | | |
|----------|--|----|
| FIGURA 1 | Swine lungs displaying mostly non-collapsed lobes with consolidation areas in the apical and diaphragmatic lobes..... | 61 |
| FIGURA 2 | Swine lung showing purple-red consolidation areas in the apical lobe and anterior portion of the diaphragmatic lobe..... | 61 |
| FIGURA 3 | Foamy exudate in the trachea..... | 62 |
| FIGURA 4 | Microscopy of swine lung tissue showing neutrophilic inflammatory infiltrate within bronchioles and alveoli..... | 62 |

CAPÍTULO 3

| | | |
|----------|--|----|
| FIGURA 1 | Phylogenetic comparison between <i>H1</i> segments of IAV of human and swine origin..... | 83 |
| FIGURA 2 | Phylogenetic comparison between <i>H3</i> segments of IAV of human and swine origin..... | 84 |
| FIGURA 3 | Phylogenetic comparison between <i>N2</i> segments of IAV of human and swine origin..... | 85 |

| | | |
|----------|--|----|
| FIGURA 4 | Phylogenetic comparison between <i>NI</i> segments of IAV of human and swine origin..... | 86 |
| FIGURA 5 | Sequence alignment of the deduced Hemagglutinin (HA) proteins of the swine influenza A(H1N1)pdm09 viruses reported in the present study..... | 87 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- TABELA 1 Detection of swine influenza virus in nasal swabs (n=66) and lung tissues (n= 6) from piglets from six sampled farms 59
- TABELA 2 Subtyping of swine influenza virus in lung or nasal swab samples and detection of co-infecting agents in lung samples from piglets displaying signs of respiratory disease..... 60

CAPÍTULO 3

- TABELA 1 Characteristics of Brazilian swine influenza A viruses sequenced in this study..... 82

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| INTRODUÇÃO | 10 |
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 1.1. Histórico..... | 13 |
| 1.2. O Vírus | 15 |
| 1.3. Genética dos vírus influenza..... | 20 |
| 1.4. Epidemiologia..... | 22 |
| 1.5. Patogenia e sinais clínicos..... | 31 |
| 1.6. Lesões macroscópicas e microscópicas..... | 32 |
| 1.7. Diagnóstico..... | 34 |
| 1.8. Controle e prevenção..... | 38 |
| 2. OBJETIVOS | 40 |
| 2.1 Objetivo Geral | 40 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 40 |
| 3. Capítulo 1 | 41 |
| Swine influenza virus and association with the porcine respiratory disease complex in pig farms in Southern Brazil | |
| 4. Capítulo 2 | 63 |
| Full-genome sequence of a reassortant H1N2 influenza A virus isolated from pigs in Brazil. | |
| 5. Capítulo 3 | 68 |
| Co-circulation of pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 and other human/swine influenza reassortants in pigs in Southern Brazil. | |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 88 |
| REFERÊNCIAS | 91 |
| APÊNDICE A | 102 |

INTRODUÇÃO

A influenza é uma importante doença viral respiratória que afeta diversas espécies, com particular importância para humanos, suínos e aves. É considerada uma enfermidade zoonótica, altamente contagiosa, causada pelo vírus influenza tipo A, (IAV). A influenza é uma enfermidade mundialmente distribuída. Em humanos, é uma doença respiratória de impacto significativo, sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo inteiro (ZANELLA & BRENTANO, 2012). Em rebanhos afetados, a infecção pode ser responsável por causar um impacto econômico significativo (OLSEN et al., 2005).

A influenza suína é causada pelo IAV, vírus da família *Orthomyxoviridae*, gênero *Influenzavirus*. O IAV possui um genoma composto por oito moléculas de RNA de polaridade negativa (EASTERDAY, 1975). A natureza segmentada do genoma destes vírus proporciona condições favoráveis para a ocorrência de recombinações durante eventos de co-infecção em suínos. Nesses eventos pode ocorrer a redistribuição de segmentos genômicos entre diferentes cepas virais, originando outros vírus com genótipos ou fenótipos mistos. Esse mecanismo genético permite aos vírus influenza uma evolução rápida e, em determinadas ocasiões, tem sido responsável pelo surgimento de cepas altamente virulentas associadas com doença grave e de alta mortalidade em humanos e animais (EASTERDAY & VAN REETH, 1999). Outra característica marcante dos IAVs é a alta variabilidade das glicoproteínas de superfície. Essa variabilidade permite ao vírus manter-se nas populações através da geração de variantes que escapam a neutralização pelo hospedeiro (ZANELLA & BRENTANO, 2012).

O primeiro isolamento do vírus influenza ocorreu em 1931, a partir de uma amostra de origem suína (SHOPE, 1931). Nos últimos anos, foram isolados alguns vírus influenza com alta variabilidade genética no rebanho de suínos dos Estados Unidos. Isto demonstra que esta espécie, pode servir como reservatório para diferentes genótipos do vírus influenza (WEBBY et al., 2004, VINCENT et al., 2008, BROCKWELL-STAAATS et al., 2009). Além disso, as evidências de que suínos podem ser naturalmente infectados com diversos subtipos virais, originários de diferentes espécies, aumentam ainda mais a preocupação com o risco de interações de IAV de animais com vírus de origem humana (NINOMIYA et al., 2002), reforçando assim a importância do caráter zoonótico desta enfermidade.

O Brasil alberga um dos maiores rebanhos de suínos do mundo, sendo que a maior parte da produção está concentrada na região Sul do país, que tem como principais produtores os estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná (FIGURA 1). Atualmente, o país ocupa o quarto lugar no *ranking* de produção e exportação mundial de carne suína (MAPA, 2012). Apesar disso, e da ampla distribuição do vírus da influenza suína (swIAV), são poucas as evidências da circulação do swIAV nos rebanhos do Brasil datadas antes de 2009 (RAJÃO et al., 2013).

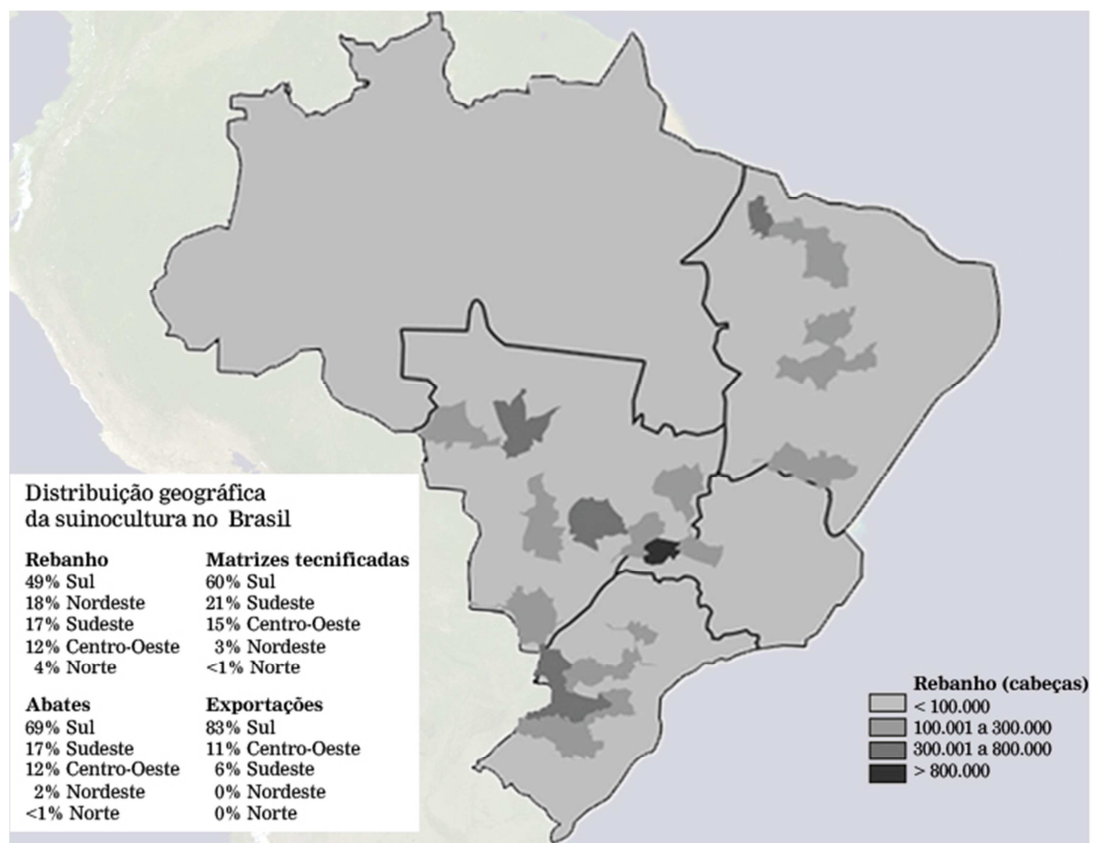


FIGURA 1. Principais regiões produtoras de suínos no Brasil. Fonte: IBGE/ Embrapa Suínos e Aves, 2011.

Durante o ano de 2009 e nos anos seguintes, foram relatados diversos surtos de doença respiratória envolvendo o vírus pandêmico H1N1 de 2009 (A(H1N1)pdm09) em diferentes regiões do Brasil. Como resultado do aumento no número de surtos de influenza em suínos, observou-se também um crescente aumento no número de pesquisas envolvendo o swIAV (NELSON et al., 2015).

Atualmente, o swIAV tem sido considerado o principal agente etiológico viral associado ao complexo respiratório dos suínos, uma doença multifatorial que resulta da ação conjunta de patógenos virais, bacterianos, condições ambientais e de manejo inadequado e hoje é considerado um dos mais importantes problemas sanitários da suinocultura (MORES et al., 2011). Ainda assim, pouco se sabe sobre a participação do swIAV nesta síndrome no Brasil. Além disso, as mudanças antigênicas nas cepas circulantes de swIAV diminuem drasticamente a eficácia das vacinas utilizadas, uma vez que não existe uma boa proteção cruzada entre os diferentes subtipos virais. Sendo assim, é de grande importância a constante atualização e o conhecimento dos subtipos virais circulantes em cada região (VAN REETH & MA, 2013). Portanto, o presente trabalho teve como objetivo examinar a ocorrência de infecções por swIAV em alguns rebanhos de suínos comerciais no estado do Rio Grande do Sul. E, além disso, também identificar possíveis variantes virais para que se possa elaborar medidas preventivas, como vacinas eficazes, na tentativa de preservar tanto a saúde pública como a saúde animal.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Histórico

Historicamente, o vírus da influenza tem sido envolvido em epidemias de grandes proporções que ceifaram a vida de milhões de pessoas. Pela sua constante evolução genética e antigênica, esse vírus é considerado uma das principais ameaças à saúde pública mundial. As epidemias e epizootias anuais e as ocasionais pandemias em humanos estão relacionadas à constante evolução do vírus originando novas variantes antigênicas, frente às quais os hospedeiros não apresentam imunidade (VINCENT, et al., 2008).

Não é possível precisar quando foi a primeira vez que um vírus influenza infectou humanos, nem quando, exatamente, ocorreu a primeira pandemia de gripe. No entanto, muitos historiadores concordam que no ano de 1510 d.C. teria ocorrido o primeiro reconhecimento de uma pandemia de influenza (MORENS et al., 2010). Naquele ano, a Europa ainda estava se recuperando do enorme êxodo causado pela Peste Negra de 1340, ao mesmo tempo enfrentando uma epidemia de sífilis (MORENS et al., 2010). Em julho e agosto de 1510, uma enfermidade caracterizada como “*gasping oppression*”, na qual as pessoas afetadas apresentavam tosse, febre e uma sensação de constrição do coração e pulmões, começava disseminar-se em diversas partes do mundo (FERNEL, 2005). Nos anos subsequentes houve uma grande evolução na ciência no ramo das análises epidemiológicas; os métodos de coleta e avaliação de dados de saúde pública estavam sendo estabelecidos e aperfeiçoados; nações ocidentais começaram a realizar censos nacionais já em 1700 e, em 1830, já eram feitos registros onde a “*causa mortis*” era reportada. Com essa evolução, as pandemias que ocorreram em 1830 e 1840 puderam então ser investigadas com métodos epidemiológicos cada vez mais apropriados, incluindo cálculos de taxas de letalidade e taxas de mortalidade específicas por idade, levando a uma maior compreensão do enorme impacto que uma doença de baixa letalidade, mas de alta morbidade, como a gripe, pode representar sobre as populações (MORENS et al., 2010).

Dentre todas as pandemias de influenza que ocorreram durante 500 anos, a “gripe Espanhola”, de 1918, foi a mais importante do ponto de vista epidemiológico, social, econômico e, em termos históricos, talvez o maior símbolo de como uma doença de alta mortalidade pode disseminar-se rapidamente no mundo moderno. A maioria dos estudos

aponta que houve entre 20 a 40 milhões de mortes durante a pandemia de 1918 (PATTERSON & PYLE, 1991; JOHNSON & MUELLER, 2002; TAUGENBERGER & MORENS, 2006). No entanto, é muito difícil precisar o número exato de mortes relacionadas somente à infecção pelo vírus influenza. O grande número de óbitos ocorridos neste período está diretamente associado ao fato de que a gripe espanhola ocorreu antes da era dos antibióticos e é muito provável que as co-infecções, baixas condições de higiene e poucos recursos médicos tenham contribuído de forma decisiva para este fato (BARRY, 2005).

Dentre diversas particularidades, um fato que chamou a atenção para a pandemia de 1918 foi a alta taxa de mortalidade em adultos jovens, diferentemente do que normalmente ocorre em casos de influenza humana (FIGURA 2). Embora este padrão atípico de ocorrência ainda não esteja muito claro, alguns estudos sugerem a existência de um componente imune, como a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, que poderia estar relacionado com a alta mortalidade naquela faixa etária, provavelmente em função de uma imunidade parcial prévia (TAUBENBERGER et al., 2001; TAUBENBERGER & KASH, 2011). Outro fato curioso e relevante após o início da gripe espanhola foi a ocorrência quase que simultânea de uma doença, muito similar à influenza, em suínos (KOEN, 1919). Investigações subsequentes foram convincentes em mostrar que o vírus influenza não havia circulado como uma doença epizootica em suínos antes de 1918. Além disso, a identificação da doença em suínos ocorreu posteriormente ao primeiro caso de influenza em humanos, sugerindo assim a transmissão do vírus de humanos para os suínos (SHOPE, 1931).

Em animais, o impacto gerado pela influenza também tem uma grande relevância. O caso que mais chamou atenção do mundo foi o do vírus H5N1 altamente patogênico que infectou aves domésticas na Ásia e resultou em uma mortalidade de aproximadamente 100% nos animais afetados.

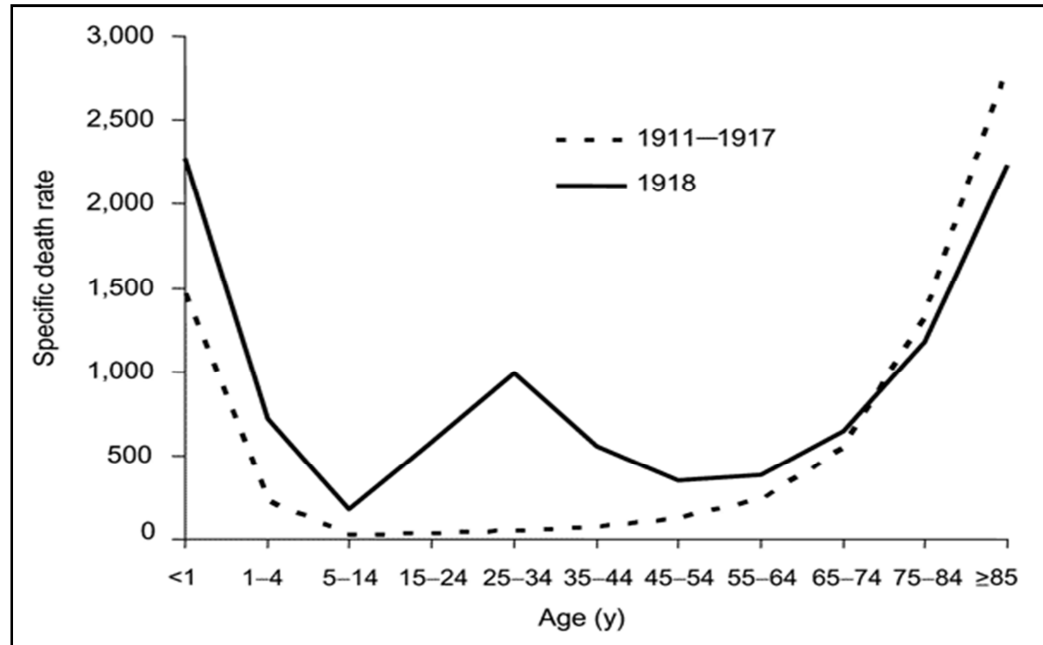


FIGURA 2. Curva de mortalidade provocada pelo vírus influenza. A linha pontilhada representa as taxas de mortalidade durante os anos de 1911 e 1917. A linha contínua representa as taxas de mortalidade durante a epidemia de 1918. Fonte: Grove & Hetzel, 1968.

No Brasil, desde o final da década de 30 existia a suspeita da presença do vírus da influenza suína (swIAV) na população de suínos. No entanto, o primeiro isolamento do vírus a partir de animais doentes foi reportado apenas em 1978 (CUNHA et al., 1978). Posteriormente, alguns trabalhos identificaram anticorpos contra vírus influenza A dos subtipos H1N1 e H3N2 em soros de suínos (BRENTANO et al., 2002; MANCINI et al., 2006; CARON et al., 2010; RAJÃO et al., 2013). Trabalhos subsequentes também demonstraram a presença de outros subtipos virais, incluindo o subtipo A(H1N1)pdm09 (SCHAEFER et al., 2011; RAJÃO et al., 2012) e H1N2 (SCHAEFER et al., 2015). Além disso, um estudo publicado recentemente demonstrou uma grande variabilidade genética entre os isolados brasileiros, além da co-circulação de diferentes subtipos virais em suínos, incluindo H1N1, H1N2 e H3N2 (NELSON et al., 2015).

1.2. O Vírus

1.2.1. Classificação

Os vírus influenza são membros da família *Orthomyxoviridae*, que alberga 5 gêneros: *Influenzavirus A*, *influenzavirus B*, *influenzavirus C*, *Thogotovirus* e *Isavirus*.

Os vírus *Influenza A* infectam uma ampla variedade de espécies de aves, de mamíferos e humanos e tem sido os únicos envolvidos nas grandes pandemias; os vírus *influenza B* infectam apenas humanos; os *influenza C*, tradicionalmente só eram identificados em humanos, porém a infecção já foi demonstrada também em suínos e caninos; o gênero *Thogotovirus* abriga vírus encontrados em carrapatos, sem descrição de envolvimento com doença em vertebrados até o presente; o gênero *Isavirus* inclui vírus que infectam salmões (WRIGHT et al., 2007; OHWADA et al., 1987). Os IAVs ainda podem ser classificados em subtipos com base nas proteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), sendo que até o momento existem descritas 18 formas diferentes de HA e 11 de NA, que podem ser diferenciadas antigênica e geneticamente (FOUCHIER et al., 2005; ZANELLA & BRENTANO, 2012; TONG et al., 2012; TONG et al., 2013). Em suínos, os subtipos de vírus influenza frequentemente identificados incluem H1N1, H1N2 e H3N2 (CHOI et al., 2002; GRAMER, 2007).

A nomenclatura dos vírus influenza A seguem as regras estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde em 1980 e deve conter as seguintes informações: I. Classificação do gênero (Influenza A, B ou C), com base na tipificação das proteínas de matriz (M) ou nucleoproteína (NP); II. Espécie hospedeira em que o vírus foi identificado, quando não for de origem humana; III. Região geográfica de origem; IV. Identificação da amostra; V. Ano de isolamento e VI. Tipo antigênico das proteínas HA e NA, descrito pelas letras e números H1 a H18 e N1 a N11 [Ex. A/swine/Brazil/185-11-7/2011(H1N2)] (WHO, 1980).

1.2.2. Características Genômicas

O genoma do vírus influenza A possui aproximadamente 13,6 Kb e é composto por 8 segmentos de RNA de polaridade negativa (WRIGHT et al., 2007). Os seis segmentos 1 a 6 codificam uma proteína cada e os segmentos 7 e 8 codificam 2 proteínas cada. Estes segmentos genômicos apresentam a mesma organização geral: codificam um gene na região central, flanqueado por sequências não codificantes altamente conservadas nas extremidades 3' (12 nt) e 5' (13 nt) (FIGURA 3). Essas sequências são parcialmente complementares e permitem a formação das estruturas que lembram cabos de panela (*panhandles*) durante a transcrição e replicação. Cada segmento genômico encontra-se recoberto por múltiplas cópias da nucleoproteína (NP) e está associado com algumas cópias das proteínas que formam o complexo

transcriptase/replicase. O genoma do IAV é composto pelos seguintes genes: no segmento 1, o gene *PB2*, que codifica a polimerase básica 2; o segmento 2 contém o gene *PB1*, que codifica a polimerase básica 1; o segmento 3 contém o gene *PA*, que codifica a polimerase ácida; no segmento 4 está o gene *HA*, que codifica a hemaglutinina viral; no segmento 5 está o gene *NP*, que codifica a nucleoproteína; já no segmento 6 encontra-se o gene *NA*, que codifica a proteína neuraminidase; o segmento 7 é formado pelo gene *M* que codifica as proteínas da matriz M1 e M2 e no segmento 8 está o gene *NS*, que codifica as proteínas não estruturais NS1 e NS2 (FIGURA 4) (PALESE & SHAW, 2007).

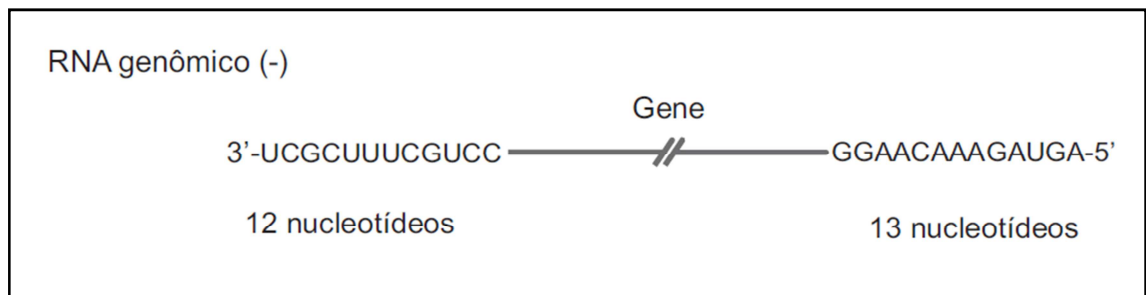


FIGURA 3. Organização esquemática dos 8 segmentos de RNA do genoma dos vírus da influenza A (família *Orthomyxoviridae*). Fonte: Flores, 2007.

A natureza segmentada do genoma proporciona condições para a ocorrência de rearranjos durante eventos de co-infecção. Nesses eventos ocorre a redistribuição de segmentos genômicos entre diferentes cepas virais, originando outros vírus com genótipos e fenótipos mistos. Esse mecanismo genético permite aos vírus influenza uma evolução rápida, e tem sido responsável pelo surgimento de cepas altamente virulentas associadas com doença severa e de alta mortalidade principalmente em humanos (EASTERDAY & VAN REETH, 1999).

Outra característica marcante dos vírus influenza é a alta variabilidade antigênica das glicoproteínas de superfície. Essa variabilidade permite ao vírus persistir indefinidamente nas populações, através de mutações e seleção de variantes, que não são neutralizadas pelos anticorpos produzidos pelo hospedeiro. A grande variabilidade antigênica, principalmente dos vírus humanos, constitui-se em um obstáculo quase intransponível para a produção de vacinas permanentes e de uso universal (FLORES et al., 2007).

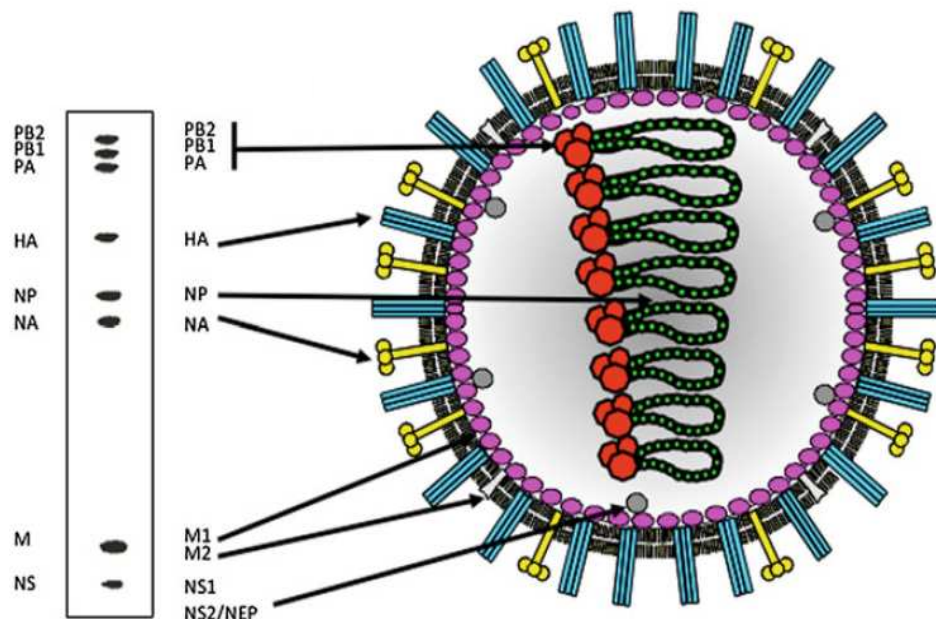


FIGURA 4. Representação esquemática de uma partícula de vírus influenza A e de seus 8 segmentos genômicos. Fonte: Stephan Pleschka, 2012.

1.2.3. Replicação

O primeiro passo no processo da infecção viral é a ligação do vírion à célula alvo. Os vírus influenza utilizam moléculas de ácido siálico (AS), também chamado de ácido neuramínico, como receptores. Essas moléculas estão presentes nas células em uma variedade de glicoproteínas e glicolipídios de membrana. A ligação dos vírions a estes componentes é mediada pela glicoproteína HA (MURPHY, et al.,1999). A ligação química que mantém o AS associado às glicoproteínas pode ser de dois tipos: $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$. O tipo de ligação do AS é responsável pela especificidade de espécie e de tropismo tecidual dos vírus da influenza. A HA de alguns vírus somente é capaz de se ligar ao AS através de ligações do tipo $\alpha 2,3$, enquanto outros se ligam a moléculas com a conformação $\alpha 2,6$ (MURPHY, et al.,1999). A traquéia humana contém AS predominantemente do tipo $\alpha 2,6$, enquanto o intestino das aves contém ligações do tipo $\alpha 2,3$. Já o trato respiratório dos suínos possui o AS com os dois tipos de conformação: $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$. Isto explica a importância dos suínos na geração de novos vírus (SKEHEL & WILEY 2000). Neste passo, proteases constitutivas presentes no trato respiratório

(pássaros e mamíferos) e no trato digestivo (aves) clivam o precursor HA0 em subunidades HA1, que contem o domínio que se liga ao receptor celular e HA2, que contem o peptídeo de fusão. Estas subunidades são ligadas por pontes dissulfeto. A ligação do vírus é mediada pela interação de HA1 com os receptores de ácido siálico $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ na superfície da célula. Uma vez ligada, a partícula viral entra na célula através de endocitose mediada por clatrina. O endossoma tem o pH baixo, cerca de 5 a 6, que desencadeia a fusão das membranas virais e endossoma que se dirigem para o interior do citoplasma (SKEHEL & WILEY, 2000). A acidificação das vesículas endossomais ocorre de forma gradativa pela ação de ATPases, que bombeiam prótons H^+ para o seu interior. Através das aberturas mediadas pela M2, os prótons H^+ penetram também no interior dos vírions. A acidificação dos endossomos resulta em dois efeitos para a penetração do vírus. Primeiramente, provoca alterações conformacionais na HA, que resultam na exposição de um peptídeo fusogênico, que leva à fusão do envelope com a membrana endocítica. Em uma segunda etapa, o pH baixo no interior dos vírions facilita a dissociação entre as ribonucleoproteínas (RNPs) e a proteína M1, promovendo o desnudamento parcial e permitindo a liberação das RNPs no interior do citoplasma (MURPHY, et al.,1999). Uma vez dissociados da M1 e liberados no interior do citoplasma, as RNPs são transportadas para o núcleo, onde penetram ativamente pelos poros nucleares. As proteínas que compõem o complexo RNP (NP, PA, PB1 e PB2) contêm sinais de localização nuclear que promovem a sua importação para o núcleo celular, o que é uma exceção entre os vírus com genoma de RNA (MURPHY, et al.,1999).

A transcrição dos RNA genômicos é realizada pelo complexo transcriptase/replicase, que está associado às RNPs. A transcrição se inicia logo após a penetração das RNPs no núcleo, e cada segmento genômico é transcrito individualmente, originando moléculas de mRNA com *cap* e poliA. A transcrição é precedida pela clivagem e subtração de segmentos de mRNAs celulares. Os oligonucleotídeos capturados correspondem aos primeiros 8 a 13 nt dos mRNA e possuem o *cap* na extremidade 5' (MURPHY, et al.,1999). Essa atividade é atribuída à PB1, que possui atividade endonuclease, ou seja, essa enzima literalmente furta segmentos de mRNAs celulares para benefício do vírus. Os oligonucleotídeos subtraídos pareiam com uma pequena sequência próxima a extremidade 3' do RNA genômico e servem de *primers* para o início da transcrição. Como resultado da polimerização a partir da extremidade 3' desses *primers*, os mRNA virais sintetizados

“furtam” dos mRNAs celulares os *caps*, que são necessários para tornar os mRNAs virais funcionais, que então podem ser reconhecidos pelos ribossomos e traduzidos. A transcrição termina 15 a 22 nt antes da extremidade 5’ de cada segmento e é seguida pela adição de uma cauda de poli-A, também presente nos mRNAs (ZANELLA et al., 2012). Os transcritos produzidos a partir dos segmentos 7 e 8 sofrem processamento por *splicing*, em que o vírus utiliza a maquinaria da própria célula hospedeira e origina mRNAs que são traduzidos em mais de uma proteína (AMORIM & DIGARD, 2006)

A replicação do RNA viral (vRNA) ocorre em duas etapas: i) síntese do RNA anti-genômico ou complementar e ii) síntese de vRNA utilizando o RNA anti-genômico como molde. Dessa forma, os RNAs anti-genômicos são exatamente complementares aos vRNAs. Em todas as etapas da replicação, os RNAs de sentido anti-genômico e genômico são rapidamente conjugados com múltiplas cópias da proteína NP. Os ortomixovírus completam a sua morfogênese e são liberados das células hospedeiras pelo brotamento dos nucleocapsídeos na membrana plasmática. Nesse processo, um fragmento das membranas celulares, contendo as glicoproteínas de membrana codificadas pelo vírus, é liberado da célula e passa a constituir o envelope viral (MURPHY et al., 1999). Neste contexto, a proteína NA tem uma grande importância na fase final da infecção viral. Acredita-se que umas das principais funções da NA é a clivagem do ácido siálico da superfície celular, facilitando assim a libertação da progênie viral a partir das células infectadas. É por esse motivo que esta proteína tem sido alvo no desenvolvimento de várias drogas antivirais para influenza. Estes antivirais atuam inibindo a NA, impedindo assim o egresso das partículas virais da célula hospedeira (AIR & LAVER, 1989; DAS et al., 2010)

1.3. Genética dos vírus influenza A

Em seus hospedeiros naturais – aves aquáticas e migratórias – os vírus influenza são geneticamente estáveis e apresentam taxas mínimas de mutação e evolução ao longo do tempo. Isso indica uma relação ancestral e reflete uma perfeita adaptação do vírus com os seus hospedeiros. No entanto, quando são transmitidos para outras espécies (mamíferos ou aves domésticas) esses vírus iniciam um processo de rápida evolução genética, sobretudo devido a mutações em ponto nos genes que codificam as

glicoproteínas de superfície HA e NA, principais alvos antigênicos (ZANELLA et al., 2012).

São dois os principais mecanismos genéticos relacionados com a evolução dos vírus influenza. O primeiro deles é conhecido por “*antigenic drift*” ou variações antigênicas menores, um processo caracterizado por mutações pontuais geradas ao acaso durante a replicação do genoma. Estes eventos são aleatórios e ocorrem essencialmente devido à baixa fidelidade da polimerase viral que introduz nucleotídeos incorretos durante a síntese das novas moléculas de RNA. O outro mecanismo é denominado “*antigenic shift*” ou variações antigênicas maiores, que se caracteriza por mudanças abruptas nas características genéticas e antigênicas do vírus e é causado por rearranjos genético entre duas ou mais cepas de influenza A. Este mecanismo permite uma evolução rápida desses vírus e tem sido associado com variantes responsáveis por pandemias de grandes dimensões em humanos (MURPHY et al., 1999).

1.3.1. “*Antigenic drift*”

Uma característica comum à maior parte das polimerases de RNA viral é a baixa fidelidade na incorporação de nucleotídeos durante a replicação do genoma (NELSON & COX, 2010). A relevância de uma determinada mutação irá depender da alteração que essa possa induzir na sequência de aminoácidos de uma determinada proteína. Por exemplo, mutações não sinônimas nas polimerases poderão afetar a eficiência da replicação viral e modificar a virulência de determinada amostra (SEYER et al., 2012; ZHU et al., 2012). Mutações em NS1 e NS2/NEP, podem interferir na capacidade do vírus de modular a resposta imune do hospedeiro durante a replicação viral (MA et al., 2010b; FORBES et al., 2012; MÄNZ et al., 2012). As alterações de NA são importantes na resistência aos medicamentos antivirais (ABED et al., 2011). Já as mudanças na HA podem afetar a entrada do vírus na célula hospedeira, podem interferir na adaptação de uma cepa em diferentes hospedeiros, além de estar relacionada com a virulência e transmissibilidade dos vírus (SEYER et al., 2012; HERFST et al., 2012).

As mutações em ponto ou “*antigenic drifts*” tem uma importância particular para as glicoproteínas HA e NA em função destas proteínas serem imunodominantes e estarem expostas diretamente à ação dos anticorpos. Essas mutações podem resultar em alterações dos sítios de reconhecimento por anticorpos neutralizantes. Assim, as

mutações de aminoácidos nos domínios antigênicos de ambas as proteínas, HA e NA, podem resultar em mecanismos de escape da imunidade pré-existente no hospedeiro (WEBSTER et al., 1982). Isso representa uma vantagem evolutiva para os vírus mutantes que, além de escaparem da neutralização, podem ser transmitidos a novos hospedeiros permitindo assim a propagação de novas variantes virais (WEBSTER et al., 1982).

1.3.2. “Antigenic Shift”

A natureza segmentada do genoma dos vírus influenza permite a produção ocasional de recombinantes que possuem segmentos de dois vírus parentais. O rearranjo permite uma evolução rápida desses vírus e a espécie suína é mais propensa a abrigar eventos de rearranjo entre vírus aviários e de mamíferos, pois possui a molécula de ácido siálico nas conformações $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$ na mesma célula (MURPHY et al., 1999).

O fenômeno “*antigenic shift*” ocorre através do rearranjo entre segmentos gênicos de diferentes cepas de IAV que infectam simultaneamente a mesma célula (MURPHY et al., 1999). Durante a replicação ocorre uma mistura entre os segmentos dos genomas virais que existam naquele momento naquela célula. Quando novos vírus são encapsidados para serem liberados da célula hospedeira, pode ocorrer o encapsidamento de genes de distintos vírus, dando origem a um novo vírus influenza, com genes de dois ou mais subtipos virais (SCHOLTISSEK, 1995).

1.4. Epidemiologia

O vírus da influenza A está mundialmente distribuído e pode infectar uma grande variedade de espécies, incluindo aves (particularmente espécies aquáticas migratórias), aves domésticas, mamíferos aquáticos, mamíferos terrestres e humanos (WEBSTER et al., 1992). A ocorrência da doença em suínos está associada principalmente com a movimentação de animais e introdução de novos animais nos rebanhos. A principal forma de transmissão é a direta, pela via nasofaríngea, por contato com secreções nasais de animais na fase aguda da infecção. Em regiões com alta densidade de suínos, a disseminação aerógena pode ser importante, especialmente nas

populações sem imunidade prévia (FLORES et al., 2007; ZANELLA & BRANTANO, 2012). O período de incubação varia de 4 a 7 dias, sendo a infecção caracterizada por uma elevada taxa de morbidade, que pode chegar a 100%, geralmente uma baixa mortalidade que dificilmente passa de 1% (MA et al., 2009).

As aves aquáticas são elemento central da epidemiologia da influenza A, uma vez que podem ser infectadas com qualquer subtipo de influenza A, atuando assim, como principal reservatório do vírus na natureza (OLSEN et al., de 2006). Até recentemente, pensava-se que os vírus de origem aviária precisavam necessariamente passar por uma adaptação em suínos, para então serem transmitidos para os seres humanos (KIDA et al., 1994). Porém, já é sabido que os seres humanos possuem ambos os tipos de receptores (α 2,3 e α 2,6) em número suficiente para permitir a transmissão direta de aves para humanos (IMAI e KAWAOKA, 2012). O episódio da transmissão do vírus H5N1 para humanos é uma prova clara desse tipo de evento, que não é comum, mas que pode eventualmente ocorrer (SUBBARAO et al., 2000).

1.4.1. Influenza A na população de suínos da América do Norte

O primeiro isolamento de um vírus influenza a partir de suínos ocorreu em 1930 por Shope (SHOPE, 1931) e foi caracterizado como sendo uma cepa H1N1 clássica, estritamente relacionada com o vírus H1N1 que infectou humanos em 1918, responsável pela Gripe Espanhola. Esta linhagem clássica do vírus H1N1 (cH1N1) de suínos, derivada do vírus pandêmico de 1918, permaneceu relativamente estável - geneticamente e antigenicamente - na população de suínos dos EUA por quase 80 anos (VINCENTE et al., 2012).

No final da década de 1970, o subtipo H3N2 foi detectado pela primeira vez em suínos, tendo um baixo impacto clínico (HINSHAW et al., 1978). Entretanto, depois de 1998 a epidemiologia da influenza A em suínos dos EUA mudou dramaticamente, quando o vírus H3N2 triplo recombinante (trH3N2) contendo uma combinação única de genes internos conhecido como TRIG (*triple reassortant internal gene cassette*) se estabeleceu com sucesso na população de suínos (WEBBY et al. , 2000). Esta nova variante viral era composta por segmentos gênicos do vírus clássico cH1N1 (NP, M, NS), segmentos do vírus sazonal H3N2 de humanos (PB1, HA, NA) e segmentos de origem aviária (PB2, PA) (ZHOU et al., 1999).

Em 1999 o subtipo H1N2 foi isolado pela primeira vez em suínos. Este vírus, originário da América do Norte, continha a HA oriunda do vírus cH1N1 e o restante do genoma era oriundo vírus trH3N2. Este vírus ficou então conhecido como H1N2 triplo recombinante (trH1N2) e foi descrito em vários locais dos EUA e também no Canadá (KARASIN et al., 2000). Além dos triplos recombinantes trH3N2 e trH1N2, a partir do ano de 2000, um outro vírus apresentando a HA e NA originárias do cH1N1 foi identificado e denominado trH1N1 (YASSINE et al., 2009) .

Vários autores têm proposto a existência de diferentes grupos de SwIAV com base na filogenia e reconhecimento antigênico da HA para os vírus influenza da América do Norte. A proposta é classificar os isolados H1 oriundos da linhagem cH1N1 em quatro *clusters* (*alfa, beta, gama e delta*); e os isolados H3 como I, II, III e IV (VINCENT et al., 2009; LORUSSO et al., 2011). No entanto, não se sabe se essa classificação reflete com precisão a epidemiologia, patogênese e proteção existente entre estes diferentes *clusters*.

A partir de 2005 surgiram os vírus H1N1 e H1N2 com o gene da HA derivado de um vírus humano (diferente do cH1N1). Esses vírus emergiram e se espalharam nos rebanhos dos EUA e foram denominados como sendo do *cluster delta* (VINCENT et al., 2009).

No período entre 2008 e 2010 os vírus influenza evoluíram tanto que foram classificados em *subclusters delta 1 e delta 2*. Desta forma, atualmente, múltiplas linhagens virais co-circulam na população de suínos da América do Norte, incluindo (i) os vírus “clássicos” de suínos que descendem do vírus H1N1 de 1918; (ii) os vírus “triplo recombinante” de suínos que emergiram no final da década de 1990; e (iii) “*delta*” vírus que são estritamente relacionados aos vírus H1 sazonal de humanos (VINCENT et al., 2009, NELSON et al., 2015a).

1.4.2. Influenza A na população de suínos da Europa

A diversidade genética e antigênica dos vírus influenza circulantes na Europa possuem características distintas. Os primeiros isolamentos de SwIAV na Europa foram feitos entre os anos de 1938 e 1940 (LAMONT, 1938; BLAKEMORE & GLEDHILL, 1941). Esses isolados eram muito semelhantes ao vírus H1N1 de 1918, responsável pela Gripe Espanhola e podiam ser diferenciados do SwIAV H1N1 de origem americana,

fato este que sugere a existência de diferentes linhas evolutivas do vírus H1N1 de 1918 (NEUMEIER et al., 1994).

O H1N1 derivado de 1918 permaneceu predominante em suínos europeus até 1976, quando o SwIAV H1N1 clássico (cH1N1) originário América do Norte foi introduzido no Sul da Itália e se espalhou para outros países da Europa (NARDELLI et al., 1978; MASUREL et al., 1983; ABUSUGRA et al., 1987). Em 1979, uma cepa H1N1 de origem aviária entrou em um rebanho de suínos da Bélgica e da Alemanha (PENSAERT et al., 1981) e se espalhou por toda a Europa. Esta nova cepa de H1N1 deslocou o cH1N1 anteriormente prevalente (SCHULTZ et al., 1991) e estabeleceu uma nova linhagem H1N1 de origem aviária (avian-like H1N1 ou avH1N1) que passou a ser o H1N1 predominante no continente (KYRIAKIS et al., 2011). Outras cepas H1N1 de diferentes origens têm sido isoladas esporadicamente; no entanto, não conseguiram se estabelecer de forma eficiente e manter-se na população suína por longos períodos (KUNTZ-SIMON & MADEC, 2009)

No que diz respeito ao subtipo H3N2, este foi detectado e relacionado inicialmente com o vírus pandêmico H3N2 de humanos (human-like ou huH3N2) de 1968; supõem-se que humanos tenham introduzido este vírus na população de suínos (MIWA et al., 1987). Em verdade, os isolados de huH3N2 obtidos durante os próximos 16 anos mantiveram uma alta similaridade genética e antigênica com os isolados sazonais de H3N2 de humanos sugerindo uma constante introdução destes vírus humanos na população de suínos (AYMARD et al., 1980; OTTIS et al., 1982; CASTRUCCI et al., 1994).

Em 1984, um evento de recombinação entre avH1N1 e huH3N2 resultou na geração de uma cepa contendo os genes internos do vírus avH1N1 e as glicoproteínas (HA e NA) do vírus huH3N2 (CASTRUCCI et al., 1993). Este vírus, chamado de “*reassortant human likes wine*” H3N2 (rH3N2) se adaptou muito bem em suínos e se espalhou por diversos países da Europa (BÖTTCHER et al., 2007; VAN REETH et al., 2008; SIMON-GRIFÉ et al., 2011)

Adicionalmente, em 1994, um vírus recombinante H1N2 surgiu em suínos da Grã-Bretanha e, posteriormente, espalhou-se para outros países da Europa. Este vírus continha a maior parte do genoma oriundo do rH3N2 e o gene da HA adquirido de um H1N1 humano que circulou na década de 1980 (BROWN et al., 1995). Assim, as três principais linhagens de swIAV que circulavam na época, na Europa, compartilhavam os mesmos genes das proteínas internas, mas possuíam o gene da HA claramente

distinguível. Desde então, diversos vírus H1N2 de diferentes origens tem sido identificados em toda a Europa. Por exemplo, o vírus H1N2 encontrado na Itália continha a NA oriunda do vírus sazonal H3N2 de humanos (MORENO et al., 2012). Na Dinamarca e na França o vírus H1N2 identificado continha a HA do vírus avH1N1 (HJULSAGER et al., 2006; KUNTZ-SIMON & MADEC., 2009) e também foi identificado um vírus H1N2 com a NA originária do vírus rH3N2 (MORENO et al., 2012).

Atualmente, os subtipos predominantes na população de suínos da Europa são os três swIAV enzoóticos: avH1N1, rH1N2 e rH3N2, bem como o subtipo A(H1N1)pdm09. Além disso, foram encontrados recombinantes oriundos destas 4 linhagens, especialmente do influenza A(H1N1)pdm09 (SIMON et al., 2014).

1.4.3. Influenza A na população de suínos da Ásia

A epidemiologia do vírus influenza na população de suínos na Ásia apresenta uma série de particularidades quando comparada com o que ocorre em outros países e continentes. Este fato pode ser atribuído à existência de uma grande população de suínos, muitas vezes criados em sistemas extensivos e em contato com aves migratórias. A primeira particularidade dos vírus que circulam na Ásia é a existência de duas linhagens principais dentro do subtipo H1N1 (cH1N1 e avH1N1), bem como uma ampla variedade de vírus recombinantes pertencentes a esse subtipo (VIJAYKRISHNA et al., 2011; CHOI et al., 2012). A diversidade das cepas H3N2 na Ásia também é mais complexa do que na Europa ou na América do Norte. Em verdade, na Ásia circulam vírus H3N2 que recombinaram com as cepas huH3N2 e rH3N2, além do triplo recombinante trH3N2 de origem norte americana e ainda, outras amostras com características ímpares: um vírus H3N2 isolado na China e na Tailândia nunca foi relatado em outros lugares (CHUTINIMITKUL et al., 2008; TAKEMAE et al., 2008; YU et al, 2008).

Na Ásia, o primeiro isolamento de H1N2 ocorreu no Japão, em 1978. Nesse caso, o vírus H1N2 era um recombinante entre o cH1N1 e o vírus sazonal H3N2 de origem humana. Esse rearranjo estabeleceu uma nova linhagem que tem circulado, desde então, naquele país (YONEYAMA et al., 2010). Na Coreia, um triplo recombinante H1N2 relacionado com o vírus na América do Norte tem circulado desde 2002 (CHOI et al., 2002; PASCUA et al., 2008). Após a emergência do vírus H1N1pdm09 em humanos,

este infectou a população de suínos no Japão e posteriormente recombinau com o vírus H1N2 (MATSUU et al., 2012).

1.4.4. Influenza A em suínos na África

A população de suínos na África não é muito expressiva, quando comparada com outros continentes. Além disso, a densidade populacional na África é baixa, o que de alguma forma pode contribuir para uma incidência relativamente baixa de influenza suína nesta região (VINCENT et al., , 2012). Inquéritos sorológicos, realizados em suínos da Nigéria, sugeriram uma alta soroprevalência de animais positivos para cepas de influenza de origem humana sazonal (ADEOLA & ADENIJI, 2010). Em contraste com estes resultados, existem outros trabalhos que relatam uma soroprevalência extremamente baixa na Costa do Marfim, Benin e Togo (COUACY-HYMAN, 2012), sendo que até hoje não se sabe muito sobre a circulação deste vírus em suínos da África. Um trabalho relatando o isolamento do vírus influenza em Camarões e na Nigéria demonstrou se tratar de isolados do vírus H1N1pdm09 (NJABO, 2011).

1.4.5. Influenza A em suínos da América do Sul

Na América do Sul, são poucos os relatos e dados sobre isolamento e sequenciamento do vírus influenza A em suínos, especialmente antes do ano de 2009. Essa escassez de informações dificulta detalhar a ocorrência desta enfermidade ao longo dos anos na população de suínos deste continente.

Na Argentina, no final de 2008, um vírus H3N2 idêntico ao vírus humano, foi isolado de suínos com sinais clínicos de doença respiratória e febre, característicos da influenza. Infecções experimentais mostraram que este vírus era transmitido de forma eficiente entre suínos; os animais inoculados apresentaram lesões típicas da doença, o que sugere que este vírus de humanos se adaptou de forma eficiente na população de suínos, podendo desta forma, ser mantido nesta população (PEREDA et al., 2011).

Nos anos de 2009 e 2010 foi identificado, também na Argentina, um vírus recombinante contendo os genes internos do H1N1pdm09 e genes da HA e NA

provenientes de um vírus norte-americano, pertencente ao *cluster delta 2*. Portanto, existem evidências indiretas da circulação dos vírus de origem norte-americana deste “*cluster*” na população de suínos da Argentina (PEREDA et al., 2011).

Em 2011, outro vírus recombinante foi isolado na Argentina, desta vez contendo os genes de superfície (HA e NA) oriundos da cepa H3N2 de origem humana e genes internos originários do vírus H1N1pdm09. Acredita-se que a não utilização de vacinas para influenza suína na América do Sul, aliada às características de produção na Argentina, no qual há criação de suínos de todas as idades, desde neonatos até adultos, alojados em um mesmo sítio, podem estar contribuindo para o aparecimento destes novos recombinantes (VINCENT et al., 2012).

No Brasil, especificamente, são poucos os relatos de infecção pelo vírus da influenza antes de 2009. A maioria dos estudos avaliou indiretamente a circulação de subtipos virais através de testes sorológicos. Um destes, utilizando o teste de inibição da hemaglutinação (HI) para influenza, analisou 1417 soros coletados em 9 estados brasileiros no período de 1996 a 1999. Os resultados indicaram a presença de anticorpos contra os subtipos virais H1N1clássico e H3N2 (BRENTANO et al., 2002). Posteriormente, foram testados 34 soros de suínos no estado de São Paulo e, da mesma forma, foram encontrados anticorpos contra os subtipos H1N1 e H3N2 (Mancini et al., 2006). O estudo realizado por Caron et al. (2010) analisando soro de suínos do estado do Paraná relatou que 46% das granjas analisadas foram consideradas positivas para o vírus influenza, com uma prevalência de anticorpos em suínos contra o subtipo H3N2 de 20%.

A partir de 2009, coincidindo com a pandemia de influenza A (H1N1) em humanos, foram relatados no Brasil inúmeros surtos de infecção respiratória aguda em suínos de várias faixas etárias. A análise destes isolados através do sequenciamento do genoma viral revelou que o vírus encontrado em suínos era o mesmo vírus A(H1N1)pdm09 que estava circulando em humanos (SCHAEFER et al., 2011; RAJÃO et al., 2012). Além disso, a análise por HI de soros coletados de suínos no Brasil, antes e depois de 2009, revelou que antes de 2009 a presença de anticorpos contra o vírus influenza A(H1N1)pdm09 não era detectado em suínos no Brasil (ZANELLA et al., 2011). Isto demonstra, claramente, que este vírus não circulava na população de suínos do Brasil antes de iniciar a pandemia em humanos.

Em 2012, um estudo realizado por Rajão et al. (2013) no estado de Minas Gerais, analisou, através do teste de HI, 355 soros de suínos. Neste estudo, observou-se

que 44,5% dos animais apresentaram anticorpos para o vírus H1N1 clássico; 10,1% dos animais foram positivos para o vírus H3N2 e 38,3% foram positivos para o vírus H1N1 de origem humana.

Adicionalmente, um novo vírus H1N2 foi identificado recentemente. A análise dos genes deste vírus revelou que este seria fruto de um rearranjo de genes, onde os genes que codificam as glicoproteínas de superfície H1 e N2 teriam origem em um vírus humano pertencente ao “*cluster*” *delta* enquanto que os demais genes seriam originários do vírus A(H1N1)pdm09 que vem circulando no Brasil desde 2009 (SCHAEFER et al., 2015).

Um trabalho recentemente publicado analisou amostras de SwIAV isoladas no Brasil entre os anos de 2009 e 2012 e encontrou uma grande variabilidade genética entre as cepas circulantes. A análise filogenética dos segmentos do genoma permitiu identificar a presença dos recombinantes H1N2 e H3N2, com as glicoproteínas HA e NA originárias de vírus humanos e os genes internos originários do A(H1N1)pdm09, circulando conjuntamente com o subtipo A(H1N1)pdm09 (NELSON et al., 2015b).

Além disto, no Brasil, alguns estudos foram conduzidos buscando avaliar a presença de IAV na população de suídeos selvagens, incluindo tanto javalis criados em cativeiro como porcos ferais (porco monteiro). Amostras de pulmão de javalis foram coletadas no abate com o objetivo de investigar o envolvimento do vírus influenza em quadros de pneumonia. O vírus foi detectado por PCR quantitativa em 11 de 60 pulmões com lesões macroscópicas típicas de pneumonia. Nas amostras positivas, o sequenciamento do gene M indicou uma identidade de 98 – 99% com o H1N1pdm09. Com relação à população de porcos monteiros analisada, foram coletadas amostras de soro e os resultados indicaram a presença de anticorpos para o vírus influenza em aproximadamente 75% das amostras testadas (BIONDO et al., 2012). Além disso, também foi detectada a presença do subtipo SwIAV H1N2 em javalis criados em cativeiro (BIONDO et al., 2014).

1.4.6. H1N1 pandêmico A(H1N1)pdm09

Em meados de março/abril de 2009, um novo vírus pandêmico H1N1 – o influenza A(H1N1)pdm09 - emergiu na população humana da América do Norte (GARTEN et al., 2009). O genoma deste vírus, responsável pela pandemia de 2009,

possuía uma composição genética complexa, com seis segmentos gênicos oriundos do vírus triplo recombinante H1N2 originário da América do Norte (PB2, PB1, PA, HA (H1), NP e NS) e dois segmentos pertencentes ao vírus H1N1 de origem aviária (NA (N1) e M), que já circulava na população de suínos da Europa e Ásia (FIGURA 5) (GARTEN et al., 2009; SMITH et al., 2009).

Estudos posteriores e o sequenciamento deste vírus demonstraram que o mesmo não continha muitas das adaptações já conhecidas, que facilitam a transmissão do SIV entre humanos, bem como os marcadores de virulência já identificados previamente. Apesar disso, tornou-se um vírus altamente transmissível na população humana (CHEN et al., 2011).

Os surtos de A(H1N1)pdm09 em suínos foram precedidos por inúmeros relatos da ocorrência da doença em humanos (HOWDEN et al., 2009 ; PEREDA et al., 2010). O primeiro caso em suínos foi identificado em 28 de abril de 2009, em uma granja do Canadá, onde os animais não eram vacinados para influenza (HOWDEN et al., 2009; WEINGARTL et al., 2010). Logo após, o influenza A(H1N1)pdm09 foi reportado em diversos outros países, incluindo Argentina, Itália, Coreia, Estados Unidos, Brasil, etc (PEREDA et al., 2010; MORENO et al., 2010; KIM et al., 2011; DUCATEZ et al., 2011; SCHAEFER et al., 2011). Curiosamente, alguns países como Noruega e Austrália que supostamente eram livres de influenza suína até 2009, passaram a relatar casos de infecção pelo vírus influenza A(H1N1)pdm09, com um elevado número de granjas afetadas (HOFSHAGEN et al., 2009; DENG et al., 2012).

Apesar dos esforços, até hoje, a origem evolucionária do vírus influenza A(H1N1)pdm09 em suínos permanece pouco compreendida. Além disso, em nenhuma parte do mundo foi identificado um possível ancestral deste vírus circulando em suínos (NELSON et al., 2015)

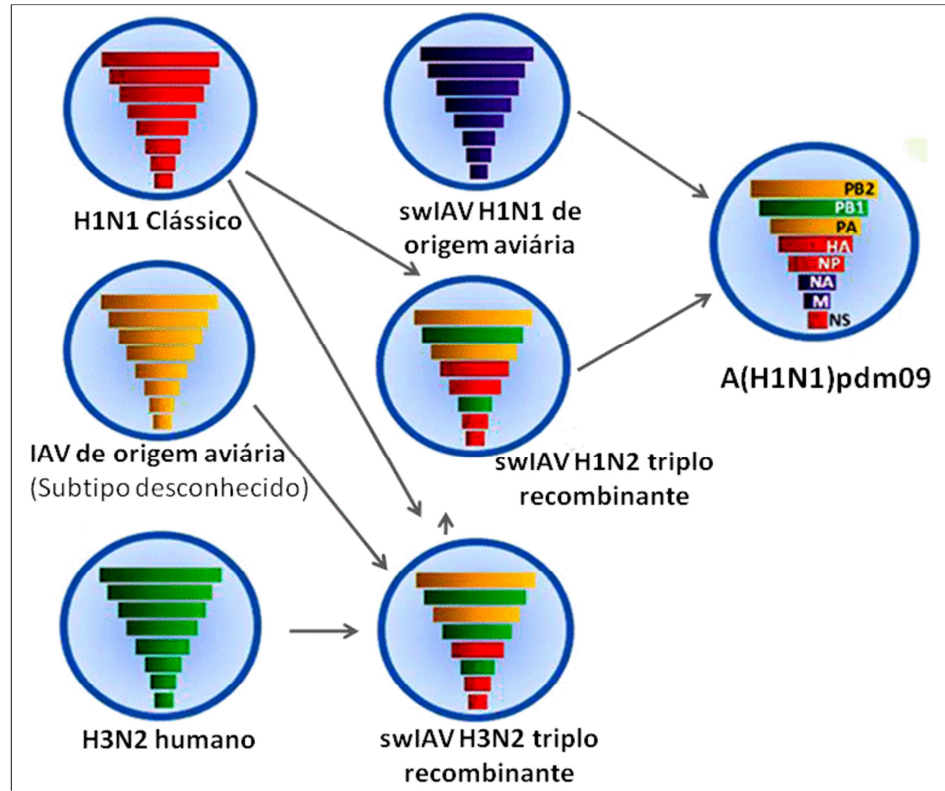


Figura 5. Origem do vírus H1N1 pandêmico de 2009.

1.4. Patogenia e sinais clínicos

Os animais se infectam pela inalação do vírus em aerossóis ou pelo contato direto ou indireto com animais infectados ou secreções contaminadas. A infecção geralmente é limitada ao trato respiratório e a viremia raramente é detectada. A replicação viral já foi demonstrada na mucosa nasal, tonsilas, traquéia, linfonodos traqueobronquiais e pulmões (FLORES et al., 2007). Células positivas para antígenos virais são encontradas no epitélio bronquial após duas horas de infecção e, após 16 horas, podem ser observadas grandes áreas infectadas no epitélio bronquial. Antígenos virais também podem ser detectados nos septos alveolares após quatro horas de infecção e, após 24 horas, aparecem numerosos focos de infecção nas células dos alvéolos e ductos (FLORES et al., 2007).

Os pulmões são, provavelmente, os principais sítios de replicação do swIAV. O RNA viral pode ser detectado nas células epiteliais dos brônquios, bronquíolos, pneumócitos e macrófagos alveolares e intersticiais, e a distribuição varia com o curso e fase da infecção. A detecção do H1N2 no epitélio dos brônquios e bronquíolos sugere que as células epiteliais desses locais representem os sítios iniciais de infecção, e que a

replicação viral induz lesão nesses tecidos, impedindo a ação dos mecanismos de defesa muco-ciliar. A associação de outros patógenos, como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus spp* e *Pasteurella multocida*, produz doença respiratória que pode estar associada com aumento da mortalidade (JUNG et al., 2005).

Os sinais clínicos da infecção pelo SIV iniciam subitamente, com todo ou grande parte do rebanho acometido dentro de um ou dois dias (EASTERDAY, 1975, EASTERDAY & VAN REETH, 1999). O estado agudo da doença geralmente dura poucos dias e a recuperação é rápida, iniciando a partir do 4º ao 7º dia após o início dos sinais clínicos (FLORES et al., 2007). Os primeiros sinais que podem ser observados são inapetência e diminuição do consumo alimentar, evoluindo para intensa prostração e anorexia, com aumento progressivo de dispnéia e tosse. (EASTERDAY, 1975). A temperatura corporal pode chegar a 41.7°C. Animais com dispnéia geralmente apresentam decúbito esternal ou posição de cão sentado, boca aberta e respiração abdominal (OLSEN et al., 2006). Conjuntivite e descarga nasal também têm sido relatadas, mas com uma menor frequência (EASTERDAY, 1975).

Existem relatos de infecções muito precoces, pois o swIAV pode afetar leitões com poucos dias de idade nascidos de porcas infectadas durante a gestação. Estes quadros costumam afetar apenas rebanhos sem imunidade prévia para tal agente. No relato de Easterday (1975), a infecção tendeu a tornar-se crônica nos leitões, que passaram a apresentar atraso no desenvolvimento e morte durante o período de lactação ou após o desmame.

Outros sinais clínicos que podem ser observados durante surtos de influenza são abortos em decorrência da febre presente no quadro agudo da doença e diminuição das taxas de concepção. Para fêmeas sem imunidade prévia, o aborto pode ocorrer de forma disseminada, com taxas variando de 5 a 10%, durando aproximadamente uma semana nos galpões de gestação (EASTERDAY & VAN REETH, 1999). A diminuição na taxa de concepção pode ser explicada pelo aumento de retorno ao estro, mumificação fetal e mortalidade logo após o parto (EASTERDAY, 1975).

1.5. Lesões macroscópicas e microscópicas

Animais com sinais agudos de influenza frequentemente apresentam congestão das mucosas e formação de exsudato nas vias aéreas superiores (cavidade nasal, laringe e

faringe), brônquios e bronquíolos, com hiperplasia e necrose focal do epitélio bronquial e bronquiolar (EASTERDAY, 1975). Os linfonodos bronquiais, cervicais e mediastínicos podem com frequência se apresentar extremamente aumentados, edematosos e por vezes congestionados (EASTERDAY, 1975, HEINEN, 2002). Em casos fatais há aumento de fibrina no exsudato bronquial e superfície pleural (EASTERDAY, 1975).

São encontradas lesões macroscópicas bem demarcadas de pneumonia intersticial nos pulmões, principalmente nos lobos apical e cardíaco, podendo afetar todos os lobos (EASTERDAY & VAN REETH, 1999). Outra lesão característica são as áreas de consolidação/atelectasia que apresentam coloração vermelho escura (FIGURA 6), com depressões e irregularidades no parênquima e edema interlobular, com presença de exsudato espumoso nas passagens aéreas (BRENTANO et al. 2002). A porção do pulmão sem pneumonia pode apresentar enfisema compensatório (EASTERDAY, 1975).

As lesões microscópicas consistem de bronquite e bronquiolite necrosante, infiltrado linfocítico peribronquiolar leve, pneumonia broncointersticial, necrose multifocal e acúmulo de neutrófilos no lúmen e células descamadas, podendo causar bronquiolite obliterante (LÓPEZ, 2006; HOWDEN et al., 2009; VINCENT et al., 2009; SCHAEFER et al., 2011). Outras lesões incluem mudanças no epitélio bronquiolar, arredondamento e degeneração do epitélio, progredindo de metaplasia cubóide a escamosa e leve traqueíte crônica não específica (HOWDEN et al., 2009). Em geral, as lesões apresentam regressão dentro de 6 a 7 dias (EASTERDAY, 1975).

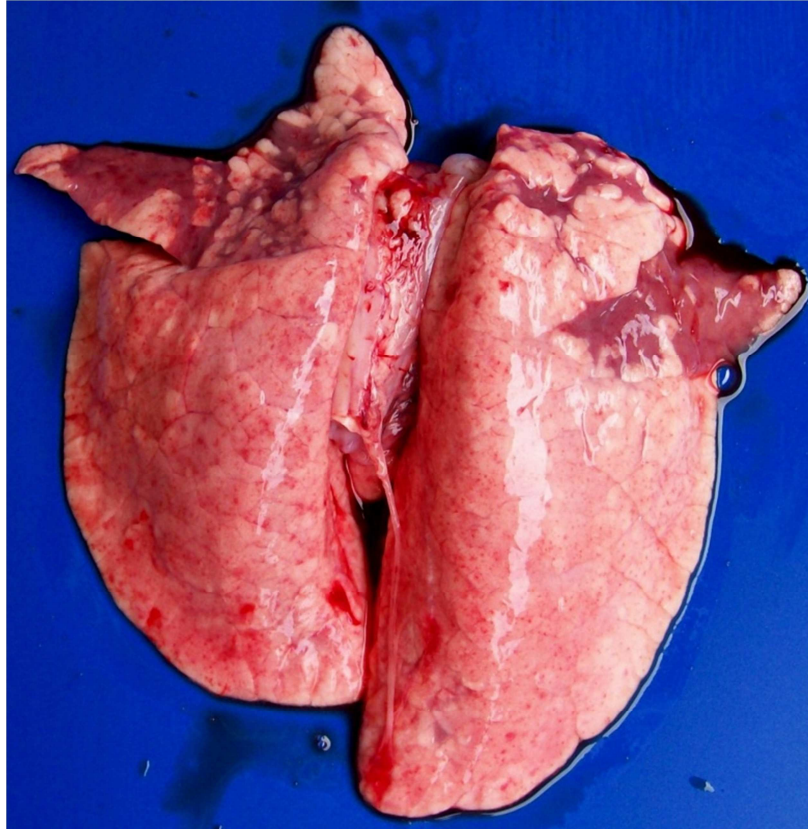


FIGURA 6. Pulmão suíno com áreas de consolidação nos lobos apicais e cardíaco.

1.5. Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo de influenza suína é realizado através da observação dos sinais clínicos dos animais e da análise dos aspectos epidemiológicos (síndrome respiratória aguda, afetando uma grande proporção de animais).

O diagnóstico definitivo da infecção pelo vírus influenza em suínos deve ser feito através de testes laboratoriais. A confirmação do agente pode ser obtida pela detecção direta do vírus em amostras biológicas ou pela detecção de anticorpos. No segundo caso, é importante observar que, durante a fase aguda da doença, os animais são soronegativos para a cepa causadora da infecção.

1.5.1. Isolamento Viral

O isolamento viral é uma das principais técnicas para diagnóstico do vírus influenza, e pode ser realizado a partir de secreção nasal, fluido oral ou tecido pulmonar

(CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 2012). Em função do curto período de duração da doença, o momento da coleta do material é fundamental para o sucesso do isolamento viral, especialmente para suabes nasais, pois o vírus está presente no muco nasal apenas nos primeiros dias após o início dos sinais clínicos (VAN REETH et al., 2012).

O método padrão para o isolamento do vírus influenza é a inoculação de ovos embrionados de galinhas SPF (“*Specific Pathogen Free*”) com nove a onze dias. A confirmação da presença do vírus é feita através do teste de hemaglutinação (HA). Em geral são realizadas no máximo duas passagens virais, para minimizar a ocorrência de possíveis alterações genéticas e antigênicas no isolado original (SCHILD et al., 1983). Por se tratar de uma técnica bastante trabalhosa, esta foi sendo substituída pelo isolamento viral em cultivo de células MDCK (“*Madin-Darby Canine Kidney*”) (CLAVIJO et al., 2002). Para a realização desta técnica, as amostras são inoculadas em cultura de células suscetíveis, que são suplementadas com tripsina e mantidas em meio sem soro. Como o efeito citopático induzido pelo vírus influenza muitas vezes é difícil de ser visualizado, a confirmação da presença do vírus no cultivo celular é realizada através de testes como a imunofluorescência, imunocitoquímica (ICC), HA ou ainda a PCR (VINCENT et al., 1997, FOUCHIER et al., 2000).

O isolamento viral é um método muito sensível para a detecção do vírus influenza. Além disso, disponibiliza o isolado viral para outras análises, como o sequenciamento completo ou parcial do genoma, e também para a produção de vacinas (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 2012). Embora as células de linhagem para o isolamento viral sejam amplamente utilizadas pela possibilidade de produção de células em grande escala e pela alta homogeneidade das mesmas (FERRARI et al., 2003; LOMBARDO et al., 2012), os ovos SPF ainda são muito utilizados para o isolamento do vírus influenza, por permitirem a replicação eficiente de certas amostras de vírus, induzindo títulos virais maiores (HUSSAIN et al., 2010). Além disso, os ovos embrionados ainda são utilizados para 100% da produção anual de vacinas para influenza em humanos (GERDIL et al., 2003)

1.5.2. Testes para detecção de ácidos nucléicos

Os testes moleculares mais utilizados para o diagnóstico de influenza A são: PCR de transcrição reversa (RT-PCR) convencional e RT-PCR em tempo real. Estas técnicas detectam o genoma viral em amostras de secreção nasal, fluido oral ou tecido

pulmonar, indicando infecção recente pelo vírus influenza A (ZANELLA & BRENTANO, 2012). Em suínos experimentalmente infectados pelo vírus influenza, a detecção do ácido nucleico viral por RT-PCR pode ser feita até 11 dias pós-infecção (LANGE et al., 2009). O principal gene alvo para os testes moleculares de triagem é o gene que codifica a proteína da matriz (*M*) do vírus influenza A, devido ao alto nível de conservação deste gene entre diferentes amostras de vírus (FOUCHIER et al., 2000).

A RT-PCR em tempo real é uma técnica mais rápida que a RT-PCR convencional e, além disso, ainda permite a quantificação da carga viral nas amostras (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 2012). A RT-PCR em tempo real também pode ser padronizada para detecção dos subtipos virais, como no caso do vírus influenza A (H1N1)pdm09, no qual a RT-PCR em tempo real foi desenvolvida visando a detecção do gene M do vírus pandêmico, que é diferente do gene M dos vírus influenza que já circulavam em suínos (LORUSSO et al., 2011). Outra técnica disponível é a RT-PCR *multiplex*, que se baseia na amplificação simultânea de mais de um fragmento gênico. Este método também permite a subtipagem do vírus influenza A como base nas proteínas HA e NA (CHOI et al., 2002).

1.7.3. Testes sorológicos

As amostras utilizadas para o diagnóstico sorológico de infecções pelo swIAV incluem fluidos orais e o soro sanguíneo. Os testes sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos específicos contra o vírus. Os anticorpos, predominantemente IgG, em suínos infectados pelo vírus influenza tornam-se detectáveis a partir dos sete dias pós-infecção, com pico de produção entre 2-3 semanas pós-infecção (VAN REETH et al., 2012).

Basicamente, existem dois tipos de testes sorológicos disponíveis para a detecção de anticorpos contra o vírus influenza. O teste do tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) indireto e o teste de inibição da hemaglutinação (HI). Os testes de ELISA disponíveis comercialmente no Brasil identificam anticorpos contra a proteína NP do vírus influenza A, tanto em amostras de soro como em amostras de fluido oral e apresenta boa sensibilidade, porém não é capaz de diferenciar os subtipos virais (CIACCI-ZANELLA et al., 2010).

Para o teste de HI são utilizadas amostras de soro suíno. Este teste baseia-se na capacidade do vírus influenza de ligar-se a receptores específicos, presentes na

superfície das hemácias, provocando a hemaglutinação. Utiliza-se como vírus de referência os subtipos virais mais prevalentes em determinada região ou País. (FLORES et al., 2007; DETMER et al., 2012). Por exemplo, no Brasil os subtipos de influenza encontrados em suínos são H1N1, H3N2 (BRENTANO et al., 2002), H1N2 (SCHAEFER et al., 2012) e A(H1N1)pdm09 (SCHAEFER et al., 2011), sendo todos esses subtipos utilizados como vírus de referência no teste de HI. Para identificar infecção recente de influenza em um rebanho, os soros devem ser coletados durante a fase aguda da infecção e após 3 ou 4 semanas (VAN REETH et al., 2012). O objetivo da coleta pareada de soro é identificar soroconversão, ou seja, um aumento no título de anticorpos de pelo menos quatro vezes (JANKE, 2000). Quando os suínos são vacinados, a interpretação torna-se mais complexa, uma vez que estas técnicas mencionadas acima não são capazes de diferenciar anticorpos vacinais de anticorpos induzidos pela infecção natural.

Para a realização da técnica de HI, o tratamento do soro é de fundamental importância. Em 1947, Francis (1947) descreveu pela primeira vez a presença de inibidores inespecíficos da hemaglutinação para o vírus influenza em soros de humanos e animais. Existem três categorias de inibidores inespecíficos que foram identificados: os *alpha* inibidores; *beta* inibidores e *gamma* inibidores. Sendo que os *gamma* inibidores são termoresistentes, possuem atividade neutralizante e estão presentes em grande quantidade nos soros de suínos, equinos e cobaias (RYAN-POIRIER et al., 1991). Estes inibidores agem competindo pelos sítios de ligação dos receptores virais. A ligação ocorre através da ligação da hemaglutinina viral com resíduos de ácido siálico presentes nas moléculas de inibidores inespecíficos, e desta forma impede a ligação dos eritrócitos com as partículas virais, gerando falsos positivos ou aumentando o título de anticorpos. (PRITCHETT & PAULSON, 1989). Várias técnicas são utilizadas para eliminar os inibidores inespecíficos do soro, incluindo o tratamento térmico; Kaolin e adsorção com eritrócitos; periodato de tripsina (TP) ou RDE (*Receptor-Destroying Enzyme*) de *Vibrio cholerae* (SUBBARAO et al., 1992). Embora diversos tratamentos tenham sido utilizados, o tratamento com RDE tem se mostrado o mais eficiente (BOLIAR et al., 2006).

1.7.4. Histopatologia e imuno-histoquímica

Para a histopatologia e imuno-histoquímica, o tecido mais adequado para a coleta de amostras para exame é o pulmão. Como as lesões observadas na histopatologia são características, mas não confirmatórias da infecção pelo vírus influenza, utiliza-se a técnica de imuno-histoquímica para demonstrar antígenos específicos, nesse caso, proteínas virais, associados com as lesões características do pulmão. Como o vírus replica no epitélio respiratório, utilizam-se anticorpos específicos para detecção dos antígenos virais nas células epiteliais dos bronquíolos e brônquios, e em menor escala, nos pneumócitos tipo II dos septos alveolares (GAUGER et al., 2012). O resultado positivo geralmente está associado à fase aguda da doença, ou seja, até 5-7 dias pós-infecção (WEINGARTL et al., 2010; GAUGER et al., 2012), embora a marcação de poucas células infectadas podem ser observadas até 13 dias pós-infecção (WEINGARTL et al., 2010).

1.8. Controle e prevenção

O controle da influenza suína é basicamente baseado em medidas de biossegurança e no uso de vacinas. Medidas de higiene para os trabalhadores rurais, visitantes e veterinários, podem ajudar a reduzir as chances de introdução de novas cepas do vírus influenza ou dificultar a disseminação do vírus dentro da granja. O sistema de manejo “*all in/all out*”, acompanhado de medidas de desinfecção e limpeza das instalações, muitas vezes auxilia na eliminação do vírus na propriedade (LEE et al., 2007; TORREMORELL et al., 2009). Outra medida de grande valia para impedir a introdução de novos vírus influenza em rebanhos suínos é a vacinação dos trabalhadores envolvidos na produção dos suínos. Esta medida é importante para minimizar a transmissão do vírus entre espécies, especialmente de humanos para suínos, diminuindo assim a geração de novos vírus recombinantes, muitas vezes com potencial zoonótico (GRAY et al., 2007).

Nos Estados Unidos e Europa, a vacinação de suínos contra swIAV é uma prática comum e utilizada há bastante tempo. Estas vacinas são inativadas e estão disponíveis para os subtipos virais H1N1, H1N2, H3N2 e A(H1N1)pdm09 e tem auxiliado no controle da influenza suína nos países que fazem uso delas (VINCENT et

al., 2010). No Brasil, até recentemente, não existia vacina licenciada para uso em suínos. No final de 2014, uma vacina inativada, contendo apenas o vírus A(H1N1)pdm09 foi liberada para imunização de suínos no Brasil.

1.8.1. Vacinas inativadas

As vacinas inativadas são produzidas em ovos embrionados ou em cultivo de células e são formuladas com a partícula viral completa e adjuvantes (na maioria das vezes oleoso). Vários relatos na literatura mostram que o uso das vacinas inativadas contra o swIAV podem trazer benefícios relacionados à diminuição da excreção viral, dos sinais clínicos e dos gastos causados pela infecção viral e infecções concomitantes (HEINEM et al., 2001; KITIKROON et al., 2006; VINCENT et al., 2010; VAN REETH & MA, 2013). Infelizmente, a atualização das vacinas comerciais não acompanha as rápidas mudanças que ocorrem no genoma dos vírus influenza. Desta forma, mudanças antigênicas nas cepas circulantes de swIAV diminuem drasticamente a eficácia das vacinas utilizadas, uma vez que não existe uma boa proteção cruzada entre os diferentes subtipos virais. Sendo assim, é de grande importância a constante atualização e o conhecimento dos subtipos virais circulantes em cada região (VAN REETH & MA, 2013).

1.8.2. Vacinas autógenas

As vacinas autógenas são preparadas a partir de amostras de vírus de campo isoladas de granjas com doença clínica, e, normalmente, são inativadas e adjuvadas. O uso de vacinas autógenas tem aumentado uma vez que os fabricantes de vacinas comerciais encontram uma grande dificuldade em atualizar os subtipos de vírus para incluir na formulação destes imunobiológicos (VINCENT et al., 2008). No entanto, o uso de vacinas autógenas só é permitido com o acompanhamento direto de um médico veterinário e a eficácia destas vacinas não tem sido avaliada (VINCENT et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Aumentar o conhecimento acerca da circulação do vírus da influenza suína no sul do Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar aspectos clínicos, patológicos e virológicos durante a ocorrência de surtos de influenza em granjas de suínos no Rio Grande do Sul;
- Classificar os subtipos de vírus influenza envolvidos nos surtos estudados;
- Fazer uma caracterização genética detalhada, através do sequenciamento do genoma completo dos vírus Influenza A identificados nas granjas analisadas.

3. CAPÍTULO 1

Swine influenza virus and association with the porcine respiratory disease complex in pig farms in Southern Brazil

Candice Schmidt^{1,2}, Samuel P. Cibulski^{1,2}, Caroline P. Andrade³, Thais F. Teixeira², Ana Paula M. Varela², Camila M. Scheffer^{1,2}, Ana Cláudia Franco¹, Laura L. de Almeida², Paulo M. Roehle¹.

¹Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

²Fepagro Animal Health –Institute of Veterinary Research Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

³Pathology Laboratory, Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

Correspondence: Candice Schmidt, Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil. E-mail: candy86.vet@gmail.com

This work was carried out in Institute of Veterinary Research Desidério Finamor (IPVDF) and Federal University of Rio Grande do Sul.

IMPACTS

- Swine have been proposed to serve as intermediate ‘mixing-vessel’ hosts for the evolution of novel reassortant viruses because of their capacity to be infected with both avian and human influenza viruses, which can exchange genome segments, generating new viruses with pandemic potential.
- The circulation of novel variants of swine influenza A viruses in pigs and the possibility of introduction of such viruses into humans, highlight the importance of keeping a vigorous epidemiological vigilance on influenza in pigs.
- Determine the diversity of swine influenza A viruses circulating in pig population is important for both, human and animal health.

SUMMARY

Despite the putative endemic status of swine influenza A virus (swIAV) infections, data on the occurrence of swine influenza outbreaks are scarce in Brazil. The aim of this study was to detect and subtype swIAVs from six outbreaks of porcine respiratory disease complex (PRDC) in Southern Brazil. Nasal swabs were collected from 66 piglets with signs of respiratory disease in six herds. Lung tissue samples were collected from six necropsied animals. Virus detection was performed by PCR screening and confirmed by virus isolation and hemagglutination (HA). Influenza A subtyping was performed by a Real-Time Reverse Transcriptase PCR (rRT-PCR) to detect the A(H1N1)pdm09; other swIAV subtypes were determined by multiplex RT-PCR. In lung tissues, the major bacterial and viral pathogens associated with PRDC (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and PCV2) were investigated. In some affected pigs, clinico-pathological evaluation was conducted. Influenza A was detected by screening PCR in 46/66 swab samples and from 5/6 lungs. Virus was recovered from pigs of the six herds. Subtype A(H1N1)pdm09 was detected in 4/6 herds and H1N2 in the other 2/6 herds. In lung tissues, further agents involved in PRDC were detected in all cases; *Pasteurella multocida* was identified in 5/6 samples and *Mycoplasma hyopneumoniae* in 3/6. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (1/6), *Haemophilus parasuis* (1/6) and PCV2 (1/6) were also detected. These findings indicate that subtypes A(H1N1)pdm09 and H1N2 were present in pigs in Southern Brazil and were associated with PRDC outbreaks.

Keywords: Influenza A virus, A(H1N1)pdm09, H1N2, swine, respiratory disease outbreaks.

1. Introduction

Respiratory diseases in pigs are a major health concern in swine production (Opriessnig et al., 2011). One of the agents of porcine respiratory disease that are particularly relevant is influenza virus, not only due to its capacity to cause disease in pigs but also due to its zoonotic potential (Vincent et al., 2008). In pigs, the first clinical description of swine influenza A (swIAV) dates to 1918, coinciding with the human influenza pandemic known as Spanish flu (Koen, 1919). Since then, swIAV have often been associated with the “porcine respiratory disease complex” (PRDC), where swIAV may act synergistically with other pathogens such as *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2) (Vincent et al., 2008).

Swine influenza viruses are members of the family *Orthomyxoviridae*, genus *Influenzavirus A*. Virions contain eight segments of single stranded RNA of negative sense (Palese et al., 2007). Currently, three main subtypes of swIAVs (H1N1, H1N2 and H3N2) with different lineages are circulating in the swine population throughout the world (Moreno et al., 2012). However, the distribution of swIAV subtypes is in constant evolution; the A(H1N1)pdm09 has been isolated from pigs in several countries (Moreno et al., 2010; Forgie et al., 2011; Schaefer et al., 2011). Furthermore, identification of reassortant viruses involving the pandemic A(H1N1)pdm09 and endemic viruses lineages have been frequently reported (Ducatez et al., 2011; Moreno et al., 2012; Schmidt et al., 2014). Therefore, the evolutionary dynamics of IAVs are complex and determined by their multi-host ecology, viral structure, and segmented genome which allows genetic reassortment between different viruses (Nelson and Vincent, 2015).

In Brazil, coinciding with the 2009 influenza pandemics in humans, outbreaks of acute respiratory infections in pigs were reported in which the subtype A(H1N1)pdm09 was identified (Schaefer et al., 2011; Rajao et al., 2013). The genome of this virus contains six gene segments (*PB2*, *PB1*, *PA*, *HA*, *NP* and *NS*) descending from the triple-reassortant swIAV of the North American swine lineage, plus two gene segments (*M* and *NA*) derived from a Eurasian lineage of swine influenza (Dawood et al., 2009). Recently, a human-like H1N2 was identified in Brazil in which the *HA* and *NA* genes clustered with influenza viruses of human lineages, whereas the internal genes (*PB1*, *PB2*, *PA*, *NP*, *M*, and *NS*) clustered with the subtype A(H1N1)pdm09 (Schmidt et al., 2014; Schaefer et al., 2015). Apart from this information, data on swIAV infections and swIAV variability in Brazil are still scarce.

Pigs may act as “mixing vessels” for the generation of reassortant viruses, eventually capable of infecting humans (Scholtissek, 1995). Thus, influenza surveillance on that species is essential to monitor viruses circulating at the human–animal interface. With this aim, the present study was conducted in search for influenza viruses in six outbreaks of porcine respiratory disease occurring in a region with intensive pig production in Southern Brazil. In addition, the major bacterial and viral pathogens, usually associated with PRDC were investigated for in order to provide an insight on the occurrence of possible co-infections in the examined herds. Clinico-pathological evaluation was also conducted in one of the affected piglets from each of the farms sampled.

2. Materials and Methods

2.1 Animals and sample collection

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA-IPVDF) under protocol number 04/2013. All protocols used are in accordance with the requirements of ethics and animal welfare proposed by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA, Law 6638 of May 8, 1979).

Sample collection was carried out in middle Autumn/Winter months. Six swine producing herds linked to a cooperative located in the centro-oriental meso-region of the state of Rio Grande do Sul (Vale do Taquari) were selected. Samples were collected from 1-5 week old piglets during outbreaks of respiratory disease in four “farrow-to-wean”, as well as two feeder pig production systems. In the “farrow-to-wean” system, the gilts were raised on the same farm, while in the feeder pig production system, piglets were bought from other farmers. Sampled farms had no clear epidemiological link and owners reported occurrence of repeated bouts of PRDC.

None of the farms had previous swIAV vaccination history. Clinical data were obtained from herd owners and veterinarians. Eleven animals were sampled per farms, based on an estimated 50% prevalence of swine influenza, with a 95% confidence interval (Thrusfield, 2007). Nasal swabs were collected from 66 piglets displaying signs of acute respiratory disease (cough, sneezing, respiratory distress and hyperthermia). Nasal swabbing was performed using sterile synthetic swabs, which were then placed in viral transport medium - Minimal Essential Medium (Gibco), supplemented with 2% antibiotic and antimycotic solution (10,000 units/ml penicillin, 10,000 ug/ml streptomycin and 25 ug/ml Fungizone® - Gibco) and 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) -. The swabs were kept frozen (-80 °C) until further processing.

In each of the farms, one piglet considered representative of the signs displayed by affected animals was euthanased following recommended ethics and animal welfare procedures (Rivera et al., 2012). Six lung tissue samples (from six different herds) were collected and kept under refrigeration for further processing. Half of each lung samples were fixed in 10% buffered formalin for histopathologic examinations.

2.2. Cells

The Madin Darby Canine Kidney-L cell lineage (MDCK-L) (Jin et al., 1996) were cultivated in MEM (Minimum Essential Medium- Gibco), supplemented with antibiotics (penicillin 100 IU/ml; streptomycin 100 µg/ml; Gibco), 1% L-glutamine (Life Technologies) and 5% fetal bovine serum (Gibco). Cell multiplication procedures were performed as following standard procedures (Freshney, 2005).

2.3. Nucleic acid extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted from nasal swabs and lung tissues as follows. Nasal swabs were squeezed in 1ml of virus transport medium. Lung tissue homogenates were prepared to 10% (w/v) in the same medium. Five hundred microliters of each of these suspensions were subjected to RNA extraction with TRIZOL[®] (Life Technologies), according to manufacturer's instructions. Ten microliters of the RNA obtained were submitted to reverse transcription with the high capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) following manufacturers' instructions. The primer used in such reactions (Uni12: 5'-AGCAAAGCAGG-3') consisted of an oligonucleotide complementary to the conserved 12 nucleotides of the 3' end of the eight viral RNA segments (Hoffmann et al., 2001).

Lung tissue samples were further submitted to DNA extractions using the PureLink[®] Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies), according to the

manufacturers specifications. The DNA extracted was used in searches for bacterial or viral nucleic acid.

2.4. Influenza A screening by PCR

The cDNA synthesized was submitted to amplification by a screening PCR to detect all influenza A genomes. The primer pair M52C (5'- CTT CTAACC GAG GTC GAA ACG -3') and M253R (5'- AGG GCA TTT TGG ACA AAG/T CGT CTA -3'), which targets a fragment of 244 bp of the gene encoding the matrix (M) protein, was used (Fouchier et al., 2000). Samples found to contain swIAV genomes were subsequently subjected to additional PCRs for subtyping and virus isolation attempts.

2.5. Influenza A subtyping

From each of the sampled herds, one sample containing IAV genomes at screening (five samples from lungs and one from a nasal swab) were selected and submitted to additional PCR assays for influenza A subtyping. Subtyping aiming detection of A(H1N1)pdm09 was performed in a set of three independent real-time reverse transcription PCRs (rRT-PCR) with the following targets: i) influenza A (InfA) matrix (*M*) gene; ii) swine influenza (SwInfA) *NP* gene; and iii) pandemic A(H1N1)pdm09 virus (*SwH1*) targeting the HA gene (Shu et al., 2011). Samples which resulted negative at A(H1N1)pdm09 amplification attempts were tested in two additional multiplex RT-PCRs designed to differentially amplify segments of the *HA* (*H1* or *H3*) and *NA* (*N1* or *N2*) genes of swIAV(Choi et al., 2002). The PCR products were visualized by electrophoresis in 1% agarose gels stained with ethidium bromide.

2.6. Virus isolation

Swab eluates or lung tissue homogenates were inoculated onto confluent MDCK-L cells in 12-well cell culture plates and let to adsorb at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 60 min. The inoculum was then removed and replaced by 1mL of serum-free MEM (SFM) supplemented with 2µg/ml TPCK (tolylsulfonil phenylalanyl chloromethyl ketone) treated trypsin (Sigma-Aldrich) and antibiotic/antimycotic solution (penicillin 100 units/mL, streptomycin 100 µg/mL, anfotericin B 0,25 µg/mL). The plates were incubated at 37°C for 72 hours and checked daily for cytopathic effect (CPE). After 3 days incubation, the supernatants were collected and tested for hemagglutination (HA) activity with 0.5% turkey red blood cell (RBC) suspensions as previously described (WHO, 2002). Samples negative at HA were again inoculated onto fresh MDCK-L cells and the procedures repeated up to three passages. After the third passage, samples without CPE and HA activity were considered negative for IAV.

2.7. Detection of pathogens associated with PRDC by PCR

The six lung tissue samples were submitted to PCRs in search for the following pathogens: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and porcine circovirus type 2 (PCV2).

Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* was performed as reported previously (Stakenborg et al., 2006), targeting a 1000 bp fragment of the 16S rDNA gene. For *Pasteurella multocida*, a PCR targeting a fragment of 460 bp of the gene *KMT1* was used (Townsend et al., 2001). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* was performed by multiplex PCR using a primer set targeting all the genes encoding the APX toxins in different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Rayamajhi et al., 2005). Detection of *Haemophilus parasuis* was based on the amplification of a 821

bp fragment of the *I6S* gene (Oliveira et al., 2001). For PCV2 detection, a PCR was carried out using primers previously described (Dezen et al., 2010).

3. Results

3.1. Influenza A detection by PCR

A summary of the findings on swIAV detection in the piglets sampled in the present study is presented on Table 1. Positive results at the screening PCR on 46 out of the 66 swab eluates confirmed the presence of the swIAV genomes in all six farms. In lung tissue samples, 5 out of the 6 lungs were found to contain swIAV genomes. Five lung samples and one nasal swab sample were selected for swIAV subtyping.

3.2. Influenza A subtyping

Subtyping of the viruses recovered from the six herds sampled are presented on Table 2. Four out of the six samples were subtyped as A(H1N1)pdm09, whereas the two other samples were subtyped as H1N2. One sample of H1N2 subtype was fully sequenced; the sequence was published elsewhere (Schmidt et al., 2014). Analyses of the eight segments revealed that the *HA* and *NA* genes clustered with human influenza viruses (H1- δ cluster and N2), whereas the internal genes (*PB1*, *PB2*, *PA*, *NP*, *M*, and *NS*) clustered along with subtype A(H1N1)pdm09 (Schmidt et al., 2014).

3.3. Virus isolation

All lungs and nasal swab samples in which swIAV genomes were detected were inoculated in MDCK-L cells. Infectious virus was recovered in 37 out of 46 swabs. In lungs, infectious virus was recovered from 5/5 tissue samples (Table 1). In all isolation attempts, virus was detected at the first passage. Infected cells displayed a cytopathic

effect (CPE) characterized by formation of plaques and quick detachment of cells from the surface of the flask at around 24-48 hours post infection. The supernatants from infected cultures were assayed by HA (Table 1).

3.4. Detection of co-infecting agents

Lung tissues were also tested in search for tested for identification of co-infecting pathogens (Table 2). All of those contained at least one of the pathogens frequently associated to PRDC. *Pasteurella multocida* was identified in 5/6 samples; *Mycoplasma hyopneumoniae* in 3/6; *Actinobacillus pleuropneumoniae* in 1/6; *Haemophilus parasuis* in 1/6 and PCV2 in 1/6.

3.5. Clinical findings, macroscopic and microscopic lesions

Clinical signs more frequently detected were hyperthermia (which often reached 41° C), respiratory distress, coughing, sneezing, conjunctivitis and nasal discharge. An additional sign reported by farm owners was decreased food intake and consequent reduction in expected growth rates. Furthermore, piglets co-infected with swIAV and *Mycoplasma hyopneumoniae* displayed slightly more severe clinical signs such as coughing, sneezing and difficult breathing.

Necropsy of the six animals revealed macroscopic lesions characterized by purple-red cranioventral consolidation of lung tissues, absence of pulmonary collapse due to interstitial pneumonia and foamy exudates in the air passages in 5 out of 6 piglets (Figure 1, 2 and 3). Fibrinous pleuritis and pleural adhesions to the chest wall were observed in one piglet.

Microscopic lesions were observed predominantly in bronchi, bronchioles, and alveoli, characterized by necrotizing bronchiolitis or bronchointerstitial pneumonia.

Inflammatory exudate with predominance of neutrophils and desquamated necrotic epithelial cells were present in the airway lumen, causing obliterative bronchiolitis in 5 out of 6 piglets (Figure 4). Infiltration of lymphocytes was present in the alveolar walls, primarily around the blood vessels (4 out of 6 piglets), characteristic of interstitial pneumonia. One of the animals presented only moderate interstitial pneumonia, without characteristic influenza lesions such as bronchiolitis (Piglet 6). One of the necropsied animals also showed moderate amount of eosinophilic material associated with histiocytes and lymphocyte infiltrates in the lung pleura.

4. Discussion

This study reports the detection and subtyping of swIAVs identified in six swine farms with ongoing outbreaks of respiratory disease in Southern Brazil. Aspects of the clinical-pathological features of influenza infection and concurrent pathogens associated with PRDC were also examined.

Since 2009, the genetic diversity of IAVs in swine populations has expanded globally, generating additional pandemic threats such as the novel variant H3N2v swIAV that infected humans in the United States during 2011–2013 (Epperson et al., 2013). In Brazil, swIAVs infections have been reported; however, only few isolates were subtyped (Rajao et al., 2013; Schmidt et al., 2014; Schaefer et al., 2015). Among these, the pandemic A(H1N1)pdm09 has been identified and appears to be circulating in Brazilian swine population since 2009 (Schaefer et al., 2011; Rajao et al., 2013). In addition, a novel human-like H1N2 influenza virus, resulting from the reassortment of the A(H1N1)pdm09 virus with human-like swIAVs, was detected in 2011 in an outbreak of acute respiratory disease in nursery piglets in Paraná State, Brazil (Schaefer et al., 2015).

The results obtained here confirmed the concurrent circulation of the subtypes A(H1N1)pdm09 and H1N2 in swine population in Southern Brazil during 2013 and 2014. The subtype A(H1N1)pdm09 was identified in four out of the six herds sampled. In the other two herds, swIAV subtype H1N2 was detected. Interestingly, at the time of collection of the samples in this study (2013-2014) the incidence of A(H1N1)pdm09 in humans was in decline, as it has been since the 2009 pandemics, though still circulating (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2013). Likewise, it remains in the swine population, although it was not possible to determine whether such circulation was associated to separate introductions of the virus from humans into the holdings or due to enzootic circulation of the virus. As regards subtype H1N2, there is no evidence indicating the circulation of this subtype in humans in Brazil. The circulation of such subtypes in swine and the possibility of introduction of such viruses into humans, stresses the importance of keeping a vigorous epidemiological vigilance on influenza in pigs. It is worth highlighting the possible risk that circulation of IAV in swine represents to humans, especially for workers who are employed at commercial swine farms. In this sense, is very important that agricultural workers receive the seasonal influenza vaccine annually (Gray & Kayali, 2009). Protect workers can not only safeguard their health but also safeguard the swine herd health.

Recovery of swIAVs in cell cultures may be relatively difficult and it is directly related on the time of sampling. Sample collection needs to be based on the differentiation of acutely infected pigs producing large amounts of viruses from subacute pigs producing little or no virus. Influenza virus titer peaks at 48 h post infection and there is little virus shed 6–8 days after infection (Kothalawala et al., 2006). In this study all samples were collected during the acute phase of infection and swIAV can be recovered in MDCK-L cells in all 6 tested herds.

Regarding co-infections with other agents, *Pasteurella multocida* was the main pathogen associated to swIAV infection, since it was identified in 5 out of the 6 lungs tested, followed in frequency by *Mycoplasma hyopneumoniae* in which was detected in 3/6 lung samples. These findings were expected since *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma hyopneumoniae* are recognized as major pathogens associated with PRDC (Choi et al., 2003). Previous reports demonstrated that pigs infected with swIAV and *Mycoplasma hyopneumoniae* exhibited more severe clinical disease (Thacker et al., 2001). In this study, piglets co-infected with swIAV and *Mycoplasma hyopneumoniae* displayed more intense clinical signs such as coughing, sneezing and difficult breathing when compared to animals where no *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection were detected.

The disease caused by influenza viruses in pigs resembles flu episodes in humans, in that, usually, high morbidity, low mortality and fast recovery are the rule. In this study, swIAV infections were manifested as acute respiratory disease characterized by high morbidity, fever, decreased food intake, respiratory distress, coughing, sneezing, conjunctivitis and nasal discharge. The high morbidity observed in affected herds may lead to considerable production losses in function of the reduction in food intake and weight gain (Fouchier et al., 2003).

Macroscopic lesions detected in necropsied piglets were similar to those reported previously (Vincent et al., 2008, Sreta et al., 2009). In the piglets necropsied here, lungs had purple-red, multifocal to coalescing areas of consolidation, predominantly in the cranio-ventral portions of the lung. Microscopically, the necrosis of bronchiolar epithelial cells and sloughing of these cells into airway lumen were the most relevant and most commonly observed microscopic changes. In addition to the typical influenza lesions, one of the animals presented pleural adhesions to the chest

wall and a moderate amount of eosinophilic material associated with histiocytes and lymphocytes infiltrate on the pleura. It is likely that these lesions were due to secondary bacterial infections, since this animal was also infected with *Pasteurella multocida*.

In summary, this study evidenced that subtypes A(H1N1)pdm09 and H1N2 were, at time of sampling, circulating in pigs in Southern Brazil and were involved in the PRDC outbreaks reported here. These findings emphasize the need for continued surveillance and swIAVs subtyping to better understand the evolutionary mechanisms that increase swIAV diversity in order to safeguard both, human and animal health.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr^a Rejane Shaeffer, EMBRAPA - CNPSA and Dr David Driemeier, from Pathology Laboratory – UFRGS, for technical support. Thanks to the field veterinarians Dr^a Maria Luisa Gonzatti and Dr. Eloi Hinnah, from Cooperativa Languiru, for technical and clinical advice, as well as for granting access to farms. This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FINEP. CS in on receipt of a CNPq doctoral grant.

References

- Choi, Y. K., S. M. Goyal and H. S. Joo, 2003: Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J*, 44, 735-737.
- Choi, Y. K., S. M. Goyal, S. W. Kang, M. W. Farnham and H. S. Joo, 2002: Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J Virol Methods*, 102, 53-59.
- Dawood, S. Jain, L. Finelli, M. W. Shaw, S. Lindstrom, R. J. Garten, L. V. Gubareva, X. Xu, C. B. Bridges and T. M. Uyeki, 2009: Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*, 360, 2605-2615.
- Dezen, D., F. A. Rijsewijk, T. F. Teixeira, C. L. Holz, S. P. Cibulski, A. C. Franco, O. A. Dellagostin and P. M. Roehe, 2010: Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: applications on detection, sequencing and virus isolation. *Res Vet Sci*, 88, 436-440.
- Ducatez, M. F., B. Hause, E. Stigger-Rosser, D. Darnell, C. Corzo, K. Juleen, R. Simonson, C. Brockwell-Staats, A. Rubrum, D. Wang, A. Webb, J. C. Crumpton, J. Lowe, M. Gramer and R. J. Webby, 2011: Multiple reassortment between pandemic (H1N1) 2009 and endemic influenza viruses in pigs, United States. *Emerg Infect Dis*, 17, 1624-1629.
- Epperson, S., M. Jhung, S. Richards, P. Quinlisk, L. Ball, M. Moll, R. Boulton, L. Haddy, M. Biggerstaff, L. Brammer, S. Trock, E. Burns, T. Gomez, K. K. Wong, J. Katz, S. Lindstrom, A. Klimov, J. S. Bresee, D. B. Jernigan, N. Cox, L. Finelli and A. v. V. I. T. Influenza, 2013: Human infections with influenza A(H3N2) variant virus in the United States, 2011-2012. *Clin Infect Dis*, 57, S4-S11.
- Forgie, S. E., J. Keenlside, C. Wilkinson, R. Webby, P. Lu, O. Sorensen, K. Fonseca, S. Barman, A. Rubrum, E. Stigger, T. J. Marrie, F. Marshall, D. W. Spady, J. Hu, M. Loeb, M. L. Russell and L. A. Babiuk, 2011: Swine outbreak of pandemic influenza A virus on a Canadian research farm supports human-to-swine transmission. *Clin Infect Dis*, 52, 10-18.
- Fouchier, R. A., T. M. Bestebroer, S. Herfst, L. Van Der Kemp, G. F. Rimmelzwaan and A. D. Osterhaus, 2000: Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol*, 38, 4096-4101.
- Fouchier, R. A., A. D. Osterhaus and I. H. Brown, 2003: Animal influenza virus surveillance. *Vaccine*, 21, 1754-1757.
- Freshney, R. I. 2005: Culture of animal cells: a manual of basic techniques, 5th Edn, pp.115-128. Wiley-Liss. New York.
- Gray, G.C. and G. Kayali, 2009: Facing pandemic influenza threats: The importance of including poultry and swine workers in preparedness plans. *PoultSci*, 88, 880-884.
- Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, R. G. Webster and D. R. Perez, 2001: Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*, 146, 2275-2289.
- Jin, H., M. Urabe and K. Tobita, 1996: A variant of MDCK cell line which restricted growth of influenza viruses mainly through suppression of viral primary transcription. *Arch Virol*, 141, 923-933.
- Koen, J.S., 1919: A practical method for field diagnoses of swine diseases. *Am J Vet Med*, 14, 468-70.

- Kothalawala, H., M. J. Toussaint and E. Gruys, 2006: An overview of swine influenza. *Vet Q*, 28, 46-53.
- Moreno, A., C. Chiapponi, M. B. Boniotti, E. Sozzi, E. Foni, I. Barbieri, M. G. Zanoni, S. Faccini, D. Lelli and P. Cordioli, 2012: Genomic characterization of H1N2 swine influenza viruses in Italy. *Vet Microbiol*, 156, 265-276.
- Moreno, A., L. Di Trani, L. Alborali, G. Vaccari, I. Barbieri, E. Falcone, E. Sozzi, S. Puzelli, G. Ferri and P. Cordioli, 2010: First Pandemic H1N1 Outbreak from a Pig Farm in Italy. *Open Virol J*, 4, 52-56.
- Nelson, M. I. and A. L. Vincent, 2015: Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface. *Trends Microbiol*, 23, 142-153
- Oliveira, S., L. Galina and C. Pijoan, 2001: Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J Vet Diagn Invest*, 13, 495-501.
- Opriessnig, T., L. G. Gimenez-Lirola, P.G. Halbur, 2011: Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev*, 12, 133-48.
- Palese, P. and M. L. Shaw, 2007: Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. in: Knipe, D. M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (eds), *Fields Virology*, 5th Edn, pp. 1647–1689. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Rajao, D. S., A. T. Costa, B. S. Brasil, H. L. Del Puerto, F. G. Oliveira, F. Alves, G. F. Braz, J. K. Reis, R. M. Guedes, Z. I. Lobato and R. C. Leite, 2013: Genetic characterization of influenza virus circulating in Brazilian pigs during 2009 and 2010 reveals a high prevalence of the pandemic H1N1 subtype. *Influenza Other Respir Viruses*, 7, 783-790.
- Rayamajhi, N., S. J. Shin, S. G. Kang, D. Y. Lee, J. M. Ahn and H. S. Yoo, 2005: Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on *Apx* toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *J Vet Diagn Invest*, 17, 359-362.
- Rivera, E. B., J. Sobestiansky, and D. Barcellos, 2012: Eutanásia em sistemas de criação de suínos. In Sobestiansky J, and D. Barcellos (eds), *Doenças dos Suínos*, 2nd Edn, pp. 68 – 75. Cãnone Editorial. Goiânia.
- Schaefer, R., J.R.C. Zanella, L. Brentano, A. L. Vincent, G. A. Ritterbusch, S. Silveira, L. Caron and N. Mores, 2011: Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. *Pesq Vet Bras*, 31,761–767.
- Schaefer, R., R. R. Rech, D. Gava, M. E. Cantao, M. C. da Silva, S. Silveira and J. R. Zanella, 2015: A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. *Arch Virol*, 160, 29-38.
- Schmidt, C., S. P. Cibulski, A. P. Muterle Varela, C. Mengue Scheffer, A. Wendlant, F. Quoos Mayer, L. Lopes de Almeida, A. C. Franco and P. M. Roehle, 2014: Full-Genome Sequence of a Reassortant H1N2 Influenza A Virus Isolated from Pigs in Brazil. *Genome Announc*, 2.
- Scholtissek, C., 1995: Molecular evolution of influenza viruses. *Virus Genes*, 11, 209-215.
- Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde., 2013: Influenza: Monitoramento das Primeiras 15 Semanas Epidemiológicas de 2013. *Boletim Epidemiológico* 2013; 44:1-10. Available at: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/junho/11/BE-2013-44--15---Influenza--SE29-.pdf> (accessed on 30 April 2015)
- Shu, B., K. H. Wu, S. Emery, J. Villanueva, R. Johnson, E. Guthrie, L. Berman, C. Warnes, N. Barnes, A. Klimov and S. Lindstrom, 2011: Design and performance

- of the CDC real-time reverse transcriptase PCR swine flu panel for detection of 2009 A (H1N1) pandemic influenza virus. *J Clin Microbiol*, 49, 2614-2619.
- Sreta, D., R. Kedkovid, S. Tuamsang, P. Kitikoon and R. Thanawongnuwech, 2009: Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. *Virol J*, 6, 34.
- Stakenborg, T., J. Vicca, P. Butaye, H. Imberechts, J. Peeters, A. de Kruif, F. Haesebrouck and D. Maes, 2006: A multiplex PCR to identify porcine mycoplasmas present in broth cultures. *Vet Res Commun*, 30, 239-247.
- Thacker, E. L., B. J. Thacker and B. H. Janke, 2001: Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol*, 39, 2525-2530.
- Townsend, K. M., J. D. Boyce, J. Y. Chung, A. J. Frost and B. Adler, 2001: Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol*, 39, 924-929.
- Thrusfield, M. 2007: *Veterinary Epidemiology*, 3rd Edn, pp. 238–240. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.
- Vincent, A. L., W. Ma, K. M. Lager, B. H. Janke and J. A. Richt, 2008: Swine influenza viruses a North American perspective. *Adv Virus Res*, 72, 127-154.
- World Health Organization, 2002: *WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance*. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf> (Accessed on 28 April 2015).

Table 1. Detection of swine influenza virus in nasal swabs (n=66) and lung tissues (n= 6) from piglets from six farms sampled.

| Herd n° | Influenza A PCR | | Virus Isolation | | HA* titer (range) | |
|---------|-----------------|------|-----------------|------|-------------------|------|
| | Nasal Swabs | Lung | Nasal Swabs | Lung | Nasal Swabs | Lung |
| 1 | 8/11 | 1/1 | 8/8 | 1/1 | 8-256 | 16 |
| 2 | 7/11 | 1/1 | 6/7 | 1/1 | 32-256 | 32 |
| 3 | 6/11 | 1/1 | 6/6 | 1/1 | 4 – 32 | 128 |
| 4 | 7/11 | 1/1 | 6/7 | 1/1 | 8 – 32 | 32 |
| 5 | 10/11 | 1/1 | 6/10 | 1/1 | 4 – 128 | 64 |
| 6 | 8/11 | 0/1 | 5/8 | - | 32 – 128 | - |
| Total | 46/66 | 5/6 | 37/46 | 5/5 | | |

* Hemagglutination assay

Table 2. Subtyping of swine influenza virus in lung or nasal swab samples and detection of co-infecting agents in lung samples from piglets displaying signs of respiratory disease.

| | swIAV subtype | <i>M.Hyo</i> ^a | <i>P.Multocida</i> ^b | <i>App</i> ^c | <i>Hps</i> ^d | <i>PCV2</i> ^e |
|---------------|---------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Sample | | | | | | |
| Piglet 1 | H1N2 | + | + | - | - | - |
| Piglet 2 | H1N2 | - | + | - | - | - |
| Piglet 3 | A(H1N1)pdm09 | - | + | - | - | - |
| Piglet 4 | A(H1N1)pdm09 | + | + | + | - | - |
| Piglet 5 | A(H1N1)pdm09 | + | + | - | - | + |
| Piglet 6 | A(H1N1)pdm09 | - | - | - | + | - |

^a*Mycoplasma hyopneumoniae*; ^b*Pasteurella multocida*; ^c*Actinobacillus pleuropneumoniae*; ^d*Haemophilus parasuis*; ^ePorcine circovirus type 2

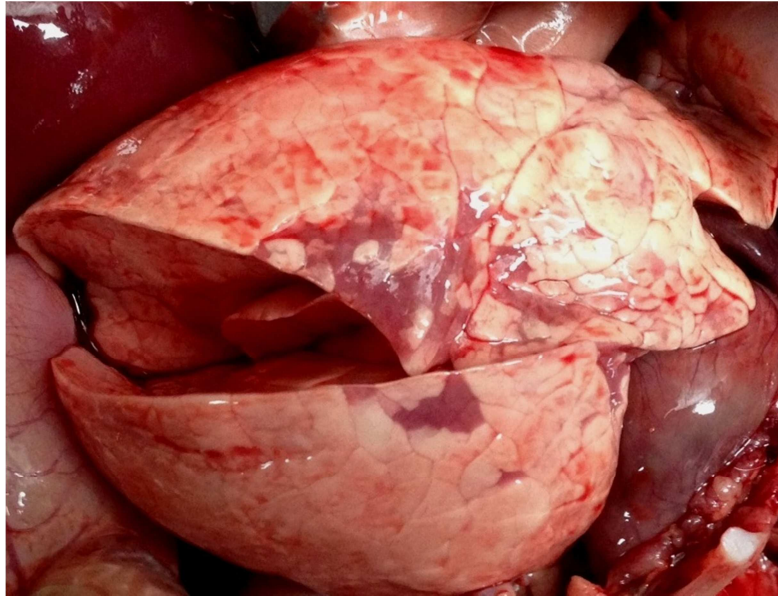


Figure 1. Swine lungs displaying mostly non-collapsed lobes with consolidation areas in the apical and diaphragmatic lobes

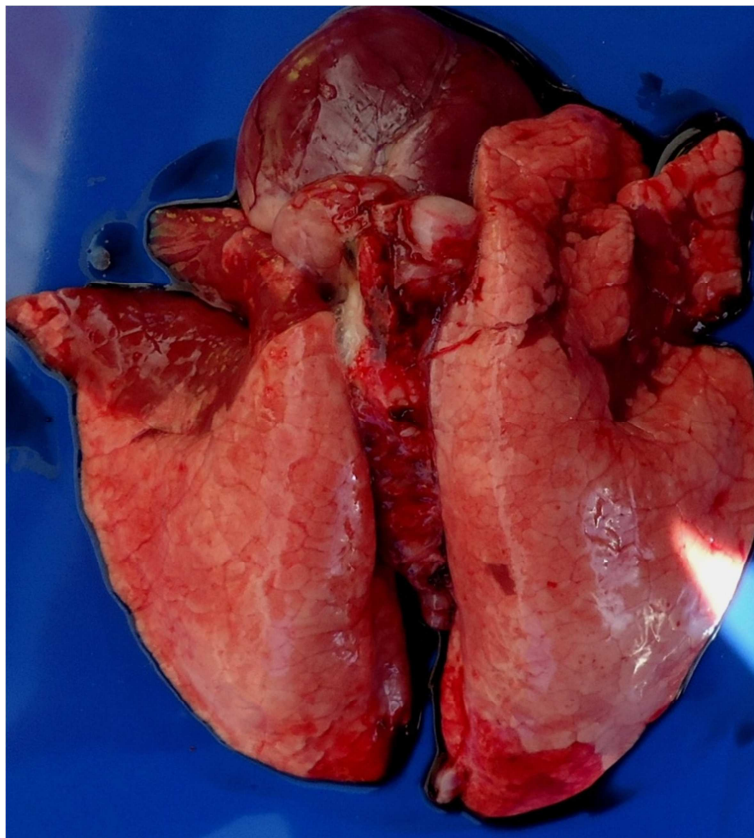


Figure 2. Swine lung showing purple-red consolidation areas in the apical lobe and anterior portion of the diaphragmatic lobe.

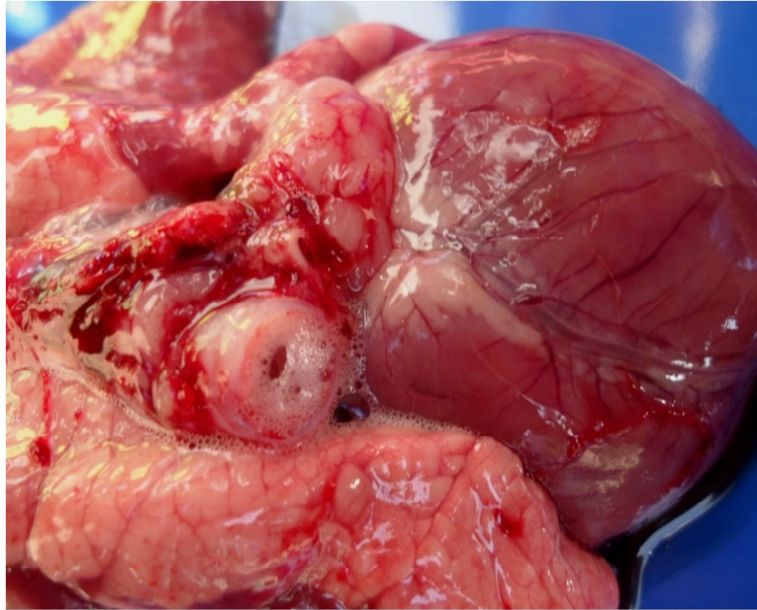


Figure 3. Foamy exudate in the trachea

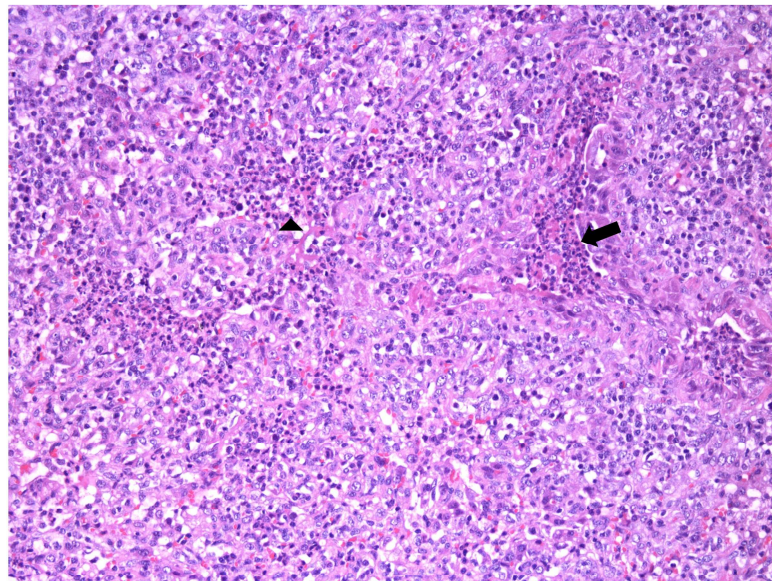


Figura 4. Microscopy of swine lung tissue showing neutrophilic inflammatory infiltrate within bronchioles (arrow) (H&E, 20x) and neutrophilic inflammatory infiltrate within alveoli (arrow head) (H&E, 20x).

4. CAPÍTULO 2

Full-genome sequence of a reassortant H1N2 influenza A virus isolated from pigs in Brazil.

Running title: Reassortant H1N2 influenza virus in Brazil

Candice Schmidt^{a,b} #, Samuel Paulo Cibulski^b, Ana Paula Muterle Varela^b, Camila Mengue Scheffer^b, Adrieli Wendlant^b, Fabiana Quoos Mayer^b, Laura Lopes de Almeida^a, Ana Cláudia Franco^a, Paulo Michel Roehé^{a,b} #

^a Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

^b Fepagro Animal Health – Institute of Veterinary Research "Desidério Finamor" (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, CEP 92990-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

- Corresponding author: proehe@gmail.com, candy.schmidt@hotmail.com

Artigo publicado no periódico Genome Announcements, 2(6): 1-2, 2014.

ABSTRACT

In this study, the full-genome of a reassortant H1N2 swine influenza virus is reported. The isolate has the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes from human lineage (H1- δ cluster and N2) and the internal genes (PB1, PB2, PA, NP, M and NS) are derived from human H1N1pdm09.

GENOME ANNOUNCEMENT

Influenza A viruses are important human and animal pathogens with high impact on public and animal health. Swine influenza viruses (SIVs) of H1N1, H1N2, and H3N2 subtypes remain endemic in swine populations worldwide (1). These contain eight RNA segments, of which the hemagglutinin (*HA*) and neuraminidase (*NA*) genes define the subtype. In case of a mixed infection by two viral strains within a cell, the exchange of gene segments may lead to the generation of a new reassortant virus. Due to this phenomenon, the origin of such viruses, as well as its genetic and antigenic characteristics, may vary in different geographic regions (2, 3).

Although SIV infections have already been detected in swine in Brazil, in most cases these viruses have not had their full genomes sequenced. Here, the complete genome sequences of two SIV isolates are reported. The viruses were recovered from lung tissues of piglets in an outbreak of respiratory disease occurred in a certified pig breeder producing farm in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Virus isolation from lung tissues was performed following standard procedures (4) in Madin-Darby canine kidney cells (MDCK). The presence of virus was confirmed with a reverse transcription PCR (RT-PCR) targeting the matrix (*M*) gene of influenza A virus (5). Viral RNA was extracted from lung tissues using TRIzol reagent (Life Technologies). Whole-genome sequences were generated by RT-PCR using the PathAmp™ FluA Reagents (Life Technologies). Amplicons were purified with Agencourt AMPure XP – PCR Purification (Beckman Coulter), followed by sequencing in the MiSeq sequencing platform (Illumina). The data were *de novo* assembled on BaseSpace Cloud (Illumina) by the SPAdes Genome Assembler (version 3.0) and analyzed by Geneious software (version 7.1.7).

Genetic analysis revealed that the two isolates share a degree of 98.9 to 100% identity at the nucleotide level. The viral genome of A/swine/Brazil/G2-P1/2013(H1N2) and A/swine/Brazil/G2-P2/2013(H1N2), consists of 8 single-stranded RNA segments: polymerase basic 2 (PB2), polymerase basic 1 (PB1), acid polymerase (PA), hemagglutinin (HA), nucleoprotein (NP), neuraminidase (NA), matrix (M), and nonstructural protein (NS), with corresponding nucleotide lengths of 2,308, 2,341, 2,175, 1,746, 1,565, 1,465, 1,027, and 890. Encoded viral proteins and amino acid lengths include PB2 (759), PB1 (757), PB1-F2 (91), PA (705), PA-X (241), HA (565), NP (498), NA (469), M1 (252), M2 (97), NS1 (219), and NS2 (121).

The amantadine resistance marker S31N (6) was observed in the M2 protein-coding region in the two genomes. Additionally, the *PB1* gene encodes an infrequently occurring truncated protein PB1-F2 of 91 aa. Phylogenetic analyses reveal that the *HA* and *NA* genes clustered with influenza viruses of human lineage (H1- δ cluster and N2), whereas the internal genes (*PB1*, *PB2*, *PA*, *NP*, *M* and *NS*) clustered with the A(H1N1)pdm09.

These results highlight the importance of continued surveillance of influenza A viruses, since the virus can recombine with viruses from different hosts, including pigs; such events may give rise to reassortants with significant pathogenic potential.

Nucleotide sequence accession numbers. The genome sequences of A/swine/Brazil/G2-P1/2013(H1N2) and A/swine/Brazil/G2-P2/2013(H1N2), are deposited in GenBank under accession nos. KP027582 to KP027589 and KP027590 to KP027597, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

Work supported by FINEP and CNPq.

REFERENCES

1. **Brown IH.** 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet. Microbiol.* **74**:29–46.
2. **Howard WA, Essen SC, Strugnell BW, Russell C, Barass L, Reid SM, Brown IH.** 2011. Reassortant pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* **17**:1049–1052.
3. **Kitikoon P, Nelson MI, Killian ML, Anderson TK, Koster L, Culhane MR, Vincent AL.** 2013. Genotype patterns of contemporary reassorted H3N2 virus in U.S. swine. *J. Gen. Virol.* **94**:1236–1241.
4. **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).** WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. World Health Organization, Geneva. 2002, 99p. Available in: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf>
5. **Lorusso A, Faaberg KS, Killian ML, Koster L, Vincent AL** (2010) One-step real-time RT-PCR for pandemic influenza A virus (H1N1) 2009 matrix gene detection in swine samples. *J Virol Methods* **164**:83–87

6. **Krumbholz A, Schmidtke M, Bergmann S, Motzke S, Bauer K, Stech J, Dürrwald R, Wutzler P, Zell R.** 2009. High prevalence of amantadine resistance among circulating European porcine influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **90**:900–908.

5. CAPÍTULO 3

Co-circulation of pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 and other human/swine influenza reassortants in pigs in Southern Brazil.

Candice Schmidt^{1,2}, Samuel P. Cibulski^{1,2}, Thais F. Teixeira¹, Ana Paula M. Varela², Camila M. Scheffer^{1,2}, Helton F. dos Santos¹, Adrieli Wendlant², Paulo M. Roehle¹.

¹Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

²Fepagro Animal Health –Institute of Veterinary Research Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

Correspondence: Candice Schmidt, Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil. E-mail: candy86.vet@gmail.com

Artigo em fase de conclusão para ser submetido na forma de artigo científico ao periódico Virus Genes

ABSTRACT

Influenza viruses are able to infect humans, swine, and avian species. Swine are long recognized as potential source for new influenza viruses that might eventually infect humans. A number of genetically diverse viruses are circulating in swine herds throughout the world and are a major concern for animal and human health. Human to swine transmission, spatial migration via swine movements, and genomic reassortment are the key evolutionary mechanisms that participate in the generation of such viral diversity. Here, phylogenetic analyses were performed on the complete genome sequences of influenza viruses of the H1N1, H1N2, and H3N2 subtypes recovered from swine herds in Southern Brazilian in 2013–2014. Two swine human-like H1N2 and H3N2 viruses with HA and NA genes similar to human seasonal strains and the internal genes closely related to 2009 H1N1 pandemic viruses were characterized. In addition, the circulation of the 2009 H1N1 pandemic virus in pigs in that period was evidenced.

Keywords: influenza A virus, subtypes, H1N2, H3N2, A(H1N1)pdm09.

1. Introduction

Influenza A viruses (IAVs) belong to the family *Orthomyxoviridae*, genus *Influenzavirus A*. Such viruses are able to infect a wide range of avian and mammalian species, including humans. The genome of IAVs is composed of eight single-stranded (ss), negative-sense segments of RNA that encode at least 12 viral proteins (1). Two surface glycoproteins, the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), are immunodominant antigens which have for long been used to characterize the antigenic diversity of IAV subtypes. In migratory birds, the reservoir hosts for IAV, at least sixteen antigenically distinct HA and nine NA subtypes have been reported (2). In addition, two new influenza A viruses H17N10 and H18N11 with previously unreported subtypes and evolutionarily distinct from all other circulating strains, were recently detected in bats (3, 4).

The evolutionary dynamics of IAVs is influenced by a complex multi-host ecology and by the propensity of viral genomes to undergo reassortment. The latter can introduce phenotypic changes by allowing exchange of genome segments between viral strains co-infecting the same host. The type of sialic acid bonds of pulmonary cells of a particular host species may be determinant to the species' susceptibility to a particular IAV strain. Humans have primarily $\alpha 2,6$ sialic acid receptors, whereas avian receptors have a $\alpha 2,3$ link (5). In this sense, the host is important because animals that can be more easily co-infected may act as "mixing vessels" to generate novel influenza viruses. Swine have both types of receptors in its pulmonary epithelial cells and are examples of potential "mixing vessels", since the species may be susceptible to influenza viruses of both avian and human origin (6, 7).

Currently, three main subtypes of influenza viruses are circulating in the swine throughout the world: subtypes H1N1, H3N2 and H1N2 (8). The reassortant 2009 pandemic H1N1 influenza virus - A(H1N1)pdm09 - was first detected in humans in Mexico in early 2009 and quickly jumped to pigs throughout the world (9). This virus has a complex genetic composition and had not been previously detected in swine; its genome comprises six genome segments originated from the North American triple reassortant swine virus (PB2, PB1, PA, HA, NP and NS) and two genome segments from an Eurasian avian-like swine virus (NA and M) (10). Since the emergence of the pandemic A(H1N1)pdm09 virus in 2009, the genetic diversity of IAVs in swine populations (swIAVs) has been studied in greater depth, leading to a wide identification of a variety of novel reassortant viruses bearing different combinations of gene segments (8, 11-14).

In Brazil, although IAV infections in pigs have been suspected since the late 1930s, the first IAV isolation from pigs was only performed in 1974 (15). Furthermore, the low mortality and relatively short course of the disease in swine, added to the fear that notification of the infection might bring economical losses to farmers, led to a situation where swIAV occurrence before 2009 was largely ignored.

In a previous study conducted by our group, the occurrence of swine influenza outbreaks in association with the porcine respiratory disease complex was investigated (16). The aim of this study was to perform a deeper analysis of the swIAV recovered from those outbreaks and two additional outbreaks by examining its complete genomes sequences. On the occasion, three pandemic A(H1N1)pdm09 viruses and five reassortants bearing genes of pandemic A(H1N1)pdm09 virus and of seasonal viruses of human origin were detected, evidencing the co-circulation of three distinct IAV subtypes in pigs in Southern Brazil. This study also demonstrates the circulation of

reassortants from human origin in pigs, highlighting the effect of reverse zoonotic transmission of the pandemic A(H1N1)pdm09 and human seasonal viruses on pig population.

2. Methods

2.1. Ethics statement

This study was approved and carried out for in compliance with the Ethics Committee on Animal Use of the Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (CEUA-IPVDF) under protocol number 04/2013.

2.2. Samples

Sample collection was carried out in middle Autumn/Winter months of 2013 and 2014. A total of 8 lung samples were collected from 7 commercial swine producing herds located in the centro-oriental meso-region of the state of Rio Grande do Sul (Vale do Taquari). Samples were collected from pigs in different production phases (suckling, nursery, and fattening) displaying typical clinical signs of influenza infection (e.g., fever, labored abdominal breathing, and dyspnea). The lung samples were transported in virus transport media and submitted to the virology laboratory for influenza A screening and sequencing. None of the animals had previous swIAV vaccination history.

2.3. RNA Extraction and Reverse Transcription PCR

The initial diagnosis of influenza A infection was established by reverse transcription PCR. Therefore, total RNA was extracted from 20 mg of lung tissue using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturers' instructions. RNA extracted was submitted to screening for all influenza A subtypes by

RT-PCR targeting the matrix (*M*) gene (17).

The RNA from all samples in which IAV has been identified at screening were submitted to reverse transcription and complete genome amplification aiming the eight influenza virus gene segments (hemagglutinin [HA], neuraminidase [NA], nucleoprotein [NP], polymerase basic 1 [PB1] and 2 [PB2], polymerase acidic [PA], matrix [M], and nonstructural [NS]) by RT-PCR using the PathAmp™ FluA Reagents (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The amplicons were visualized on 1% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml) under UV light. To avoid contamination, different rooms were used to perform RNA extractions, to prepare the reactions.

2.4. Library preparation and sequencing

Amplified products were purified using Agencourt AMPureXP - PCR Purification kit (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) according to the Illumina's sample preparation guide. Purified amplicons were used in libraries preparation using Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA), following manufacturer's instructions (Illumina Nextera XT guide). Libraries were sequenced with paired-end 2 x 150 reads on a MiSeq System (Illumina, USA).

The reads were *de novo* assembled on BaseSpace Cloud (Illumina) using the SPAdes Genome Assembler (version 3.5). Resulting contigs were compared to sequences in the GenBank database using Blast2Go (18) to remove non-influenza sequences. Analysis and classification of each influenza virus segment was carried out using the Geneious software version 8.0.4 (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand).

2.5. Phylogenetic Analysis

Nucleotide sequences of all gene segments (*PB2*, *PB1*, *PA*, *NP*, *MP* and *NS* and for *H1*, *H3*, *N1* and *N2*) were aligned with the ClustalW software (19). Human and swine influenza virus sequences available in GenBank were included in the analyses (20). For the six internal genes segments (*PB2*, *PB1*, *PA*, *NP*, *MP* and *NS*), the dataset comprised sequences of the A(H1N1)pdm09 lineage, reported globally in swine during 2009-2015. Another dataset comprised H1 (Brazilian swIAVs sequenced for this study, deposited Brazilian swIAVs sequences, classical swine virus sequences, pandemic A(H1N1)pdm09 lineage and related human seasonal viruses); H3 (Brazilian swIAVs sequenced for this study, deposited Brazilian swIAVs sequences, related human seasonal viruses and swine viruses); N1 (Brazilian swIAVs sequenced for this study, deposited Brazilian swIAVs sequences, classical swine virus sequences and pandemic A(H1N1)pdm09 lineage); N2 (Brazilian swIAVs sequenced for this study, deposited Brazilian swIAVs sequences, related human seasonal viruses and swine viruses). Phylogenetic trees were generated by the neighbor-joining method using the MEGA package version 6.0.6 (21) with 1,000 bootstrap replications. Evolutionary distances were estimated using the Kimura 2-parameter.

In order to investigate the variability of HA antigenic sites in the pandemic A(H1N1)pdm09 viruses here recovered, a comparison of amino acid (aa) sequences of the viral hemagglutinin subunit 1 (HA1) on antigenic sites Sa, Sb, Ca, and Cb (22, 23) was performed. A reference strain [A/Mexico/4108/2009(H1N1)] was compared with the pandemic A(H1N1)pdm09 samples of this work (Sw/G3, Sw/G5, Sw/G7) and with other six Brazilian swine A(H1N1)pdm09 studied previously that had the fully HA sequenced.

3. Results

3.1. Genetic diversity of swIAVs in Southern Brazil

Five reassortants and three pandemic viruses representing 3 subtypes of swIAV were detected in the present study (Table 1). Whole-genome sequence data were obtained for seven viruses. Sequencing of one of the viruses, (Sw/G1) presented low coverage for the *PA*, *PB1* and *PB2* genes, yielding partially sequenced fragments; in view of that, these were not included in the phylogeny. The viruses (Sw/G1) and (Sw/G1N1) were originated from the same farm and the other viruses were from different farms. All sequence data in this study were submitted to the Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology Information's GenBank (20).

3.2. Detection of influenza A(H1N1)pdm09

Genomes of influenza A(H1N1)pdm09 were identified in three out of the eight lung samples tested. These three samples (Sw/G3, Sw/G5 and Sw/G7) had their genomes fully sequenced and characterized. The eight genomic segments of such viruses revealed a high similarity with the pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 which emerged in 2009 (10). The strain Sw/G3 was detected in suckling pigs in 2013, while strains Sw/G5 and Sw/G7 were recovered from weaning pigs, in 2013 and 2014, respectively. The phylogeny based on the *HA* gene is presented in figure 1; the phylogenetic analysis based on the *NA* gene is presented in figure 4.

3.3. Detection of H3N2 IAV of human origin in swine

The sample referred as Sw/G1 was classified as a new human-origin H3N2 in swine. Complete *HA*, *NP*, *NA*, *M* and *NS*, and partial *PB2*, *PB1* and *PA* gene segment sequences were obtained. The *HA* and *NA* phylogeny indicated that the *HA* and *NA* genes of the Sw/G1 swine virus were closely related to human H3N2 influenza viruses

that circulated in North America and South America in the late 1990s (Figure 2 and 3), indicating that human-to-swine transmission probably occurred several years ago, though remained undetectable until recently (24). The internal genes (*NP*, *M*, and *NS*) of the human like H3N2 virus were closely related to pandemic A(H1N1)pdm09 virus. The other internal genes PB2, PB1 and PA were only partially sequenced, however fragments of these genes were analyzed and also showed high similarity with pandemic A(H1N1)pdm09 viruses.

3.4. Detection of H1N2 IAV of human origin in swine

Four out of eight swIAVs recovered in this study were classified as H1N2. Phylogenetic analysis showed that viruses Sw/G1N1, Sw/G2P1, Sw/G2P2 and Sw/DP2 carry the HA gene closely related to the human seasonal H1N2 viruses that circulated in humans during the early 2000s (Figure 1), which is consistent with the period of global circulation of the reassortant H1N2 virus in humans (2001–2003) (24). The NA gene of Sw/G1N1, Sw/G2P1, Sw/G2P2 and Sw/DP2 samples is most closely related to human seasonal H3N2 viruses that circulated in humans in the late 1980s (Figure 3), whereas the internal genes were all derived from the pandemic A(H1N1)pdm09 influenza virus.

3.5. Analysis of antigenic sites

The putative HA1 mature peptide of the viral hemagglutinin (HA) sequences here reported were examined in search for aa changes in the antigenic sites that might affect receptor-binding specificity of the viruses (Figure 5). The HA of samples Sw/G3 and Sw/G5 contained at least one aa change in the Sa, Sb, Ca, and Cb antigenic sites. Sample Sw/G7 showed aa changes in Ca and Sb antigenic sites. Interestingly, the amino acid substitution S220T in HA1 subunit of Ca1 subsite was observed in all Brazilian

pandemic A(H1N1)pdm09 samples used in this analysis when compared to the reference sequence [A/Mexico/4108/2009(H1N1)] used here. The amino acid alignment of all strains used for this analysis is shown in Figure 5.

4. Discussion

This work and phylogenetic analysis of swIAVs, it has been attempted to expand the knowledge on the diversity of swIAV subtypes circulating in Brazil. The pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09, was detected in three farms. Interestingly, two viruses (H3N2 and H1N2) of putative human origin were also identified in this work. The swIAVs of human seasonal and pandemic origin have also been identified in other works in Brazil in recent years (24-26).

The continuous spillover of human viruses into pig populations followed by reassortment has resulted in the circulation of swIAVs with gene segments from human origin in many countries (8, 12, 24, 25). These facts highlight the importance of the human-swine interface in the evolution of IAVs. Furthermore, the transmission of influenza from human -to- swine represents the largest 'reverse zoonosis' of a pathogen documented until now (9).

The phylogenetic analysis suggests that IAV H3N2 of human origin detected in swines in this work seems to have been introduced into swine population during the late 1990s. Likewise, the seasonal IAV H1N2, which apparently is of human origin was probably introduced during the early 2000s. However, after 2009, probably due to the continuous introduction of pandemic A(H1N1)pdm09 virus from humans into swine population, as demonstrated in a recent study, the internal gene segments of circulating swIAVs in Brazil were replaced by reassortment with pandemic viruses A(H1N1)pdm09 (24). Since then, it seems that all viruses identified and fully

sequenced in Brazil have internal genes (PB2, PB1, PA, NP, M and NS) derived from the pandemic A(H1N1)pdm09 virus (24-26), suggesting that the pandemic A(H1N1)pdm09 internal gene segments appeared to provide some advantage over the equivalent segments of other circulating swine viruses, as observed in this study with the reassortants human-like H1N2 and human-like H3N2.

The novel reassortant viruses - H1N2 and H3N2 - harboring the internal genes of the pandemic A(H1N1)pdm09 influenza virus may pose a threat to public health. Example of this is the H3N2 variant (H3N2v), which was generated by endemic triple reassortant H3N2 influenza viruses and pandemic A(H1N1)pdm09 influenza viruses in pigs which was transmitted to humans and has caused more than 340 human infections in the U.S.A. during 2011–2013, emphasizing the role of swine in the generation of reassortant influenza variants with potential to infect humans (27). In addition, the H3N2 and H1N2 viruses identified here have the immunodominant glycoproteins HA and NA most closely related to human seasonal IAVs that circulated during the 1990s and 2000s and people born after the period of circulation of those viruses may have low preexisting immunity against these viruses.

As expected, the analysis of the antigenic sites of the putative HAs of the viral genomes identified here revealed genetic diversity in *HA* gene sequences, mainly at antigenic sites Ca and Cb. Interestingly, the pandemic viruses A(H1N1)pdm09 here reported showed some aa changes in relation to the reference sequence in the Sa and Sb sites. These may be involved with neutralizing epitopes on the HA glycoprotein (23, 28). The HA envelope glycoprotein have four distinct antigenic sites (Sa, Sb, Ca, and Cb) and is the major target for neutralizing antibodies of influenza A viruses (22, 23, 29). As such, it tends to bear the highest number of aa substitutions, what characterizes antigenic drifts (30). Besides, changes in the antigenic sites of the HA protein due to

antigenic drift result in viruses that can evade the host's acquired immunity and recurrent infections by the same subtype may occur (31).

The identification of variability in antigenic sites of pandemic influenza viruses A(H1N1)pdm09 reported here, and their diversity, particularly in the HA and NA segments, may have implications for the design of effective swine influenza vaccines for Brazil. The vaccines used in Brazil must be reviewed and reformulated annually based on the swIAV lineages that are circulating in the Brazilian pig population. In addition, the detection of reassortants viruses from human origin in the studied pigs suggest that at some time has occurred human-to-swine transmission of human seasonal H1N2 and H3N2 IAVs and highlight that human-to-swine transmission events may be playing an important role in the evolution of swIAVs and generation of new SwIAVs reassortants.

In view of the possibilities for reassortment between IAVs, continued monitoring of swIAVs through analyses of full genome sequences is mandatory to allow identification of novel IAV reassortants, thus allowing identification of viruses that may eventually pose potential threats to public and animal health.

Acknowledgments

We would like to thank the government agencies FINEP and CNPq by the financial support. Thanks to the field veterinarians Dr^a Maria Luisa Gonzatti and Dr. Eloi Hinnah for technical and clinical advice. P.M. Roehle is CNPq research fellow.

References

1. Palese P.S., M L. in Knipe D.M.H., P. M.; Griffin, D. E.; Lamb, R. A.; Martin, M. A.; Roizman, B.; Straus, S. E. (ed). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, pp. 1647 - 1689.
2. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., and Kawaoka Y., *Microbiol Rev* 56, 152-179, 1992.
3. Tong S., Li Y., Rivaille P., Conrardy C., Castillo D.A., Chen L.M., Recuenco S., Ellison J.A., Davis C.T., York I.A., Turmelle A.S., Moran D., Rogers S., Shi M., Tao Y., Weil M.R., Tang K., Rowe L.A., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K.A., Cox N.J., Anderson L.J., Rupprecht C.E., and Donis R.O., *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 4269-4274, 2012.
4. Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L.M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., McBride R., Carney P.J., Gilbert A.T., Chang J., Guo Z., Davis C.T., Paulson J.C., Stevens J., Rupprecht C.E., Holmes E.C., Wilson I.A., and Donis R.O., *PLoS Pathog* 9, e1003657, 2013.
5. Skehel J.J., and Wiley D.C., *Annu Rev Biochem* 69, 531-569, 2000.
6. Matrosovich M.N., Matrosovich T.Y., Gray T., Roberts N.A., and Klenk H.D., *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4620-4624, 2004.
7. Ma W., Kahn R.E., and Richt J.A., *J Mol Genet Med* 3, 158-166, 2008.
8. Moreno A., Chiapponi C., Boniotti M.B., Sozzi E., Foni E., Barbieri I., Zanoni M.G., Faccini S., Lelli D., and Cordioli P., *Vet Microbiol* 156, 265-276, 2012.
9. Nelson M.I., and Vincent A.L., *Trends Microbiol* 23, 142-153, 2015.
10. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W.M., Xu X., Skepner E., Deyde V., Okomo-Adhiambo M., Gubareva L., Barnes J., Smith C.B., Emery S.L., Hillman M.J., Rivaille P., Smagala J., de Graaf M., Burke D.F., Fouchier R.A., Pappas C., Alpuche-Aranda C.M., Lopez-Gatell H., Olivera H., Lopez I., Myers C.A., Faix D., Blair P.J., Yu C., Keene K.M., Dotson P.D., Jr., Boxrud D., Sambol A.R., Abid S.H., St George K., Bannerman T., Moore A.L., Stringer D.J., Blevins P., Demmler-Harrison G.J., Ginsberg M., Kriner P., Waterman S., Smole S., Guevara H.F., Belongia E.A., Clark P.A., Beatrice S.T., Donis R., Katz J., Finelli L., Bridges C.B., Shaw M., Jernigan D.B., Uyeki T.M., Smith D.J., Klimov A.I., and Cox N.J., *Science* 325, 197-201, 2009.
11. Ducatez M.F., Hause B., Stigger-Rosser E., Darnell D., Corzo C., Juleen K., Simonson R., Brockwell-Staats C., Rubrum A., Wang D., Webb A., Crumpton J.C., Lowe J., Gramer M., and Webby R.J., *Emerg Infect Dis* 17, 1624-1629, 2011.
12. Pereda A., Rimondi A., Cappuccio J., Sanguinetti R., Angel M., Ye J., Sutton T., Dibarbora M., Olivera V., Craig M.I., Quiroga M., Machuca M., Ferrero A., Perfumo C., and Perez D.R., *Influenza Other Respir Viruses* 5, 409-412, 2011.
13. Ali A., Khatri M., Wang L., Saif Y.M., and Lee C.W., *Vet Microbiol* 158, 60-68, 2012.
14. Charoenvisal N., Keawcharoen J., Sreta D., Chaiyawong S., Nonthabenjawan N., Tantawet S., Jittimanee S., Arunorat J., Amonsin A., and Thanawongnuwech R., *Virus Genes* 47, 75-85, 2013.
15. Cunha R.G., Vinha V.R., and Passos W.D., *Rev Bras Biol* 38, 13-17, 1978.
16. Schmidt C., Cibulski S.P., Andrade C.P., Teixeira T.F., Varela A.P., Scheffer C.M., Franco A.C., de Almeida L.L., and Roehe P.M., *Zoonoses Public Health*, 2015.
17. Fouchier R.A., Bestebroer T.M., Herfst S., Van Der Kemp L., Rimmelzwaan G.F., and Osterhaus A.D., *J Clin Microbiol* 38, 4096-4101, 2000.

18. Conesa A., Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Talon M., and Robles M., *Bioinformatics* 21, 3674-3676, 2005.
19. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., and Higgins D.G., *Bioinformatics* 23, 2947-2948, 2007.
20. Bao Y., Bolotov P., Dernovoy D., Kiryutin B., Zaslavsky L., Tatusova T., Ostell J., and Lipman D., *J Virol* 82, 596-601, 2008.
21. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., and Kumar S., *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729, 2013.
22. Gerhard W., Yewdell J., Frankel M.E., and Webster R., *Nature* 290, 713-717, 1981.
23. Caton A.J., Brownlee G.G., Yewdell J.W., and Gerhard W., *Cell* 31, 417-427, 1982.
24. Nelson M.I., Schaefer R., Gava D., Cantao M.E., and Ciacci-Zanella J.R., *Emerg Infect Dis* 21, 1339-1347, 2015.
25. Schmidt C., Cibulski S.P., Muterle Varela A.P., Mengue Scheffer C., Wendlant A., Quoos Mayer F., Lopes de Almeida L., Franco A.C., and Roehe P.M., *Genome Announc* 2, 2014.
26. Schaefer R., Rech R.R., Gava D., Cantao M.E., da Silva M.C., Silveira S., and Zanella J.R., *Arch Virol* 160, 29-38, 2015.
27. Epperson S., Jhung M., Richards S., Quinlisk P., Ball L., Moll M., Boulton R., Haddy L., Biggerstaff M., Brammer L., Trock S., Burns E., Gomez T., Wong K.K., Katz J., Lindstrom S., Klimov A., Bresee J.S., Jernigan D.B., Cox N., Finelli L., and Influenza A.v.V.I.T., *Clin Infect Dis* 57 Suppl 1, S4-S11, 2013.
28. Brownlee G.G., and Fodor E., *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 1871-1876, 2001.
29. Luoh S.M., McGregor M.W., and Hinshaw V.S., *J Virol* 66, 1066-1073, 1992.
30. Igarashi M., Ito K., Yoshida R., Tomabechi D., Kida H., and Takada A., *PLoS One* 5, e8553, 2010.
31. Steinhauer D.A., and Skehel J.J., *Annu Rev Genet* 36, 305-332, 2002.

Table 1. Characteristics of Brazilian swine influenza A viruses sequenced in this study.

| Name | Short Name | Internal Genes* | Probable Origin of Segments | |
|-----------------------------|------------|-----------------|-----------------------------|-------------------|
| | | | HA | NA |
| A/sw/Brazil/G1N1/2013(H1N2) | Sw/G1N1 | A(H1N1)pdm09 | Human seasonal H1 | Human seasonal N2 |
| A/sw/Brazil/G2P1/2013(H1N2) | Sw/G2P1 | A(H1N1)pdm09 | Human seasonal H1 | Human seasonal N2 |
| A/sw/Brazil/G2P2/2013(H1N2) | Sw/G2P2 | A(H1N1)pdm09 | Human seasonal H1 | Human seasonal N2 |
| A/sw/Brazil/G3/2013(H1N1) | Sw/G3 | A(H1N1)pdm09 | A(H1N1)pdm09 | A(H1N1)pdm09 |
| A/sw/Brazil/G5/2013(H1N1) | Sw/G5 | A(H1N1)pdm09 | A(H1N1)pdm09 | A(H1N1)pdm09 |
| A/sw/Brazil/G7/2014(H1N1) | Sw/G7 | A(H1N1)pdm09 | A(H1N1)pdm09 | A(H1N1)pdm09 |
| A/sw/Brazil/DP2/2014(H1N2) | Sw/DP2 | A(H1N1)pdm09 | Human seasonal H1 | Human seasonal N2 |
| A/sw/Brazil/G1/2013(H3N2) | Sw/G1 | A(H1N1)pdm09 | Human seasonal H3 | Human seasonal N2 |

*Internal genes, corresponds to the genes of nucleoprotein (NP), polymerase basic 1 (PB1) and 2 (PB2), polymerase acidic (PA), matrix (M), and nonstructural (NS); HA, hemagglutinin; NA, neuraminidase.

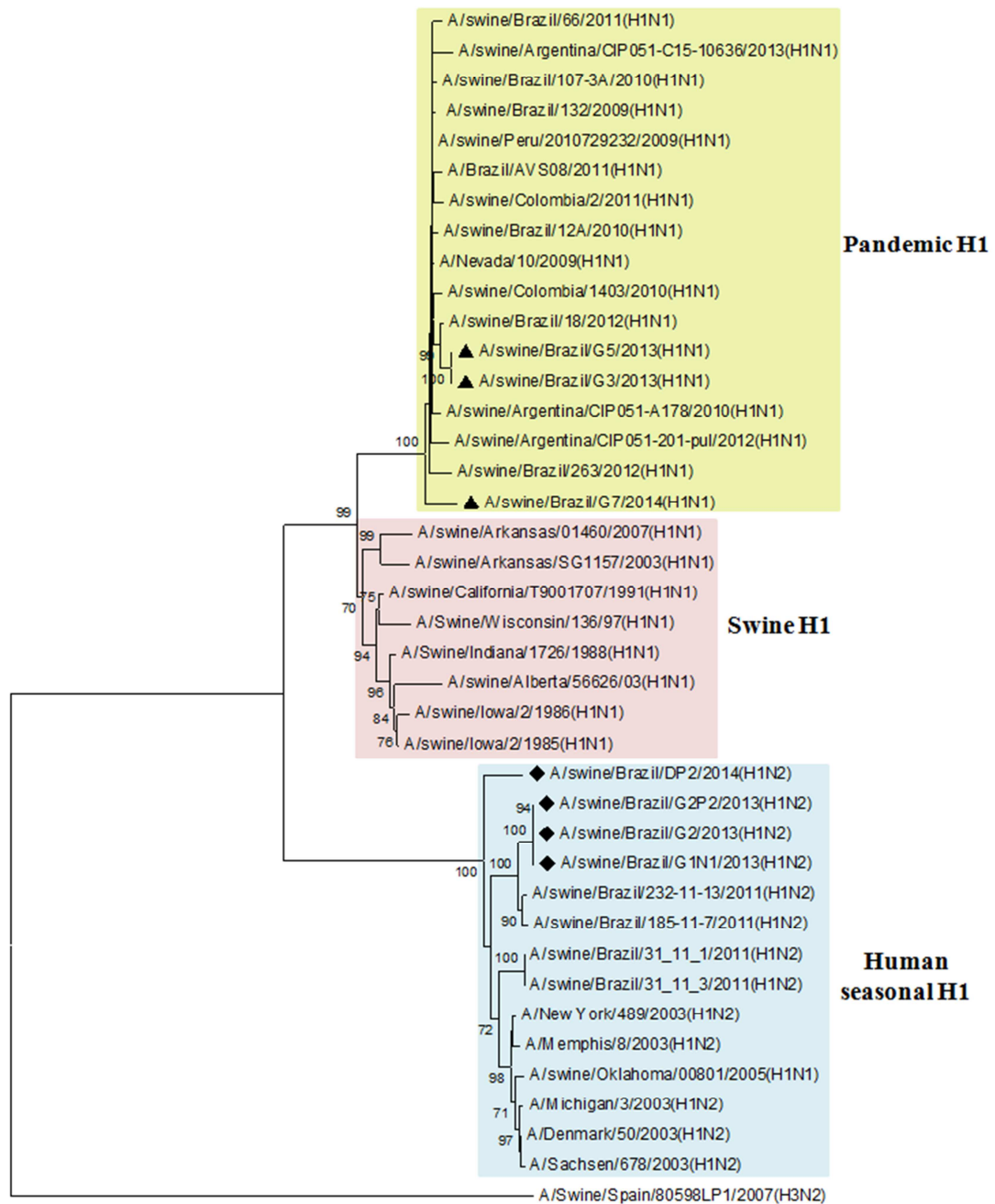


Figure 1. Phylogenetic comparison between *H1* segments of IAV of human and swine origin. The A(H1N1)pdm09 viruses introduced in this study are indicated by black triangles and H1N2 viruses are indicated by black lozenges. Data based on nucleotide sequences available at GenBank. Tree generated by the neighbor-joining method using the MEGA 6.0.6 software. Bootstrap values ≥ 70 % are shown. The scale bar of the tree indicates substitutions per site.

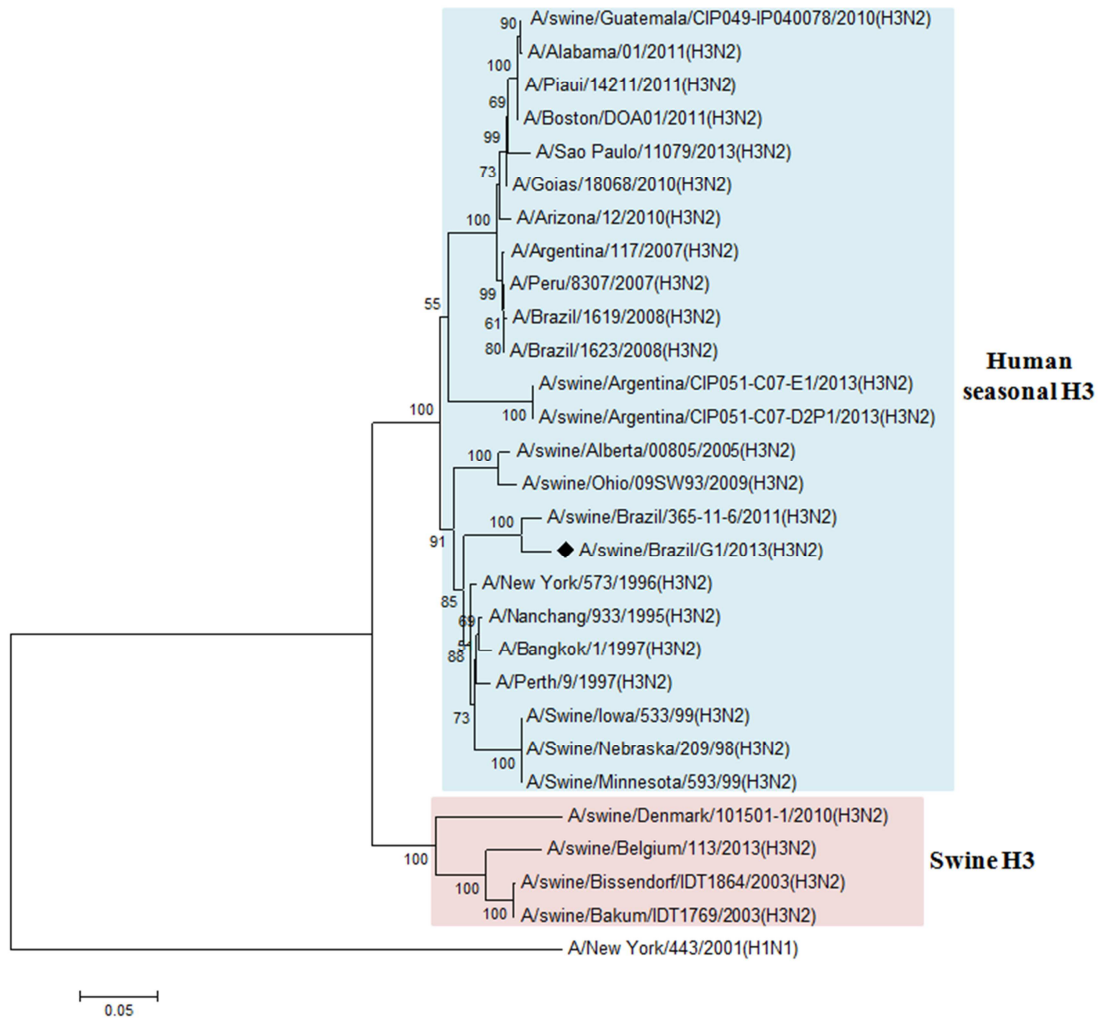


Figure 2. Phylogenetic comparison between *H3* segments of IAV of human and swine origin. The H3N2 virus introduced in this study is indicated by a black lozenge. Data based on nucleotide sequences available at GenBank. Tree generated by the neighbor-joining method using the MEGA 6.0.6 software. Bootstrap values $\geq 70\%$ are shown. The scale bar of the tree indicates substitutions per site.

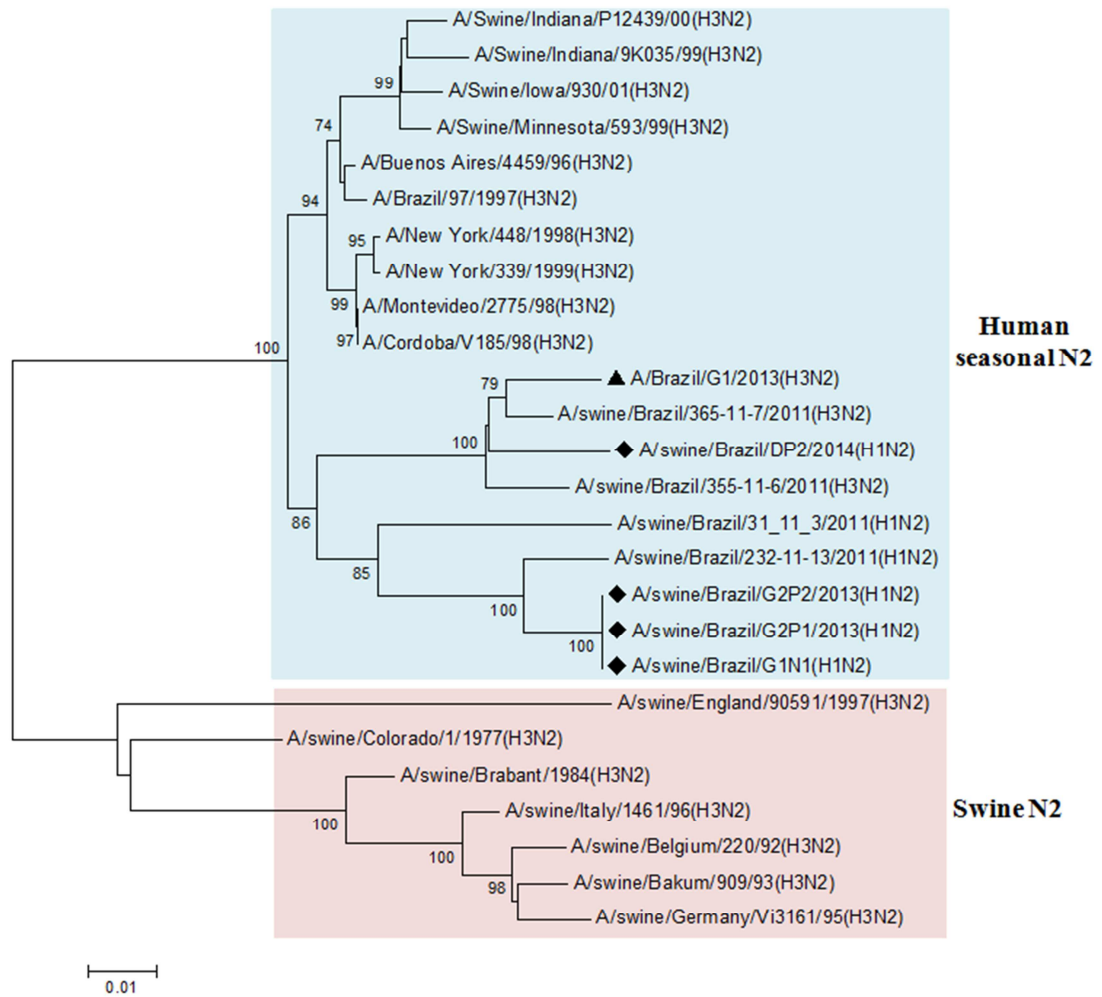


Figure 3. Phylogenetic comparison between N2 segments of IAV of human and swine origin. The H1N2 viruses introduced in this study are indicated by black lozenges and H3N2 virus is indicated by black triangle. Data based on nucleotide sequences available in GenBank. Tree generated by the neighbor-joining method using the MEGA 6.0.6 software. Bootstrap values $\geq 70\%$ are shown. The scale bar of the tree indicates substitutions per site.

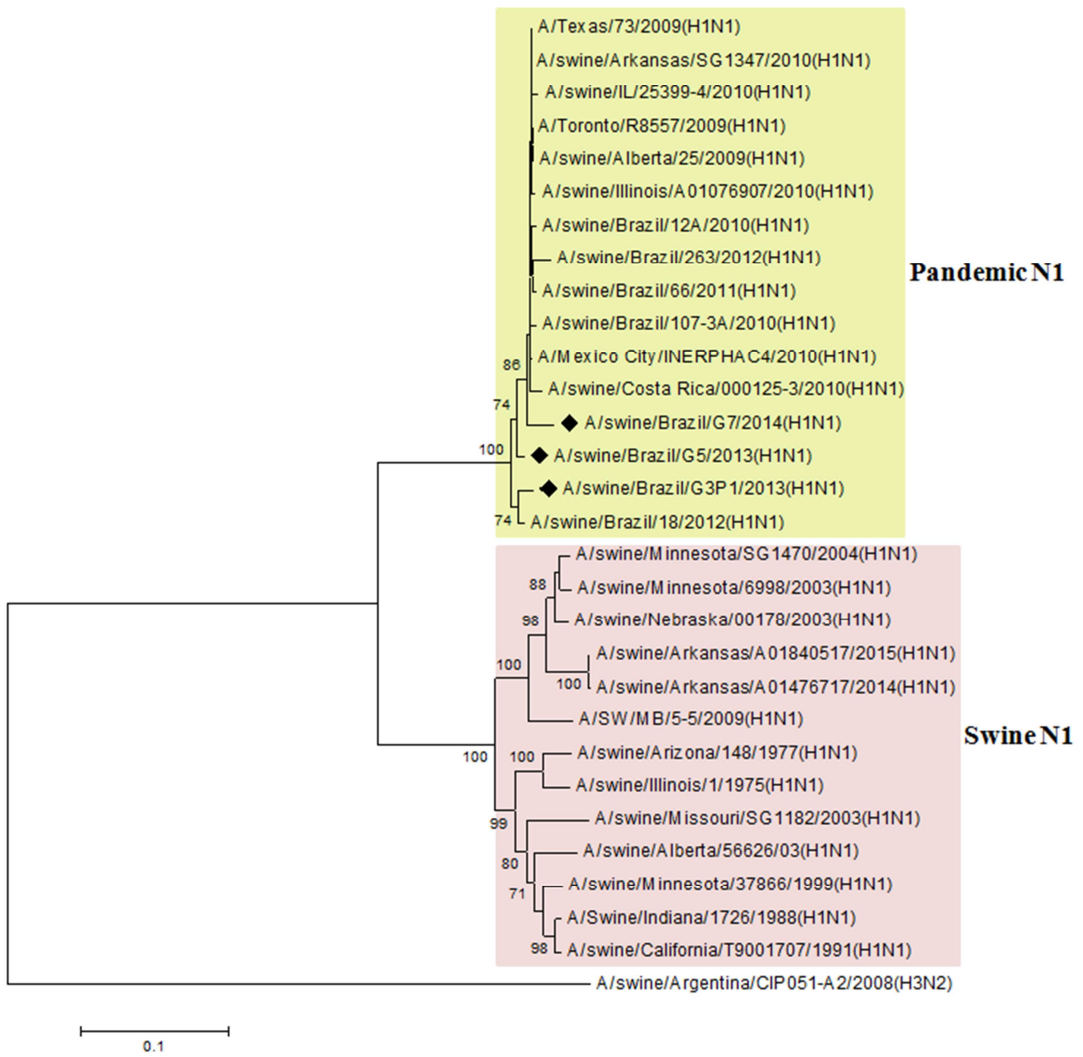


Figure 4. Phylogenetic comparison between *N1* segments of IAV of human and swine origin. The H1N1 viruses introduced in this study are indicated by black lozenges. Data based on nucleotide sequences available at GenBank. Tree generated by the neighbor-joining method using the MEGA 6.0.6 software. Bootstrap values $\geq 70\%$ are shown. The scale bar of the tree indicates substitutions per site.

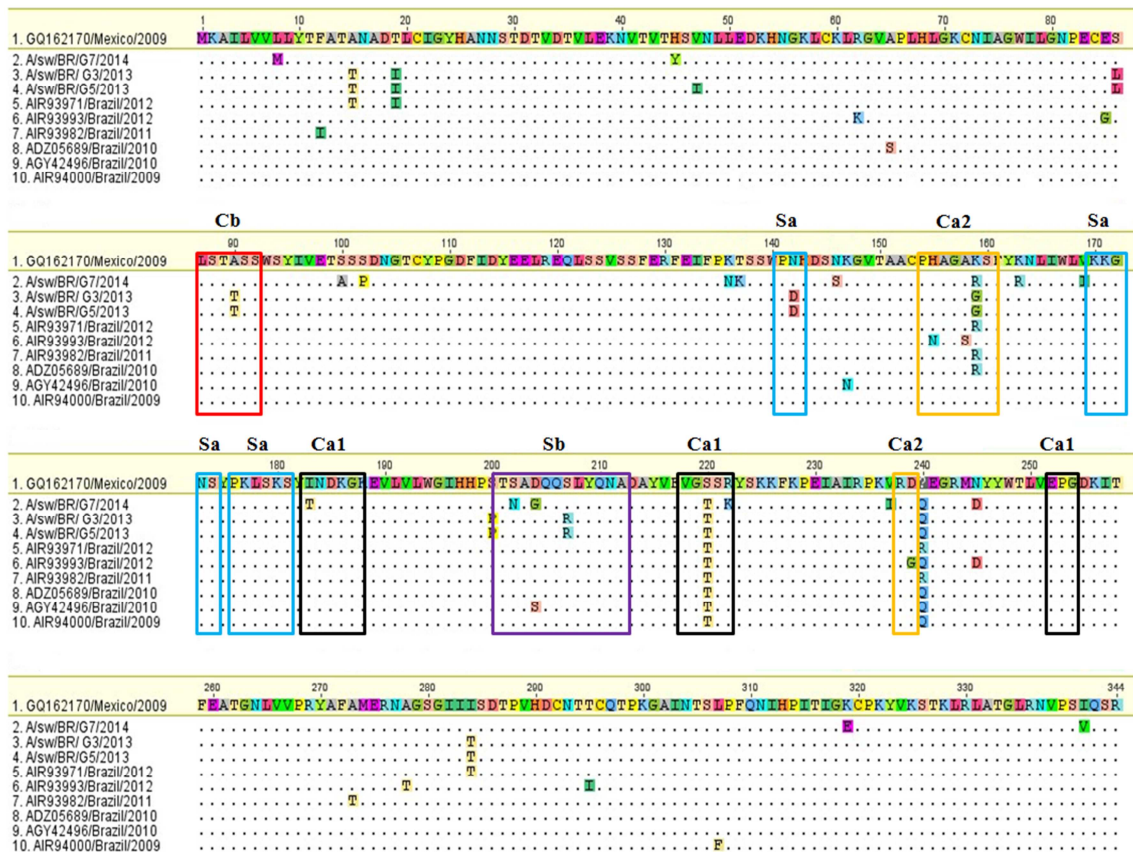


Figure 5. Sequence alignment of the deduced Hemagglutinin (HA) proteins of the swine influenza A(H1N1)pdm09 viruses reported in the present study. Dots represent consensual amino acids in comparison to the reference sequence (A/Mexico/4108/2009; GenBank accession no. GQ162170). The antigenic sites (Sa, Sb, Ca1, Ca2, and Cb) are highlighted in rectangles.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, a importância do vírus influenza no desencadeamento de doenças do complexo respiratório tem aumentado significativamente. Isso se deve, principalmente, aos eventos de introdução de novos subtipos virais na população de suínos (Zhou et al., 2000; Choi et al., 2002) que resultam no aumento da ocorrência de surtos e no aumento das complicações das doenças respiratórias (Van Reeth et al., 1996). Além disso, com a emergência do vírus pandêmico A(H1N1)pdm09 em 2009, muitos recombinantes, contendo distintas combinações gênicas do vírus pandêmico e vírus endêmicos de suínos, começaram a ser detectados em diferentes países (Ali et al., 2012; Charoenvisal et al., 2013; Ducatez et al., 2011; Moreno et al., 2011). Nesse sentido, o presente estudo foi desenvolvido buscando ampliar o conhecimento acerca da ocorrência de infecções por diferentes subtipos de vírus influenza suína (IAV) e seu envolvimento com a doença do complexo respiratório dos suínos (PRDC). Para tanto, granjas comerciais que apresentavam surtos de doenças respiratórias foram investigadas. Essas propriedades estão localizadas no Rio Grande do Sul (RS), estado que ocupa uma posição de destaque dentro da cadeia produtiva de suínos, enfatizando, dessa forma, a importância de um melhor entendimento sobre a circulação e evolução destes agentes.

Em uma primeira etapa do estudo, buscou-se associar o IAV ao PRDC, além de classificar os subtipos de vírus influenza envolvidos nos surtos de doença respiratória analisados. Normalmente, dois ou mais agentes infecciosos estão envolvidos em doenças do complexo respiratório. Adicionalmente, fatores de risco relacionados ao manejo e ambiente onde os animais são criados também podem influenciar (Sorensen et al., 2006). Assim, aspectos clínicos, patológicos e virológicos da ocorrência e interação desses agentes foram investigados. Este estudo demonstrou que o IAV estava envolvido nos casos de doença do complexo respiratório e que existem pelo menos dois diferentes subtipos de IAV circulando na população analisada. Esses resultados reforçam a ideia de que as medidas de controle e monitoria devem ser repensadas e melhoradas, com o intuito e minimizar o risco da introdução de diferentes subtipos virais nas granjas.

Os resultados encontrados nessa primeira etapa propiciaram o desenvolvimento de estudos subsequentes. Após detecção de diferentes subtipos do vírus influenza e comprovação do seu envolvimento com os surtos de doença respiratória, uma granja de reprodutores suídeos certificada (*GRSC*), com elevado nível de biossegurança, foi

selecionada para um estudo de caracterização genética do vírus influenza envolvido no surto. Para tanto, duas amostras virais, obtidas a partir do tecido pulmonar de dois leitões foram utilizadas para análise. Os genomas completos foram obtidos e a análise dos mesmos revelou que se tratava de um novo vírus H1N2 (*human-like* H1N2) contendo genes de origem humana e genes originários do vírus pandêmico A(H1N1)pdm09. Este foi o primeiro relato de um vírus recombinante *human-like* H1N2 derivado do vírus pandêmico A(H1N2)pdm09 associado a surto de doença respiratória em suínos no Brasil. A detecção deste novo recombinante reforça ainda mais a importância de se manter um sistema de vigilância atuante para detecção do vírus influenza A em suínos bem como a possibilidade de recombinação com outros tipos de influenza.

Por fim, um estudo foi conduzido visando ampliar os conhecimentos acerca da composição genética dos diferentes subtipos de vírus influenza que circulam em suínos do Rio Grande do Sul. Para tanto, oito amostras virais, oriundas de surtos de influenza suína, foram selecionadas e sequenciadas utilizando uma plataforma de nova geração. A análise das sequências revelou que durante os anos de 2013 e 2014 pelo menos 3 diferentes subtipos virais circularam em suínos do Rio Grande do Sul. Foram identificados dois subtipos virais de origem humana - H1N2 e H3N2 - e o vírus pandêmico A(H1N1)pdm09. Os subtipos de origem humana possuem os genes da hemaglutinina e neuraminidase (*HA* e *NA*) similares a vírus sazonais que circularam em humanos durante o final da década de 90 e início dos anos 2000. Já os genes internos são estreitamente relacionados com o vírus pandêmico A(H1N1)pdm09.

Os estudos aqui apresentados representam uma contribuição para aprimorar o entendimento sobre a evolução dos vírus influenza em suínos no Estado do Rio Grande do Sul e no Brasil. É primordial a consolidação de um sistema de vigilância ativo para esta enfermidade; onde os vírus isolados possam ser completamente sequenciados e analisados para permitir a identificação de possíveis recombinantes que possam representar um potencial risco tanto para saúde animal como para saúde humana. Além disso, o conhecimento detalhado dos subtipos virais que circulam a cada ano no Brasil é de extrema importância para o desenvolvimento de vacinas eficazes que podem auxiliar no controle da influenza suína.

Outro ponto de grande importância é a questão da vacinação de trabalhadores da suinocultura para o vírus influenza. Conforme demonstrado nestes e em outros estudos desenvolvidos recentemente no Brasil, vírus influenza de origem humana estão sendo

transmitidos de humanos para suínos e estão recombinação e gerando novos vírus. Ainda assim, no Brasil, os trabalhadores envolvidos na atividade da suinocultura não estão incluídos nos grupos prioritários dos programas de imunização para influenza. Esta medida teria uma grande importância para minimizar a transmissão do vírus de humanos para suínos e esse procedimento teria como objetivo não só a proteção individual do trabalhador como também a proteção dos rebanhos e a segurança da economia nacional.

REFERÊNCIAS

- ABED, Y. et al. Role of permissive neuraminidase mutations in influenza A/Brisbane /59/2007-like (H1N1) viruses. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 12, 2011.
- ABUSUGRA, I A. et al. The provenance of the Swedish swine influenza H1N1 virus of 1983. **Zentralblv. Veterinarmed B**, v. 34, p. 566-572, 1987.
- AIR, G.M. et al. Antibody recognition of the influenza virus neuraminidase. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 54, p. 247-255, 1989.
- ALI, A. et al. Identification of swine H1N2/pandemic H1N1 reassortant influenza virus in pigs, United States. **Vet Microbiol**, v. 158, p. 60–68, 2012.
- AMORIM, MJ & DIGARD. Influenza A virus and the cell nucleus. **Vaccine**, v. 24, n. 44, p. 6651-5, 2006.
- AYMARD, M. et al. Comparison of influenza antibody serologic immunity in man and in pig. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 3, p. 111–119, 1980.
- BARRY, J.M. *The Great Influenza. The story of the deadliest pandemic*. Ed. USA: Penguin Books, 2005. ISBN-10: 0143034480.
- BIONDO, N. *Estudo Etiológico e Patológico de Pneumonias em Javalis Criados de Forma Confinada no Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.*
- BIONDO N. et al. Genomic analysis of influenza A virus from captive wild boars in Brazil reveals a human-like H1N2 influenza virus. **Vet Microbiol**, v. 168, p. 34–40, 2014.
- BLAKEMORE, F. & GLEDHILL, A.W. Swine influenza in the British Isles. **Proc R Soc Med**, v. 34, p. 611, 1941.
- BOLIAR, S. et al. Inability of kaolin treatment to remove nonspecific inhibitors from equine serum for the hemagglutination inhibition test against equine H7N7 influenza vírus. **J Vet Diagn Invest**, v. 18, p. 264–267, 2006.
- BÖTTCHER J. et al. Endemic circulation of swine influenza virus (SIV) in the absence of disease. In: 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Krakow, Poland, p. 255, 2007.
- BRENTANO, L. et al. Levantamento soroepidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus de influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. In: Comunicado técnico (Concórdia, Embrapa Suínos e Aves), p. 1-6, 2002.

BROCKWELL-STAATS C., et al. Diversity of Influenza Viruses in Swine and the Emergence of a Novel Human Pandemic Influenza A (H1N1). **Influenza Other Respir. Viruses**, v.3, p. 207-213, 2009.

BROWN, I.H. et al. Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype. **Vet Rec**, 136: 328-329. 1995.

BUONAGURIO, D. A. Evolution of human influenza A viruses over 50 years: Rapid, uniform rate of change in NS gene. **Science**, v. 232, n. 4753, p. 980–982, 1986.

CAPPUCCIO, J.A. et al. Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a noncontemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. **J Gen Virol**, v. 92, p. 2871-2878, 2011

CARON, L.F. et al. Seroprevalence of H3N2 influenza A virus in pigs from Paraná (South Brazil): Interference of the animal management and climatic conditions. **Virus Rev. Res.** v. 15, p. 63-73, 2010.

CASTRUCCI, M.R. et al. Antigenic and sequence analysis of H3 influenza virus haemagglutinins from pigs in Italy. **J Gen Virol**, v. 75, p. 371-379, 1994.

CHAROENVISAL, N. et al. Genetic characterization of Thai swine influenza viruses after the introduction of pandemic H1N1 2009. **Virus Genes**, v. 47, p. 75–85, 2013.

CHEN, L.M. et al. Receptor specificity of sub- type H1 influenza A viruses isolated from swine and humans in the United States. **Virology**, v. 412, p. 401–410, 2011.

CHOI, Y.K. et al. Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States. **Arch Virol**, v. 147, p. 1209–1220, 2002.

CHOI, Y.K. et al. Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. **J Virol**, v. 79, p. 10821–10825, 2004.

CHOI, Y.K. et al. Swine Influenza Viruses: An Asian Perspective. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 370, p. 147-172, 2012.

CHRISTOPHER-HENNINGS, J. et al. Diagnostic tests, test performance, and considerations for interpretation, In: Zimmerman J.J et al. (Eds), Diseases of Swine. 10th ed. Ames:Iowa State University Press, 2012. p.77-93.

CHUTINIMITKUL S. et al. Genetic characterization of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza virus in Thailand. **Arch Virol**, v. 153, p. 1049-1056, 2008.

CIACCI-ZANELLA, J.R. et al. Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. **J Vet Diagn Invest**, v. 22, p. 3-9, 2010.

CLAVIJO, A. et al. Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. **Can J Vet Res.** v. 66, p. 117–121, 2002.

- CUNHA, R.G. Isolation of a strain of Myxovirus influenzae-A suis from swine slaughtered in Rio de Janeiro. **Rev Bras Biol**, v. 38, p. 13-17, 1978.
- DAS K. et al. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. **Nat. Struct. Mol. Biol.** v. 17, p. 530–538, 2010.
- DENG, Y.M. et al. Transmission of influenza A(H1N1) 2009 pandemic viruses in Australian swine. **Influenza Other Respi. Viruses**, v. 6, p. 42–47, 2012.
- DETMER, S. et al. Diagnostics and surveillance for swine influenza. **Curr. Topics Microbiol. Immunol.** Heidelberg: Springer-Verlag Berlin: 28p. 2012.
- DRAKE, J. et al. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. **Proc Natl Acad Sci**, v. 90, p. 4171–4175, 1993.
- DUCATEZ, M.F. et al. Multiple reassortment between pandemic (H1N1) 2009 and endemic influenza viruses in pigs. **Emerg Infect Dis**, v. 17, p. 1624-1629, 2011.
- EASTERDAY, B.C. Swine Influenza. In: Ed. DUNNE, H. & LEMAN, E.A.D. Diseases of Swine. Ames: Iowa State University Press, 1975. p. 141-162.
- EASTERDAY, B.C. & VAN REETH, K. Swine influenza In: STRAW, B. ET AL. E. (Ed). Diseases of Swine. 8.ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 277-290.
- FERNEL, J. On the pestilent diseases: that their cause is hidden. Leiden: Brill, 2005, p. 563–595.
- FERRARI, M. et al. Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. **J. Virol. Methods**, v. 107, n. 2, p. 205-212, 2003.
- FLORES, E.F. et al. Orthomyxoviridae. In: FLORES, E.F. (Ed.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007, p. 489 -512.
- FORBES, N.E. Multifunctional adaptive NS1 mutations are selected upon human influenza virus evolution in the mouse. **PLoS One**. v. 7, n. 2, p. 31839, 2012.
- FOUCHIER, R.A. et al. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. **J. Clin. Microbiol.** V. 38, p. 4096-4101, 2000.
- FRANCIS, T. et al. Dissociation of hemagglutinating and antibody-measuring capacities of influenza virus. **J Exp Med**, v. 85, p. 1–7, 1947.
- GARTEN, R. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. **Science**, v. 325, p. 197–201, 2009.
- GAUGER, P.C. et al. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. **Vet. Pathol**, v. 49, p. 900–912, 2012.

- GERDIL, C. The annual production cycle for influenza vaccine. **Vaccine**, v. 21, p. 1776–1779, 2003.
- GRAMER, M.R. 38th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians, Orlando, FL, 2007.
- GRAY, G.C., & BAKER W.S. The importance of including swine and poultry workers in influenza vaccination programs. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 82, p. 638–641, 2007.
- HERFST, S. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. **Science**, v. 336, p. 1534-1541, 2012.
- HINSHAW, V.S. The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. **Virology**, v. 84, p. 51-62. 1978.
- HOFSHAGEN, M. Pandemic influenza A(H1N1)v: human to pig transmission in Norway? **Euro Surveill**, v. 14, n. 45, p. 19406, 2009.
- HOWDEN, K.J. et al. An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. **Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.1153-1161, 2009.
- HUSSAIN A.I. et al. Comparison of egg and high yielding MDCK cell-derived live attenuated influenza virus for commercial production of trivalent influenza vaccine: in vitro cell susceptibility and influenza virus replication kinetics in permissive and semi-permissive cells. **Vaccine**, v. 28, n. 22, p. 3848-3855, 2010.
- IMAI, M. & KAWAOKA, Y. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses. **Curr Opin Virol**, v. 2, p. 160-167, 2012.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Agropecuário 2012, 2012. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp>.
- JANKE, B.H. Diagnosis of swine influenza. **Swine Health Prod.** v. 8, p. 79-83, 2000.
- JOHNSON, N.P.A.S. & MUELLER, J. Updating the accounts: global mortality of the 1918–1919 “Spanish” influenza pandemic. **Bull Hist Med**, v. 76, p. 105-115, 2002.
- JUNG, K.; HA, Y.; CHAE, C. Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs. **Journal of Comparative Pathology**, v.132, p.179-184, 2005.
- KARASIN, A. I. et al. Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. **J. Virol.** v. 74, p. 9322–9327, 2000.
- KIDA, H. et al. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. **J Gen Virol**, v. 75, p. 2183–2188, 1994.

- KIM, S.H. Outbreak of pandemic influenza (H1N1) 2009 in pigs in Korea. **Vet Rec**, v. 169, p. 155, 2011.
- KITIKOON, P. et al. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. **Vet. Immunol. Immunopathol.** V. 112, p. 117–128, 2006.
- KOEN, J.S. et al. A practical method for field diagnosis of swine diseases. **Am J Vet Med**, v. 14, p. 468–470, 1919.
- KITIKOON, P. et al. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 112, p. 117–128, 2006.
- KUNTZ-SIMON, G. & MADEC, F. Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. **Zoonoses Public Health**, v. 56, p. 310-325, 2009.
- KYRIAKIS, C.S. et al. Virological surveillance and preliminary antigenic characterization of influenza viruses in pigs in five European countries from 2006 to 2008. **Zoonoses Public Health**, v. 58, p. 93-101, 2011.
- LAMONT, H.G. et al. The problems of the practitioner in connection with the differential diagnosis and treatment of diseases of young pigs. **Vet Rec**, v. 50, p. 1377, 1938.
- LEE, J.H. et al. Efficacy of swine influenza A virus vaccines against an H3N2 virus variant. **Can J Vet Res**, v. 71, p. 207–212, 2007.
- LOMBARDO, T. et al. Susceptibility of different cell lines to Avian and Swine Influenza viruses. **J. Virol Methods**. v. 185, n. 1, p. 82–88, 2012.
- LÓPEZ, A. Respiratory System. In: McGavin, M.D. & Zachary, J.F. Pathologic basis of veterinary disease. 4ed. Mosby Elsevier. 2006. cap 9. p.463-558, 2006
- LORUSSO, A. et al. Genetic and antigenic characterization of H1 influenza viruses from United States swine from 2008. **J Gen Virol**, v. 92, p. 919-930, 2011.
- LOURIA, D.B. et al. Studies on influenza in the pandemic of 1957-1958. II. Pulmonary complications of influenza. **J Clin Invest**, v. 38, p. 213-265, 1959.
- MA, W. et al. The Role of Swine in the Generation of Novel Influenza Viruses. v. 56, p. 326–337, 2009.
- MA, W. et al. The NS segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism, and host range of an H7N1 HPAIV. **J Virol**, v. 84, p. 2122-2133, 2010.
- MA, W. & RICHT, J.A. Swine influenza vaccines: current status and future perspectives, v. 11, n. 1, 2010.

MANCINI, D.A.P et al. Evidence of swine respiratory infection by influenza viruses in Brazil. **Virus Rev. Res.** v. 11, p. 39-43, 2006.

MÄNZ, B. et al. Adaptive mutations in NEP compensate for defective H5N1 RNA replication in cultured human cells. **Nat Commun**, v. 3, p. 802. 2012.

MATSUU, A.Y. et al. Genetic characterization of swine influenza viruses isolated in Japan between 2009 and 2012. **Microbiol. Immunol**, v. 56, p. 792–803, 2012.

MASUREL, N. et al. Prevalence of influenza viruses A-H1N1 and A-H3N2 in swine in the Netherlands. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 6, p. 141-149, 1983.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
EXPORTAÇÃO (MAPA), 2012. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>.

MIWA, Y. et al. Isolation of human (H3N2) influenza virus and prevalence of the virus-antibody in swine. **Nihon Juigaku Zasshi**, v. 49, p. 1168-1170, 1987.

MORENO, A. First Pandemic H1N1 Outbreak from a Pig Farm in Italy. **Open Virol J**, v. 4, p. 52-56, 2010.

MORENO, A.T.L. Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus. **Vet Microbiol**. v. 149, p. 472–477, 2011.

MORENO, A. et al. Genomic characterization of H1N2 swine influenza viruses in Italy. **Vet Microbiol**, v. 156, p. 265-276, 2012.

MORENS, D.M. et al. Pandemic influenza's 500th anniversary. **Clin Infect Dis**, v. 51, p. 1442-1444, 2010.

MORES, M.A.Z. Etiologia de problemas respiratórios em suínos enviados ao CEDISA para diagnóstico no ano de 2010. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 15., 2011, Fortaleza. Anais de palestras e resumos. Fortaleza: Abraves, 2011.

MURPHY, F.A. et al. Orthomyxoviridae. In: Murphy, F.A. et al. **Veterinary virology**. 3.ed. San Diego, CA: Academic Press, 1999, p.459-468.

NARDELLI, L. et al. Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 25, p. 853-857, 1978.

NELSON, D.L. & COX, M.M. Lehninger: Principles of Biochemistry. 5th Edition. New York :WH Freeman Publishers, 2010.

NELSON, M. I. et al. Global migration of influenza A viruses in swine. **Nature**, p. 1 – 11, 2015a.

NELSON M. I. et al. Influenza A Viruses of Human Origin in Swine, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 21, p. 1339-1347, 2015b.

NEUMEIER, E et al. Genetic relatedness between influenza A(H1N1) viruses isolated from humans and pigs. **J Gen Virol**, v. 75, p. 2103-2107, 1994.

NINOMIYA, A. et al. Seroepidemiological evidence of avian H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in southeastern China. **Vet Microbiol**, v. 88, p. 107-114, 2002.

NOBUSAWA, E. & SATO, K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. **J Virol**, v. 80, p. 3675-3678, 2006.

OHWADA, K. et al. Distribution of the antibody to influenza C virus in dogs and pigs in Yamagata Prefecture. **Japan Microbiol Immunol** v. 31, n. 121, p. 173–1180, 1987.

OLSEN, C.W. et al. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. **Virus Research**, v. 85, p. 199-210, 2002.

OLSEN, C.W. et al. Swine Influenza. In: STRA,W. (Eds) **Diseases of Swine**. Ames, USA: Iowa State University Press, 2005, p. 469–482.

OLSEN, B. Global patterns of influenza a virus in wild birds. **Science**, v. 312, p. 384-388, 2006.

OTTIS, K. et al. Human influenza A viruses in pigs: isolation of a H3N2 strain antigenically related to A/England/42/72 and evidence for continuous circulation of human viruses in the pig population. **Arch Virol**, v. 73, p. 103–108, 1982.

PALESE, P. & SHAW, M.L. In: KNIPE, D.M. & HOWLEY, P.M. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. (Eds.), **Fields virology**. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 1647–1689.

PASCUA, P.N. et al. Seroprevalence and genetic evolutions of swine influenza viruses under vaccination pressure in Korean swine herds. **Virus Res**, v. 138, p. 43-49, 2008.

PATTERSON, D.K. & PYLE, G.F. The geography and mortality of the 1918 influenza pandemic. **Bull Hist Med**, v. 65, p. 4-21, 1991.

PENSAERT, M. et al. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. **Bull World Health Organ**, v. 59, p. 75–78, 1981.

PEREDA, A. et al. Pandemic (H1N1) 2009 outbreak on pig farm, Argentina. **Emerg Infect Dis**, v. 16, p. 304-307, 2010.

PRITCHETT, T.J. & PAULSON, J.C. Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig alpha 2- macroglobulin. **J Biol Chem** v. 264, p. 9850–9858, 1989.

- RAJÃO, D.S. et al. Genetic characterization of influenza virus circulating in Brazilian pigs during 2009 and 2010 reveals a high prevalence of the pandemic H1N1 subtype. **Influenza Other Respi Viruses**, 2012.
- RAJÃO, D.S. et al. Serological evidence of swine influenza in Brazil. **Influenza Other Respi Viruses**, v. 7, p. 109-112, 2013.
- RYAN-POIRIER, K.A. & KAWAOKA, Y. Distinct glycoprotein inhibitors of influenza A virus in different animal sera. **J Virol**, v. 65, p. 389–395, 1991.
- SCHAEFER, R. et al. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. **Pesq Vet Bras**, v. 31, n. 9, p. 761-767, 2011.
- SCHAEFER, R. et al. A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. **Arch Virol**, v.160, p. 29-38, 2015.
- SCHILD, G.C. et al. Evidence for host cell selection of influenza virus antigenic variants. **Nature**, v. 303, n. 5919, p. 706-709, 1983.
- SCHOLTISSEK, C. Molecular evolution of influenza viruses. **Virus Genes**, v. 11, p. 209–215, 1995.
- SEYER R, et al. Synergistic Adaptive Mutations in the Hemagglutinin and Polymerase Acidic Protein Lead to Increased Virulence of Pandemic 2009 H1N1 Influenza A Virus in Mice. **J Infect Dis**, v. 205, n. 2, p. 262–271, 2012.
- SHOPE, R.E. The etiology of swine influenza. **Science**, v. 73, p. 214-215, 1931.
- SIMON, G. et al. European Surveillance Network for Influenza in Pigs: Surveillance Programs, Diagnostic Tools and Swine Influenza Virus Subtypes Identified in 14 European Countries from 2010 to 2013. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1 -21, 2014
- SIMON-GRIFE, M. et al. Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. **Vet Microbiol**, v. 149, p. 56–63, 2011.
- SKEHEL, J.J. & WILEY, D.C. Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin. **Ann Rev Biochem** v. 69, p. 531-569, 2000.
- SMITH, G.J. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, p. 11709-11712, 2009.
- SUBBARAO, K. Comparison of different approaches to measuring influenza A virus-specific hemagglutination inhibition antibodies in the presence of serum inhibitors. **J Clin Microbiol**, v. 30, p. 996–999, 1992.
- SUBBARAO, K. & SHAW, M.W. Molecular aspects of avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans. **Rev Med Virol**, v. 10, p. 337-348, 2000.

TAKEMAE, N. et al. Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand. **Influenza Other Respi Viruses**, v. 2, p. 181-189, 2008.

TAUBENBERGER, J.K. et al. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 356, p. 1829-1839, 2001.

TAUBENBERGER, J.K. & MORENS, D.M. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. **Emerg Infect Dis**, v. 12: p. 15-22, 2006.

TAUBENBERGER, J.K. & KASH, J.C. Insights on influenza pathogenesis from the grave. **Virus Res**, v. 162, p. 2-7, 2011.

TONG, S. et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 109, p. 4269-4274, 2012.

TONG, S. et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. **PLoS Pathog**, v. 9, p. 1-12, 2013.

TORREMORELL, M. et al. Procedures to eliminate H3N2 swine influenza virus from a pig herd. **Veterinary Records**. v. 165, p. 74–77, 2009.

USAID. USAID Launches Emerging Pandemic Threats Program. Washington, DC, 2009. Disponible em: <http://www.usaid.gov/what-we-do/global-health/pandemic-influenza-and-other-emerging-threats>

VAN REETH, K. et al. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. **Influenza Other Respi Viruses**, v. 2, p. 99-105, 2008.

VAN REETH, K. & MA, W. Swine Influenza Virus Vaccines: To Change or Not to Change—That's the Question. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 370, p. 173–200, 2013.

VIBOUD, C. et al. Multinational impact of the 1968 Hong Kong influenza pandemic: evidence for a smoldering pandemic. **J Infect Dis**, v. 192, p. 233-248, 2005.

VIJAYKRISHNA, D. et al. Long-term evolution and transmission dynamics of swine influenza A virus. **Nature**, v. 473, p. 519-522, 2011.

VINCENT, A. et al. A monoclonal-antibodybased immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **J. Vet Diagn Invest**, v. 9, p. 191-195, 1997.

VINCENT, A. et al. Failure of protection and enhanced pneumonia with a US H1N2 swine influenza virus in pigs vaccinated with an inactivated classical swine H1N1 vaccine. **Vet Microbiol**, v. 126, p. 310-323, 2008.

VINCENT, A. et al. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. **Virus Genes**, v. 39, p. 176-185, 2009.

VINCENT, A. et al. Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. **Influenza Other RespiViruses**, v. 4, p. 53–60, 2010.

VINCENT, A. et al. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research. **Zoonoses Public Health**, 2012.

WEBBY, R. et al. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. **J. Virol.** v. 74, p. 8243–8251, 2000.

WEBBY, R.J. & WEBSTER, R.G. Emergence of influenza A viruses. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 356, n. 1416, p. 1817–1828, 2001.

WEBBY, R.J. et al. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. **Virus Res.** v. 103, p. 67- 73, 2004.

WEBSTER, R.G. et al. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. **Nature**, v. 296, p. 115–121, 1982.

WEBSTER, R.G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiol Rev**, v. 56, p. 152-179, 1992.

WEBSTER, R.G. The importance of animal influenza for human disease. **Vaccine**, v. 20, n. 2, p. 16–20, 2002.

WEINGARTL, H. et al. Genetic and pathobiologic characterization of pandemic H1N1 2009 influenza viruses from a naturally infected swine herd. **J Virol**, v. 84, p. 2245–2256, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 4, p.585-591, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Media centre. Influenza Seasonal, 2009. Fact sheet n°11. Disponible em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>

WRIGHT, P. F. et al. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, B.N et al. **Fields Virology**. 5th Edition, Philadelphia, USA:Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 1691-1740.

YASSINE, H.M. et al. Characterization of triple reassortant H1N1 influenza A viruses from swine in Ohio H.M., **Vet Microbiol**, v. 39, p. 132–139, 2009.

YONEYAMA, S. et al. Occurrence of a pig respiratory disease associated with swine

influenza A (H1N2) virus in Tochigi Prefecture, Japan. **J Vet Med Sci**, v. 72, p. 481-488, 2010.

YU, H. et al. Genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in China from 1970 to 2006. **J Clin Microbiol**, v. 46, p. 1067-1075, 2008.

ZANELLA, J.R.C. et al. Prevalence of influenza viruses infection in swine herds in Brazil in 2011. Proc. 22nd International Pig Veterinary Society Congress. 2012, Jeju, Korea, p.412. (Resumo)

ZANELLA, J.C. et al. Orthomyxoviridae. In: FLORES, E.F. (Org). **Virologia Veterinária**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012, p. 489 -512.

ZANELLA, J.C. & BRENTANO, L. Influenza Suína. In: SOBESTIANSKY, J. & BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**. 2. ed. Goiânia: Cãnone Editorial, 2012, p. 355– 362.

ZHOU, N.N. et al. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in american pigs. **J Virol**, v. 73, p. 8851–8856, 1999.

ZHU, X. et al. Crystal structures of two subtype N10 neuraminidase-like proteins from bat influenza A viruses reveal a diverged putative active site. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 109, p. 18903–18908, 2012.

APÊNDICE A

QUESTIONÁRIO UTILIZADO NAS GRANJAS ESTUDADAS



UFRGS/Laboratório de Virologia

| | |
|----|-----------------|
| Nº | Data: / / |
|----|-----------------|

DADOS GERAIS

| | | |
|--------------------------|-------------|-------|
| Nome do criador | Coordenadas | |
| Localidade | Lat. | Long. |
| Município/UF | 0 | 0 |
| Telefone | ‘ | ‘ |
| E-mail: | “ | “ |
| Responsável técnico: | | |
| Fone: _____ E-mail _____ | | |

CARACTERÍSTICAS DA GRANJA

1. Tipo de sistema: Maternidade () Creche () Recria/terminação () Ciclo completo ()

Populacionais

3. Qual é o tamanho do rebanho: _____

4. Qual é o numero de doentes? _____

5. Há quantos dias os animais estão alojados nesta granja? _____

6. Qual é a origem do lote: () Única () Múltipla. Quantas? _____

7. Quantas pessoas tratam os animais? _____

8. A granja possui funcionários? Sim () Não ()

9. O (s) funcionário (s) da granja trabalha em algum outro lugar? Sim () Não ()

Qual? _____

SANIDADE E BIOSSEGURIDADE

11. A granja é cercada: Sim () Não ()

12. A granja possui registro de entrada de pessoas? Sim () Não ()

13. Quais cuidados são tomados para entrar na granja?

() Lavar as mãos

() Troca de botas ou uso de botas descartáveis

() Troca de roupa

() Banho

14. Visitantes entram em contato com suínos? Sim () Não ()

14. Possui pedilúvio na entrada da sala? Sim () Não ()

Qual produto? _____

15. O caminhão que carrega suínos: Entra na granja () Possui área restrita ()

16. O caminhão que transporta os suínos é:

Próprio () Terceirizado () Empresa Integradora ()

17. Utiliza caiação no galpão? : Sim () Não ()

20. Os suínos tem contato com outras espécies animais? Sim () Não ()

Quais? _____

21. Existem suínos para consumo próprio na granja?

Sim () Não () Quantos? _____ Procedência? _____

Possui outros animais na propriedade? Sim () Quais ? _____

Não ()

22. A granja tem histórico de sintomas respiratórios em suínos nos últimos 3 lotes?

Não () Sim () Quais? _____

23. Qual é a idade dos animais doentes? _____

24. Quantos animais morreram desde o início do problema? _____

