

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO DE RT-qPCR *MULTIPLEX* PARA
DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DOS SUBTIPOS DO VÍRUS INFLUENZA A (H1/H3,
N1/N2) CIRCULANTES EM SUÍNOS NO BRASIL

VANESSA HAACH

Porto Alegre

2019

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO DE RT-qPCR *MULTIPLEX* PARA
DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DOS SUBTIPOS DO VÍRUS INFLUENZA A (H1/H3,
N1/N2) CIRCULANTES EM SUÍNOS NO BRASIL

Autora: Vanessa Haach

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias, na área de concentração de
Microbiologia – Virologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Cláudia Franco

Coorientadora: Dra. Rejane Schaefer

Porto Alegre

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

CIP - Catalogação na Publicação

Haach, Vanessa

Desenvolvimento e validação de ensaio de RT-qPCR multiplex para detecção e diferenciação dos subtipos do vírus influenza A (H1/H3, N1/N2) circulantes em suínos no Brasil / Vanessa Haach. -- 2019.

71 f.

Orientadora: Ana Cláudia Franco.

Coorientadora: Rejane Schaefer.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Vírus influenza A. 2. Suíno. 3. Subtipagem. 4. RT-qPCR multiplex. 5. Diagnóstico rápido. I. Franco, Ana Cláudia, orient. II. Schaefer, Rejane, coorient. III. Título.

Vanessa Haach

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO DE RT-qPCR *MULTIPLEX* PARA
DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DOS SUBTIPOS DO VÍRUS INFLUENZA A (H1/H3,
N1/N2) CIRCULANTES EM SUÍNOS NO BRASIL

Aprovada em 28 de fevereiro de 2019.

APROVADA POR:

Prof.^a Dra. Ana Cláudia Franco
Orientadora e Presidente da Comissão

Dra. Rejane Schaefer
Coorientadora e Membro da Comissão

Prof. Dr. Diogenes Dezen
Membro da Comissão

Prof.^a Dra. Franciele Maboni Siqueira
Membro da Comissão

Prof. Dr. Samuel Paulo Cibulski
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Ana Cláudia Franco pela oportunidade, confiança em mim depositada, ajuda, experiência e belo exemplo profissional.

À minha coorientadora Rejane Schaefer pela amizade, por toda ajuda, dedicação, apoio, experiência, conhecimento e ensinamentos compartilhados, e por sempre estar disposta a contribuir comigo. Por ser uma profissional exemplar, na qual tenho grande admiração.

À Danielle Gava pela amizade, ajuda incansável, apoio, disposição, experiência e conhecimento repassado, sanando minhas dúvidas, e por me "aguentar" dividindo a sala. Também é uma profissional exemplar que admiro.

À Marisete F. Schiochet e Neide L. Simon pela ajuda, apoio, experiência, conhecimento e amizade.

À Adriana M. G. Ibelli e Sabrina C. Duarte pela disposição, por todas as dicas, experiência compartilhada e ajuda para a realização deste estudo.

Ao bioinformata Maurício E. Cantão pelo conhecimento, ajuda e contribuição com este trabalho.

Ao estatístico Arlei Coldebella e à designer Marina Schmitt pelo auxílio neste trabalho.

Aos meus pais, meu irmão e meu namorado por todo o apoio, incentivo e compreensão pela minha ausência.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e participarem deste processo.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Sanidade e Genética Animal/Embrapa Suínos e Aves, e do Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela amizade e convivência.

A Embrapa Suínos e Aves pela estrutura e equipamentos, bem como os recursos financeiros necessários para este trabalho ser realizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste estudo. Muito obrigada!

RESUMO

A influenza é uma doença respiratória viral aguda que afeta várias espécies de aves e mamíferos, incluindo o homem. A doença em suínos é causada pelo vírus influenza A (IAV), tendo um impacto econômico significativo nos rebanhos suínos afetados, além de representar uma ameaça à população humana devido ao seu potencial pandêmico e zoonótico. Muito embora os subtipos virais globalmente prevalentes em suínos sejam o H1N1, H1N2 e H3N2, estes são geneticamente e antigenicamente distintos, de acordo com a região geográfica de origem. Estudos recentes realizados com isolados do IAV de suínos confirmaram que as linhagens virais detectadas no Brasil são restritas ao território brasileiro, não sendo encontrados vírus semelhantes em suínos de outros países. Desta forma, um teste de diagnóstico rápido, que seja capaz de detectar e diferenciar o subtipo do IAV em suínos é importante para o monitoramento e controle da infecção em rebanhos suínos. Além disto, no Brasil não existem testes rápidos disponíveis comercialmente, como RT-qPCR para subtipar o IAV em amostras clínicas de suínos. Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver e validar dois ensaios de RT-qPCR *multiplex* (um para a hemaglutinina viral – H1pdm, H1hu, H3; e outro para a neuraminidase viral – N1pdm, N1hu, N2) para a detecção e diferenciação dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 do IAV circulantes em suínos no Brasil. A especificidade analítica da técnica foi de 100%, na correta identificação do subtipo e linhagem viral em 85 IAVs previamente caracterizados por sequenciamento genômico. O ensaio apresentou 100% de especificidade diagnóstica em 50 amostras negativas para o IAV e positivas para outros patógenos de suínos. O limite de detecção da RT-qPCR variou entre $5,09 \times 10^3$ e $5,09 \times 10^1$ cópias de RNA viral/ μL , conforme o gene avaliado. Posteriormente, 73 amostras clínicas de suínos positivas para o IAV por RT-PCR (gene da matriz) foram testadas. A RT-qPCR *multiplex* identificou o subtipo e a linhagem viral em 74% das amostras clínicas analisadas, sendo que o subtipo H3N2 de origem humana (46,3%) foi o mais detectado, seguido pelo H1N1 de origem pandêmica (33,3%), H1N2 de origem humana (11,1%) e HxN1pdm (3,7%). Além disto, coinfeções (3,7%) e vírus que sofreram rearranjo gênico (1,9%) foram detectados. Portanto, o ensaio de RT-qPCR *multiplex* desenvolvido e validado neste estudo mostrou-se um método rápido, muito sensível e específico para a identificação dos subtipos e linhagens do IAV em amostras de suínos. A técnica descrita é economicamente viável quando comparada a outros métodos, como o sequenciamento genômico, e uma vez implementada em laboratórios de diagnóstico, poderá fornecer informações sobre a prevalência dos subtipos virais em suínos, contribuindo para o monitoramento e vigilância da influenza em rebanhos suínos.

Palavras-chave: Vírus influenza A. Suíno. Subtipagem. RT-qPCR *multiplex*. Diagnóstico rápido.

ABSTRACT

Influenza is an acute viral respiratory disease that affects several species of birds and mammals, including humans. The disease in pigs is caused by influenza A virus (IAV), which may have a significant economic impact on the affected swine herds, posing a threat to the human population due to its pandemic and zoonotic potential. Although the prevalent virus subtypes in swine herds worldwide are H1N1, H1N2 and H3N2, these are genetically and antigenically distinct, according to the geographic region of origin. Recent studies with IAV isolates from swine confirmed that the viral lineages detected in Brazil are restricted to the Brazilian territory, and no similar viruses were found in swine from other countries. In this way, a rapid diagnostic test, able to detect and differentiate the IAV subtype in pigs is important for the monitoring and control of the infection in swine herds. In addition, in Brazil there are no rapid tests commercially available, such as RT-qPCR, to subtype IAV in swine clinical samples. This study aimed to develop and validate two multiplex RT-qPCR assays (one for viral hemagglutinin – H1pdm, H1hu, H3; and another for viral neuraminidase – N1pdm, N1hu, N2) for the detection and differentiation H1N1, H1N2 and H3N2 IAV subtypes circulating in swine in Brazil. The analytical specificity of the technique was 100%, identifying the correct viral subtype and lineage in 85 IAVs previously characterized by genomic sequencing. The assay presented 100% of diagnostic specificity in 50 negative samples for IAV and positive for other swine pathogens. The limit of detection of the RT-qPCR ranged from 5.09×10^3 to 5.09×10^1 copies of viral RNA/ μL , according to the gene evaluated. Afterwards, 73 swine clinical samples positive for IAV by RT-PCR (matrix gene) were tested. The multiplex RT-qPCR identified the viral subtype and lineage in 74% of the clinical samples analyzed, which the human-origin H3N2 (46.3%) subtype was the most detected, followed by the pandemic-origin H1N1 (33.3%), human-origin H1N2 (11.1%) and HxN1pdm (3.7%). In addition, co-infections (3.7%) and reassortant viruses (1.9%) were detected. Therefore, the multiplex RT-qPCR assay developed and validated in this study showed to be a rapid, very sensitive and specific method for IAV subtyping and lineages identification in swine samples. The technique described is cost-effective when compared to other methods, such as genomic sequencing, and once implemented in diagnostic laboratories, may provide information on the prevalence of viral subtypes in pigs, contributing to the monitoring and surveillance of influenza in swine herds.

Keywords: *Influenza A virus. Swine. Subtyping. Multiplex RT-qPCR. Rapid diagnosis.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1. Diagrama do vírus influenza A mostrando o envelope viral e os oito genes virais. . | 17 |
| Figura 2. Modelo da ecologia do vírus influenza A. | 20 |
| Figura 3. Origem do vírus influenza H1N1 pandêmico de 2009..... | 23 |
| Figura 4. Filogenia do gene H1 dos vírus influenza norte-americanos circulantes em suínos. | 24 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Table 1. Sets of primers and probes sequences for the one-step multiplex RT-qPCR (HA and NA gene segments). | 50 |
| Table 2. Sets of primers sequences for the production of standard RNAs (H1pdm, H1hu, H3, N1pdm, N1hu and N2) for absolute quantification. | 51 |
| Table 3. Standardized protocol for the one-step multiplex RT-qPCR (HA and NA). | 52 |
| Table 4. Intra- and inter-assay variability of the one-step multiplex RT-qPCR for HA and for NA gene segments. | 54 |
| Table 5. Diagnostic sensitivity and analytical specificity of sequenced/isolated strains and clinical field samples, respectively, by one-step multiplex RT-qPCR. | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|--|
| BLASTn | <i>Basic Local Alignment Search Tool – nucleotide</i> |
| Cq | <i>Quantification cycle</i> |
| CV | <i>Coefficient of variation</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| F | <i>Forward primer</i> |
| FA | Imunofluorescência |
| H1N1pdm09 | H1N1 pandêmico de 2009 |
| HA | Gene da hemaglutinina (<i>Hemagglutinin gene</i>) / Teste de hemaglutinação |
| HI | Inibição da hemaglutinação (<i>Hemagglutination inhibition</i>) |
| Hu | <i>Seasonal human origin</i> |
| IAV | Vírus influenza A (<i>Influenza A virus</i>) |
| ICQ | Imunocitoquímica |
| IHQ | Imuno-histoquímica |
| LOD | <i>Limit of detection</i> |
| M | Gene da matriz (<i>Matrix gene</i>) |
| MDCK | <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> |
| NA | Gene da neuraminidase (<i>Neuraminidase gene</i>) |
| NI | Inibição da neuraminidase |
| NP | Gene da nucleoproteína |
| NS | Gene não-estrutural |
| OFFLU | <i>OIE/FAO Network of expertise on animal influenza</i> |
| PA | Gene da polimerase ácida |
| PB1 | Gene da polimerase básica 1 |
| PB2 | Gene da polimerase básica 2 |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| Pdm | <i>Pandemic/2009 origin</i> |
| R | <i>Reverse primer</i> |
| R ² | <i>Linear correlation</i> |
| RNA | Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>) |
| RT-PCR | Reação de transcrição reversa seguido da reação em cadeia da polimerase (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>) |

| | |
|---------|--|
| RT-qPCR | Reação de transcrição reversa seguido da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (<i>Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>) |
| SD | <i>Standard deviation</i> |
| SN | Soroneutralização |
| SPF | <i>Specific Pathogen Free</i> |
| TRIG | <i>Triple-reassortant internal gene</i> |
| VAERD | Doença respiratória exacerbada associada à vacinação (<i>Vaccine-associated enhanced respiratory disease</i>) |
| VI | <i>Virus isolation</i> |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|-------------------|
| α | Alfa |
| bp | <i>Base pairs</i> |
| β | Beta |
| δ | Delta |
| γ | Gama |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grau Celsius |
| μL | Microlitro |
| nM | Nanomolar |
| % | Porcentagem |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | Objetivos | 15 |
| 1.1.1 | Objetivo geral | 15 |
| 1.1.2 | Objetivos específicos..... | 15 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 2.1 | Vírus influenza A | 16 |
| 2.2 | Epidemiologia | 19 |
| 2.2.1 | Distribuição geográfica do vírus influenza A em suínos | 21 |
| 2.2.1.1 | Vírus influenza A na América do Norte..... | 22 |
| 2.2.1.2 | Vírus influenza A na Europa | 24 |
| 2.2.1.3 | Vírus influenza A na Ásia | 25 |
| 2.2.1.4 | Vírus influenza A na África | 26 |
| 2.2.1.5 | Vírus influenza A na América do Sul | 26 |
| 2.3 | Patogenia, sinais clínicos e lesões histológicas | 28 |
| 2.4 | Imunidade | 30 |
| 2.5 | Diagnóstico | 31 |
| 2.6 | Medidas de prevenção e controle | 33 |
| 3 | ARTIGO CIENTÍFICO | 36 |
| 3.1 | Introduction | 38 |
| 3.2 | Material and methods | 39 |
| 3.2.1 | Primers and probes design..... | 39 |
| 3.2.2 | Production of standard RNAs for absolute quantification | 40 |
| 3.2.3 | Standardization and performance evaluation of the one-step multiplex RT-qPCR ... | 40 |
| 3.2.4 | Analytical and diagnostic specificity of the one-step multiplex RT-qPCR | 41 |
| 3.2.5 | Evaluation of clinical samples by the one-step multiplex RT-qPCR..... | 41 |
| 3.3 | Results | 42 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.3.1 | Standardized protocol for the one-step multiplex RT-qPCR | 42 |
| 3.3.2 | Performance of the one-step multiplex RT-qPCR | 42 |
| 3.3.3 | Analytical and diagnostic specificity of the one-step multiplex RT-qPCR on viral isolates | 42 |
| 3.3.4 | Evaluation of clinical samples by the one-step multiplex RT-qPCR..... | 43 |
| 3.4 | Discussion | 43 |
| | References | 46 |
| 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 57 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |

1 INTRODUÇÃO

Após a pandemia de influenza em humanos iniciada em 2009, causada pelo vírus influenza A/H1N1 (H1N1pdm09) de origem suína, as pesquisas envolvendo o vírus influenza foram intensificadas, tanto na área humana quanto na área veterinária, uma vez que logo após a emergência em humanos, o vírus H1N1pdm09 foi reintroduzido em suínos em vários países (HOLYOAKE et al., 2011; PASMA; JOSEPH, 2010; SCHAEFER et al., 2011; TREVENNEC et al., 2012; ZHOU et al., 2011). Os vírus influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae* e causam uma infecção respiratória aguda, altamente contagiosa e com distribuição mundial (GONEAU et al., 2018). Os vírus influenza A (IAVs) são divididos em subtipos virais, os quais são diferenciados tendo como base a antigenicidade de duas glicoproteínas de superfície, a hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) (NELSON; VINCENT, 2015). Em suínos, a doença é causada pela infecção pelo IAV e, por se tratar de um agente zoonótico, representa uma ameaça à saúde humana. A doença em suínos apresenta muitas semelhanças clínicas e patológicas como a influenza em humanos, e os animais afetados apresentam sinais clínicos de tosse, dispneia e hipertermia (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012).

O suíno é um hospedeiro importante na dinâmica e epidemiologia da infecção pelo IAV por expressar, nas células epiteliais de seu trato respiratório, receptores celulares para ligação de vírus de origem aviária e mamífera, podendo, desta forma sofrer infecção por IAVs oriundos de diferentes espécies, como a humana e a aviária (MA; KAHN; RICHT, 2009). Além disto, o genoma segmentado do IAV permite a ocorrência de rearranjo gênico entre diferentes IAVs que infectam o suíno, permitindo uma rápida evolução viral e surgimento de novos vírus emergentes (NELSON; HOLMES, 2007). No Brasil, o IAV é considerado endêmico em suínos, e os subtipos virais predominantes são: H1N1, H1N2 e H3N2 (CIACCI-ZANELLA et al., 2015; RAJÃO et al., 2013a).

Para o diagnóstico de influenza, as técnicas mais utilizadas atualmente são a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR). As principais vantagens apresentadas são a rapidez na obtenção dos resultados, menor custo quando comparado ao sequenciamento genômico, além de serem sensíveis e específicas (LANDRY, 2011). Testes moleculares comerciais para detecção dos subtipos do vírus influenza em amostras clínicas de suínos estão disponíveis em outros países (ZHANG; HARMON, 2014), porém no Brasil não existem ensaios para diferenciação dos subtipos de IAV. Além disto,

diferenças genéticas observadas em sequências dos genes HA e NA obtidas de vírus isolados no Brasil (NELSON et al., 2015b) indicam que os testes validados em outros países podem não detectar os IAVs que circulam em suínos no Brasil. Devido a estas diferenças genéticas observadas em vírus que circulam em diferentes regiões geográficas, a OIE/FAO *Network of expertise on animal influenza* (OFFLU) definiu como uma das prioridades na pesquisa do vírus da influenza em suínos o desenvolvimento de técnicas moleculares com pares de iniciadores específicos para as linhagens virais circulantes em determinada região geográfica (OFFLU STEERING COMMITTEE, 2011, 2014). Desta forma, o desenvolvimento de um teste rápido e sensível para a detecção e diferenciação dos principais subtipos virais circulantes em suínos no Brasil é altamente relevante. O conhecimento sobre quais subtipos do IAV circulam nos plantéis suínos brasileiros permitirá a realização de estudos epidemiológicos sobre a dinâmica de infecção, agregando conhecimentos que auxiliarão no manejo, prevenção e controle da infecção em suínos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Detectar e diferenciar os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 dos vírus influenza A circulantes em suínos no Brasil.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver dois ensaios de RT-qPCR *multiplex one-step* (um para o gene HA e outro para o gene NA) para subtipagem dos vírus influenza A circulantes em suínos no Brasil.
- Validar os dois ensaios de RT-qPCR *multiplex one-step* (um para o gene HA e outro para o gene NA) desenvolvidos neste estudo.
- Aplicar os ensaios de RT-qPCR *multiplex one-step* desenvolvidos em amostras clínicas de suínos.

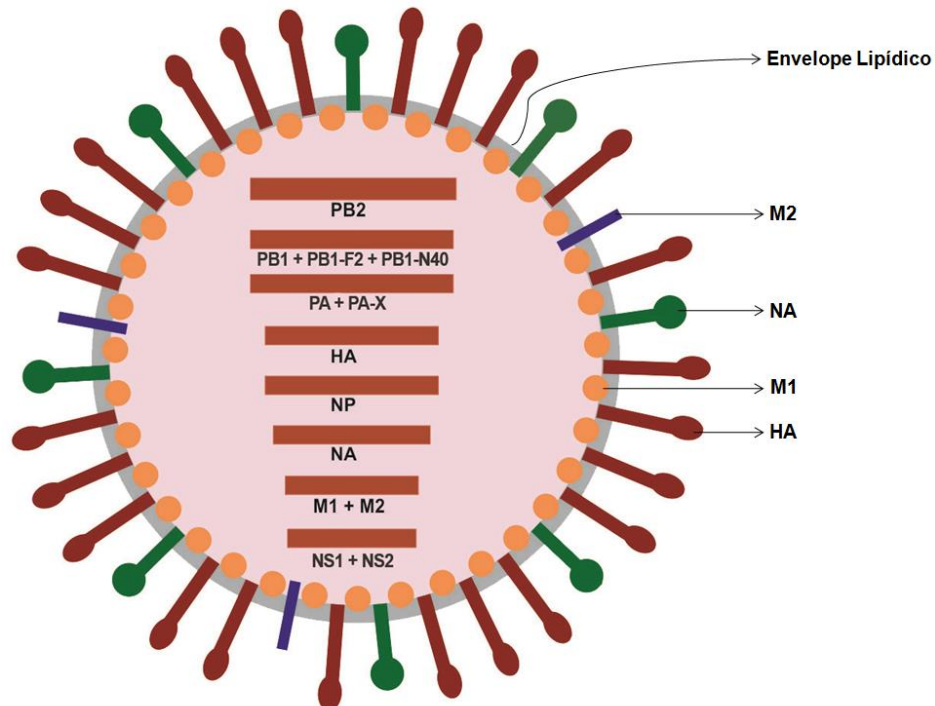
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vírus influenza A

Os vírus influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae*, que é composta por sete gêneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Influenzavirus D*, *Thogotovirus*, *Isavirus* e *Quaranjavirus* (GONEAU et al., 2018; ICTV, 2018). Os vírus pertencentes ao gênero *Influenzavirus A* são classificados em subtipos e os demais gêneros apenas em tipos virais. A nomenclatura segue um padrão universal com as seguintes informações: tipo do vírus, espécie hospedeira de origem (exceto vírus de origem humana), região geográfica de origem, número da amostra, ano de isolamento, subtipo da amostra (entre parênteses); como por exemplo, *A/swine/Brazil/07/2011(H1N1)* (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012).

Os vírus influenza A (IAVs) são pleomórficos, com 80 a 120 nanômetros de diâmetro, possuem capsídeo helicoidal e um envelope lipídico que os torna altamente suscetíveis a solventes e detergentes, além de serem sensíveis a temperaturas elevadas (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). O genoma viral é segmentado, composto por oito segmentos lineares de RNA de fita simples com polaridade negativa: polimerase básica 2 (PB2), polimerase básica 1 (PB1), polimerase ácida (PA), hemaglutinina (HA), nucleoproteína (NP), neuraminidase (NA), matriz (M), e não-estrutural (NS) (GONEAU et al., 2018). Os segmentos gênicos codificam 12 a 13 proteínas, sendo que o segmento PB1 codifica as proteínas PB1, PB1-F2 e PB1-N40, o gene PA codifica as proteínas PA e PA-X, o segmento M codifica as proteínas M1 e M2, o gene NS codifica as proteínas NS1 e NS2/NEP. Os demais segmentos codificam apenas uma proteína cada (VINCENT et al., 2017; ZHANG; GAUGER; HARMON, 2016) (Figura 1). Os genes M e NP codificam proteínas internas e, por conseguinte, são mais conservados. Os genes HA e NA codificam as glicoproteínas de superfície, as quais são alvo do sistema imune do hospedeiro e conseqüentemente, são mais propensos a sofrerem mutações (GAYMARD et al., 2016).

Figura 1. Diagrama do vírus influenza A mostrando o envelope viral e os oito genes virais.



Legenda: HA – gene da hemaglutinina; M1 – gene da matriz 1; M2 – gene da matriz 2; NA – gene da neuraminidase.

Fonte: Adaptado de VINCENT et al., 2008.

As aves silvestres aquáticas são os reservatórios dos IAVs na natureza. Nestes animais já foram identificados dezesseis tipos diferentes de HA (H1–H16) e nove tipos de NA (N1–N9) (GAMBLIN; SKEHEL, 2010; NEUMANN; KAWAOKA, 2015) sendo que a determinação dos subtipos virais tem como base a antigenicidade das glicoproteínas de superfície (HA e NA) (NELSON; VINCENT, 2015; SHORT et al., 2015). Em 2009 e 2010, foram identificados em morcegos na Guatemala e no Peru os vírus H17N10 e H18N11, porém não há registros de que estes novos vírus possam infectar outras espécies animais além dos próprios morcegos (TONG et al., 2012, 2013; WU et al., 2014). Os IAVs infectam uma ampla variedade de espécies, aves (selvagens e domésticas), humanos, suínos, equinos, caninos, felinos e mamíferos marinhos (BROWN, 2000; SHORT et al., 2015). Em suínos, os subtipos considerados endêmicos na maioria dos países produtores de suínos são H1N1, H1N2 e H3N2 (BAUDON et al., 2017; CIACCI-ZANELLA et al., 2015; LEWIS et al., 2016; NELSON et al., 2015a). Embora os subtipos virais detectados em suínos em diferentes continentes sejam os mesmos, estes possuem diferentes origens e também são antigenicamente e geneticamente distintos (KUNTZ-SIMON; MADEC, 2009; VINCENT et al., 2014).

Existem dois mecanismos responsáveis pela grande variabilidade genética dos IAVs: *antigenic drift* e *antigenic shift*. O *antigenic drift* é ocasionado por uma alta frequência de erros induzidos pela enzima RNA polimerase viral durante o processo de replicação do genoma, devido a incapacidade da enzima para correção de erros ou *proofreading*, resultando em mutações pontuais nos diferentes genes (HAMPSON, 2002; ZHANG; GAUGER; HARMON, 2016). Nos genes que codificam a HA e NA, estas mutações ocorrem com maior frequência, sendo constantemente submetidas à pressão de seleção imposta pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (CORREIA; ABECASIS; REBELO-DE-ANDRADE, 2018; DE, 2018; KLEIN et al., 2014). O *antigenic shift* ou *reassortment* ocorre quando dois ou mais vírus infectam uma mesma célula do hospedeiro e trocam segmentos gênicos, podendo surgir um vírus novo distinto dos vírus parentais (LOWEN, 2018; ZHANG; GAUGER; HARMON, 2016). O novo vírus que sofreu rearranjo gênico pode apresentar propriedades antigênicas e patogênicas distintas dos vírus parentais, podendo também ser capaz de infectar outras espécies (GARTEN et al., 2009). Os erros inerentes da polimerase viral e o genoma segmentado dos vírus influenza possibilitam uma rápida evolução dos IAVs, e assim, uma alta variabilidade nas glicoproteínas de superfície, o que contribui para que os vírus não sejam neutralizados pela imunidade prévia do hospedeiro. Os rearranjos gênicos, mutações pontuais e introduções de IAVs oriundos de outras espécies em suínos favorecem o aumento da diversidade dos vírus circulantes, contribuindo para a perpetuação destes vírus na natureza (VINCENT et al., 2017).

Para que ocorra a infecção viral, a proteína HA precisa ligar-se aos receptores de ácido siálico presentes nas células do hospedeiro (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). Existem várias formas quimicamente distintas dos ácidos siálicos, e diferentes vírus influenza apresentam distintos níveis de afinidade a estes. As diferenças de afinidade podem determinar qual a espécie animal pode ser infectada por determinado vírus. Sendo assim, em nível molecular, os ácidos siálicos são ligados ao açúcar galactose por meio de ligações $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$. Os receptores do tipo $\alpha 2,3$ são os preferenciais para ligação de vírus aviários e os receptores $\alpha 2,6$ são os preferenciais para vírus de mamíferos (IMAI; KAWAOKA, 2012). As células epiteliais do trato respiratório de suínos produzem ambos os receptores ($\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$) (ITO et al., 1998; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). Entretanto, os suínos expressam em maior abundância os receptores do tipo humano ($\alpha 2,6$) do que os receptores do tipo aviário ($\alpha 2,3$), e a distribuição destes receptores no epitélio suíno varia conforme a porção do trato respiratório (NELLI et al., 2010; VAN POUCKE et al., 2010). Por esta razão, os suínos podem ser infectados por vírus de origem aviária e humana e, desta forma, servirem como um “vaso de mistura” ou “*mixing vessel*” para a emergência de novos vírus (BROWN, 2000; JANKE, 2014;

NELSON et al., 2014; RAJÃO; VINCENT; PEREZ, 2019). Por conseguinte, no epitélio respiratório do suíno o vírus influenza pode adaptar, replicar e tornar-se infeccioso para outras espécies, e ainda, pode proporcionar rearranjos que permitam a transmissão interespecíficas, devido a mutações gênicas (CRISCI et al., 2013). Ademais, em humanos e aves terrestres, incluindo galinhas, perus e codornas, também são detectados ambos os tipos de receptores nas células epiteliais respiratórias, contribuindo para a replicação e adaptação de diferentes IAVs (IMAI; KAWAOKA, 2012), como o vírus H5N1 de origem aviária que foi transmitido diretamente para humanos (PEIRIS; DE JONG; GUAN, 2007).

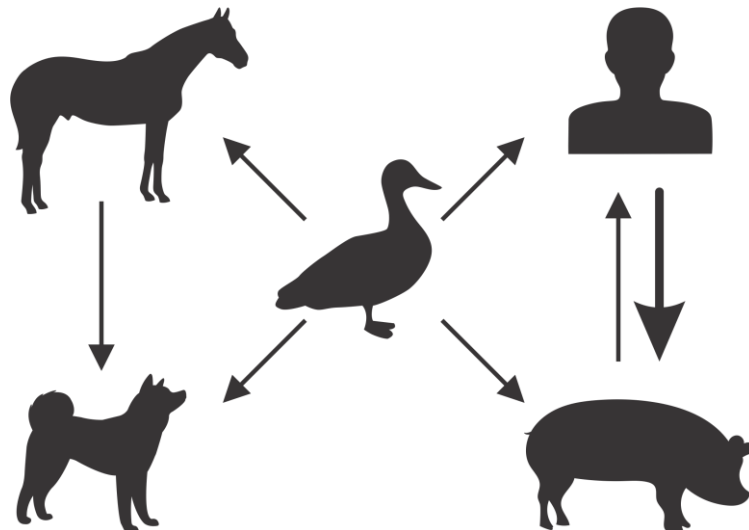
2.2 Epidemiologia

O IAV é responsável por ocasionar pandemias de influenza, como ocorreu em 1918 com um vírus H1N1. Nesta ocasião a infecção de suínos foi concomitante com a pandemia de influenza em humanos, conhecida como gripe espanhola, que resultou na morte de até 50 milhões de pessoas no mundo todo (JOHNSON; MUELLER, 2002; TUMPEY et al., 2005). Posteriormente, em 1957 ocorreu a pandemia asiática com um vírus H2N2, em 1968 a pandemia de Hong Kong com um vírus H3N2, e em 1977 a pandemia russa com um vírus H1N1 (COX; SUBBARAO, 2000; HORIMOTO; KAWAOKA, 2005). A última pandemia de influenza em humanos iniciou no México e Estados Unidos no ano de 2009, e foi causada pelo vírus influenza A/H1N1 de origem suína (H1N1pdm09), que logo se espalhou para outros países (MEDINA; GARCÍA-SASTRE, 2011; SMITH et al., 2009). O H1N1pdm09 surgiu após a ocorrência de rearranjo gênico entre linhagens virais norte-americanas e eurásianas (GARTEN et al., 2009; SMITH et al., 2009). Logo após a emergência do H1N1pdm09 em humanos, o vírus foi rapidamente transmitido para suínos, aumentando os casos de influenza em suínos em todo o mundo, inclusive com a ocorrência de surtos em países que ainda não haviam relatado casos clínicos da doença (VINCENT et al., 2014). No Brasil, o primeiro surto de influenza causado pelo vírus H1N1pdm09 em suínos foi descrito em 2010 (SCHAEFER et al., 2011), mas o vírus já estava presente em suínos desde 2009 (RAJÃO et al., 2013a). Este surto aconteceu em um rebanho localizado em Santa Catarina, onde o IAV acometeu suínos na fase de crescimento e fêmeas adultas. Os animais apresentaram febre, tosse e perda de apetite por um período em torno de dez dias, porém não houve mortalidade (SCHAEFER et al., 2011).

O suíno é considerado um hospedeiro importante na dinâmica e epidemiologia da infecção. Isto ocorre porque esta espécie pode ser infectada por IAVs de diferentes espécies,

como humana e aviária, servindo como um hospedeiro intermediário para eventos de rearranjo gênico e adaptação de vírus, os quais podem ter potencial pandêmico para a população humana (NELSON; VINCENT, 2015; RAJÃO; VINCENT; PEREZ, 2019; SHORT et al., 2015; SIMON et al., 2014). Ademais, estudos de Nelson e Vincent (2015) indicam que os eventos de transmissão do IAV de humanos para suínos são mais frequentes do que o inverso, sendo considerada a maior zoonose reversa de doenças infecciosas com ocorrência global documentada até o momento. A frequência da transmissão do IAV de aves para suínos é bem menor, quando comparada com a transmissão do IAV de humanos para suínos (Figura 2). Estes eventos de transmissão dos IAVs para os suínos contribuem para a diversidade dos vírus que circulam mundialmente na espécie suína (RAJÃO; VINCENT; PEREZ, 2019).

Figura 2. Modelo da ecologia do vírus influenza A.



Legenda: A espessura da seta é proporcional à frequência de transmissão interespecies.

Fonte: Adaptado de NELSON; VINCENT, 2015.

Apesar da ocorrência de eventos de transmissão viral interespecies, os IAVs apresentam uma restrição parcial em relação à gama de hospedeiros que infectam. Na maioria dos casos de transmissão interespecies, os vírus dificilmente são mantidos com sucesso na nova espécie hospedeira, permanecendo preferencialmente em seus hospedeiros originais, o que limita a propagação do vírus em outras espécies (LANDOLT; OLSEN, 2007; WEBSTER et al., 1992). Provavelmente, a capacidade de “quebrar” a barreira interespecies varia entre os subtipos virais, e existem evidências de que os oito segmentos gênicos são importantes na determinação da espécie hospedeira suscetível (LANDOLT; OLSEN, 2007; NEUMANN; KAWAOKA, 2006). Porém, vários estudos mostram que a proteína HA é um dos principais determinantes da

especificidade dos IAVs por ser responsável pela ligação do vírus ao receptor de ácido siálico. Além disto, a existência de variações nos receptores de ácido siálico também podem diferir entre as espécies hospedeiras do IAV (ITO, 2000; MATROSOVICH et al., 2000; NICHOLLS et al., 2008).

O vírus influenza é considerado endêmico nas populações de suínos no Brasil, onde surtos frequentes da doença tem sido observados desde 2009 (CIACCI-ZANELLA et al., 2015; NELSON et al., 2015b; RAJÃO et al., 2013a; RECH et al., 2018; SCHAEFER et al., 2011). A forma epidêmica da doença ocorre quando o IAV é introduzido pela primeira vez na granja, podendo haver acometimento de até 100% dos animais, de diferentes faixas etárias. Uma vez que a doença torna-se estabelecida em um rebanho, a mesma ocorre na forma endêmica, comumente surgindo na fase de creche, quando há diminuição da imunidade passiva (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). Em situações de endemia, a influenza pode acometer suínos durante todo o ano, embora a infecção ocorra com mais frequência nos períodos mais frios do ano (final do outono e inverno). Contudo, as partículas virais podem permanecer suspensas no ar de instalações de produção de suínos por até 20 dias, facilitando a sua disseminação aérea (NEIRA et al., 2016).

2.2.1 Distribuição geográfica do vírus influenza A em suínos

Os IAVs estão distribuídos mundialmente em rebanhos suínos, porém os subtipos e linhagens virais presentes em cada continente tem variação significativa (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). As características genéticas e antigênicas dos IAVs estão relacionadas com as regiões geográficas. Desta forma, os vírus isolados na Europa diferem dos vírus isolados na América do Norte, e estes, por sua vez, diferem dos vírus isolados na Ásia (KUNTZ-SIMON; MADEC, 2009; VINCENT et al., 2014). Isto ocorre devido a introduções virais independentes em suínos e manutenção de linhagens do vírus influenza de origem aviária, humana e suína (BROWN, 2000). Nelson et al. (2015b) relataram que os IAVs detectados em suínos no Brasil são geneticamente distintos dos vírus que circulam em suínos em outros países. Situação similar foi encontrada através da análise genética dos IAVs detectados em suínos em outros países da América Latina, como a Argentina, Chile e Colômbia (BRAVO-VASQUEZ et al., 2017; CAPPUCCIO et al., 2011; NELSON et al., 2015c; PEREDA et al., 2011).

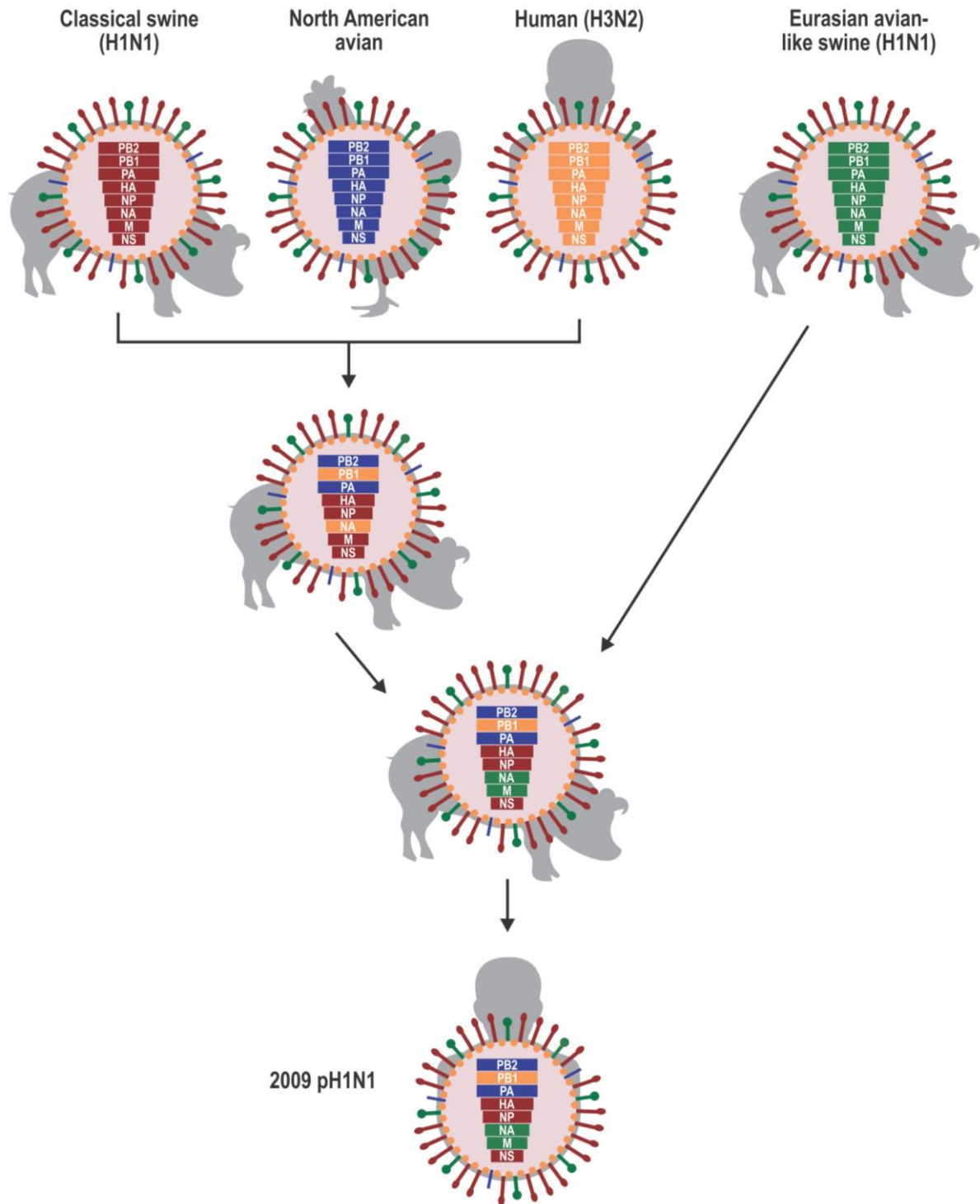
2.2.1.1 Vírus influenza A na América do Norte

O primeiro isolamento do IAV em suínos na América do Norte ocorreu em 1930 (SHOPE, 1931), mas a doença em suínos já era observada durante a ocorrência da pandemia de 1918 em humanos. Posteriormente, confirmou-se que o vírus isolado de suínos era o mesmo que circulava em humanos em 1918 (SHOPE; FRANCIS, 1936). O vírus H1N1 originário do vírus de 1918 tornou-se endêmico em suínos, permanecendo relativamente estável até o final dos anos 90 (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; VINCENT et al., 2014). Subsequentemente, o vírus H1N1 foi referido como vírus H1N1 da linhagem clássica (H1- α). Em 1998, foi introduzido em suínos um vírus do subtipo H3N2 contendo segmentos gênicos do vírus H1N1 clássico de suínos (M, NP e NS), do vírus H3N2 humano sazonal (PB1, HA e NA), e do vírus de origem aviária (PB2 e PA) (KARASIN et al., 2000; ZHOU et al., 1999). A partir de então, como resultado do estabelecimento deste vírus em suínos, a epidemiologia do IAV em suínos mudou completamente (OLSEN et al., 2006; RICHT et al., 2003; WEBBY et al., 2000). A partir da ocorrência de eventos de rearranjo entre este vírus triplo recombinante e o vírus H1N1 clássico que já circulava em suínos, surgiram novos clados genéticos dos subtipos H1N1 e H1N2 (CHOI et al., 2002; KARASIN et al., 2002; KARASIN; OLSEN; ANDERSON, 2000; WEBBY et al., 2004). Um novo padrão foi estabelecido na geração de novos vírus, com manutenção dos genes internos (conhecido como *triple-reassortant internal gene* (TRIG) *cassete*) e modificação dos segmentos HA e NA (VINCENT et al., 2008).

A partir de 2005 foram introduzidos em suínos vírus H1N1 e H1N2 contendo os segmentos HA e/ou NA originários de vírus da influenza humana sazonal, os quais ficaram conhecidos como a linhagem delta (H1- δ) (VINCENT et al., 2009). Estudos apontam que houveram pelo menos duas introduções independentes de HAs da linhagem humana sazonal circulante no início dos anos 2000, que é distinta do H1 clássico, sendo os vírus diferenciados filogeneticamente em dois sub-clados, delta 1 (H1- δ 1) e delta 2 (H1- δ 2) (LORUSSO et al., 2011). Em 2009, o vírus H1N1pdm09 emergiu em humanos, sendo posteriormente reintroduzido em suínos no mundo todo. O vírus H1N1pdm09 contém os genes PB2 e PA de origem aviária norte-americana, gene PB1 do vírus H3N2 humano, genes HA, NP e NS do vírus H1N1 suíno clássico, e os genes NA e M de origem aviária da Eurásia (SMITH et al., 2009) (Figura 3). Logo após a emergência do vírus H1N1pdm09 em suínos, este sofreu rearranjo gênico com outros vírus influenza que já circulavam em suínos aumentando a diversidade genética dos vírus encontrados em suínos (DUCATEZ et al., 2011; KITIKOON et al., 2012). Em 2010, um novo IAV com segmento H3 foi transmitido de humanos para suínos, resultando

no estabelecimento de uma nova linhagem viral em suínos, H3 *human-like* (RAJÃO et al., 2015).

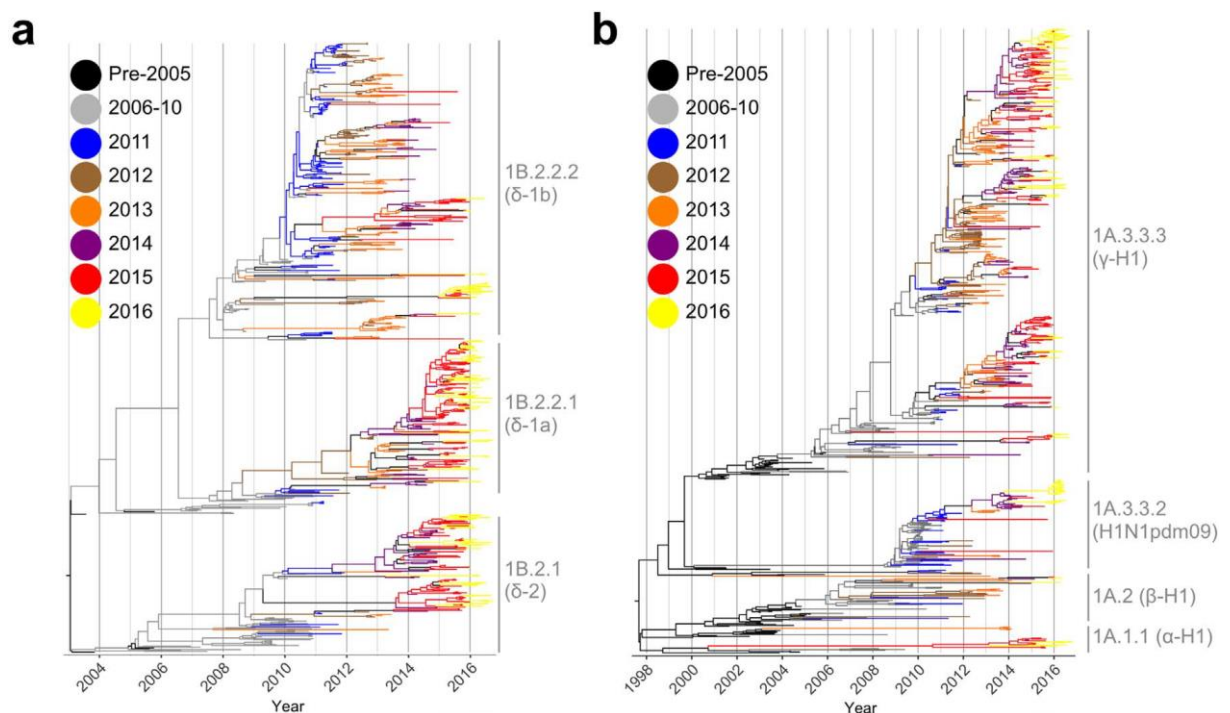
Figura 3. Origem do vírus influenza H1N1 pandêmico de 2009.



Fonte: Adaptado de VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012.

Devido aos processos de *antigenic drift* e *shift*, e subsequente diversidade genética e antigênica dos vírus norte-americanos circulantes em suínos, o segmento HA foi dividido em diferentes clados genéticos: cinco clados da linhagem H1 suína clássica (H1- α , H1- β , H1- γ 1, H1- γ 2, e H1N1pdm09) (Figura 4.b), dois clados da linhagem delta (H1- δ 1 e H1- δ 2) (Figura 4.a), seis clados da linhagem H3 da década de 1990 (IV-A, IV-B, IV-C, IV-D, IV-E e IV-F), e um clado da linhagem H3 do ano de 2010 (H3 *human-like*) (WALIA; ANDERSON; VINCENT, 2018).

Figura 4. Filogenia do gene H1 dos vírus influenza norte-americanos circulantes em suínos.



Fonte: RAJÃO et al., 2018.

2.2.1.2 Vírus influenza A na Europa

Na Europa, o vírus H1N1 α circulou em suínos até 1979 quando foi substituído por um vírus de origem aviária (H1N1 *avian-like*), o qual se tornou endêmico em rebanhos suínos (BROWN, 2013; VINCENT et al., 2014). Já os vírus H3N2 europeus tem como origem o vírus causador da pandemia em humanos ocorrida em Hong Kong em 1968, sendo divergente dos IAVs H3N2 contemporâneos norte-americanos (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; VINCENT et al., 2014). Ainda, os IAVs detectados em suínos na Europa evoluíram através de *reassortment* com o H1N1 *avian-like*, dando origem a vírus H3N2 contendo as glicoproteínas

HA e NA derivadas do vírus H3N2 *human-like*, e os genes internos derivados do H1N1 *avian-like* (CAMPITELLI et al., 1997; CASTRUCCI et al., 1993; DE JONG et al., 1999).

Na década de 1990, o vírus H1N2 estabeleceu-se em rebanhos suínos na Europa. Este vírus manteve o genótipo do IAV H3N2, porém adquiriu o segmento H1 de vírus da linhagem humana da década de 1980 (MAROZIN et al., 2002; SCHRADER; SÜSS, 2003). Atualmente, os IAVs H1N1 *avian-like*, H1N2 *human-like* e H3N2 *human-like* continuam circulando nas populações de suínos da Europa (KYRIAKIS et al., 2011; SIMON et al., 2014), juntamente com o H1N1pdm09, possibilitando a ocorrência de rearranjo gênico entre os diferentes vírus (VINCENT et al., 2014; ZHANG; GAUGER; HARMON, 2016).

2.2.1.3 Vírus influenza A na Ásia

Na Ásia, os IAVs encontrados em suínos tem como origem vírus que circulam na Europa e na América do Norte. A introdução em suínos da linhagem H1N1 α , bem como várias introduções de vírus de origem aviária e humana, resultaram em linhagens virais geneticamente distintas que cocirculam em populações de suínos asiáticos (VINCENT; LAGER; ANDERSON, 2014). Desde a década de 1970, vírus H3N2 têm sido transmitidos de humanos para suínos frequentemente neste continente. Além disto, há cocirculação de variantes originárias do vírus da pandemia de Hong Kong/1968 e de vírus H3N2 humano contemporâneos (NEROME et al., 1995; PEIRIS et al., 2001; YU et al., 2007, 2008).

Atualmente, são detectados em rebanhos suínos asiáticos IAVs das linhagens H1N1 α , H1N1 *avian-like* europeu, H1N2 norte-americano, e recombinantes do H3N2 que se assemelham às linhagens europeias ou norte-americanas (GUAN et al., 1996; QI; PANG; LU, 2009; TAKEMAE et al., 2008; YU et al., 2008, 2009). Contudo, outros vírus emergiram localmente, aumentando a diversidade genética dos vírus circulantes na Ásia, resultando na detecção de novos IAVs (LU et al., 2010; SONG et al., 2016; SUN et al., 2009; XU et al., 2011). Como ocorrido em vários continentes, o vírus H1N1pdm09 foi introduzido em suínos asiáticos, e sofreu rearranjo com IAVs endêmicos em suínos (KITIKOON et al., 2011; MATSUU et al., 2012; VIJAYKRISHNA et al., 2010).

2.2.1.4 Vírus influenza A na África

A África apresenta uma população de suínos relativamente pequena, quando comparada com outros continentes. Ainda, a densidade populacional é dispersa, contribuindo para a incidência relativamente baixa de influenza relatada em suínos na África (VINCENT et al., 2014). Em 2008, na Nigéria foi detectada uma alta soroprevalência de vírus H1N1 e H3N2 de origem humana em suínos (ADEOLA; ADENIJI, 2010; ADEOLA; ADENIJI; OLUGASA, 2010), sendo os vírus também isolados (ADEOLA; ADENIJI; OLUGASA, 2009). No entanto, observou-se uma baixa soroprevalência de IAVs em suínos na Costa do Marfim, Benin e Togo no período entre 2008 e 2010 (COUACY-HYMANN et al., 2012). Em Camarões, no ano de 2010, foi relatada a presença de IAV em suínos, sendo isolado o H1N1pdm09 (NJABO et al., 2012). Entre 2009 e 2012, Snoeck et al. (2015) observaram em suínos da Nigéria e Camarões altos títulos de anticorpos contra o vírus H1N1pdm09. Em Togo, o vírus H1N1pdm09 foi isolado de suínos em 2013 (DUCATEZ; AWOUME; WEBBY, 2015). Em 2014, na Nigéria e Gana, foi detectado em suínos o vírus H3N2 (ADEOLA; OLUGASA; EMIKPE, 2016) e H1N1pdm09 (ADEOLA; OLUGASA; EMIKPE, 2015). Ainda, em Moçambique, Laisse et al. (2018) registraram infecção pelo IAV em suínos, quando analisadas amostras de pulmões colhidas durante o abate no período de 2014 a 2016.

2.2.1.5 Vírus influenza A na América do Sul

Existem poucos registros disponíveis sobre a circulação do IAV em rebanhos suínos de alguns países da América do Sul. Entretanto, os relatos de infecção de suínos pelo IAV aumentaram a partir de 2009, coincidindo com a pandemia de influenza em humanos iniciada neste ano (VINCENT et al., 2014). Na Colômbia, no ano de 2008 foram isolados vírus H1N1 α , e nos anos de 2009 e 2010 foi isolado o vírus H1N1pdm09 (JIMÉNEZ et al., 2014; RAMIREZ-NIETO et al., 2012). No Chile, em 2012 foram identificados o vírus H1N1pdm09, juntamente com os vírus influenza de origem humana H1N1, H1N2 e H3N2 (NELSON et al., 2015c). Em 2014, foi isolado de suínos no Chile um vírus H1N2 contendo os segmentos internos do vírus H1N1pdm09 e os genes HA e NA de um vírus que circulou em humanos na década de 1990 (BRAVO-VASQUEZ et al., 2016, 2017). No Peru, no período entre 2009 e 2011 foi detectado o vírus H1N1pdm09 em suínos de criação extensiva/subsistência (TINOCO et al., 2016).

Na Argentina, em 2008, foi isolado de suínos um vírus H3N2 que apresentava uma alta similaridade com vírus H3N2 que circulou em humanos entre os anos 2000 e 2003. Estudos realizados mostraram que o vírus era bem adaptado a suínos e que poderia tornar-se endêmico em rebanhos suínos no país (CAPPUCCIO et al., 2011). Os IAVs presentes em suínos na Argentina surgiram como consequência de eventos independentes de transmissão viral de humanos para suínos, sendo distintos dos IAVs circulantes na América do Norte. O vírus H1N1pdm09 foi isolado de suínos em 2009 por Pereda et al. (2010). Entre 2009 e 2010 foi reportada a ocorrência de dois IAVs com genomas compostos por segmentos internos do vírus H1N1pdm09, pelo gene HA do vírus H1 *human-like* da linhagem $\delta 2$ norte-americana e gene NA similar ao N1 *human-like* e ao N2 *human-like* (PEREDA et al., 2011). Além disto, um vírus do subtipo H3N2 foi isolado de suínos em 2011, o qual contém os genes internos derivados do vírus H1N1pdm09 e os genes HA e NA do vírus H3N2 detectado em 2008 (VINCENT et al., 2014).

No Brasil, o primeiro isolamento do vírus influenza de suínos ocorreu em 1974, e este vírus era relacionado com a linhagem H1N1 clássica norte-americana (CUNHA; VINHA; PASSOS, 1978). Após esta primeira detecção, os trabalhos subsequentes realizados identificaram a presença de anticorpos contra os vírus influenza em suínos. Brentano et al. (2002) relataram a presença de anticorpos contra os subtipos H1N1 clássico e H3N2 em amostras de soros colhidas em rebanhos suínos no período de 1996 a 1999 em nove estados brasileiros. Mancini et al. (2006) também detectaram a presença de anticorpos contra os subtipos H1N1 clássico e H3N2 em suínos do estado de São Paulo. Caron et al. (2010) analisaram soros de suínos do estado do Paraná e observaram a presença de anticorpos contra o subtipo H3N2. No início do ano de 2009, anteriormente à ocorrência da pandemia em humanos, foi identificada a presença de anticorpos contra os subtipos H1N1 suíno clássico, H1N1 *human-like* e H3N2 *triple-reassortant* norte-americano em amostras de soros de suínos do estado de Minas Gerais (RAJÃO et al., 2013b). Posteriormente, mas ainda em 2009, foram relatados em vários estados brasileiros surtos de infecção respiratória aguda em suínos nas quais foi identificado o vírus H1N1pdm09 em amostras de secreção nasal e tecido pulmonar colhidas de suínos (RAJÃO et al., 2013a; SCHAEFER et al., 2011). A análise de soros suínos colhidos entre 2006 e 2010, por meio do teste de inibição da hemaglutinação (HI), mostrou que anticorpos contra o vírus H1N1pdm09 não estavam presentes em suínos antes de 2009 (ZANELLA et al., 2011). Em 2011, Ciacchi-Zanella et al. (2015) avaliaram amostras de soro e secreção nasal de suínos de 48 granjas comerciais localizadas em sete estados brasileiros, e

detectaram a presença de anticorpos contra os vírus H1N1pdm09, H1N2 e H3N2 em 24 granjas, bem como detectaram a presença de anticorpos contra mais de um subtipo viral em sete granjas.

Como observado em outros países, após a introdução do vírus H1N1pdm09 em suínos houve um aumento da diversidade genética dos IAVs detectados no Brasil. A partir deste ano, foram isolados pela primeira vez vírus dos subtipos H1N2 (SCHAEFER et al., 2015) e H3N2 (CIACCI-ZANELLA et al., 2015), contendo os segmentos internos do vírus H1N1pdm09 e os genes HA e NA derivados de vírus da influenza humana sazonal que circulou em humanos durante o início dos anos 2000 e final da década de 90, respectivamente (NELSON et al., 2015b). Em Minas Gerais, foram identificados em suínos anticorpos para os vírus H1N1pdm09 e H3N2 (DIAS et al., 2015). Em rebanhos suínos localizados no estado do Rio Grande do Sul foram detectados os vírus H1N1pdm09 e H1N2 (SCHMIDT et al., 2016). Estudos posteriores realizados por Rech et al. (2018), na análise de amostras de pulmão de suínos colhidas entre os anos de 2009 e 2015, e recebidas para diagnóstico laboratorial, mostraram que o vírus H1N1pdm09 foi o mais detectado, seguido pelos subtipos H1N2 e H3N2. O IAV também tem sido detectado em populações de javalis criados em cativeiro, onde um vírus do subtipo H1N2, bastante similar ao encontrado em suínos de granjas comerciais, foi identificado (BIONDO et al., 2014).

2.3 Patogenia, sinais clínicos e lesões histológicas

O IAV é um dos principais patógenos causadores de doença respiratória aguda em suínos (VINCENT; LAGER; ANDERSON, 2014). A infecção é caracterizada por apresentar alta morbidade (até 100%) e baixa mortalidade (geralmente menos de 1%) (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; VINCENT; LAGER; ANDERSON, 2014). A elevada morbidade nos rebanhos afetados pode ocasionar a perda de produtividade devido à redução na ingestão de ração, e conseqüentemente, redução do ganho de peso (SCHMIDT et al., 2016). Além disto, as infecções bacterianas secundárias intercorrentes fazem com que haja aumento de custos com o uso de antimicrobianos. Assim, a doença em suínos ocasiona uma perda econômica significativa na suinocultura do mundo inteiro (RAJÃO et al., 2014).

A principal via de transmissão viral é através do contato direto entre os suínos, por meio das secreções nasofaríngeas de animais infectados pelo vírus. A transmissão do vírus por aerossóis eliminados durante a tosse e espirros, bem como por meio de fômites e pela introdução de animais infectados pelo vírus no rebanho também são relatados (ROMAGOSA et al., 2011;

TORREMORELL et al., 2012). A infecção viral é limitada as células epiteliais do trato respiratório superior e inferior, podendo haver replicação viral na mucosa nasal, tonsilas, traqueia, linfonodos traqueobronquiais e pulmões, e raramente é detectada viremia (RAJÃO et al., 2014; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). A excreção do vírus ocorre durante a fase aguda da doença (cinco a sete dias pós-infecção), quando ocorre eliminação de altas concentrações de vírus nas secreções respiratórias dos suínos (JANKE, 2013). Na forma epidêmica, a doença aparece de forma abrupta, acometendo todo ou grande parte do rebanho após um período de incubação de um a três dias, com os sinais clínicos regredindo de forma rápida entre cinco e sete dias pós-infecção, desde que não ocorram infecções bacterianas secundárias (RAJÃO et al., 2014; VINCENT; LAGER; ANDERSON, 2014).

Os sinais clínicos frequentemente observados em suínos infectados pelo IAV são semelhantes aos observados em humanos, como hipertermia, prostração, anorexia, dispneia, taquipneia, hesitação em movimentar-se e tosse (LANGE et al., 2009; VINCENT et al., 2010; VINCENT; LAGER; ANDERSON, 2014). Também podem ocorrer infecções subclínicas, caracterizadas pela ausência de doença respiratória significativa. Geralmente infecções restritas ao trato respiratório superior resultam em infecção subclínica ou com sinais clínicos brandos, quando comparado com infecções do trato respiratório inferior (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012).

Os sinais clínicos observados para os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 são semelhantes, não sendo observados em estudos experimentais diferenças na patogenicidade ou virulência entre os subtipos (LANDOLT et al., 2003; RICHT et al., 2003; SRETA et al., 2009; VINCENT et al., 2006, 2009). Entretanto, fatores como idade do animal, condição imunológica, pressão de infecção, condições climáticas, manejo e infecções concomitantes também determinam a gravidade da doença (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). Usualmente, o IAV é encontrado associado a outros patógenos, e infecções secundárias causadas pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* tipo 2, circovírus suíno tipo 2, vírus da síndrome reprodutiva e respiratória do suíno e coronavírus respiratório suíno podem aumentar a severidade da infecção juntamente com o IAV (BROCKMEIER; HALBUR; THACKER, 2002; JUNG; HA; CHAE, 2005; THACKER; THACKER; JANKE, 2001).

Comumente, as lesões macroscópicas encontradas em pulmões de suínos infectados pelo IAV são lesões bem demarcadas de consolidação pulmonar, caracterizadas por coloração vermelho-púrpura nos lobos cranioventrais. A porcentagem do tecido pulmonar com consolidação varia, podendo o pulmão ser afetado em mais de 50%. Também em vários casos

de infecção aguda severa pode-se observar congestão das mucosas, vias aéreas preenchidas por exsudato fibrinoso, edema pulmonar, bem como linfonodos brônquicos e mediastínicos aumentados (GAUGER et al., 2012; JANKE, 2014; KHATRI et al., 2010; LÓPEZ, 2007; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). As lesões ocasionadas pelo IAV podem ser observadas até duas semanas após a infecção, desaparecendo após três semanas (JANKE, 2000). Devido às infecções intercorrentes, especialmente bacterianas, as lesões podem ser aumentadas ou até mesmo ocultadas (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). Microscopicamente, as lesões consistem de bronquite e bronquiolite necrosante, infiltrado linfocítico peribronquiolar leve, pneumonia broncointersticial, necrose multifocal e acúmulo de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e células epiteliais descamadas no lúmen, podendo levar a bronquiolite obliterante (GAUGER et al., 2012; KHATRI et al., 2010; LÓPEZ, 2007; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; VINCENT et al., 2010; WATANABE et al., 2012).

2.4 Imunidade

Geralmente, o sistema imune responde rapidamente a infecções pelo IAV, com a eliminação do vírus do trato respiratório em até uma semana após à infecção. Os anticorpos produzidos contra o IAV podem ser detectados a partir de sete a dez dias pós-infecção, havendo um pico em torno de duas a três semanas, mantendo títulos elevados durante várias semanas e iniciando o declínio cerca de oito a dez semanas pós-infecção (LARSEN et al., 2000; VAN REETH; LABARQUE; PENSAERT, 2006). Os anticorpos maternos para o IAV protegem os leitões no período inicial de vida contra vírus antígenicamente relacionados, porém os mesmos também interferem no desenvolvimento da resposta imune ativa à vacinação ou infecção (KITIKOON et al., 2006). Em suínos recém-nascidos, os níveis de anticorpos maternos são dependentes da concentração inicial de anticorpos da fêmea, e declinam no soro de leitões até a sexta semana de vida em rebanhos não vacinados (JANKE, 2000). A imunidade passiva adquirida através do colostro pode reduzir a doença clínica nos leitões, mas não impede a infecção e a excreção viral. Além disto, a imunidade adquirida é contra vírus homólogo (ALLERSON et al., 2013).

2.5 Diagnóstico

Diferentes métodos de diagnóstico de influenza em suínos têm sido utilizados pelos laboratórios. Entretanto, nos últimos anos o diagnóstico tornou-se mais complexo devido a grande diversidade genética e rápida evolução dos IAVs cocirculantes em suínos (DETMER et al., 2013). O sucesso da detecção do IAV em suínos depende de alguns fatores, como escolha do animal para a amostragem, a correta colheita das amostras, armazenamento adequado e envio rápido ao laboratório de diagnóstico de escolha (SCHAEFER et al., 2013). Os métodos de diagnóstico podem ser aplicados para a detecção do agente, antígeno ou ácido nucleico viral; ou para identificação de anticorpos específicos contra o vírus, ou seja, detectam a resposta do hospedeiro à infecção (DETMER et al., 2013). Para a detecção de IAV pode-se colher tecido pulmonar, traqueia, secreção nasal, e ainda, fluido oral, obtidos preferencialmente de suínos durante a fase aguda da infecção. As amostras para o diagnóstico virológico devem ser armazenadas a 4°C até o envio ao laboratório e posteriormente mantidas a -80°C; e as amostras para o diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico devem ser acondicionadas em formalina tamponada a 10% e mantidas em temperatura ambiente (23°C). Para a detecção de anticorpos são utilizadas amostras de soro, que devem ser armazenadas a 4°C até o envio ao laboratório e posteriormente mantidas a -20°C (CULHANE; DETMER, 2014).

Para a detecção de anticorpos em soros de suínos podem ser utilizados os ensaios de inibição da hemaglutinação (HI) (KITIKOON; GAUGER; VINCENT, 2014), soroneutralização (SN) (GAUGER; VINCENT, 2014; KITIKOON; VINCENT, 2014) e ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (CIACCI-ZANELLA et al., 2010; GAUGER; LOVING; VINCENT, 2014). Os métodos sorológicos utilizados para a detecção de anticorpos contra o IAV indicam contato prévio com o agente, mas não indicam infecção. Além disto, a implementação da vacinação contra o IAV em muitos rebanhos dificulta a interpretação dos resultados sorológicos, uma vez que os mesmos não diferenciam anticorpos induzidos pela vacinação dos anticorpos produzidos após infecção natural (GAUGER; LOVING; VINCENT, 2014; JANKE, 2014).

A análise histopatológica é realizada para a identificação de lesões microscópicas características de infecção pelo IAV nos pulmões de suínos afetados, porém não são confirmatórias. Assim, os tecidos fixados devem ser analisados pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para detecção do antígeno viral associado às lesões histológicas observadas, com a utilização de anticorpos específicos marcados com corantes ou enzimas (PANTIN-JACKWOOD, 2014).

Comumente, a detecção do antígeno é realizada a partir do isolamento viral em ovos embrionados de galinhas SPF (*Specific Pathogen Free*) e/ou em cultivo celular, principalmente com o uso da linhagem de células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), seguido do teste de hemaglutinação (HA). Para confirmar o isolamento viral é realizado o teste de imunocitoquímica (ICQ), imunofluorescência (FA) direta ou RT-PCR/RT-qPCR (ZHANG; GAUGER, 2014). O isolamento viral é considerado o método “padrão-ouro” no diagnóstico de influenza, e a partir da sua propagação é possível realizar estudos de caracterização genética e antigênica, patogenia e produção de antígenos vacinais. Embora o isolamento viral seja tradicionalmente utilizado no diagnóstico, esta técnica é bastante laboriosa (resultado obtido em uma ou duas semanas) e apresenta limitações, uma vez que depende da viabilidade viral (JANKE, 2000). Isto pode comprometer o diagnóstico da doença, levando a detecção de amostras falso-negativas, se o mesmo for baseado apenas no isolamento viral (RICHT et al., 2004).

No diagnóstico virológico também são utilizadas técnicas moleculares que detectam o RNA viral, como RT-PCR e RT-qPCR. Comparadas a outros métodos, as técnicas moleculares são menos afetadas pela qualidade da amostra, e são mais sensíveis e específicas, permitindo a detecção de ácido nucleico viral mesmo em amostras com baixa carga viral (GUNSON; COLLINS; CARMAN, 2006). Também são testes mais rápidos, usados para diagnosticar um grande número de amostras (tanto isolados virais como amostras clínicas) em um curto período de tempo (DETMER et al., 2013; ZHANG; GAUGER; HARMON, 2016). Além disto, o uso de RT-qPCR possibilita a quantificação da carga viral presente nas amostras biológicas. Os ensaios de RT-PCR e RT-qPCR são amplamente utilizados pelos laboratórios de diagnóstico para detecção do gene M do IAV, devido ao alto nível de conservação deste gene. No entanto, os ensaios baseados no gene M identificam apenas o tipo viral e não o subtipo, a não ser que sejam utilizados iniciadores específicos para detecção de outros segmentos gênicos (DETMER et al., 2013; ZHANG; GAUGER; HARMON, 2016; ZHANG; HARMON, 2014). O uso de RT-PCR e RT-qPCR para subtipagem do IAV, com pares de iniciadores e sondas específicas para os genes HA e NA permite a distinção dos subtipos do IAV circulantes em suínos, além de possibilitar a detecção de infecções mistas em um único animal (DETMER et al., 2013; RICHT et al., 2004). Contudo, a alta taxa de mutação observada nos segmentos HA e NA (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012) evidencia a necessidade de uma atualização periódica dos pares de iniciadores e sondas empregadas nas técnicas de RT-PCR e RT-qPCR, a fim de detectar novos vírus emergentes (DETMER et al., 2013; ZHANG; HARMON, 2014). Devido as diferenças genéticas observadas em vírus que circulam em diferentes regiões geográficas, a

OIE/FAO *Network of expertise on animal influenza* (OFFLU) definiu como uma das prioridades na pesquisa do vírus da influenza em suínos o desenvolvimento de técnicas moleculares com pares de iniciadores específicos para os principais subtipos virais circulantes em determinada região geográfica (OFFLU STEERING COMMITTEE, 2011, 2014).

Uma alternativa tradicionalmente utilizada para determinar o subtipo do IAV em isolados virais é a associação dos testes de HI e inibição da neuraminidase (NI), porém, ambas as técnicas são laboriosas e requerem um amplo painel de antígenos e antissoros de referência padronizados para todos os genes HA e NA antigenicamente distintos circulantes em suínos (PEDERSEN, 2014a, 2014b). Uma outra alternativa para a identificação do subtipo viral é a realização do sequenciamento genômico, porém esta técnica apresenta um alto custo, é mais laboriosa e nem sempre é disponibilizada em laboratórios de diagnóstico (CHAN et al., 2006; HOFFMANN et al., 2001). Desta forma, RT-PCR e RT-qPCR apresentam vantagens para a rápida determinação do subtipo viral, sendo ensaios menos laboriosos e com menor custo quando comparados ao sequenciamento genômico.

2.6 Medidas de prevenção e controle

Entre as principais medidas de controle recomendadas para a prevenção da introdução do IAV em rebanhos suínos, destacam-se: a manutenção dos procedimentos sanitários básicos de biossegurança de rebanhos, como por exemplo, manter os animais em local limpo e seco, observar as boas práticas de produção, como boa higiene, ventilação das instalações, limpeza e desinfecção das instalações entre lotes e implementação de vazio sanitário, monitorar os animais novos que entram no rebanho, evitar transportar os suínos durante a fase aguda da infecção, evitar o contato dos suínos com outras espécies animais e vacinar anualmente contra o vírus influenza todas as pessoas que entram em contato com os suínos. Caso o vírus seja introduzido no rebanho, e na ocorrência de doença clínica mais severa, pode ser indicado o uso de antitérmicos, expectorantes e antimicrobianos para combater infecções bacterianas secundárias (SCHAEFER et al., 2013; TORREMORELL et al., 2009, 2012; WHITE; TORREMORELL; CRAFT, 2017).

Quando os suínos apresentam sinais clínicos respiratórios característicos do IAV é necessário realizar o diagnóstico para confirmação da presença do agente viral. Em casos de infecção pelo vírus torna-se importante identificar qual o subtipo circulante no rebanho (JANKE, 2014). O diagnóstico rápido do IAV em suínos possibilita aos responsáveis pela

sanidade dos rebanhos monitorar a doença e implementar medidas eficientes de manejo e controle da infecção (WHITE; TORREMORELL; CRAFT, 2017). Além disto, a utilização de um método rápido para identificação do subtipo do IAV em suínos também é importante para obter informações sobre a prevalência dos subtipos circulantes nos rebanhos e para a monitoria de programas vacinais (RICHT et al., 2004). Ademais, a troca de informações entre a agroindústria e os órgãos de saúde pública é fundamental para a realização da vigilância epidemiológica mais completa em suínos (VINCENT et al., 2014).

A utilização da vacina para o IAV tem sido uma das medidas profiláticas adotadas em rebanhos suínos em vários países. As vacinas mais utilizadas contra o IAV são as inativadas e as autógenas. As vacinas contendo vírus inativado conferem proteção contra vírus homólogo, porém quando os suínos são desafiados com vírus heterólogo (com composição antigênica distinta do vírus vacinal), a proteção induzida pela vacina não é suficiente para neutralizar o vírus heterólogo, e pode haver intensificação dos sinais clínicos da doença, induzindo o fenômeno conhecido como doença respiratória exacerbada associada à vacinação (VAERD; *vaccine-associated enhanced respiratory disease*) (GAUGER et al., 2011; RAJÃO et al., 2014), que é caracterizada por pneumonia broncointersticial severa com bronquiolite necrótica e hiperplasia (GAUGER et al., 2011, 2012). As vacinas contendo vírus atenuado são uma alternativa ao uso de vacinas de vírus inativado, apresentando uma imunidade cruzada mais ampla (SANDBULTE et al., 2014; VINCENT et al., 2012). Todavia, a presença de anticorpos maternos no momento da vacinação pode interferir negativamente na eficácia da vacina (KITIKOON et al., 2006). Além disto, o sucesso da vacinação para o IAV também pode ser prejudicado pela rápida evolução viral e aumento da diversidade do vírus, trazendo desafios para o desenvolvimento de vacinas que induzam proteção cruzada para todas as variantes virais circulantes (RAJÃO et al., 2014).

A vacinação para o IAV é rotineiramente realizada pelos produtores de suínos na América do Norte e Europa (MA; RICHT, 2010; RAJÃO et al., 2013c). Entretanto, a vacinação não é uma prática de rotina nas granjas brasileiras. Desde junho de 2014 existe uma vacina comercial para o IAV disponível no Brasil, produzida a partir de uma amostra do vírus influenza H1N1pdm09. Desde 2017, vacinas autógenas, produzidas a partir de isolados virais do próprio rebanho têm sido utilizadas no Brasil, na qual o vírus é isolado, inativado e acrescido de adjuvante. As vacinas autógenas são personalizadas para cada granja, usando os seus isolados recentes em um processo mais ágil de produção e fornecendo proteção contra vírus homólogo (MAPA, 2018).

Em suínos, a circulação de vírus influenza dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2, geneticamente distintos, representam novos desafios para o desenvolvimento de vacinas eficazes que induzam proteção cruzada contra os diferentes subtipos virais, reforçando a necessidade da constante vigilância dos vírus que circulam em suínos (NELSON et al., 2015b; RAJÃO; PÉREZ, 2018). Somado a isto, o monitoramento de surtos de infecção respiratória aguda em suínos, associado com a caracterização genética e antigênica do IAV são necessários para o acompanhamento da evolução do vírus nos rebanhos, auxiliando no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e de vacinas eficazes (RAJÃO et al., 2013c; VINCENT et al., 2014). A grande diversidade genética encontrada em suínos, circulação de novas variantes, além da possibilidade da introdução de vírus suínos em humanos, demonstram a importância do monitoramento e da vigilância da circulação viral em rebanhos suínos, tanto para a saúde humana como para a saúde animal, especialmente em países com alta produção de suínos como o Brasil (SCHMIDT et al., 2016).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais e métodos, resultados e discussão que compõem esta dissertação são apresentados a seguir na forma de artigo científico. Este artigo científico foi publicado no periódico *Journal of Virological Methods*, 269 (2019) 43–48 (DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.04.005) e é intitulado “*One-step multiplex RT-qPCR for the detection and subtyping of influenza A virus in swine in Brazil*”.

One-step multiplex RT-qPCR for the detection and subtyping of influenza A virus in swine in Brazil

Vanessa Haach^a, Danielle Gava^b, Maurício Egídio Cantão^b, Ana Cláudia Franco^a, Rejane Schaefer^{b,*}

^a Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Embrapa Suínos e Aves, BR-153, Km 110, Distrito de Tamanduá, Concórdia, CEP 89715-899, Santa Catarina, Brazil

* Corresponding author: Rejane Schaefer

Embrapa Suínos e Aves, BR-153, Km 110, Distrito de Tamanduá, Concórdia, CEP 89715-899, Santa Catarina, Brazil

E-mail address: rejane.schaefer@embrapa.br

Highlights

- A multiplex RT-qPCR with TaqMan probes was developed for IAV subtyping.
- LODs ranged from 5.09×10^1 to 5.09×10^3 copies/ μ L.
- The IAV subtype was determined in 74.0% (62.9-82.7, CI 95%) of the clinical samples.
- The most frequently detected subtype was H3N2, followed by H1N1 and H1N2.
- Different IAV lineages, mixed infections and reassortant viruses were detected.

Abstract

Pandemic H1N1, human-like H1N2 and H3N2 influenza A (IAV) viruses are co-circulating in swine herds in Brazil. The genetic analysis of the Brazilian IAVs has shown that they are genetically distinct from viruses found in swine in other countries; therefore, an update of the diagnostic assays for IAV detection and subtyping is needed. This study describes the development and validation of a TaqMan based – one-step multiplex RT-qPCR to discriminate the hemagglutinin and neuraminidase genes of the three major IAV subtypes circulating in pigs in Brazil. The RT-qPCR assays presented 100% (95.7–100, CI 95%) of diagnostic sensitivity

in the analysis of 85 IAVs, previously characterized by sequencing. The limits of detection ranged from 5.09×10^1 to 5.09×10^3 viral RNA copies/ μL . For the analytical specificity, 73 pig samples collected during 2017 and 2018 were analyzed, resulting in the identification of the subtype in 74.0% (62.9–82.7, CI 95%) of samples. From these, 46.3% were H3N2, 33.3% were H1N1, 11.1% were H1N2 and 3.7% were HxN1. Mixed viral infections (3.7%) and reassortant viruses (1.9%) were also detected by the test. This multiplex RT-qPCR assay provides a fast and specific diagnostic tool for identification of different subtypes and lineages of IAV in pigs, contributing to the monitoring of influenza in swine.

Keywords: Influenza A virus, Swine, Subtyping, Multiplex RT-qPCR, Rapid diagnosis.

3.1 Introduction

Influenza A virus (IAV) causes an acute respiratory disease in swine, leading to significant economic losses for swine producers worldwide (Zhang et al., 2016). IAV belongs to the *Orthomyxoviridae* family and is characterized by a segmented genome consisting of eight single-stranded RNA molecules with negative polarity (Kawaoka and Neumann, 2012). The surface glycoproteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), are the most immunogenic virus proteins, and determination of the viral subtype is based on the antigenic properties of these two proteins (Nelson and Vincent, 2015). Although 16 antigenically different HAs and nine different NAs are described in the reservoir species (aquatic wild birds and shore birds), IAV subtypes detected in pigs are more restricted (Liu et al., 2009; Medina and García-Sastre, 2011; Neumann and Kawaoka, 2015).

Swine are considered candidates for the generation of pandemic IAVs because they are susceptible to infection with both human and avian IAVs, and allow the occurrence of reassortment events during co-infection of the host cell (Ito et al., 1998; Ma et al., 2009). The accumulation of mutations (antigenic drift), in addition to genomic reassortment (antigenic shift) on the virus genome increases influenza virus diversity over time (Medina and García-Sastre, 2011), leading to difficulties in the laboratory diagnosis, with further need for updates of the molecular-based diagnostic tests and vaccines for the novel circulating IAVs.

Various diagnostic methods have been used to detect IAV in pigs (Janke, 2014). Virus isolation (VI) in embryonated chicken eggs or on Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells are considered the gold standard for the diagnosis of IAV infection (Zhang and Gauger, 2014).

Additionally, the antigenic characterization of the isolated viruses can be performed by using the hemagglutination inhibition test (HI) (Kitikoon et al., 2014). Genomic sequencing is also employed and does provide more complete information on the origin of the virus, but its use is generally limited for economic reasons and is mostly restricted to research purposes. Although VI and HI tests are considered gold standards for IAV diagnosis, these techniques are time-consuming and labor-intensive. In contrast, molecular techniques, such as RT-qPCR, are fast, sensitive and specific for detection and characterization of IAVs (Zhang et al., 2016).

Influenza A viruses H1N1, H1N2 and H3N2 are the three major subtypes circulating in the swine populations around the world (Lewis et al., 2016; Nelson et al., 2015b). Although virus subtypes circulating in swine in different countries are similar, they are genetically and antigenically distinct (Kuntz-Simon and Madec, 2009; Vincent et al., 2014). Recently, Nelson et al. (2015a) have shown that influenza viruses isolated from swine in Brazil are genetically distinct from IAVs circulating in swine in other countries. Consequently, the development of diagnostic assays, able to identify locally adapted IAV strains, is important for the monitoring and control of influenza in swine. Additionally, one of the OIE/FAO Network of expertise on animal influenza (OFFLU) research priorities on influenza in swine is the development of molecular diagnostic tests using more specific primers for the identification of the major virus lineages (OFFLU Steering Committee, 2014, 2011).

The aim of this study was to develop and validate a one-step multiplex RT-qPCR assay for the rapid identification of different subtypes and lineages of IAVs circulating in swine in Brazil, therefore contributing to the surveillance of IAV in pigs.

3.2 Material and methods

3.2.1 Primers and probes design

Nucleotide sequences of the HA and NA genes, obtained from IAVs isolated from swine samples in Brazil, were selected from the Influenza Virus Sequence Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU>). A total of 46 H1 sequences from pandemic/2009 virus (H1pdm), 21 H1 sequences from seasonal human influenza virus origin (H1hu), 13 H3 sequences, 50 N1 sequences from pandemic/2009 virus (N1pdm), two N1 sequences from seasonal human influenza virus origin (N1hu) and 36 N2 sequences were selected. The target regions were determined for each gene segment (H1pdm, H1hu, H3,

N1pdm, N1hu and N2) using BLASTn (Altschul et al., 1990) to find conserved regions within each gene segment. Primers and probes for each gene segment were designed by Primer Express software (Applied Biosystems). The sequences of primers and probes are listed in Table 1.

3.2.2 Production of standard RNAs for absolute quantification

Viral RNA was extracted from IAVs isolated from swine lung using MagMAX Viral RNA Isolation Kit (AMB18365, Ambion) and RT-PCR products were generated for each target gene (HA – H1pdm, H1hu, H3; and NA – N1pdm, N1hu, N2) using the primers sets described in Table 2. The amplicons were cloned into pCR2.1 TOPO vector (TOPO TA Cloning Kit, 450641, Invitrogen) and plasmid DNAs were transformed into One Shot TOP10 Chemically Competent *Escherichia coli* cells (C404003, Invitrogen), following the manufacturer's recommendations. Plasmid DNAs were purified by PureYield Plasmid Miniprep System Kit (A1222, Promega) and positive clones, containing the targeted sequences, were confirmed by PCR and subsequent DNA sequencing using M13 primers (M13 Forward (-20), N52002, Invitrogen; M13 Reverse, N53002, Invitrogen). Plasmids containing the target genes were linearized and used in the *in vitro* transcription (MEGAscript T7 High Yield Transcription Kit, AM1333, Ambion). The obtained RNAs were quantified (Qubit RNA HS Assay Kit, Q32852, Invitrogen), the number of viral RNA copies were calculated (Fey et al., 2004) and tenfold serial dilutions of each standard were prepared.

3.2.3 Standardization and performance evaluation of the one-step multiplex RT-qPCR

The RT-qPCR assay was performed in two distinct reactions; one reaction was focused on the HA gene (H1pdm, H1hu and H3) and the other reaction was focused on the NA gene (N1pdm, N1hu and N2). The standard RNAs for each gene segment were used in the standardization of both assays by using the AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit (4387391, Ambion). The RT-qPCR assays were performed in a reaction volume of 25 μ L. For the standardization of the HA and NA reactions, different concentrations of buffer solution (0.5, 0.75 and 1X), forward and reverse primers (80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, 400 and 440nM) and probes (24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 and 144nM) were evaluated. Additionally, an internal control (SPUD) (Nolan et al., 2006) was included in the assays, but

the probe was modified with the label Cy5 on 5' and BHQ-2 on 3' (Table 1). The runs were executed on an ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

To determine the limit of detection (LOD) for both RT-qPCR assays, tenfold dilutions of each standard RNA, containing 5.09×10^8 down to 5.09×10^0 viral RNA copies per microliter, were also analyzed. The standard curves were determined by plotting the logarithm of the standard RNA copies number against the measured quantification cycle (Cq) values.

The repeatability (intra-assay variance) and reproducibility (inter-assay variance) of the assays were assessed using tenfold dilutions of the standard RNAs for HA (H1pdm, H1hu and H3) and for NA (N1pdm, N1hu and N2). The assays were performed in triplicate and in three different runs to evaluate the coefficients of variation (CVs) of both assays. Intra- and inter-assay CVs based on the Cq values were calculated by Statistical Analysis System software (SAS, 2012).

3.2.4 Analytical and diagnostic specificity of the one-step multiplex RT-qPCR

For the evaluation of the analytical specificity for both assays, 85 IAV strains isolated from swine from 2009 to 2016, and previously characterized by genomic sequencing, were selected for testing. In addition, to verify the diagnostic specificity of the assays, 50 clinical samples collected from pigs and considered negative for IAV by RT-PCR (matrix (M) gene) (Fouchier et al., 2000) and positive for other swine pathogens as porcine circovirus type 2, porcine circovirus type 3, porcine parvovirus type 1, senecavirus A, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* were also selected to be tested by the one-step multiplex RT-qPCR.

3.2.5 Evaluation of clinical samples by the one-step multiplex RT-qPCR

Seventy-three clinical samples (34 nasal swabs and 39 lung tissues samples) collected from pigs during 2017 and 2018, and previously diagnosed as positive for IAV by RT-PCR (M gene) (Fouchier et al., 2000), were selected. Viral RNA was extracted using MagMAX Viral RNA Isolation Kit (AMB18365, Ambion) according to the manufacturer's recommendations, and the samples were run on the one-step multiplex RT-qPCR assays developed in this study.

3.3 Results

3.3.1 Standardized protocol for the one-step multiplex RT-qPCR

The standardized protocol for the amplification of HA and NA gene segments is shown in Table 3. The detection enhancer was included in the reactions to minimize the formation of secondary structures. Cycling parameters for both reactions (HA and NA) were established as follows: reverse transcription at 45°C for 10min, followed by initial denaturation at 95°C for 10min, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15s and annealing at 60°C for 30s. Collection of fluorescence signal was during the annealing step and the threshold was automatically set.

3.3.2 Performance of the one-step multiplex RT-qPCR

The C_q values for both HA and NA segments are shown in Table 4. For the HA segment, the C_q values ranged from 6.96 to 37.15 cycles with a linear correlation (R^2) of 0.99 between the C_q value and the logarithm of the standard RNA copies number. For the NA segment, the C_q values ranged from 5.79 to 36.53 cycles with a R^2 of 0.99. The internal control (SPUD) was consistently detected with a C_q of ~25.

The intra- and inter-assay CVs of both one-step multiplex RT-qPCR assays are shown in Table 4. The LOD for the HA segment was as follows: 5.09×10^2 viral RNA copies/ μ L for H1pdm, 5.09×10^3 for H1hu, and 5.09×10^2 for H3. In addition, the LOD for the NA segment was as follows: 5.09×10^2 viral RNA copies/ μ L for N1pdm, 5.09×10^1 for N1hu and 5.09×10^2 for N2.

3.3.3 Analytical and diagnostic specificity of the one-step multiplex RT-qPCR on viral isolates

A high analytical specificity (100%; 95.7–100.0, CI 95%), with the correct assignment of IAV subtypes and viral lineages, was demonstrated by using the RT-qPCR assays in the analysis of 85 IAV isolates previously characterized by genomic sequencing. The C_q values ranged from 12.54 to 25.47 cycles. From these 85 IAV isolates, 53.0% were classified as pandemic H1N1, 20.0% as human-like H1N2, 13.0% as human-like H3N2, 3.5% as human-

like H1N1, 3.5% as H1pdmN2, and, co-infection with two virus subtypes was detected in 7.0% of the samples (Table 5).

The diagnostic specificity of the RT-qPCR assays was of 100% (92.9–100.0, CI 95%), resulting in the absence of fluorescence signal for other viral and bacterial swine pathogens.

3.3.4 Evaluation of clinical samples by the one-step multiplex RT-qPCR

The viral subtype and the lineage of origin were determined in 54 out of 73 samples (74.0%; 62.9–82.7, CI 95%), as follows: 46.3% were derived from the seasonal human influenza H3N2 virus, 33.3% were pandemic H1N1, 11.1% were derived from the seasonal human influenza H1N2 virus and 1.9% were a reassortant H1pdmN2. Co-infection with two virus subtypes was detected in two out of 54 (3.7%) samples. In two (3.7%) samples, only the NA gene was identified (HxN1pdm) (Table 5). In general, the Cq values ranged from 16.22 to 39.98 cycles. For 26.0% (17.3–37.1, CI 95%) of clinical samples, the virus subtype was not determined.

3.4 Discussion

A high genetic diversity of IAVs circulating in swine in most pork producing countries has been described (Lewis et al., 2016; Vincent et al., 2014). Since the genetic characteristics of IAVs in swine are related to their geographic distribution (Nelson et al., 2015b; Simon et al., 2014), specific diagnostic methods to detect locally adapted strains are necessary to monitor the circulation of influenza viruses in pigs. Currently, there is no commercially available diagnostic test in Brazil to differentiate the IAV subtypes circulating in pigs. The only test available in diagnostic laboratories for IAV detection is a RT-PCR targeting the influenza virus matrix (M) gene. However, such RT-PCR is not able to differentiate the viral subtypes and lineages or to detect mixed infections or neither to infer if IAVs are reassortants. In this sense, the determination of the virus subtype and probable origin of HA and NA genes may complement the diagnosis and is extremely important to trace back the spread of such viruses in the swine population. In this study, we evaluated two one-step multiplex RT-qPCR assays to differentiate the main IAV subtypes circulating in swine in Brazil *i.e.* pandemic H1N1, human-like H1N2 and H3N2 (Nelson et al., 2015a) and potential reassortants that may be originated from these viruses. Besides, a recently isolated H1N1 virus, derived from a seasonal human

influenza virus, was also detected by using the RT-qPCR developed here (unpublished data). The RT-qPCR assays provided good repeatability and reproducibility, represented by the low values of CVs of intra- and inter-assays at every viral RNA concentration of the standard curves, indicating a good linearity. In addition, there was an excellent level of agreement (100%; 95.7–100.0, CI 95%) between the results provided by the multiplex RT-qPCR and genomic sequencing, in relation to detection of IAV subtypes and the virus lineage designation. In our study, cross-reactivity with other swine pathogens was not observed, confirming a high (100%; 92.9–100.0, CI 95%) diagnostic specificity of the assays.

The assay performance was evaluated in the analysis of 73 samples collected from pigs during 2017 and 2018, and previously considered positive to IAV by RT-PCR (M gene) (Fouchier et al., 2000). The virus subtype was determined in 74.0% (62.9–82.7, CI 95%) of samples. Although the limits of detection of the assays were high (ranging from 5.09×10^1 to 5.09×10^3 viral RNA copies per microliter), the subtype could not be determined in 26.0% (17.3–37.1, CI 95%) clinical samples. However, for 3.7% samples, only the NA segment was determined by the NA assay. This could be explained by the higher limit of detection for the NA segment compared to the limit of detection for the HA segment. The lack of ability to determine the virus subtype in 19 out of 73 clinical samples is probably due to the presence of low viral loads (below the limits of detection of the assays). In addition, despite the primers sets and probes have being designed for a conserved region of HA and NA genes, high mutation rate is observed on those segments, which could also lead to difficulties in the subtype determination of these viruses. Also, even in rare events, other IAV subtypes than H1N1, H1N2 and H3N2 can infect pigs (Landolt and Olsen, 2007; Zell et al., 2013). Such situation could also hinder virus subtyping, and, for this reason, a periodic update of those reagents is necessary in order to detect new emerging viruses. Previous reports on the molecular detection and IAVs subtyping have been published, with different sensitivities and specificities. Chiapponi et al. (2012) tested 27 clinical samples from pigs, with unsuccessful virus isolation, and determined the viral subtype in 56% of the cases.

Distinct influenza virus lineages circulate in different geographic regions. Therefore, tests based on the virus lineages are available for subtyping of IAVs in swine in North America (Choi et al., 2002; Nagarajan et al., 2010; Richt et al., 2004), Asia (Fu et al., 2010; Lee et al., 2008) and Europe (Bonin et al., 2018; Chiapponi et al., 2012; Henritzi et al., 2016). Although various multiplex RT-PCRs have been described, it is difficult to compare the results due to the particularities displayed on the experimental design and steps applied for the standardization of the assay. In this study, we used previously sequenced IAVs and negative IAV samples for the

assay validation and afterwards, the assay was tested on clinical samples. Usually, RT-PCR assays described in the literature identify only the virus subtype which is present in the sample, however, the assays developed in this study also provide the identification of the HA and NA virus lineage (pandemic H1N1, human-like H1N1, H1N2 or H3N2). Additionally, the test was able to detect mixed viral infections and reassortant viruses, even before performing genomic sequencing, providing the basis for an improved early detection of novel viruses in swine. Subsequently, the genomic sequencing confirmed the presence of reassortant viruses, as well as it confirmed the virus lineages present in the samples (data not shown).

The emergence of pandemic H1N1 in 2009, followed by reassortment events among H1N1pdm and enzootic IAVs circulating in the swine population has increased the genetic diversity of IAVs (Bonin et al., 2018). Due to the possibility of transmission of IAVs from pigs to humans, the monitoring and surveillance of circulating viruses in swine herds is highly recommended, as a way to quickly identify emerging viruses (Schmidt et al., 2016; Vincent et al., 2014). An accurate and rapid diagnosis and characterization of IAVs in swine is important to control pig-to-pig and pig-to-human transmission (Zhang and Harmon, 2014). In this sense, the RT-qPCR developed and validated in this study showed to be a highly sensitive and specific method to discriminate the viral subtypes circulating in Brazilian swine herds and once implemented in diagnostic laboratories, it will provide more information on the prevalence of IAV subtypes in swine herds.

Funding

This study was supported by the EMBRAPA (SEG 22.16.05.004.00.03). VH has a grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). ACF is a CNPq 2 fellow.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

The authors acknowledge Marisete F. Schiochet, Neide L. Simon and Adriana M. G. Ibelli for laboratory assistance, Arlei Coldebella for statistical analysis and Sabrina C. Duarte for the critical review.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bonin, E., Quéguiner, S., Woudstra, C., Gorin, S., Barbier, N., Harder, T.C., Fach, P., Hervé, S., Simon, G., 2018. Molecular subtyping of European swine influenza viruses and scaling to high-throughput analysis. *Viol. J.* 15, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0920-z>
- Chiapponi, C., Moreno, A., Barbieri, I., Merenda, M., Foni, E., 2012. Multiplex RT-PCR assay for differentiating European swine influenza virus subtypes H1N1, H1N2 and H3N2. *J. Virol. Methods* 184, 117–120. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.05.020>
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., Kang, S.W., Farnham, M.W., Joo, H.S., 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. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00442-6](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00442-6)
- Fey, A., Eichler, S., Flavier, S., Christen, R., Höfle, M.G., Guzmán, C.A., 2004. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3618–3623. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3618-3623.2004>
- Fouchier, R.A.M., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Van der Kemp, L., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D.M.E., 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029971>
- Fu, G., Liu, M., Zeng, W., Pu, J., Bi, Y., Ma, G., Liu, J., 2010. Establishment of a multiplex RT-PCR assay to detect different lineages of swine H1 and H3 influenza A viruses. *Virus Genes* 41, 236–240. <https://doi.org/10.1007/s11262-010-0508-1>
- Henritzi, D., Zhao, N., Starick, E., Simon, G., Krog, J.S., Larsen, L.E., Reid, S.M., Brown, I.H., Chiapponi, C., Foni, E., Wacheck, S., Schmid, P., Beer, M., Hoffmann, B., Harder, T.C., 2016. Rapid detection and subtyping of European swine influenza viruses in porcine clinical samples by haemagglutinin- and neuraminidase-specific tetra- and triplex real-time RT-PCRs. *Influenza Other Respi. Viruses* 10, 504–517. <https://doi.org/10.1111/irv.12407>

- Ito, T., Couceiro, J.N.S.S., Kelm, S., Baum, L.G., Krauss, S., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J.C., Webster, R.G., Kawaoka, Y., 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* 72, 7367–7373. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.007>
- Janke, B.H., 2014. Influenza A virus infections in swine: pathogenesis and diagnosis. *Vet. Pathol.* 51, 410–426. <https://doi.org/10.1177/0300985813513043>
- Kawaoka, Y., Neumann, G., 2012. Influenza viruses: an introduction. *Methods Mol. Biol.* 865, 1–9. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-621-0_1
- Kitikoon, P., Gauger, P.C., Vincent, A.L., 2014. Hemagglutinin inhibition assay with swine sera. *Methods Mol. Biol.* 1161, 295–301. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_24
- Kuntz-Simon, G., Madec, F., 2009. Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. *Zoonoses Public Health* 56, 310–325. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01236.x>
- Landolt, G.A., Olsen, C.W., 2007. Up to new tricks - a review of cross -species transmission of influenza A viruses. *Anim. Heal. Res. Rev.* 8, 1–21. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001272>
- Lee, C.S., Kang, B.K., Lee, D.H., Lyou, S.H., Park, B.K., Ann, S.K., Jung, K., Song, D.S., 2008. One-step multiplex RT-PCR for detection and subtyping of swine influenza H1, H3, N1, N2 viruses in clinical samples using a dual priming oligonucleotide (DPO) system. *J. Virol. Methods* 151, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.04.001>
- Lewis, N.S., Russell, C.A., Langat, P., Anderson, T.K., Berger, K., Bielejec, F., Burke, D.F., Dudas, G., Fonville, J.M., Fouchier, R.A.M., Kellam, P., Koel, B.F., Lemey, P., Nguyen, T., Nuansrichy, B., Malik Peiris, J.S., Saito, T., Simon, G., Skepner, E., Takemae, N., Webby, R.J., Van Reeth, K., Brookes, S.M., Larsen, L., Watson, S.J., Brown, I.H., Vincent, A.L., Reid, S., Garcia, M.A., Harder, T., Foni, E., Markowska-Daniel, I., 2016. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. *Elife* 5, 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.12217>
- Liu, S., Ji, K., Chen, J., Tai, D., Jiang, W., Hou, G., Chen, J., Li, J., Huang, B., 2009. Panorama phylogenetic diversity and distribution of type A influenza virus. *PLoS One* 4, e5022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005022>
- Ma, W., Kahn, R.E., Richt, J.A., 2009. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: human and veterinary implications. *J. Mol. Genet. Med.* 3, 158–166. <https://doi.org/10.4172/1747-0862.1000028>
- Medina, R.A., García-Sastre, A., 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 590–603. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2613>
- Nagarajan, M.M., Simard, G., Longtin, D., Simard, C., 2010. Single-step multiplex conventional and real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for simultaneous detection and subtype differentiation of influenza A virus in swine. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 402–408. <https://doi.org/10.1177/104063871002200309>

- Nelson, M.I., Schaefer, R., Gava, D., Cantão, M.E., Ciacci-Zanella, J.R., 2015a. Influenza A viruses of human origin in swine, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1339–1347. <https://doi.org/10.3201/eid2108.141891>
- Nelson, M.I., Viboud, C., Vincent, A.L., Culhane, M.R., Detmer, S.E., Wentworth, D.E., Rambaut, A., Suchard, M.A., Holmes, E.C., Lemey, P., 2015b. Global migration of influenza A viruses in swine. *Nat. Commun.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms7696>
- Nelson, M.I., Vincent, A.L., 2015. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface. *Trends Microbiol.* 23, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.002>
- Neumann, G., Kawaoka, Y., 2015. Transmission of influenza A viruses. *Virology* 479–480, 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.009>
- Nolan, T., Hands, R.E., Ogunkolade, W., Bustin, S.A., 2006. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal. Biochem.* 351, 308–310. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.051>
- OFFLU Steering Committee, 2014. Report of the combined meeting of the OFFLU steering and executive committees. http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/about-us/pdf/OFFLU_Strategy_Agenda_Setting_Meeting_Report_Oct_2014_final.pdf (accessed 24 September 2018).
- OFFLU Steering Committee, 2011. An OFFLU agenda for influenza research priorities in animal species, pp. 9–11. <http://oie.int/doc/ged/D11129.PDF> (accessed 24 September 2018).
- Richt, J.A., Lager, K.M., Clouser, D.F., Spackman, E., Suarez, D.L., Yoon, K.J., 2004. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the detection and differentiation of North American swine influenza viruses. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 16, 367–373. <https://doi.org/10.1177/104063870401600501>
- SAS, 2012. System for Microsoft Windows, Release 9.4. (Cary, NC, USA, 2002–2012, cd-rom).
- Schmidt, C., Cibulski, S.P., Andrade, C.P., Teixeira, T.F., Varela, A.P.M., Scheffer, C.M., Franco, A.C., de Almeida, L.L., Roehe, P.M., 2016. Swine influenza virus and association with the Porcine Respiratory Disease Complex in pig farms in Southern Brazil. *Zoonoses Public Health* 63, 234–240. <https://doi.org/10.1111/zph.12223>
- Simon, G., Larsen, L.E., Dürrwald, R., Foni, E., Harder, T., Van Reeth, K., Markowska-Daniel, I., Reid, S.M., Dan, A., Maldonado, J., Huovilainen, A., Billinis, C., Davidson, I., Agüero, M., Vila, T., Hervé, S., Breum, S.Ø., Chiapponi, C., Urbaniak, K., Kyriakis, C.S., Brown, I.H., Loeffen, W., Van der Meulen, K., Schlegel, M., Bublot, M., Kellam, P., Watson, S., Lewis, N.S., Pybus, O.G., Webby, R., Chen, H., Vincent, A.L., 2014. 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* 9, e115815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115815>

- Vincent, A., Awada, L., Brown, I., Chen, H., Claes, F., Dauphin, G., Donis, R., Culhane, M., Hamilton, K., Lewis, N., Mumford, E., Nguyen, T., Parchariyanon, S., Pasick, J., Pavade, G., Pereda, A., Peiris, M., Saito, T., Swenson, S., Van Reeth, K., Webby, R., Wong, F., Ciacchi-Zanella, J., 2014. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public Health* 61, 4–17. <https://doi.org/10.1111/zph.12049>
- Zell, R., Scholtissek, C., Ludwig, S., 2013. Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European swine influenza viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 370, 29–55. <https://doi.org/10.1007/82-2012-267>
- Zhang, J., Gauger, P., Harmon, K., 2016. Swine Influenza A Virus, in: Liu, D. (Ed.), *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens*. CRC Press, Boca Raton, pp. 399–406. <https://doi.org/10.1201/b19719-49>
- Zhang, J., Gauger, P.C., 2014. Isolation of swine influenza virus in cell cultures and embryonated chicken eggs. *Methods Mol. Biol.* 1161, 265–76. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_22
- Zhang, J., Harmon, K.M., 2014. RNA extraction from swine samples and detection of influenza A virus in swine by real-time RT-PCR. *Methods Mol. Biol.* 1161, 277–293. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_23

Table 1. Sets of primers and probes sequences for the one-step multiplex RT-qPCR (HA and NA gene segments).

| Specific primers and probes | Primers and probes sequences (5' → 3') | Position | Fragment (bp) |
|------------------------------------|--|-------------|---------------|
| H1pdm ^a _F ^e | CACAAAWTTGAGACTGGYMACA | 1007 – 1028 | |
| H1pdm_R ^f | CTGTCCAYCCYCTTCAAT | 1107 – 1089 | 101 |
| H1pdm_Probe | FAM-CCTATTTGGRGCCATTGCGYGGTT-QSY | 1064 – 1086 | |
| H1hu ^{b,c} _F | GGTTTGTGGWGCCATTGC | 1062 – 1081 | |
| H1hu_R | CAGCATAVCCAGAYCCTTGC | 1167 – 1148 | 106 |
| H1hu_Probe | VIC-TTCATTGAAGGRGGDTGGACTGGAAT-QSY | 1086 – 1111 | |
| H3 ^d _F | GTTGGTAYGGTTTCAGGCATC | 1115 – 1135 | |
| H3_R | TCCCAYTGATTTGGTCRATTG | 1207 – 1187 | 93 |
| H3_Probe | NED-CAAGCWGCAGAYCTTAAAAGYACTCAAGCA-QSY | 1156 – 1185 | |
| N1pdm ^a _F | GAGGARTGYTCYTGATCCTGA | 849 – 871 | |
| N1pdm_R | AAAGACACCAHGGYCGRTT | 937 – 918 | 89 |
| N1pdm_Probe | FAM-ATGTGTRTGCAGGGATAACTGGCATGG-QSY | 887 – 913 | |
| N1hu ^c _F | CCGATGGCCCGAGTAATG | 748 – 765 | |
| N1hu_R | TGGAAATTGGGTGCATTAACTC | 844 – 822 | 97 |
| N1hu_Probe | NED-CCGCCTCGTACAAGATCTTCAAGATCGA-QSY | 769 – 796 | |
| N2 ^{b,d} _F | GGGTRTYCCRTTTCAYTTGGGAA | 508 – 530 | |
| N2_R | CTGGCRGTTGCATTTTYATCATG | 630 – 608 | 123 |
| N2_Probe | VIC-CAAGTGTGYATDGCATGGTCCAGYTCAA-QSY | 536 – 563 | |
| SPUD ^g _F | AACTTGGCTTTAATGGACCTCCA | 449 – 471 | |
| SPUD_R | ACATTCATCCTTACATGGCACCA | 549 – 527 | 101 |
| SPUD_Probe | Cy5-TGCACAAGCTATGGAACACCACGT-BHQ2 | 482 – 505 | |

^(a) Pandemic H1N1

^(b) Human-like H1N2

^(c) Human-like H1N1

^(d) Human-like H3N2

^(e) Forward primer

^(f) Reverse primer

^(g) Described by Nolan et al., 2006

Table 2. Sets of primers sequences for the production of standard RNAs (H1pdm, H1hu, H3, N1pdm, N1hu and N2) for absolute quantification.

| Specific primers | Primers sequences (5' → 3') | Position | PCR products (bp) | Reference strain |
|------------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------------|--|
| H1pdm ^a _F ^e | ATGCTGGATCTGGTATTATCATT | 859 – 881 | 411 | A/swine/Brazil/25-15/2015 (H1N1) MH559931 |
| H1pdm_R ^f | ACTCTTTGCCTACTGCTGTG | 1269 – 1250 | | |
| H1hu ^{b,c} _F | AACAGCAGTCTTCCTTTCCA | 939 – 958 | 295 | A/swine/Brazil/223-15-1/2015 (H1N2) MH560035 |
| H1hu_R | TCTCAATTACAGAATTCACCTTGTT | 1233 – 1209 | | |
| H3 ^d _F | ACAGGGATGCGGAATGTACC | 1021 – 1040 | 344 | A/swine/Brazil/28-15-8/2015 (H3N2) MH559963 |
| H3_R | TCCAGGGCAACAAGAAGCTC | 1364 – 1345 | | |
| N1pdm ^a _F | TAATGACCGATGGACCAAGT | 742 – 761 | 364 | A/swine/Brazil/25-15/2015 (H1N1) MH559933 |
| N1pdm_R | GTTCTCCCTATCCAAACACCA | 1105 – 1085 | | |
| N1hu ^c _F | ACAAGAGTCTGAATGTGTCTGC | 698 – 719 | 295 | A/swine/Brazil/103-14-2/2014 (H1N1) MG572190 |
| N1hu_R | ATCACCGAATACTCCACTGC | 992 – 973 | | |
| N2 ^{b,d} _F | ACAACAGGCATTCAAATAACACA | 441 – 463 | 389 | A/swine/Brazil/28-15-8/2015 (H3N2) MH559965 |
| N2_R | CCCTGACAGTTGGCTAATATGGA | 829 – 807 | | |

^(a) Pandemic H1N1

^(b) Human-like H1N2

^(c) Human-like H1N1

^(d) Human-like H3N2

^(e) Forward primer

^(f) Reverse primer

Table 3. Standardized protocol for the one-step multiplex RT-qPCR (HA and NA).

| One-step multiplex RT-qPCR for HA | |
|--|--------------------------------------|
| Component | Concentration in the reaction |
| Nuclease-free water | 1.36 μ L |
| 2X RT-PCR buffer* | 0.75X |
| Detection enhancer | 1.67 μ L |
| Forward primer for H1pdm | 200nM |
| Reverse primer for H1pdm | 200nM |
| H1pdm probe | 48nM |
| Forward primer for H1hu | 160nM |
| Reverse primer for H1hu | 160nM |
| H1hu probe | 48nM |
| Forward primer for H3 | 200nM |
| Reverse primer for H3 | 200nM |
| H3 probe | 60nM |
| Forward primer for SPUD | 200nM |
| Reverse primer for SPUD | 200nM |
| SPUD probe | 60nM |
| 25X RT-PCR enzyme mix | 1X |
| SPUD DNA | 1.0 μ L |
| RNA sample | 5.0 μ L |
| Total volume per reaction | 25.0μL |
| One-step multiplex RT-qPCR for NA | |
| Component | Concentration in the reaction |
| Nuclease-free water | 0.06 μ L |
| 2X RT-PCR buffer* | 0.75X |
| Detection enhancer | 1.67 μ L |
| Forward primer for N1pdm | 400nM |
| Reverse primer for N1pdm | 400nM |
| N1pdm probe | 132nM |
| Forward primer for N1hu | 200nM |
| Reverse primer for N1hu | 200nM |

| | |
|----------------------------------|------------------------------|
| N1hu probe | 60nM |
| Forward primer for N2 | 200nM |
| Reverse Primer for N2 | 200nM |
| N2 probe | 48nM |
| Forward primer for SPUD | 120nM |
| Reverse primer for SPUD | 120nM |
| SPUD probe | 36nM |
| 25X RT-PCR enzyme mix | 1X |
| SPUD DNA | 1.0 μ L |
| RNA sample | 5.0 μ L |
| Total volume per reaction | 25.0μL |

* Buffer solution contains ROX passive reference dye.

Table 4. Intra- and inter-assay variability of the one-step multiplex RT-qPCR for HA and for NA gene segments.

| Gene segment | Viral RNA copies/ μ L | Mean Cq | Intra-assay | | Inter-assay | |
|--------------|---------------------------|---------|-------------|------|-------------|------|
| | | | CV (%) | SD | CV (%) | SD |
| H1pdm | 5.09×10^8 | 6.96 | 2.08 | 0.14 | 10.12 | 0.70 |
| | 5.09×10^7 | 11.78 | 2.72 | 0.32 | 6.86 | 0.80 |
| | 5.09×10^6 | 16.18 | 1.92 | 0.31 | 5.39 | 0.87 |
| | 5.09×10^5 | 20.56 | 1.21 | 0.24 | 2.79 | 0.57 |
| | 5.09×10^4 | 25.28 | 2.24 | 0.56 | 4.74 | 1.19 |
| | 5.09×10^3 | 31.11 | 1.84 | 0.57 | 5.30 | 1.65 |
| | 5.09×10^2 | 37.15 | 0.63 | 0.23 | 1.67 | 0.62 |
| H1hu | 5.09×10^8 | 12.64 | 2.00 | 0.25 | 1.78 | 0.22 |
| | 5.09×10^7 | 16.21 | 2.81 | 0.45 | 2.23 | 0.36 |
| | 5.09×10^6 | 21.10 | 1.35 | 0.28 | 1.86 | 0.39 |
| | 5.09×10^5 | 25.13 | 1.02 | 0.25 | 1.04 | 0.26 |
| | 5.09×10^4 | 30.70 | 0.55 | 0.16 | 3.11 | 0.95 |
| | 5.09×10^3 | 35.86 | 0.63 | 0.22 | 1.87 | 0.67 |
| H3 | 5.09×10^8 | 8.18 | 2.28 | 0.18 | 1.98 | 0.16 |
| | 5.09×10^7 | 12.20 | 1.91 | 0.23 | 2.55 | 0.31 |
| | 5.09×10^6 | 16.41 | 1.84 | 0.30 | 1.16 | 0.19 |
| | 5.09×10^5 | 20.60 | 1.72 | 0.35 | 1.09 | 0.22 |
| | 5.09×10^4 | 24.88 | 1.33 | 0.33 | 1.90 | 0.47 |
| | 5.09×10^3 | 30.21 | 1.19 | 0.36 | 4.32 | 1.30 |
| | 5.09×10^2 | 36.43 | 0.71 | 0.25 | 1.24 | 0.45 |
| N1pdm | 5.09×10^8 | 5.79 | 2.94 | 0.17 | 2.82 | 0.16 |
| | 5.09×10^7 | 10.25 | 2.27 | 0.23 | 9.01 | 0.92 |

| | | | | | | |
|------|--------------------|-------|------|------|------|------|
| | 5.09×10^6 | 14.55 | 2.00 | 0.29 | 1.59 | 0.23 |
| | 5.09×10^5 | 18.57 | 1.50 | 0.27 | 1.31 | 0.24 |
| | 5.09×10^4 | 22.71 | 0.87 | 0.19 | 3.12 | 0.70 |
| | 5.09×10^3 | 28.08 | 2.44 | 0.68 | 4.53 | 1.27 |
| | 5.09×10^2 | 36.19 | 1.41 | 0.51 | 3.77 | 1.36 |
| | 5.09×10^8 | 7.97 | 0.42 | 0.03 | 0.28 | 0.02 |
| | 5.09×10^7 | 11.76 | 0.64 | 0.07 | 0.58 | 0.06 |
| | 5.09×10^6 | 15.41 | 0.34 | 0.05 | 0.72 | 0.11 |
| N1hu | 5.09×10^5 | 18.66 | 0.17 | 0.03 | 0.51 | 0.09 |
| | 5.09×10^4 | 22.24 | 0.27 | 0.06 | 0.10 | 0.02 |
| | 5.09×10^3 | 25.32 | 0.19 | 0.04 | 0.38 | 0.09 |
| | 5.09×10^2 | 29.04 | 0.31 | 0.09 | 1.02 | 0.29 |
| | 5.09×10^1 | 36.53 | 1.43 | 0.52 | 0.27 | 0.10 |
| | 5.09×10^8 | 8.31 | 2.57 | 0.21 | 3.66 | 0.30 |
| | 5.09×10^7 | 12.76 | 1.60 | 0.20 | 0.90 | 0.11 |
| | 5.09×10^6 | 17.03 | 0.64 | 0.10 | 3.29 | 0.56 |
| N2 | 5.09×10^5 | 20.65 | 1.01 | 0.20 | 1.47 | 0.30 |
| | 5.09×10^4 | 25.43 | 2.04 | 0.51 | 2.06 | 0.52 |
| | 5.09×10^3 | 29.51 | 0.32 | 0.09 | 3.06 | 0.90 |
| | 5.09×10^2 | 34.94 | 0.57 | 0.19 | 2.67 | 0.93 |

Cq = quantification cycle
CV = coefficient of variation
SD = standard deviation

Table 5. Diagnostic sensitivity and analytical specificity of sequenced/isolated strains and clinical field samples, respectively, by one-step multiplex RT-qPCR.

| Subtype/lineage | Sequenced/isolated strains | Clinical field samples |
|--|-----------------------------------|-------------------------------|
| pandemic H1N1 | 45 | 18 |
| human-like H1N2 | 17 | 6 |
| human-like H3N2 | 11 | 25 |
| H1pdmN2 ^r | 3 | 1 |
| human-like H1N1 ^r | 3 | 0 |
| pandemic H1N1 + human-like H3N2 | 4 | 0 |
| human-like H1N2 + human-like H3N2 | 1 | 0 |
| human-like H3N2 + H1pdmN2 ^r | 1 | 0 |
| pandemic H1N1 + human-like H1N2 | 0 | 1 |
| pandemic H1N1 + H1pdmN2 ^r | 0 | 1 |
| HxN1pdm | 0 | 2 |
| Not subtyped | 0 | 19 |
| Total | 85 | 73 |

pdm = pandemic

^(r) Reassortant virus

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As infecções respiratórias em suínos causadas pelo IAV são consideradas o principal problema sanitário enfrentado pelos produtores de suínos. A rápida detecção dos vírus circulantes em suínos é essencial para a implementação de medidas de controle da doença, sejam estas pelo uso de vacinação ou mesmo pelo reforço nas medidas de biossegurança dos rebanhos. O uso de técnicas moleculares, como a RT-qPCR, para o diagnóstico do IAV permite a rápida detecção, quantificação da carga viral e diferenciação dos subtipos virais em amostras de suínos. As informações geradas possibilitam uma rápida tomada de decisão, seja esta para a seleção de vírus para serem utilizados como candidatos vacinais, ou para a detecção de vírus com rearranjos gênicos e com potencial para causar doenças em humanos. Entretanto, o aumento da diversidade genética observada em IAVs isolados de suínos nos últimos anos traz dificuldades para o diagnóstico, exigindo atualizações periódicas dos iniciadores e sondas utilizados nos ensaios de RT-qPCR.

Neste estudo foram desenvolvidos e validados dois ensaios de RT-qPCR *multiplex one-step* para discriminação dos subtipos do IAV em isolados virais e em amostras clínicas colhidas de suínos. Os ensaios mostraram-se altamente sensíveis e específicos na detecção e diferenciação dos subtipos virais H1N1, H1N2 e H3N2 circulantes em suínos. Além disto, foi possível identificar nas amostras analisadas a linhagem de origem do vírus, como H1N1 pandêmico, H1N2 *human-like*, H3N2 *human-like* e H1N1 *human-like*. Ademais, a utilização do ensaio de RT-qPCR possibilitará a geração de informações sobre a prevalência dos subtipos e linhagens virais em plantéis suínos, auxiliando os programas de vacinação e identificação de pontos a serem melhorados no manejo dos suínos levando em conta as fases mais afetadas pela doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEOLA, O. A.; ADENIJI, J. A. Prevalence of antibodies to influenza viruses among handlers of live pigs at three locations in Ibadan, Nigeria. **Veterinaria Italiana**, v. 46, n. 2, p. 147–53, 2010.
- ADEOLA, O. A.; ADENIJI, J. A.; OLUGASA, B. O. Isolation of influenza A viruses from pigs in Ibadan, Nigeria. **Veterinaria Italiana**, v. 45, n. 3, p. 383–90, 2009.
- ADEOLA, O. A.; ADENIJI, J. A.; OLUGASA, B. O. Detection of haemagglutination-inhibiting antibodies against human H1 and H3 strains of influenza A viruses in pigs in Ibadan, Nigeria. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 7–8, p. 89–94, 2010.
- ADEOLA, O. A.; OLUGASA, B. O.; EMIKPE, B. O. Detection of pandemic strain of influenza virus (A/H1N1/pdm09) in pigs, West Africa: implications and considerations for prevention of future influenza pandemics at the source. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 5, n. 1, p. 30227, 2015.
- ADEOLA, O. A.; OLUGASA, B. O.; EMIKPE, B. O. Antigenic detection of human strain of influenza virus A (H3N2) in swine populations at three locations in Nigeria and Ghana during the dry early months of 2014. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 2, p. 106–111, 2016.
- ALLERSON, M. et al. The impact of maternally derived immunity on influenza A virus transmission in neonatal pig populations. **Vaccine**, v. 31, n. 3, p. 500–505, 2013.
- BAUDON, E. et al. Epidemiological features of influenza circulation in swine populations: a systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179044, 2017.
- BIONDO, N. et al. Genomic analysis of influenza A virus from captive wild boars in Brazil reveals a human-like H1N2 influenza virus. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 1, p. 34–40, 2014.
- BRAVO-VASQUEZ, N. et al. Presence of influenza viruses in backyard poultry and swine in El Yali wetland, Chile. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 134, p. 211–215, 2016.
- BRAVO-VASQUEZ, N. et al. Swine influenza virus (H1N2) characterization and transmission in ferrets, Chile. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 241–251, 2017.
- BRENTANO, L. et al. Levantamento soropidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus de influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. **Comunicado Técnico (Embrapa)**, Concórdia, p. 6, 2002.
- BROCKMEIER, S. L.; HALBUR, P. G.; THACKER, E. L. Porcine Respiratory Disease Complex. In: BROGDEN, K. A.; GUTHMILLER, J. M. (Eds.). **Polymicrobial Diseases**. Washington (DC): ASM Press, 2002. p. 231–258.
- BROWN, I. H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 1–2, p. 29–46, 2000.

BROWN, I. H. History and epidemiology of swine influenza in Europe. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 370, p. 133–146, 2013.

CAMPITELLI, L. et al. Continued evolution of H1N1 and H3N2 influenza viruses in pigs in Italy. **Virology**, v. 232, n. 2, p. 310–318, 1997.

CAPPUCCIO, J. A. et al. Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a non-contemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 12, 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 Reviews e Research**, v. 15, n. 1, p. 63–73, 2010.

CASTRUCCI, M. R. et al. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. **Virology**, v. 193, n. 1, p. 503–506, 1993.

CHAN, C. H. et al. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 136, n. 1–2, p. 38–43, 2006.

CHOI, Y. K. et al. Phylogenetic analysis of H1N2 isolates of influenza A virus from pigs in the United States. **Virus Research**, v. 87, n. 2, p. 173–179, 2002.

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. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 1, p. 3–9, 2010.

CIACCI-ZANELLA, J. R. et al. Influenza A virus infection in Brazilian swine herds following the introduction of pandemic 2009 H1N1. **Veterinary Microbiology**, v. 180, n. 1–2, p. 118–122, 2015.

CORREIA, V.; ABECASIS, A. B.; REBELO-DE-ANDRADE, H. Molecular footprints of selective pressure in the neuraminidase gene of currently circulating human influenza subtypes and lineages. **Virology**, v. 522, p. 122–130, 2018.

COUACY-HYMANN, E. et al. Surveillance for influenza viruses in poultry and swine, West Africa, 2006–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 9, p. 1446–1452, 2012.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. Global epidemiology of influenza: past and present. **Annual Review of Medicine**, v. 51, n. 1, p. 407–421, 2000.

CRISCI, E. et al. Review: influenza virus in pigs. **Molecular Immunology**, v. 55, n. 3–4, p. 200–211, 2013.

CULHANE, M. R.; DETMER, S. E. Sample types, collection, and transport for influenza A viruses of swine. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 259–263, 2014.

CUNHA, R. G.; VINHA, V. R.; PASSOS, W. D. Isolation of a strain of Myxovirus

- influenzae-A suis from swine slaughtered in Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, n. 1, p. 13–17, 1978.
- DE, A. Molecular evolution of hemagglutinin gene of influenza A virus. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, p. 101–118, 2018.
- DE JONG, J. C. et al. Antigenic drift in swine influenza H3 haemagglutinins with implications for vaccination policy. **Vaccine**, v. 17, n. 11–12, p. 1321–1328, 1999.
- DETMER, S. et al. Diagnostics and surveillance for swine influenza. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 370, p. 85–112, 2013.
- DIAS, A. S. et al. Distribution of antibodies against influenza virus in pigs from farrow-to-finish farms in Minas Gerais state, Brazil. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 9, n. 3, p. 161–167, 2015.
- DUCATEZ, M. F. et al. Multiple reassortment between pandemic (H1N1) 2009 and endemic influenza viruses in pigs, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 1624–1629, 2011.
- DUCATEZ, M. F.; AWOUME, F.; WEBBY, R. J. Influenza A(H1N1)pdm09 virus in pigs, Togo, 2013. **Veterinary Microbiology**, v. 177, n. 1–2, p. 201–205, 2015.
- GAMBLIN, S. J.; SKEHEL, J. J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28403–28409, 2010.
- GARTEN, R. J. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 197–201, 2009.
- GAUGER, P. C. et al. Enhanced pneumonia and disease in pigs vaccinated with an inactivated human-like (δ -cluster) H1N2 vaccine and challenged with pandemic 2009 H1N1 influenza virus. **Vaccine**, v. 29, n. 15, p. 2712–2719, 2011.
- 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. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 6, p. 900–912, 2012.
- GAUGER, P. C.; LOVING, C. L.; VINCENT, A. L. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum or mucosal isotype-specific IgG and IgA whole-virus antibody to influenza A virus in swine. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 303–312, 2014.
- GAUGER, P. C.; VINCENT, A. L. Serum virus neutralization assay for detection and quantitation of serum-neutralizing antibodies to influenza A virus in swine. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 313–324, 2014.
- GAYMARD, A. et al. Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 12, p. 975–983, 2016.
- GONEAU, L. W. et al. Zoonotic influenza and human health—part 1: virology and

epidemiology of zoonotic influenzas. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 10, p. 37, 2018.

GUAN, Y. et al. Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. **Journal of Virology**, v. 70, n. 11, p. 8041–8046, 1996.

GUNSON, R. N.; COLLINS, T. C.; CARMAN, W. F. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, n. 4, p. 355–367, 2006.

HAMPSON, A. W. Influenza virus antigens and ‘antigenic drift’. **Perspectives in Medical Virology**, v. 7, p. 49–85, 2002.

HOFFMANN, E. et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Archives of Virology**, v. 146, n. 12, p. 2275–2289, 2001.

HOLYOAKE, P. K. et al. The first identified case of pandemic H1N1 influenza in pigs in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 11, p. 427–431, 2011.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 591–600, 2005.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). **Virus taxonomy: 2018 release**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

IMAI, M.; KAWAOKA, Y. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 2, p. 160–167, 2012.

ITO, T. et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. **Journal of Virology**, v. 72, n. 9, p. 7367–7373, 1998.

ITO, T. Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A viruses. **Microbiology and Immunology**, v. 44, n. 6, p. 423–430, 2000.

JANKE, B. H. Diagnosis of swine influenza. **Swine Health and Production**, v. 8, n. 2, p. 79–84, 2000.

JANKE, B. H. Clinicopathological features of swine influenza. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 370, p. 69–83, 2013.

JANKE, B. H. Influenza A virus infections in swine: pathogenesis and diagnosis. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 410–426, 2014.

JIMÉNEZ, L. F. M. et al. Association of swine influenza H1N1 pandemic virus (SIV-H1N1p) with porcine respiratory disease complex in sows from commercial pig farms in Colombia. **Virologica Sinica**, v. 29, n. 4, p. 242–249, 2014.

JOHNSON, N. P. A. S.; MUELLER, J. Updating the accounts: global mortality of the 1918–1920 “Spanish” influenza pandemic. **Bulletin of the History of Medicine**, v. 76, n. 1, 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, n. 2–3, p. 179–184, 2005.

KARASIN, A. I. et al. Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. **Virus Research**, v. 68, n. 1, p. 71–85, 2000.

KARASIN, A. I. et al. Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 1073–1079, 2002.

KARASIN, A. I.; OLSEN, C. W.; ANDERSON, G. A. Genetic characterization of an H1N2 influenza virus isolated from a pig in Indiana. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2453–2456, 2000.

KHATRI, M. et al. Swine influenza H1N1 virus induces acute inflammatory immune responses in pig lungs: a potential animal model for human H1N1 influenza virus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11210–11218, 2010.

KITIKOON, P. et al. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 117–128, 2006.

KITIKOON, P. et al. Brief report: molecular characterization of a novel reassorted pandemic H1N1 2009 in Thai pigs. **Virus Genes**, v. 43, n. 1, p. 1–5, 2011.

KITIKOON, P. et al. Pathogenicity and transmission in pigs of the novel A(H3N2)v influenza virus isolated from humans and characterization of swine H3N2 viruses isolated in 2010-2011. **Journal of Virology**, v. 86, n. 12, p. 6804–6814, 2012.

KITIKOON, P.; GAUGER, P. C.; VINCENT, A. L. Hemagglutinin inhibition assay with swine sera. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 295–301, 2014.

KITIKOON, P.; VINCENT, A. L. Microneutralization assay for swine influenza virus in swine serum. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 325–335, 2014.

KLEIN, E. Y. et al. Influenza A H1N1 pandemic strain evolution - divergence and the potential for antigenic drift variants. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93632, 2014.

KUNTZ-SIMON, G.; MADEC, F. Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n. 6–7, 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 and Public Health**, v. 58, n. 2, p. 93–101, 2011.

LAISSÉ, C. J. M. et al. Infecção pelo vírus influenza A em suínos no sul de Moçambique. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 1484–1490, 2018.

- LANDOLT, G. A. et al. Comparison of the pathogenesis of two genetically different H3N2 influenza A viruses in pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1936–1941, 2003.
- LANDOLT, G. A.; OLSEN, C. W. Up to new tricks – a review of cross-species transmission of influenza A viruses. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 1, p. 1–21, 2007.
- LANDRY, M. L. Diagnostic tests for influenza infection. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 23, n. 1, p. 91–97, 2011.
- LANGE, E. et al. Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 9, p. 2119–2123, 2009.
- LARSEN, D. L. et al. Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 1–2, p. 117–131, 2000.
- LEWIS, N. S. et al. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. **eLife**, v. 5, n. e12217, p. 1–17, 2016.
- LÓPEZ, A. Respiratory system. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Eds.). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4th. ed. Saint Louis: Mosby Elsevier, 2007. p. 463–558.
- LORUSSO, A. et al. Genetic and antigenic characterization of H1 influenza viruses from United States swine from 2008. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 4, p. 919–930, 2011.
- LOWEN, A. C. It's in the mix: reassortment of segmented viral genomes. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. e1007200, 2018.
- LU, L. et al. Genetic correlation between current circulating H1N1 swine and human influenza viruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 49, n. 3, p. 186–191, 2010.
- MA, W.; KAHN, R. E.; RICHT, J. A. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: human and veterinary implications. **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, v. 3, n. 1, p. 158–166, 2009.
- MA, W.; RICHT, J. A. Swine influenza vaccines: current status and future perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v. 11, n. 1, p. 81–96, 2010.
- MANCINI, D. A. P. et al. Evidence of swine respiratory infection by influenza viruses in Brazil. **Virus Reviews e Research**, v. 11, n. 1–2, p. 39–43, 2006.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 19 dez. 2018.
- MAROZIN, S. et al. Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 4, p. 735–745, 2002.
- MATROSOVICH, M. et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. **Journal**

of **Virology**, v. 74, n. 18, p. 8502–8512, 2000.

MATSUU, A. et al. Genetic characterization of swine influenza viruses isolated in Japan between 2009 and 2012. **Microbiology and Immunology**, v. 56, n. 11, p. 792–803, 2012.

MEDINA, R. A.; GARCÍA-SASTRE, A. Influenza A viruses: new research developments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 590–603, 2011.

NEIRA, V. et al. Characterization of viral load, viability and persistence of influenza a virus in air and on surfaces of swine production facilities. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016.

NELLI, R. K. et al. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 4, 2010.

NELSON, M. I. et al. Introductions and evolution of human-origin seasonal influenza A viruses in multinational swine populations. **Journal of Virology**, v. 88, n. 17, p. 10110–10119, 2014.

NELSON, M. I. et al. Global migration of influenza A viruses in swine. **Nature Communications**, v. 6, n. 6696, p. 1–11, 2015a.

NELSON, M. I. et al. Influenza A viruses of human origin in swine, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1339–1347, 2015b.

NELSON, M. I. et al. Novel human-like influenza A Viruses circulate in swine in Mexico and Chile. **PLoS Currents**, v. 7, 2015c.

NELSON, M. I.; HOLMES, E. C. The evolution of epidemic influenza. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 3, p. 196–205, 2007.

NELSON, M. I.; VINCENT, A. L. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 142–153, 2015.

NEROME, K. et al. Genetic analysis of porcine H3N2 viruses originating in Southern China. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 3, p. 613–624, 1995.

NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 881–886, 2006.

NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Transmission of influenza A viruses. **Virology**, v. 479–480, p. 234–246, 2015.

NICHOLLS, J. M. et al. Evolving complexities of influenza virus and its receptors. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 149–157, 2008.

NJABO, K. Y. et al. Pandemic A/H1N1/2009 influenza virus in swine, Cameroon, 2010. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 1–2, p. 189–192, 2012.

OFFLU Steering Committee. **An OFFLU agenda for influenza research priorities in animal species**, p. 9–11, 2011. Disponível em: <<http://oie.int/doc/ged/D11129.PDF>>. Acesso

em: 24 set. 2018.

OFFLU Steering Committee. **Report of the combined meeting of the OFFLU steering and executive committees**, 2014. Disponível em:

<http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/about-us/pdf/OFFLU_Strategy_Agenda_Setting_Meeting_Report_Oct_2014_final.pdf>. Acesso em: 24 set. 2018.

OLSEN, C. W. et al. Triple reassortant H3N2 influenza A viruses, Canada, 2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 7, p. 1132–1135, 2006.

PANTIN-JACKWOOD, M. J. Immunohistochemical staining of influenza virus in tissues. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 51–58, 2014.

PASMA, T.; JOSEPH, T. Pandemic (H1N1) 2009 infection in swine herds, Manitoba, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 706–708, 2010.

PEDERSEN, J. C. Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 11–25, 2014a.

PEDERSEN, J. C. Neuraminidase-inhibition assay for the identification of influenza A virus neuraminidase virus subtype or neuraminidase antibody specificity. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 27–36, 2014b.

PEIRIS, J. S. M. et al. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary “human” H3N2 influenza A viruses in pigs in Southeastern China: potential for genetic reassortment? **Journal of Virology**, v. 75, n. 20, p. 9679–9686, 2001.

PEIRIS, J. S. M.; DE JONG, M. D.; GUAN, Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 243–267, 2007.

PEREDA, A. et al. Pandemic (H1N1) 2009 outbreak on pig farm, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 304–307, 2010.

PEREDA, A. et al. Evidence of reassortment of pandemic H1N1 influenza virus in swine in Argentina: are we facing the expansion of potential epicenters of influenza emergence? **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 5, n. 6, p. 409–412, 2011.

QI, X.; PANG, B.; LU, C. P. Genetic characterization of H1N1 swine influenza A viruses isolated in eastern China. **Virus Genes**, v. 39, n. 2, p. 193–199, 2009.

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 and Other Respiratory Viruses**, v. 7, n. 5, p. 783–790, 2013a.

RAJÃO, D. S. et al. Serological evidence of swine influenza in Brazil. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 7, n. 2, p. 109–112, 2013b.

RAJÃO, D. S. et al. Diagnosis and clinic-pathological findings of influenza virus infection in

Brazilian pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 30–36, 2013c.

RAJÃO, D. S. et al. Pathogenesis and vaccination of influenza A virus in swine. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 385, p. 307–326, 2014.

RAJÃO, D. S. et al. Novel reassortant human-like H3N2 and H3N1 influenza A viruses detected in pigs are virulent and antigenically distinct from swine viruses endemic to the United States. **Journal of Virology**, v. 89, n. 22, p. 11213–11222, 2015.

RAJÃO, D. S. et al. Antigenic and genetic evolution of contemporary swine H1 influenza viruses in the United States. **Virology**, v. 518, p. 45–54, 2018.

RAJÃO, D. S.; PÉREZ, D. R. Universal vaccines and vaccine platforms to protect against influenza viruses in humans and agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 123, p. 1–21, 2018.

RAJÃO, D. S.; VINCENT, A. L.; PEREZ, D. R. Adaptation of human influenza viruses to swine. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, n. 347, p. 1–12, 2019.

RAMIREZ-NIETO, G. C. et al. First isolation and identification of H1N1 swine influenza viruses in Colombian pig farms. **Health**, v. 4, n. 10, p. 983–990, 2012.

RECH, R. R. et al. Porcine respiratory disease complex after the introduction of H1N1/2009 influenza virus in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 1, p. e155–e161, 2018.

RICHT, J. A. et al. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3198–3205, 2003.

RICHT, J. A. et al. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the detection and differentiation of North American swine influenza viruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 5, p. 367–373, 2004.

ROMAGOSA, A. et al. Vaccination of influenza A virus decreases transmission rates in pigs. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, 2011.

SANDBULTE, M. R. et al. Divergent immune responses and disease outcomes in piglets immunized with inactivated and attenuated H3N2 swine influenza vaccines in the presence of maternally-derived antibodies. **Virology**, v. 464–465, n. 1, p. 45–54, 2014.

SCHAEFER, R. et al. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 9, 2011.

SCHAEFER, R. et al. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 61–73, 2013.

SCHAEFER, R. et al. A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, n. 1, p. 29–38, 2015.

- SCHMIDT, C. et al. Swine influenza virus and association with the porcine respiratory disease complex in pig farms in Southern Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 3, p. 234–240, 2016.
- SCHRADER, C.; SÜSS, J. Genetic characterization of a porcine H1N2 influenza virus strain isolated in Germany. **Intervirology**, v. 46, n. 1, p. 66–70, 2003.
- SHOPE, R. E. Swine influenza: III. Filtration experiments and etiology. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 54, n. 3, p. 373–385, 1931.
- SHOPE, R. E.; FRANCIS, T. The susceptibility of swine to the virus of human influenza. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 64, n. 5, p. 791–801, 1936.
- SHORT, K. R. et al. One health, multiple challenges: the inter-species transmission of influenza A virus. **One Health**, v. 1, p. 1–13, 2015.
- 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, n. 12, p. e115815, 2014.
- SMITH, G. J. D. et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. **Nature**, v. 459, n. 7250, p. 1122–1125, 2009.
- SNOECK, C. J. et al. Serological evidence of pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, West and Central Africa. **Veterinary Microbiology**, v. 176, n. 1–2, p. 165–171, 2015.
- SONG, Y. et al. A novel H1N2 influenza virus related to the classical and human influenza viruses from pigs in Southern China. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1068, p. 1–13, 2016.
- SRETA, D. et al. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. **Virology Journal**, v. 6, n. 34, 2009.
- SUN, L. et al. Genetic correlation between H3N2 human and swine influenza viruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 2, p. 141–144, 2009.
- TAKEMAE, N. et al. Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 2, n. 5, p. 181–189, 2008.
- THACKER, E. L.; THACKER, B. J.; JANKE, B. H. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2525–2530, 2001.
- TINOCO, Y. O. et al. Transmission dynamics of pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus in humans and swine in backyard farms in Tumbes, Peru. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 10, n. 1, p. 47–56, 2016.
- TONG, S. et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 11, p. 4269–4274, 2012.

TONG, S. et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.

TORREMORELL, M. et al. Procedures to eliminate H3N2 swine influenza virus from a pig herd. **Veterinary Record**, v. 165, n. 3, p. 74–77, 2009.

TORREMORELL, M. et al. Transmission of influenza A virus in pigs. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. Suppl. 1, p. 68–84, 2012.

TREVENNEC, K. et al. Transmission of pandemic influenza H1N1 (2009) in Vietnamese swine in 2009–2010. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 6, n. 5, p. 348–357, 2012.

TUMPEY, T. M. et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. **Science**, v. 310, n. 5745, p. 77–80, 2005.

VAN POUCKE, S. G. M. et al. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. **Virology Journal**, v. 7, n. 38, 2010.

VAN REETH, K.; BROWN, I. H.; OLSEN, C. W. Influenza virus. In: ZIMMERMAN, J. J. et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10th. ed. Ames: Iowa State University Press, 2012. p. 557–571.

VAN REETH, K.; LABARQUE, G.; PENSAERT, M. Serological profiles after consecutive experimental infections of pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 swine influenza viruses. **Viral Immunology**, v. 19, n. 3, p. 373–382, 2006.

VIJAYKRISHNA, D. et al. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. **Science**, v. 328, n. 5985, p. 1529, 2010.

VINCENT, A. L. et al. Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses from the United States. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3–4, p. 212–222, 2006.

VINCENT, A. L. et al. Swine influenza viruses: a North American perspective. **Advances in Virus Research**, v. 72, p. 127–154, 2008.

VINCENT, A. L. et al. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. **Virus Genes**, v. 39, n. 2, p. 176–185, 2009.

VINCENT, A. L. et al. Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 4, n. 2, p. 53–60, 2010.

VINCENT, A. L. et al. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease. **Journal of Virology**, v. 86, n. 19, p. 10597–10605, 2012.

VINCENT, A. L. et al. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, n. 1, p. 4–17, 2014.

VINCENT, A. L. et al. Influenza A virus vaccines for swine. **Veterinary Microbiology**, v.

206, p. 35–44, 2017.

VINCENT, A. L.; LAGER, K. M.; ANDERSON, T. K. A brief introduction to influenza A virus in swine. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 243–258, 2014.

WALIA, R. R.; ANDERSON, T. K.; VINCENT, A. L. Regional patterns of genetic diversity in swine influenza A viruses in the United States from 2010 to 2016. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, 2018.

WATANABE, T. T. N. et al. Histopathological and immunohistochemical findings of swine with spontaneous influenza a infection in Brazil, 2009-2010. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1148–1154, 2012.

WEBBY, R. J. et al. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. **Journal of Virology**, v. 74, n. 18, p. 8243–8251, 2000.

WEBBY, R. J. et al. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. **Virus Research**, v. 103, n. 1–2, p. 67–73, 2004.

WEBSTER, R. G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 1, p. 152–79, 1992.

WHITE, L. A.; TORREMORELL, M.; CRAFT, M. E. Influenza A virus in swine breeding herds: combination of vaccination and biosecurity practices can reduce likelihood of endemic piglet reservoir. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 138, p. 55–69, 2017.

WU, Y. et al. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 183–191, 2014.

XU, M. et al. Isolation and genetic analysis of a novel triple-reassortant H1N1 influenza virus from a pig in China. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 3–4, p. 403–409, 2011.

YU, H. et al. Isolation and genetic analysis of human origin H1N1 and H3N2 influenza viruses from pigs in China. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 1, p. 91–96, 2007.

YU, H. et al. Genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in China from 1970 to 2006. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 1067–1075, 2008.

YU, H. et al. Isolation and genetic characterization of avian-like H1N1 and novel reassortant H1N2 influenza viruses from pigs in China. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 386, n. 2, p. 278–283, 2009.

ZANELLA, J. R. C. et al. Current and retrospective serology study of influenza A viruses antibodies in Brazilian pig populations. In: International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, 6., 2011, Barcelona. **Proceedings**. Barcelona: CREsA-UAB-IRTA, 2011. p. 261.

ZHANG, J.; GAUGER, P. C. Isolation of swine influenza virus in cell cultures and

embryonated chicken eggs. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 265–76, 2014.

ZHANG, J.; GAUGER, P.; HARMON, K. Swine Influenza A Virus. In: LIU, D. (Ed.). **Molecular Detection of Animal Viral Pathogens**. Boca Raton: CRC Press, 2016. p. 399–406.

ZHANG, J.; HARMON, K. M. RNA extraction from swine samples and detection of influenza A virus in swine by real-time RT-PCR. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 277–293, 2014.

ZHOU, H. et al. Pandemic (H1N1) 2009 virus in swine herds, People's Republic of China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 1757–1759, 2011.

ZHOU, N. N. et al. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. **Journal of Virology**, v. 73, n. 10, p. 8851–6, 1999.