

Alessandra Silva Dias

**INFLUENZA A: DETECÇÃO DE ANTICORPOS E SUBTIPOS
VIRAIIS EM SUÍNOS DO BRASIL E ESTADOS UNIDOS**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária
Preventiva

Orientador: Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2015

D541i Dias, Alessandra Silva, 1984-
Influenza A: detecção de anticorpos e subtipos virais em suínos do Brasil e Estados Unidos / Alessandra Silva Dias. – 2015.
91 p. : il.

Orientador: Zélia Inês Portela Lobato
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Influenza – Teses. 3. Vírus da influenza – Teses.
I. Lobato, Zélia Inês Portela. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

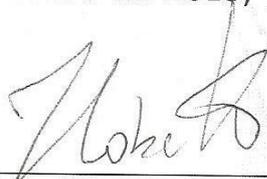
CDD – 636.408 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

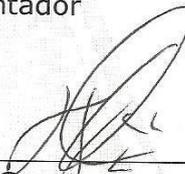
ALESSANDRA SILVA DIAS

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

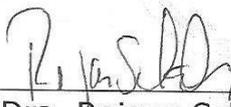
Aprovada em 25 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Profª. Zélia Inês Portela Lobato
Presidente - Orientador



Prof. Luiz Felipe Caron
Universidade Federal do Paraná



Dra. Rejane Schaefer
EMBRAPA



Prof. Marcos Bryan Heinemann
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Escola de Veterinária - UFMG

Dedico este trabalho ao meu pai Paulo (in memoriam) e a minha mãe Vera, pelo apoio em cada passo da minha caminhada, pela confiança e por viverem cada desafio e cada vitória ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força, saúde, determinação e coragem para seguir todo o caminho traçado e pela bondade em sempre colocar pessoas tão importantes e situações tão fundamentais para o meu crescimento.

À minha mãe pelo amor, companheirismo, apoio, confiança e paciência. Ao meus irmãos Carlos Henrique e Fábio (*in memoriam*) pelo apoio e confiança.

Ao meu namorado Renato, pelo carinho, apoio, paciência, dedicação e pela presença constante em todos os momentos. À família Ângelo Campos pelo carinho e apoio.

À profa. Zélia pela oportunidade de continuar meu crescimento pessoal e profissional sob sua orientação, pelos ensinamentos e por todo o apoio durante esses anos.

Aos meus co-orientadores prof. Roberto Guedes e Dra. Daniela Rajão pela supervisão e orientação durante o doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Preventiva Veterinária pela cooperação.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal Grazielle, Izabelle, Ana Carolina, Maria Isabel, Érica, Júlio César e Daniel pelo companheirismo, apoio e por fazerem os momentos no laboratório mais prazerosos.

À Priscilla Gerber e Daniela Rajão pela recepção e apoio durante o doutorado sanduíche.

Aos colegas Aristóteles, Talita Resende, Paulo Oliveira, Flávia Garrocho e Michelle Gabardo pela ajuda durante as coletas.

Ao Dr. José Eustáquio Cavalcanti, Dra. Aline Moreira, Dr. Maurício Grazianni, Dr. Alvimar Jales, Dr. Antônio Clever e Dr. Fernando Araújo pela ajuda na seleção das granjas.

A todos os proprietários das granjas por autorizarem a realização das coletas e aos funcionários de todas as granjas pelo auxílio e cooperação.

À Dra. Amy Vincent por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório e em sua vida, pelos ensinamentos e pelos grandes momentos vividos em Ames.

Ao Dr. Phillip Gauger por permitir o desenvolvimento do projeto do doutorado sanduíche, pelos grandes ensinamentos e por cada um dos vários momentos de descontração.

Ao Dr. Butch Baker e à Emma Baker por me receberem na família, pelo carinho e pela ajuda em cada momento em que precisei.

Ao Dr. Kelly Lager e família, pela recepção e pelos grandes momentos de interação, socialização e ensinamentos sobre a cultura americana.

Ao Dr. Jianqiang Zhang (JQ) por toda ajuda e pelos bons momentos de descontração.

À querida amiga Marianna Moreira Jahnke e sua família (e à Cindy), pela grande amizade, pelo carinho e por me receberem como mais membro da família.

Ao colega Paulo Arruda pela recepção e pelo apoio.

Aos colegas do Swine Lab do USDA Michelle, Pravina, Tavis, Bryan, Carine, Juan e Gwen (em especial) pelo grande apoio, pela paciência e recepção.

Aos meus familiares e amigos, por acreditarem no meu trabalho e torcerem pelo meu sucesso.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelo suporte.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS GERAIS.....	15
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1. Etiologia	16
1.2. Epidemiologia	18
1.3. Patogenia.....	22
1.4. Sinais clínicos e lesões	22
1.5. Resposta Imune	23
1.6. Diagnóstico	25
1.7. Prevenção e controle	27
CAPITULO 2: RESPOSTA VACINAL EM PORCAS E ANTICORPOS MATERNOS CONTRA INFLUENZA EM LEITÕES LACTENTES NO MEIO- OESTE DOS ESTADO UNIDOS	31
Resumo	31
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Material e Métodos	32
- <i>Animais e amostras</i>	32
- <i>Processamento das amostras</i>	34
- <i>NP ELISA</i>	34
- <i>Hemaglutinação (HA)</i>	34
- <i>Inibição da hemaglutinação (HI)</i>	34
- <i>Isolamento viral</i>	36
Resultados	36

- Detecção de anticorpos anti- nucleoproteína viral pelo teste NP ELISA.....	36
- Detecção de anticorpos contra os antígenos vacinais pelo teste de HI.....	38
Discussão	48
Conclusões.....	50
CAPÍTULO 3: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA EM LEITÕES LACTENTES E DE CRECHE EM GRANJAS VACINADAS DO MEIO-OESTE DOS ESTADOS UNIDOS	52
Resumo	52
Abstract.....	52
Introdução.....	53
Material e Métodos	54
- Animais e amostras	54
- Extração do RNA viral.....	56
- Detecção de RNA viral por RT- PCR em tempo real e subtipagem.....	56
- Isolamento viral	57
- Sequenciamento completo do genoma	57
Resultados	58
- Detecção do RNA viral e subtipagem	58
- Isolamento viral	60
- Sequenciamento completo do genoma	60
Discussão	61
Conclusões.....	63
CAPÍTULO 4: DISTRIBUIÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS INFLUENZA EM SUÍNOS EM GRANJAS DE CICLO COMPLETO DE MINAS GERAIS*	64
Resumo	64
Abstract.....	64
Introdução.....	65
Material e Métodos	66

- Amostras	66
- Vírus e controles	66
- Inibição da hemaglutinação	66
Resultados	67
Discussão	71
Conclusões.....	74
CONCLUSÕES	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama do vírus da influenza A com o envelope viral e os oito segmentos de RNA. M1: matriz 1; M2: matriz 2; HA: hemaglutinina; NA: neuraminidase. Fonte: Vincent et al., 2008.....	17
Figura 2: Localização geográfica das quatro granjas selecionadas para o estudo realizado no Meio-Oeste dos Estados Unidos.....	33
Figura 3: Cronograma geral do experimento realizado nas quatro granjas pertencentes ao mesmo sistema de produção do Meio- Oeste dos Estados Unidos durante o ano de 2013.....	35
Figura 4: Percentual de porcas positivas para a presença anticorpos anti-NP nas quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas.....	37
Figura 5: Percentual de leitões positivos para a presença de anticorpos anti-NP nas quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas.	37
Figura 6: Perfil de anticorpos contra o antígeno H3 cluster IV em porcas das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal. Barras verticais indicam o erro padrão.	38
Figura 7: Perfil de anticorpos contra o antígeno H1- δ em porcas das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal. Barras verticais indicam o erro padrão	39
Figura 8: Perfil de anticorpos contra o antígeno H1- γ em porcas das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal. Barras verticais indicam o erro padrão.	40

- Figura 9: Perfil de anticorpos contra o antígeno H3 cluster IV em leitões das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal. 41
- Figura 10: Perfil de anticorpos contra o antígeno H1- δ em leitões das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal. 42
- Figura 11: Perfil de anticorpos contra o antígeno H1- γ em leitões das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal. 42
- Figura 12: Percentual de porcas e leitões com títulos de anticorpos protetores na G1 em todas as coletas e para todas as amostras virais avaliadas. Letras A, B e C no canto inferior direito de cada gráfico referem-se às avaliações feitas para as amostras virais H3 cluster IV, H1 δ e H1 γ , respectivamente. *Diferença entre os grupos estudados ($P < 0,05$). 44
- Figura 13: Percentual de porcas e leitões com títulos de anticorpos protetores na G2 em todas as coletas e para todas as amostras virais avaliadas. Letras A, B e C no canto inferior direito de cada gráfico referem-se às avaliações feitas para as amostras virais H3 cluster IV, H1 δ e H1 γ , respectivamente. *Diferença entre os grupos estudados ($P < 0,05$). 45
- Figura 14: Percentual de porcas e leitões com títulos de anticorpos protetores na G3 em todas as coletas e para todas as amostras virais avaliadas. Letras A, B e C no canto inferior direito de cada gráfico referem-se às avaliações feitas para as amostras virais H3 cluster IV, H1 δ e H1 γ , respectivamente. *Diferença entre os grupos estudados ($P < 0,05$). 46
- Figura 15: Percentual de porcas e leitões com títulos de anticorpos protetores na G4 em todas as coletas e para todas as amostras virais avaliadas. Letras A, B e C no canto inferior direito de cada gráfico referem-se às avaliações feitas para as amostras virais H3 cluster IV, H1 δ e H1 γ , respectivamente. *Diferença entre os grupos estudados ($P < 0,05$). 47
- Figura 16: Fluxograma de coleta de amostras de suabe nasal de leitões neonatos e fluido oral de leitões de creche nas quatro granjas do Meio- Oeste dos Estados Unidos..... 55
- Figura 17: Árvore filogenética construída com base no sequenciamento do gene da hemaglutinina (HA) pelo método *Neighbor-joining* (usando a diferença de nucleotídeos) com repetição de bootstrap de 1000 por meio do software Mega 4.0.2. Somente valores de *bootstrap* maiores que 60% estão representados. Triângulo fechado: amostras virais usadas na produção da vacina autógena utilizada pelas granjas estudadas. Círculo fechado: amostras virais isoladas de suabes nasais das granjas estudadas. 62
- Figura 18: Mapa do estado de Minas Gerais mostrando todas as áreas amostradas no estudo e o número de granjas selecionadas em cada área. 1= Região Metropolitana de Belo

Horizonte; 2= Zona da Mata; 3= Sul/Sudoeste; 4= Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba. N= número de granjas amostradas em cada área	67
Figura 19: Perfis sorológicos para o vírus H1N1pdm09 de todas as granjas estudadas, organizados por mesorregião, em Minas Gerais. Valores estão demonstrados como média dos títulos de anticorpos transformados em log2. Barras verticais indicam o erro padrão. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal.....	69
Figura 20: Distribuição de anticorpos anti-H1N1pdm09 em todas as quatro mesorregiões estudadas no estado de Minas Gerais de acordo com as categorias do ciclo de produção.	70
Figura 21: Distribuição de anticorpos anti-H3N2 nas granjas soropositivas de acordo com as categorias do ciclo de produção.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais vacinas contra influenza suína comercializadas na América do Norte, Europa e Brasil.....	28
Tabela 2: Relação de amostras de suabe nasal e fluido oral positivos nos testes de subtipagem, isolamento viral e sequenciamento completo do genoma provenientes das quatro granjas do Meio-Oeste dos Estados Unidos.....	59
Tabela 3: Caracterização dos oito segmentos genéticos do vírus da influenza provenientes do sequenciamento completo das duas amostras de suabe nasal isoladas da G2.	60
Tabela 4: Percentual de soropositividade para H1N1pdm09 e H3N2 nos rebanhos e animais amostrados em todas as áreas estudadas em Minas Gerais, Brasil.....	68

ANEXOS

Anexo 1: Distribuição de anticorpos contra os antígenos da vacina de subunidade autógena no soro de porcas amostradas durante o estudo realizado nas quatro granjas selecionadas no Meio-oeste dos Estados Unidos.	90
Anexo 2: Distribuição de anticorpos contra os antígenos da vacina de subunidade autógena no soro de leitões lactentes amostrados durante o estudo realizado nas quatro granjas selecionadas no Meio-oeste dos Estados Unidos	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC – citotoxicidade celular dependente de anticorpos
BSA – albumina sérica bovina
cH1N1 – vírus H1N1 clássico
ECP – efeito citopático
ELISA – ensaio de imunoadsorção ligada à enzima
FAO – Organização Mundial das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
H1N1pdm09 – vírus pandêmico H1N1
HA – hemaglutinina
HI – inibição da hemaglutinação
IAV- vírus da influenza A
IFN- α – interferon alfa
M1 – proteína da matriz 1
MDCK – células Madin- Darby de rim canino
MEM – meio mínimo essencial
MHC – complexo de histocompatibilidade
NA - neuraminidase
NeuAc – ácido siálico N-acetilneuramínico
NS – proteína viral não estrutural
OFFLU – rede de vigilância da influenza
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
ORF- janela aberta de leitura
PA – polimerase ácida
PAMPs – padrões moleculares associados ao patógeno
PEDV – vírus da diarreia epidêmica suína
PB1 – polimerase básica 1
PB2 – polimerase básica 2
PCV2 – Circovírus Suíno tipo 2
PRCV – Coronavírus Respiratório Suíno
PRRs – receptores de reconhecimento padrão
PRRSV – vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína
RNP – complexo ribonucleoproteína
RT PCR – transcrição reversa em cadeia da polimerase
SIAV – vírus da influenza A em suínos
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
UHA – unidades hemaglutinantes
VAERD – exacerbação da doença respiratória associada à vacinação
VSA – vacina de subunidade autógena

RESUMO

Nos EUA, os subtipos predominantes do vírus da influenza suína (SIAV) são H1N1, H3N2 e H1N2. No Brasil, após a pandemia de 2009, estudos sorológicos demonstraram a circulação do H1N1 pandêmico (H1N1pdm09), H3N2 e H1N2. Os objetivos deste trabalho foram detectar a presença de anticorpos contra influenza A em suínos em granjas no Brasil e Estados Unidos e detectar subtipos do vírus influenza em populações de leitões lactentes e de creche em granjas vacinadas nos Estados Unidos. Trinta granjas de ciclo completo em Minas Gerais, Brasil, foram selecionadas para a avaliação do perfil sorológico contra H1N109 e H3N2. Quatro granjas do mesmo sistema de produção do Meio-Oeste dos Estados Unidos com rebanho reprodutivo vacinado contra influenza foram selecionadas e amostras de soro de 135 leitões com 12-17 dias de idade e das porcas correspondentes a estes leitões foram coletadas. As amostras foram submetidas à detecção de anticorpos contra a nucleoproteína viral e contra os antígenos da vacina utilizada nas granjas. Suabe nasal dos mesmos leitões amostrados na maternidade e de fluido oral do mesmo grupo de leitões após transferência para a creche foram coletadas para a detecção dos subtipos virais. O percentual de leitões e porcas soronegativas variou independente do uso da vacinação. No Brasil, 26.23% e 1.57% dos animais foram soropositivos para H1N1pdm09 e H3N2, respectivamente, sugerindo circulação viral nas granjas estudadas. Os subtipos H1N2 e H3N2 foram detectados em amostras de suabe nasal e fluido oral dos leitões das granjas nos Estados Unidos e vírus H1N2 similar ao da amostra vacinal foi isolado em uma granja com sintomatologia clínica.

Palavras- chave: influenza A, suíno, anticorpos, subtipos virais

ABSTRACT

In United States, prevalent subtypes of swine influenza A virus (SIAV) include H1N1, H3N2 e H1N2. In Brazil, after H1N1 pandemic outbreak in 2009, serological studies demonstrated circulation of H1N1pdm09, H3N2 and H1N2. The objectives of this study were to detect the presence of antibodies against influenza A in pigs from farms in Brazil and in United States and to detect the presence of influenza virus in nursing and nursery piglets in vaccinated farms in United States. Thirty farrow-to-finish farms from Minas Gerais state, Brazil, were selected to the serological profile evaluation for H1N1 and H3N2 viruses. Four farms from the same production system in Midwest United States with breeding herds vaccinated against influenza were selected and 135 serum samples were collected from 12-17 days old piglets and from all dams corresponding with the piglets. Serum samples were submitted to detection of antibodies against virus nucleoprotein and against virus strains from the vaccine used in the farms. Nasal swabs from the same nursing piglets and oral fluid from the same group of piglets after transfer to nursery age were collected to detect influenza virus and different subtypes circulating in these ages. Percentage of seronegative piglets and dams varied despite of the vaccination. In Brazil, 26.23% and 1.57% of the animals were seropositive to H1N1pdm09 and H3N2 viruses, respectively, suggesting virus circulation in the farms. H1N2 and H3N2 subtypes were detected in nasal swabs and oral fluid samples from farms in United States. H1N2 virus similar to the vaccine strain virus was isolated from one farm with influenza clinical disease.

Keywords: influenza A, swine, antibodies, viral subtypes

INTRODUÇÃO

A influenza é uma zoonose que afeta uma grande variedade de espécies, incluindo humanos, aves, suínos, equinos e mamíferos aquáticos e gera problemas econômicos para a saúde pública e animal. Por ter um genoma segmentado e por apresentar duas importantes proteínas de superfície hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) que participam do processo de mutação e variabilidade genética, o vírus da influenza pode sofrer mudanças que podem gerar novas amostras ou subtipos virais, fato que pode resultar na ocorrência de epidemias.

O vírus da influenza A em suínos (SIAV) é mundialmente disseminado e diversos subtipos virais circulam em diferentes países. Nos EUA, os subtipos predominantes são o H1N1, H3N2 e H1N2. No Brasil, após a pandemia de 2009, alguns estudos elucidaram os subtipos virais circulantes no país e demonstraram a circulação do H1N1 pandêmico (H1N1pdm09), H1N1 clássico, H3N2 e H1N2.

A produção de suínos é um segmento importante no âmbito agropecuário mundial e tem um papel relevante na economia de diversos países. Sistemas de produção de suínos podem ser do tipo ciclo completo, no qual o animal permanece durante todo o ciclo de produção, desde a cria até a terminação, unidades produtoras de leitão (UPL), que se destinam fase de criação de leitões e já os vende desmamados para a terminação ou unidades de terminação (UT), que fazem a terminação dos suínos até que estes estejam prontos para o abate. De uma forma geral, todos os sistemas de produção são caracterizados por elevada densidade animal, o que facilita a transmissão de doenças entre os animais. Assim, o controle e a prevenção de doenças nos rebanhos suínos são de extrema importância, pois minimizam os prejuízos econômicos e a disseminação de agentes com potencial zoonótico. O suíno tem importante papel na epidemiologia da influenza, pois pode se infectar com vírus de origem humana e aviária, atuando como hospedeiro intermediário na transmissão viral e facilitando a formação de novas amostras virais que podem causar epidemias.

A vacinação é uma medida de controle para a influenza amplamente utilizada em diversos países e, diante da grande variabilidade de amostras virais circulantes, a composição das vacinas pode variar por região geográfica. Na tentativa de monitorar as amostras do vírus da influenza circulantes e definir aquelas que fornecem maior proteção vacinal, formou-se uma rede de vigilância mundial para a influenza (OFFLU) por meio de uma parceria entre a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e a Organização Mundial das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO). Diante da escassez de informações sobre o tema no Brasil, a inclusão de um representante brasileiro na OFFLU pode ampliar a oportunidade de um melhor conhecimento a respeito da epidemiologia do vírus por meio de troca de informações e treinamento de profissionais que possam trabalhar na prevenção, controle e diagnóstico da influenza suína no Brasil.

OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais desse estudo foram:

- Detectar a presença de anticorpos contra a influenza em suínos em granjas no Brasil e nos Estados Unidos
- Detectar a presença do vírus da influenza em populações de leitões lactentes e de creche em granjas que utilizam a vacinação como medida de controle da influenza.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Etiologia

Os vírus da influenza pertencem à família *Orthomixoviridae*, que é composta por seis gêneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus*, *Quarantavirus* e *Isavirus* (ICTV, 2014). Os vírus dos gêneros *Influenzavirus A*, *B* e *C* são diferenciados entre si com base nas diferenças antigênicas encontradas nas proteínas do nucleocapsídeo e da matriz (Cox et al., 2004). Além disso, outros fatores como as espécies naturalmente infectadas por cada gênero, a variabilidade na sequência de aminoácidos das glicoproteínas de superfície, fatores morfológicos, mecanismos relacionados à codificação de proteínas e o número de segmentos do genoma também são importantes características que distinguem os três gêneros (Lamb e Krug, 2001). De forma geral, os vírus influenza A (IAV) infectam uma variedade de animais, incluindo humanos, suínos, equinos, mamíferos aquáticos e aves (Webster et al., 1992). Estudos recentes isolaram o vírus influenza em morcegos na América Central e América do Sul, sugerindo que esses animais possam atuar como carreadores do vírus (Tong et al., 2013). Por outro lado, vírus da influenza B são patógenos primários de humanos e vírus da influenza C foram isolados principalmente de humanos, e em alguns casos, de suínos (Lamb e Krug, 2001).

Os vírus influenza A são divididos em subtipos de acordo com a natureza antigênica das suas glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Estudos anteriores relatavam a existência de 16 HA e nove NA antigenicamente diferentes (Van Reeth, 2007). No entanto, um estudo identificou os subtipos H17 e N10 em morcegos na América Central (Tong et al., 2012) e recentemente, os subtipos H18 e N11 foram identificados, também em morcegos, no Peru (Tong et al., 2013), totalizando então, 18 subtipos de HA e 11 subtipos de NA.

O vírus da influenza A possui genoma segmentado composto por RNA fita simples senso negativo. Vírus influenza A e B possuem o genoma com oito segmentos (Ritchey et al., 1976) enquanto que o genoma do vírus da influenza C apresentam somente sete segmentos de RNA (Lamb e Krug, 2001). A partícula viral é pleomórfica, podendo ser encontrada na forma esférica ou filamentosa. Os vírus isolados de humanos e animais geralmente apresentam partícula filamentosa de diâmetro uniforme (diâmetro ~ 80nm), mas após o cultivo em laboratório a forma viral esférica (diâmetro de 80-120 nm) é mais comumente observada (Chopin et al., 1960).

O envelope lipídico viral é proveniente da membrana plasmática da célula hospedeira e logo abaixo dele, encontra-se a proteína da matriz 1 (M1), que é a proteína viral mais abundante (Figura 1). As glicoproteínas de superfície HA e NA se projetam do envelope lipídico (Lamb e Krug, 2001) e são os principais alvos da resposta imune do hospedeiro (Vincent et al., 2008). O terceiro componente do complexo glicoproteico da partícula do vírus da influenza é a proteína da matriz 2 (M2), que serve como canal de cálcio (Wang et al., 1993). Moléculas de nucleoproteína (NP) envolvem e protegem o RNA viral formando o complexo ribonucleoproteína (RNP) (Nayak, et al. 2004). Associado ao RNP está o complexo RNA polimerase, que consiste em três polimerases (polimerase básica 1 - PB1, polimerase básica 2 - PB2 e polimerase ácida - PA) (Lamb e Krug, 2001).

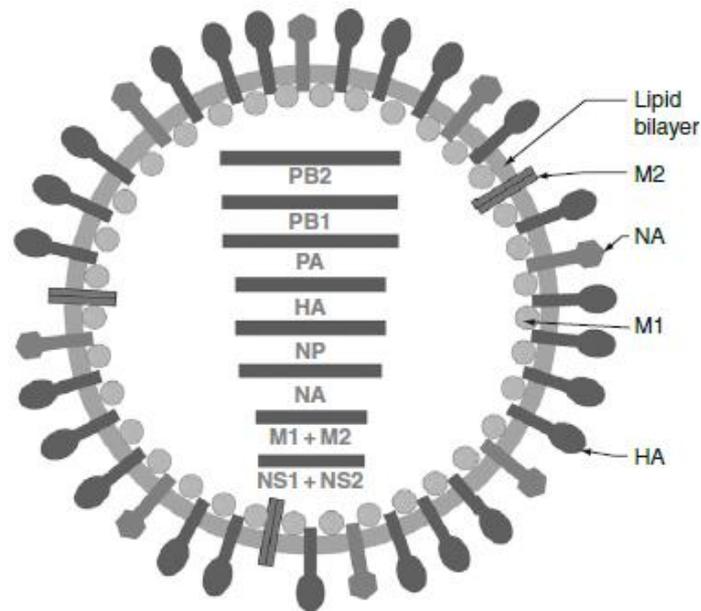


Figura 1: Diagrama do vírus da influenza A com o envelope viral e os oito segmentos de RNA. M1: matriz 1; M2: matriz 2; HA: hemaglutinina; NA: neuraminidase. Fonte: Vincent et al., 2008.

Os oito segmentos do vírus influenza A codificam entre 10 e 11 proteínas. Os segmentos 1, 2 e 3, os três maiores segmentos virais, codificam as proteínas PB2, PB1 e PA, respectivamente. PB2 é importante no início da transcrição do RNA viral (vRNA) enquanto que a PB1 atua na extensão do vRNA (Webster et al., 1992). Em alguns casos, o segmento 2 codifica uma segunda proteína chamada PB1-F2 (Conenelo e Palese, 2007). Já a proteína PA está relacionada à replicação do vRNA. PB1, PB2 e PA são sintetizadas no núcleo das células infectadas (Webster et al., 1992). O segmento 5 codifica a nucleoproteína, considerada a maior proteína estrutural que interage com os segmentos de RNA para formar o complexo RNP. Esta proteína é diferente entre os vírus influenza A, B e C (Lamb e Krug, 2001). O segmento 7 codifica as proteínas M1 e M2 e o segmento 8 codifica as proteínas NS1 e NS2. A NS1 tem importante atuação no transporte, montagem e tradução do RNA enquanto que a NS2 é uma proteína de exportação nuclear do vRNA (Webster et al., 1992).

As glicoproteínas HA e NA são as principais proteínas de superfície do vírus da influenza (Vincent et al., 2008). A hemaglutinina é codificada pelo quarto segmento de RNA viral e é sintetizada nos ribossomos ligados à membrana. A origem do seu nome pode ser explicada pela habilidade do vírus em aglutinar eritrócitos pela ligação aos receptores de ácido siálico presentes na superfície dessas células (Lamb e Krug, 2001). Da mesma forma, a HA se liga aos receptores de ácido siálico presentes nas células do trato respiratório do hospedeiro, mediando a fusão do envelope viral à membrana celular (Skehel e Wiley, 2000). A síntese da HA nas células ocorre a partir de uma molécula polipeptídica precursora, a HA0. Para que haja a adequada infectividade e patogenicidade viral, é importante que ocorra a clivagem da HA0, que é mediada por proteases produzidas pelo hospedeiro (Webster et al., 1992). Desta forma, a HA0 é clivada em duas subunidades, a HA1 e HA2, que são conectadas por ligações dissulfeto. A liberação da HA2 é um evento chave neste processo, pois a fusão do vírus à célula do

hospedeiro é mediada pela região amino terminal livre desta fração. A existência de um ambiente com o pH ácido (5 – 5.5) estimula mudanças conformacionais irreversíveis na HA2, permitindo assim que ocorra a fusão das membranas do vírus e da célula hospedeira, liberando o genoma viral no citoplasma para iniciar o processo de replicação (Rumschlag-Boom e Rong, 2013).

O segmento 6 do vírus da influenza dá origem à NA, que é a segunda maior proteína de superfície viral. Esta proteína cliva o ácido siálico terminal das superfícies da célula hospedeira e do vírus, permitindo a liberação da progênie da célula hospedeira, iniciando a disseminação viral (Matrosovich et al., 2004). A NA também cliva receptores presentes na mucina, auxiliando na penetração na célula hospedeira no trato respiratório (Lamb e Krug, 2001). Assim como a HA, a NA sofre constantes variações antigênicas.

Os vírus da influenza são os únicos entre os vírus respiratórios que são capazes de sofrer variações antigênicas. Estes vírus estão continuamente sofrendo mudanças antigênicas para escapar dos mecanismos de imunidade do hospedeiro. As duas glicoproteínas de superfície (HA e NA) podem sofrer dois tipos de variações conhecidas como *antigenic drift* (ou mutação pontual) e *antigenic shift* (ou rearranjo). O *antigenic drift* resulta do acúmulo de mutações pontuais em decorrência da reduzida fidelidade da RNA polimerase e de sua baixa habilidade em corrigir erros (Hampson, 2002). Essas mutações ocorrem com maior frequência em genes que codificam as glicoproteínas de superfície (HA e NA) e muitas vezes resultam da pressão de seleção imposta pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (Cox et al., 2004). No caso do *antigenic shift*, ocorre a troca de segmentos de diferentes vírus em uma célula infectada com dois ou mais vírus resultando em grande variação das glicoproteínas HA e NA. Tal rearranjo pode levar à formação de novos subtipos virais e introduzir novas amostras em populações não imunes (Cox et al., 2004).

Outro evento de variação genética que pode ocorrer nos vírus da influenza é a recombinação, que pode gerar novas amostras virais por meio da troca de informação genética, fato que comumente ocorre quando a polimerase muda o molde ou quando segmentos de ácido nucléico são quebrados e reunidos. Em geral, a recombinação é mascarada pela baixa atividade biológica dos vírus recombinantes, mas em casos de pressão seletiva, podem resultar em vantagem para a linhagem recombinante (Pasick et al., 2005).

1.2. Epidemiologia

A influenza suína é uma doença com distribuição mundial e seu surgimento nos rebanhos é comumente associado ao movimento de animais provenientes de rebanhos infectados, como por exemplo, pela introdução de fêmeas de reposição (Easterday e Van Reeth, 1999). Em suínos, a doença é caracterizada por surtos explosivos de doença respiratória, com alta morbidade (podendo atingir 100%) e baixa mortalidade (inferior a 1%). As infecções pelo vírus da influenza manifestam-se na forma de doença respiratória aguda (Richt et al., 2003) e apesar da severidade da doença ser afetada por diversos fatores, incluindo a amostra viral circulante, seu início é tipicamente repentino. O período de incubação varia entre um e três dias e a recuperação geralmente ocorre entre quatro a sete dias pós-infecção. (Vincent et al., 2008). A secreção nasal de animais infectados é a principal via de eliminação do vírus e a transmissão ocorre pela via naso-faríngeal. O vírus pode ser detectado em secreções nasais um a três dias após a infecção e sua excreção geralmente dura cinco a sete dias (Janke, 2013). A transmissão ocorre pelo contato direto entre animais sadios e infectados e pelo contato indireto entre animais

e objetos e superfícies contaminadas com o vírus (Bridges et al., 2003). No entanto, a transmissão por aerossóis também é considerada uma rota de transmissão da influenza (Corzo et al., 2013). O vírus pode permanecer viável por oito a 10 horas em superfícies porosas e por até 48 horas em superfícies não porosas e nas mãos (Bean et al., 1982). Já em aerossóis, pode permanecer viável por até 24 horas em ambiente com umidade relativa do ar baixa (Brankston et al., 2007). Além disso, SIAV tem grande habilidade em persistir na forma endêmica em granjas de ciclo completo, fazendo com que todos os suínos do plantel sejam infectados em alguma fase da vida dentro do sistema de produção (Rose et al., 2013).

Surto da doença geralmente ocorrem durante o inverno em países do hemisfério Norte e entre os meses de maio e setembro em países do hemisfério Sul (Cox et al., 2004). No entanto, a doença pode ocorrer durante o ano todo em regiões onde haja grande variação térmica diária (Caron et al., 2010). A prevalência e a distribuição dos vírus e dos subtipos são diferentes em diferentes partes do mundo e pode haver diferenças regionais dentro de um mesmo país ou continente (Cox et al., 2004).

O IAV pode infectar uma grande variedade de espécies incluindo humanos, suínos, equinos, mamíferos aquáticos e aves, e estudos filogenéticos revelam linhagens espécie-específicas e demonstram que a prevalência de transmissão entre espécies depende de cada espécie em questão (Webster et al., 1992). Vírus influenza aviários não replicam eficientemente em humanos (Beare e Webster, 1991), enquanto que vírus influenza humanos não replicam eficientemente em aves (Hinshaw *et al.*, 1983). Os vírus influenza A apresentam afinidade da glicoproteína HA com receptores de ácido siálico distintos. Desta forma, vírus humanos reconhecem preferencialmente receptores de ácido siálico N-acetilneuramínicos (NeuAc) ligados à galactose por uma ligação do tipo $\alpha 2,6$ (NeuAc $\alpha 2,6$ Gal), pois as células epiteliais da traqueia humana possuem receptores com ligação do tipo NeuAc $\alpha 2,6$ Gal (Couceiro *et al.*, 1993), enquanto que vírus aviários e equinos geralmente reconhecem receptores de ácido siálico com ligação $\alpha 2,3$ (NeuAc $\alpha 2,3$ Gal) (Ito, 2000; Gambaryan et al., 2005), uma vez que células da traqueia de cavalos e do cólon de patos possuem receptores com esse tipo de ligação (Ito, 2000). Os suínos apresentam ambos os receptores em seu epitélio respiratório (Gambaryan et al., 2005). Portanto o suíno é suscetível à infecção com vírus humanos e aviários e pode servir de hospedeiro intermediário ou “sítio de mistura” (*mixing vessel*) para esses patógenos (Ito e Kawaoka, 2000; Ma et al., 2009). No entanto, os receptores de ácido siálico parecem estar distribuídos de forma irregular no trato respiratório dos suínos, com receptores NeuAc $\alpha 2,3$ Gal presentes em menor abundância no trato superior, o que leva à pior replicação de vírus aviários nas traqueia e fossas nasais de suínos, dificultando a transmissão de vírus aviários entre suínos (Lipatov et al., 2008; Van Poucke et al., 2010). Apesar de humanos possuírem os dois tipos de receptores de ácido siálico no trato respiratório e, portanto serem alvo da infecção por vírus aviários, a distribuição destes receptores nas vias aéreas provavelmente contribui para a ineficiente transmissão do vírus aviário entre humanos (Shinya et al., 2006).

O primeiro relato de infecção pelo SIAV em suínos ocorreu durante a pandemia em 1918, conhecida como *Gripe Espanhola*, quando um surto de doença respiratória aguda, semelhante ao observado em humanos no mesmo período, acometeu suínos do Meio-Oeste dos Estados Unidos (Koen, 1919). A etiologia infecciosa deste vírus foi confirmada em 1930, quando se observou que o vírus presente em secreções de animais doentes era capaz de causar doença respiratória em animais sadios (Shope, 1930). Mais tarde, estudos moleculares confirmaram que o vírus responsável pela pandemia em humanos em 1918 era antigênica e geneticamente semelhante ao vírus encontrado em suínos (Shope e Francis, 1936).

Três diferentes subtipos do SIAV (H1N1, H1N2 e H3N2) circulam na população de suínos em todo o mundo e, ao contrário do que ocorre com vírus influenza de humanos, os vírus suínos têm origem e caracterização distinta nos diferentes continentes (Vincent et al., 2008). Na América do Norte, a linhagem suína clássica do H1N1 (cH1N1) semelhante ao vírus da pandemia de 1918 permaneceu relativamente estável antigênica e geneticamente por aproximadamente 80 anos (Vincent et al., 2014). Uma grande mudança na epidemiologia da influenza na América do Norte ocorreu a partir de 1998, com o surgimento de um novo vírus do subtipo H3N2 de triplo rearranjo contendo genes do vírus humano (HA, NA, PB1), suíno cH1N1 (NS, NP, M) e aviário (PB2, PA) (Zhou et al., 1999). Outro vírus do subtipo H3N2, porém com rearranjo duplo, também surgiu no final da década de 90, mas somente o vírus de rearranjo triplo se estabeleceu na população de suínos (Webby et al., 2000). A combinação de genes internos de rearranjo passou a ser denominado TRIG (Vincent et al., 2008), e a co-circulação e subsequente rearranjo entre o H3N2 e o cH1N1 levou ao surgimento de novos subtipos H1N1 e H1N2 (Karasin et al., 2002; Webby et al., 2004). Atualmente, a maioria dos vírus suínos caracterizados na América do Norte contém diferentes combinações de HA e NA, combinados com genes internos do vírus TRIG (Lorusso et al., 2011). Além disso, desde 2005, vírus H1N1 e H1N2 com HA e/ou NA derivadas de vírus influenza sazonais humanos emergiram em rebanhos suínos dos Estados Unidos. (Vincent et al., 2009). Para representar a evolução dos vírus suínos atualmente circulantes na América do Norte, foi estabelecida uma classificação em *clusters* com base no gene da HA (Vincent et al., 2014). Vírus com gene da HA que evoluíram do cH1N1 são classificados como α , β e γ *clusters*, enquanto que subtipos H1 com genes de origem que circularam após o ano 2000 são classificados como *cluster* δ (Vincent et al., 2009). Os clusters H1 podem ser encontrados com as neuraminidases dos subtipos N1 ou N2 (Vincent et al., 2014). Por outro lado, vírus do subtipo H3N2 podem ser classificados dentro dos *clusters* I, II III e IV (Richt et al., 2003), sendo este último o predominante nas população de suínos da América do Norte (Zoetis, 2012). Atualmente, vírus do subtipo H3 *cluster* IV são ainda subdivididos em clusters emergentes que variam de A até F (Anderson et al., 2013).

A epidemiologia dos vírus influenza na Europa é diferente de outras partes do mundo e análises de todas as linhagens estáveis em suínos revelam que estes vírus são originados de linhagens aviárias e humanas (Brown, 2013). Os H1N1 circulantes são de origem aviária e foram introduzidos na população suína por patos selvagens em 1979 (Pensaert et al., 1981) e o H3N2, introduzido na década de 80, com todos os segmentos originados de vírus humano (Castrucci et al., 1993). Um estudo recente de vigilância relatou a presença do H1N1 aviário, H3N2 humano e H1N2 humano em rebanhos suínos da Bélgica, Itália, Espanha, mas somente os vírus H1N1 e H1N2 foram encontrados no Reino Unido e França (Kyriakis et al., 2011). Essa linhagem inicial do H3N2 suíno circulou no continente Europeu até a década seguinte, mas a partir daí a linhagem originada do rearranjo entre o vírus tipo humano H3N2 (HA e NA) com o vírus H1N1 tipo aviário (proteínas internas e não estruturais) passou a ser predominante (Jong et al., 2007). O vírus H1N2 contendo genes de origem humana (HA e NA) e derivados do vírus Europeu tipo aviário H1N1 emergiu no Reino Unido no início dos anos 90 e se tornou endêmico nos suínos da Europa (Lam et al., 2008).

Na Ásia, o cH1N1 foi detectado pela primeira vez na China em 1974 e permanece enzoótico nesse país, co-circulando com vírus H1N2 (N2 de origem humana). Vírus H3N2 humanos foram transmitidos diversas vezes para suínos e circularam em rebanhos muito tempo após a linhagem humana ser substituída na população (Peiris et al., 2001). Vírus H1N1 aviários foram

detectados em suínos da China em 1993, mas estes não descenderam dos vírus H1N1 aviários da linhagem Europa/Ásia, representando provavelmente uma transmissão entre espécies de reservatórios aviários da Ásia para suínos (Guan et al., 1996). Vírus H3N2 e H1N1 são encontrados em suínos na Tailândia desde o começo da década de 1980 (Nerome et al., 1982). De uma forma geral, esses vírus que circulam na Tailândia são relacionados a linhagens do H3N2 e H1N1 encontrados na Europa e ao cH1N1 (Vincent et al., 2014). No Vietnã, vírus H3N2 rearranjados com o TRIG da América do Norte já foram identificados em suínos. O H3 e o N2 foram adquiridos através do rearranjo com vírus humanos sazonais circulantes em humanos entre 2004 e 2006 (Ngo et al., 2012). Na Coreia do Sul, além da linhagem H3N2 humana (diferente da linhagem que circula na China e Vietnã), o cH1N1 e linhagens do H1N2 e H3N2 contendo o gene TRIG da América do Norte co-circulam neste país (Lee et al., 2008).

Na América do Sul, a Argentina detectou a presença de linhagens humanas dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 (Cappuccio et al., 2011; Pereda et al., 2011). Em 2009 e 2010, vírus com genes internos do H1N1pdm09 e genes de superfície do vírus humano da América do Norte foram isolados em rebanhos argentinos (Pereda et al., 2011). No Brasil, o primeiro isolamento do SIAV em suínos ocorreu em 1974 (Cunha et al., 1978). Estudos sorológicos realizados em 10 estados brasileiros identificaram em suínos anticorpos contra vírus humanos H3N2 e H1N1 humano e suíno (Brentano et al. 2002). Elevadas prevalências para anticorpos contra os subtipos H1N1 e H3N2 foram encontradas em suínos do estado de São Paulo, onde o vírus também foi isolado (Mancini et al., 2006). Um estudo realizado em granjas do Paraná observou que 46% das granjas foram consideradas positivas para SIAV, com uma prevalência de anticorpos contra o subtipo H3N2 de 20% (Caron et al., 2010). H1N1pdm09 foi isolado de suínos provenientes de uma granja com surto respiratório em Santa Catarina (Schaefer et al, 2011) e a partir daí, outros estudos também revelaram a circulação do vírus pandêmico nos estados de MG, SP, PR, RS e MT nos anos de 2009-2010 em granjas com surto de doença respiratória (Rajão et al., 2013b). Um estudo sorológico realizado após a pandemia do H1N1 em 2009 também detectou anticorpos contra cH1N1, H3N2 suíno e H1N1 humano em rebanhos de suínos no Brasil (Rajão et al, 2013a). Vírus da influenza foi detectado em amostras de suabes nasais e fragmentos de pulmão de suínos, e análises filogenéticas dos isolados sugeriram a presença dos vírus H1N1pdm09 e do H1N2 com rearranjo entre segmentos do vírus humano e do vírus pandêmico de 2009 (Biondo et al., 2014; Schaefer et al., 2015).

O primeiro caso de surto de influenza causado pelo H1N1pdm09 ocorreu no Canadá em abril de 2009 (Howden et al., 2009) e, a partir daí, entre abril de 2009 a setembro de 2010, um total de 25 países relataram a ocorrência do vírus à OIE (Vincent et al., 2014). Este novo vírus se disseminou rapidamente na população humana, fazendo com que a Organização Mundial de Saúde declarasse em junho do mesmo ano, que o surto atingiu a fase de pandemia 6. O vírus H1N1pdm09 possui um genoma único contendo seis genes (PB2, PB1, PA, HA, NP e NS) derivados do SIAV de linhagem suína com rearranjo triplo da América do Norte e dois genes (M e NA) derivados de linhagens do vírus influenza suína da Eurásia (Dawood et al., 2009). Os surtos inicialmente documentados em suínos foram precedidos por relatos de doença semelhante à influenza em humanos (Dawood et al., 2009) e o rápido aspecto global em suínos pode ser atribuído pela disseminação via humanos (Vincent et al., 2014).

O vírus H1N1pdm09 replica de forma muito eficiente no trato respiratório inferior e superior de suínos experimentalmente infectados, causando doença clínica semelhante àquela causada por SIAV enzoóticos (Vincent et al., 2010). Suínos infectados pelo H1N1pdm09 apresentam sinais clínicos e lesões pulmonares semelhantes aos observados na infecção pelo SIAV sazonal

(Pereda et al., 2010) e a resposta imune gerada por exposição prévia a vírus endêmicos resulta apenas em proteção parcial contra o vírus pandêmico (Vincent et al., 2010). Animais infectados pelo H1N1pdm09 normalmente apresentam eliminação viral nas secreções respiratórias durante 11 a 20 dias, período mais prolongado quando comparado à infecção pelo vírus influenza suíno sazonal (Pereda et al., 2010).

1.3. Patogenia

A infecção pelo SIAV geralmente se limita ao trato respiratório e a viremia só foi detectada em casos raros em animais um a três dias após a inoculação (Brown et al., 1993). A replicação viral ocorre geralmente em células da mucosa nasal, tonsila, traqueia, linfonodos traqueo-bronquiais e pulmões (Nayak et al., 1965) e a replicação fora do trato respiratório geralmente não acontece de forma bem sucedida.

Após a inoculação intra-traqueal, os títulos virais nos pulmões podem ser maiores do que 10^8 EID₅₀/grama de tecido (Haesebrouck e Pensaert 1986). A quantidade de vírus que alcança as vias aéreas mais profundas e a produção de vírus infectante nos pulmões determina a severidade da doença. Estudos mostram que a inoculação de elevadas quantidades de vírus pela via nasal em suínos na fase de engorda resultou em infecção subclínica, enquanto que a inoculação intra-traqueal da mesma quantidade e do mesmo vírus produziu sinais típicos da doença em aproximadamente 24 horas (Maes et al., 1984). O SIAV tem grande tropismo e se replica rapidamente no epitélio bronquiolar (Nayak et al., 1965, Brown et al., 1993) e não existe relato de replicação viral em diferentes locais no pulmão quando comparado com diferentes amostras virais (Nayak et al., 1995). A duração da infecção pelo SIAV é curta e o *clearance* viral é extremamente rápido. Não é possível detectar o vírus na secreção nasal e no pulmão sete dias após a infecção natural ou experimental (Brown et al., 1993; Jo et al., 2007).

Lesões celulares relacionadas ao SIAV são causadas pela apoptose desencadeada pela ação das proteínas NA e PB1 (Gibbs et al., 2003). No entanto, as citocinas pró-inflamatórias iniciais, produzidas por células não imunes no local da infecção durante a fase aguda, possuem papel fundamental no desenvolvimento da reação inflamatória local e de alguns sinais clínicos sistêmicos. Citocinas iniciais como o interferon- α (IFN- α), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e IL-6, têm sido associadas à ocorrência de febre, prostração e anorexia (Van Reeth, 2000, Jo et al., 2007). TNF- α e IL-1 estimulam moléculas quimioatrativas de neutrófilos e macrófagos, levando à rápida infiltração dessas células fagocíticas no trato respiratório (Ulich et al., 1991). As citocinas tardias são produzidas principalmente pelos linfócitos T após reconhecimento de antígenos, e são moduladores importantes da resposta imune específica (La Gruta et al., 2007). Apesar de participar do estímulo à resposta inflamatória, as citocinas iniciais e tardias também contribuem para a injúria pulmonar, causando aumento da permeabilidade vascular, hemorragia e edema (Ulich et al., 1991).

1.4. Sinais clínicos e lesões

Após um período de incubação de um a três dias, sinais clínicos incluindo anorexia, prostração, febre (40,5 a 41,7°C), apatia, inapetência podem ser visualizados, resultando em perda de peso significativa (Alexander e Brown, 2000). Os animais ainda podem apresentar dificuldade respiratória, com respiração predominantemente abdominal e com a boca aberta, principalmente quando forçados a movimentar (Richt et al., 2003). A movimentação animal pode ainda ser acompanhada de severos acessos de tosse, que assumem característica de “latido de cachorro” (Easterday e Van Reeth, 1999). Outros sinais como conjuntivite, rinite, descarga nasal e espirros

podem ocorrer em animais doentes. Acentuada perda de peso e fraqueza são sinais observados que estão diretamente relacionados à anorexia e inapetência. Em alguns casos, falhas reprodutivas incluindo aborto, natimortalidade, infertilidade e leitegadas pequenas podem ser observadas como consequência da infecção pelo SIAV (Wesley et al., 2004).

Geralmente, animais acometidos se recuperam entre cinco e sete dias após o início da doença e os surtos típicos da influenza suína são normalmente limitados a animais soronegativos, sem proteção imune contra o vírus (Easterday e Van Reeth, 1999). Em rebanhos de ciclo completo, a faixa etária frequentemente acometida é de animais de creche, recria e terminação (até 120 dias) (Loeffen et al., 2009).

Infecções subclínicas ocorrem frequentemente e são observadas pela elevada soroprevalência para os subtipos virais mesmo na ausência de doença respiratória significativa. Diversos fatores podem determinar o resultado clínico de uma infecção pelo vírus da influenza, dentre eles o estado imune, idade, pressão de infecção, infecções concomitantes, condições climáticas e alojamento (Easterday e Van Reeth, 1999).

Infecções concomitantes com outros agentes causadores de doenças respiratórias estão entre os maiores fatores que agravam a infecção pelo SIAV. Infecções secundárias por bactérias do trato respiratório como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Streptococcus suis* tipo 2 aumentam a severidade e o curso da infecção pelo vírus da influenza (Choi et al., 2003). A co-infecção com vírus respiratórios, como o Coronavírus Respiratório Suíno (PRCV), o Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2) ou o Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína (PRRSV), também pode agir como fator de complicação da influenza, aumentando o curso e a gravidade da doença (Choi et al., 2003).

Lesões características da infecção pelo vírus da influenza suína são associadas à pneumonia, com alterações geralmente limitadas aos lobos apical e cardíaco, apesar de mais da metade do pulmão poder ser acometida em casos de infecção severa. Pode-se observar uma linha bem demarcada entre o tecido pulmonar normal e o afetado, consolidação vermelho-escura, edema interlobular, vias aéreas repletas de sangue e exsudato fibrinoso e aumento de linfonodos bronquiais e mediastinais. Em casos mais graves, pode-se observar pleurite fibrinosa (Nayak et al., 1965; Easterday e Van Reeth, 1999).

As lesões microscópicas observadas nas infecções pelo SIAV incluem degeneração e necrose de epitélio de brônquios e bronquíolos, presença de exsudato contendo células descamadas e neutrófilos no lúmen de brônquios, bronquíolos e alvéolos, variável hipertermia com dilatação dos capilares e presença de infiltrado alveolar (linfócitos e histiócitos), atelectasia alveolar, pneumonia intersticial e enfisema (Easterday e Van Reeth, 1999).

1.5. Resposta Imune

A proteção contra a infecção pelo vírus da influenza envolve tanto a resposta imune humoral quanto a resposta imune celular. A combinação de anticorpos neutralizantes, resposta imune de mucosa e resposta mediada por células T são importantes para a proteção e recuperação da doença (Tamura et al., 2005). A resposta imune induzida pela infecção protege contra a reinfecção pelo mesmo vírus ou contra amostras virais antigenicamente semelhantes (Cox et al., 2004). No entanto, a infecção pelo vírus homólogos parece fornecer proteção somente parcial contra vírus heterólogos (Vincent et al., 2008).

A resposta imune inata atua na defesa contra o vírus da influenza e é formada por componentes que previnem a infecção do epitélio respiratório e controlam a replicação viral (Kreijtz et al., 2011). O sistema imune inato detecta infecções virais pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Os PAMPs estão presentes nos patógenos ou são gerados durante a infecção. A resposta inata reconhece o vírus da influenza por até três classes distintas de PRRs, que são responsáveis por detectar células infectadas, detectar o vírus no citosol das células infectadas e detectar o RNA que foi levado para o endossomo de células sentinelas (Iwasaki e Pillai, 2014). A sinalização dos receptores PRR leva à produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons (Lund et al., 2004). Os interferons têm alta atividade antiviral, inibem a síntese de proteína na célula hospedeira e limitam a replicação viral (Kreijtz et al., 2011). Na infecção viral ao nível de alvéolo, macrófagos alveolares são ativados e fagocitam células infectadas pelo vírus da influenza, limitando assim a disseminação viral (Kim et al., 2008). Por outro lado, uma vez que estes macrófagos são ativados nos pulmões durante uma infecção, eles produzem óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o que pode contribuir para a patogênese do vírus (Lin et al., 2008). Células dendríticas, situadas abaixo da barreira do epitélio das vias aéreas e sobre a membrana basal, monitoram o lúmen das vias aéreas e podem detectar vírions opsonizados e corpos apoptóticos de células infectadas. As células dendríticas também exercem atividade citolítica em uma infecção pelo vírus da influenza. Células *natural killer* reconhecem anticorpos ligados a células infectadas pelo vírus da influenza provocando a lise destas células, processo conhecido como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (Kreijtz et al., 2011).

A resposta imune adaptativa é essencial para a prevenção e recuperação da infecção pelo vírus da influenza. Todas as principais imunoglobulinas podem ser identificadas na infecção pelo SIAV em soro e lavado nasal e broncoalveolar de suínos (Murphy e Clements, 1989). O sistema imune humoral produz anticorpos contra diferentes IAV e os anticorpos específicos para a glicoproteína HA, que são capazes de inibir a hemaglutinação, são os mais importantes para a neutralização do vírus e prevenção da doença, e estão mais comumente relacionados com a proteção contra o vírus da influenza. Anticorpos específicos para a glicoproteína NA são menos efetivos na prevenção da infecção, mas reduzem a liberação do vírus das células infectadas (Cox et al., 2004). Além disso, anticorpos anti-NA facilitam a ocorrência da ADCC e contribuem para o *clearance* de células infectadas (Mozdzanowska et al., 1999). Anticorpos contra a nucleoproteína (NP) também podem contribuir para a proteção contra o vírus da influenza por meio da indução da lise de células infectadas mediada pelo complemento (Sambhara et al., 2001; Carragher et al., 2008). Anticorpos específicos para HA inibem a ligação e entrada do vírus na célula hospedeira, podendo também facilitar a fagocitose viral e mediar a ADCC (Kreijtz et al., 2011).

A proteção contra infecção viral parece estar diretamente relacionada com os títulos de anticorpos hemaglutinantes no soro dos animais, sendo que títulos elevados fornecem maior proteção quando comparados a baixos títulos (Vincent et al. 2008). Durante uma infecção primária, anticorpos inibidores da hemaglutinação podem ser detectados no soro entre 10 e 14 dias. As imunoglobulinas IgA e IgM atingem um pico após duas semanas e começam a declinar, enquanto níveis máximos da IgG são vistos entre quatro e seis semanas. Títulos consideráveis de anticorpos podem ser detectados até seis meses após a infecção (Easterday e Van Reeth, 1999). Secreções nasais contêm anticorpos neutralizantes para as glicoproteínas HA e NA e são inicialmente do tipo IgA (Mazanec et al., 1995). Durante infecção primária, IgA, IgM e IgG

podem ser detectados em lavados nasais, apesar de IgA e IgM serem mais frequentemente detectados do que IgG. A atuação local de IgA estimulada pela infecção natural dura pelo menos três a cinco meses (Murphy e Clements, 1989).

Anticorpos maternos do subtipo IgG protegem os pulmões contra a invasão e replicação viral, enquanto que IgA é importante na inibição da replicação viral nas vias aéreas superiores (Tomoda et al., 1995). Anticorpos maternos protegem leitões contra a doença clínica (Kitikoon et al., 2006), mas essa proteção é apenas parcial (Loeffen et al., 2003). Além disso, a transmissão viral pode ser reduzida, mas não prevenida, em suínos com anticorpos maternos homólogos quando comparada a suínos com anticorpos maternos heterólogos ou soronegativos (Allerson et al., 2013). A presença de anticorpos maternos no momento da vacinação pode reduzir a eficácia vacinal e a vacinação geralmente fornece melhor proteção do que anticorpos maternos adquiridos no colostro (Kitikoon et al., 2006).

A imunidade celular tem um importante papel na recuperação da infecção pelo vírus da influenza e na prevenção de complicações associadas à doença, mas não contribui para prevenir a infecção. A resposta citotóxica primária pode ser detectada no sangue entre seis e 14 dias e geralmente desaparece numa média de 21 dias após a infecção ou vacinação (Cox et al., 2004). Durante a infecção pelo vírus da influenza, células TCD4⁺, TCD8⁺ e células T regulatórias são ativadas. Células TCD4⁺ são ativadas após células apresentadoras de antígenos apresentarem o vírus da influenza e atuam na produção de interleucinas e IFN- γ por meio das células T *helper*. Células T regulatórias são responsáveis pela regulação da resposta imune frente à infecção pelo vírus da influenza e após a vacinação. Células TCD8⁺ são ativadas nos tecidos linfoides e recrutadas ao local da infecção para reconhecimento e eliminação do vírus da influenza em células infectadas, prevenindo assim a disseminação da progênie viral. A atividade lítica das células TCD8⁺ é mediada pela liberação de perforinas (atuam na permeabilização da membrana das células infectadas) e granzimas (entram na célula para induzir a apoptose) (Kreijtz et al., 2011).

1.6. Diagnóstico

Métodos rápidos, acurados e precisos para o diagnóstico da infecção pelo SIAV são necessários para vigilância de vírus emergentes, manejo de surtos, tratamentos antivirais, profilaxia e controle da infecção (Wang e Taubenberger, 2010). A suspeita da ocorrência da influenza suína deve ser considerada quando existir um surto de doença respiratória aguda acometendo a maioria ou todos os animais em um rebanho. Devido à semelhança nos sinais clínicos, a influenza suína deve ser diferenciada das outras doenças que compõem o complexo de doenças respiratórias em suínos. Isolamento viral, detecção de RNA e/ou proteínas virais e detecção de anticorpos específicos são as técnicas mais frequentemente utilizadas para o diagnóstico da influenza suína (Easterday e Van Reeth, 1999).

O SIAV pode ser isolado de animais vivos a partir de secreções nasais e faríngeas de animais na fase aguda da doença. Tecidos pulmonares de animais eutanasiados durante a fase aguda da doença também pode ser utilizados para o isolamento do SIAV. As amostras devem ser mantidas a 4°C se forem utilizadas em até 48 horas e a -80°C se forem estocadas por longos períodos. O estoque das amostras a -20°C não deve ser utilizada, pois o vírus não é estável a essa temperatura (OIE, 2010). O isolamento viral pode ser realizado em ovos embrionados ou em cultivo de células Madin- Darby de rim canino (MDCK). O isolamento em ovos embrionados, considerado como a técnica padrão para isolamento do SIAV, consiste na

inoculação da amostra na cavidade alantóide de ovos embrionados com 10 a 11 dias de incubação. Após um período de incubação dos ovos inoculados, o fluido alantóideo é coletado submetido à técnica de hemaglutinação para confirmar a presença de vírus hemaglutinante (Easterday e Van Reeth, 1999; Clavijo et al., 2002). O isolamento do SIAV em cultivo celular é amplamente utilizado e consiste na inoculação das amostras em monocamada confluyente de MDCK buscando a visualização de efeito citopático (ECP) causado pelo vírus. A confirmação da presença do vírus se dá pelo teste de hemaglutinação ou pelo teste de imunocitoquímica (Clavijo et al., 2002). A utilização de células MDCK para isolamento viral requer a adição de tripsina ao meio de cultura para que ocorra a clivagem da HA (Herman et al., 2005).

A utilização de técnicas moleculares para o diagnóstico da influenza vem crescendo nos últimos anos por serem rápidas, confiáveis e sensíveis. O desenvolvimento da transcrição reversa em cadeia da polimerase (RT-PCR) tem facilitado o rápido e acurado diagnóstico da infecção da influenza por detectar sequências genômicas do ácido nucléico viral de forma sensível e específica (Wang e Taubenberger, 2010). A utilização da RT-PCR em tempo real torna-se cada vez maior na detecção, diagnóstico e vigilância da influenza suína devido à sua grande sensibilidade e boa reprodutibilidade (Wang e Taubenberger, 2010). Neste sentido, amostras de fluido oral tem sido amplamente utilizadas para a detecção do SIAV por meio da RT-PCR de forma fácil, sensível e segura (Detmer et al., 2011). O uso da PCR multiplex tem se mostrado acurado e sensível para a tipagem e subtipagem do SIAV (Lee et al., 2008; Wang e Taubenberger, 2010).

O teste sorológico mais utilizado para a detecção pelo SIAV é a inibição da hemaglutinação (HI). A glicoproteína HA do envelope viral tem habilidade em aglutinar eritrócitos de diversas espécies e na presença de anticorpos específicos para a hemaglutinina pesquisada, a ligação HA-eritrócitos é inibida. Apesar de largamente utilizada, a HI apresenta problemas relacionados à presença de inibidores inespecíficos da hemaglutinação ou à ocorrência de alterações genéticas virais que podem comprometer o resultado do teste (Wood et al., 1994). Outros testes sorológicos que podem ser usados incluem a soro neutralização (SN) (Julkunen et al., 1985) e o ensaio de imunoadsorção ligada à enzima (ELISA) (Julkunen et al., 1985; Ciacci Zanela et al., 2010). Um teste ELISA comercial (AI- MS ELISA) foi desenvolvido e validado para a detecção de anticorpos contra influenza em aves. Tal teste usa anticorpo monoclonal gerado contra o subtipo H1N1 humano e reconhece um epítipo altamente conservado da nucleoproteína do vírus da Influenza A. A base do teste é a capacidade de anticorpos da amostra se ligarem e bloquearem um epítipo imunodominante conservado (nucleoproteína) e por isso, o ensaio não requer o uso de reagentes espécie-específicos. Desta forma, o uso do teste para espécie suína é mais um método de diagnóstico para a detecção de anticorpos contra o vírus da influenza, possibilitando de forma qualitativa a detecção de anticorpos contra vírus heterólogos (Ciacci Zanela et al., 2010).

Métodos adicionais de detecção do SIAV ou dos seus antígenos incluem a reação de imunofluorescência direta (IFD) e indireta (IFI) em tecido pulmonar, células nasotraqueais ou lavado broncoalveolar, além da imunohistoquímica (IHC) em tecidos fixados (Vincent et al., 1997). A imunofluorescência é um teste rápido, mas de custo elevado por exigir o uso de um microscópio de fluorescência (Selleck et al., 2003), enquanto que a IHC é um método rápido, de baixo custo, fácil execução, no qual o vírus pode ser visto em células epiteliais, macrófagos ou pneumócitos (Vincent et al., 1997).

1.7. Prevenção e controle

Medidas de prevenção da influenza suína envolvem biosseguridade, adequado manejo nutricional e ambiental e vacinação. Alguns fatores como a rápida variação na circulação viral quando comparada à atualização das vacinas, a necessidade de vacinas que induzam melhor proteção cruzada entre diferentes isolados do SIAV e a interferência de anticorpos passivos na eficácia das vacinas em suínos são considerados grandes problemas para a prevenção e controle da influenza (Vincent et al., 2008). Dentre as medidas de biosseguridade destacam-se a correta avaliação na introdução de novos animais nas granjas por meio de uma quarentena e do controle de origem desses animais, a limpeza e desinfecção das instalações antes da entrada de novos lotes, a adoção do vazio sanitário, a separação de animais doentes dos animais saudáveis, o controle no contato entre diferentes espécies, principalmente aves e humanos. No caso de humanos com sintomatologia sugestiva de influenza que trabalhem em granjas, é de extrema importância a suspensão do trabalho até a recuperação total, evitando assim a possível transmissão interespecie (Easterday e Van Reeth, 1999). Além disso, a vacinação de humanos é uma ferramenta importante na prevenção da doença nessa espécie. O tratamento de suínos doentes baseia-se no uso de anti-inflamatórios para a redução da febre e de outros sinais clínicos e de antibióticos para combater infecções secundárias (Hawkins, 2010).

A vacinação é o método mais utilizado no controle e prevenção da influenza suína em diversos países. A via de vacinação mais comum em suínos é a intramuscular (IM), que induz altos níveis de IgG específica no soro e no pulmão em dois a seis dias (Kothalawala et al., 2006). O protocolo de vacinação inclui a aplicação de duas doses em fêmeas reprodutoras, com intervalo de duas a quatro semanas entre cada dose (Easterday e Van Reeth, 1999). Vacinas comerciais inativadas são as únicas licenciadas e autorizadas para uso em suínos no mundo todo e estão disponíveis desde 1994 nos Estados Unidos (Vincent et al., 2008; Chen et al., 2012). Vacinas inativadas são geralmente produzidas por meio da propagação do vírus vivo em ovos embrionados, com posterior inativação utilizando formaldeído ou β -propiolactona (Cox et al., 2004). A resposta imune à vacinação com vacinas inativadas normalmente é do tipo humoral e celular (Platt et al., 2011). No entanto, essa resposta imune fornece fraca reação cruzada contra vírus heterólogos, ou seja, a proteção total só ocorre quando a proteína HA vacinal é semelhante à proteína HA viral que causa a infecção (Van Reeth et al., 2004; Platt et al., 2011). Além disso, o uso de vacinas inativadas em suínos está associado à doença respiratória exarcebada associada à vacinação (VAERD) que ocorre em suínos vacinados com vacinas inativadas e desafiados com vírus heterólogos, causando pneumonia broncointersticial severa com bronquiolite necrosante e maior percentual de consolidação pulmonar (Gauger et al., 2011; Gauger et al., 2012; Rajão et al., 2014).

Vacinas comerciais para suínos contra SIAV estão disponíveis em vários países. A grande variação genética e antigênica entre os vírus circulantes em diferentes regiões faz com que haja também uma variação na composição das vacinas, de forma a melhor atender cada uma dessas regiões (Tabela 1). Na Europa, vacinas contra SIAV são comercializadas na maioria dos países. A liberação para comercialização ocorreu em meados de 1980 e início de 1990, e as vacinas contêm basicamente os subtipos H1N1 e H3N2, que eram os subtipos prevalentes naquela época. As vacinas bivalentes comercializadas nessa época não sofreram nenhuma atualização até 2010, quando o subtipo H1N2 se disseminou em todo o continente europeu. Apesar da confirmação da circulação do H1N1pdm09 a partir de 2009 em suínos em diversos países da Europa, nenhuma vacina específica para o vírus foi licenciada no continente europeu (Van Reeth e Ma, 2012). Na América do Norte, uma vacina monovalente contendo o vírus cH1N1 foi

Tabela 1: Principais vacinas contra influenza suína comercializadas na América do Norte, Europa e Brasil.

	Fabricante	Nome do produto	Amostras virais	Adjuvante
América do Norte	Novartis/ Elanco	Pneumostar SIV	α - cluster H1N1, H3N2 cluster I	Immunstar®
	MSD	MaxiVac Excell 3.0	α - cluster H1N1, β - cluter H1N1, H3N2 cluster I	Emunade®
	MSD	MaxiVac Excell 5.0	β - cluter H1N1, γ - cluster H1N1, δ - cluster H1N1, H3N2 cluster I, H3N2 cluster IV	Emunade®
	Zoetis	FluSure Legacy	α - cluster H1N1, H3N2 cluster I	Amphigen®
	Zoetis	FluSure XP	γ - cluster H1N1, δ - cluster H1N1, H3N2 cluster IV	Amphigen®
	Zoetis	FluSure Pandemic	H1N1 pandêmico de 2009	Amphigen®
	Zoetis	FluSure XP	γ - cluster H1N1, δ 2- cluster H1N1, δ 1- cluster H1N2, H3N2 cluster IV	Amphigen®
Europa	Merial	Gripovac	A/New Jersey/8/76 (H1N1) A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	Oleoso
	Zoetis	Suvaxyn Flu	Sw/Netherlands/25/80 (H1N1) A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	Oleoso
	Hipra	Gripork	Sw/Olost/84 (H1N1) A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	Oleoso
	Impfstoffwerk Dessau-Tornau	Respipork Flu	Sw/ Belgium/230/92 (H1N1) Sw/ Belgium/220/92 (H3N2)	Hidróxido de alumínio
	Impfstoffwerk Dessau-Tornau	Respipork Flu3	Sw/Haselunne/2617/03 (H1N1) Sw/Bakum/1769/03 (H3N2) Sw/Bakum/1832/00 (H1N2)	Carbômero
Brasil	Zoetis	FluSure pandemic	A/California.04/2009	Amphigen®

Adaptado de Van Reeth e Ma, 2012.

licenciada em 1994. A constante mudança da epidemiologia do SIAV levou à atualização das vacinas e após o surgimento do H3N2 TRIG em 1998, vacinas monovalentes contendo H3N2 e vacinas multivalentes contendo vírus H1 e H3 foram lançadas no mercado. Diferentemente do que ocorreu na Europa, uma vacina monovalente contra o H1N1pdm09 foi licenciada na América do Norte na ocasião da pandemia de 2009 (Van Reeth e Ma, 2012). No Brasil, a primeira vacina contra SIAV foi licenciada no início de 2014 e é composta pelo H1N1pdm09. De acordo com indicações do fabricante, a vacina é indicada para leitões a partir de três semanas de idade e para porcas e marrãs (Zoetis, 2014).

A rápida variação genética dos vírus influenza, a circulação de diferentes amostras virais nos rebanhos suínos e a necessidade de constante atualização das vacinas visando a melhor proteção resultou no aumento no uso de vacinas autógenas (Vincent et al., 2008). Em 2006, mais de 20% de todas as porcas de rebanho reprodutivo dos Estados Unidos foram vacinadas com vacina autógena (USDA, 2007) e até 2010, cerca de 50% das vacinas contra influenza utilizadas para suínos eram autógenas (Ma e Richt, 2010). As vacinas autógenas são preparadas a partir de amostras de vírus isoladas de rebanhos suínos e sua utilização está associada à supervisão do veterinário responsável pelo rebanho em questão (Vincent et al., 2008)

A vacina ideal contra SIAV deve induzir a melhor resposta imune possível e ainda superar a interferência de anticorpos maternos. Tais fatores são grandes desafios na produção de vacinas e por isso, estimulam a pesquisa de diferentes alternativas de vacinação. Vírus recombinantes podem ser obtidos por meio da tecnologia de genética reversa e serem, então, usados para a produção de vacinas vivas modificadas (Chen et al., 2012). Estas vacinas são administradas via intranasal e geralmente induzem a produção de células T e a imunidade de mucosa (Hoft et al., 2011), além de melhorar a resposta a vírus heterólogos (Vincent et al., 2007). Vacinas vivas modificadas ainda não são licenciadas para uso em suínos e apresentam risco relacionado à possibilidade de rearranjo entre vírus vacinais e vírus circulantes em rebanhos (Babiuk et al., 2011).

A expressão de proteínas do SIAV em vetores para uso na vacinação pode induzir uma melhor resposta imune humoral e celular quando comparada à vacinação com vacinas inativadas, apesar de que essas vacinas não provocam um bom estímulo de linfócitos T citotóxicos (Souza et al., 2005). Os vetores mais utilizados para vacinação em suínos incluem o Alphavirus (Vander Veen et al., 2012), Adenovírus (Wesley e Lager, 2006) e vírus da Pseudorraiva (Tian et al., 2006). Dentre os vetores conhecidos, o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) é o mais comumente utilizado para a produção de vacinas baseadas na tecnologia *Alphavirus* replicon (Vander Veen et al., 2012). O genoma deste vetor contém duas janelas abertas de leitura (ORFs). A ORF 5' codifica quatro proteínas não estruturais (nsp 1-4) e a ORF 3' codifica duas proteínas estruturais virais (capsídeo e glicoproteína). As proteínas não estruturais são traduzidas a partir do RNA genômico senso-positivo e transcrevem o RNA senso-negativo. O RNA senso-negativo serve de modelo para o RNA genômico e o RNA mensageiro (mRNA) subgenômico 26S. O promotor do 26S está localizado entre as duas ORFs do RNA senso-negativo e é reconhecido pelas proteínas não estruturais para a transcrição do mRNA subgenômico, do qual as proteínas estruturais são traduzidas. Genes externos de interesse podem ser inseridos no lugar dos genes estruturais do vetor *Alphavirus* por meio de um clone de DNA complementar (cDNA), gerando um RNA de auto replicação (replicon), capaz de expressar os genes externos quando introduzidos em células. A auto- amplificação do replicon de RNA gera a tradução de grandes quantidades de proteína heteróloga nas células transfectadas. O replicon de RNA pode ser empacotado em partículas de replicon (RP) por meio

da co-transfecção em células permissivas. Então, as RPs são consideradas partículas incapazes de se propagar e produzir novas partículas ou vírus. As RPs são muito atrativas na produção de vacinas por serem seguras, por produzir altos níveis de expressão de genes heterólogos, gerar uma resposta imune balanceada e protetora, por permitir a construção de vacinas multivalentes, pelo alto tropismo por células dendríticas, por permitir a diferenciação entre animais infectados e vacinados, dentre outros (Vander Veen et al., 2012).

Vacinas de DNA utilizam o DNA viral para a produção de antígenos virais intracelulares que serão apresentados por moléculas MHC I e MHC II, induzindo a resposta humoral e celular de longa duração (Van Reeth e Ma, 2012). Dentre as diversas vantagens do uso de vacinas de DNA, pode-se citar o custo reduzido, pois a molécula de DNA recombinante pode codificar múltiplos genes de interesse; o DNA recombinante pode expressar elevados níveis da proteína de interesse nas células; é possível diferenciar animais infectados de animais vacinados com vacinas de DNA, pois essas vacinas não expressam todas as proteínas virais e por isso, induzem diferentes respostas imunes quando comparada à infecção natural (Chen et al., 2012).

CAPITULO 2: RESPOSTA VACINAL EM PORCAS E ANTICORPOS MATERNOS CONTRA INFLUENZA EM LEITÕES LACTENTES NO MEIO-OESTE DOS ESTADO UNIDOS

Resumo

O vírus da influenza suína (SIAV) é endêmico na população suína da América do Norte e os subtipos virais H1N1, H1N2 e H3N2 co-circulam nos rebanhos suínos. A imunização das porcas protege contra a doença clínica e fornece proteção passiva aos leitões via colostro. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a resposta vacinal em porcas imunizadas contra SIAV e determinar a presença de anticorpos passivos contra SIAV em seus leitões lactentes em granjas que utilizavam a vacinação no rebanho reprodutivo. Quatro granjas localizadas no Meio-Oeste dos Estados Unidos, pertencentes ao mesmo sistema de produção e com rotina de vacinação contra influenza no rebanho reprodutivo, foram selecionadas para o estudo. Cento e trinta e cinco amostras de sangue de leitões com 12 a 17 dias de idade foram coletadas em cada granja, totalizando 540 amostras em cada semana de coleta e 4.320 amostras no total. Amostras de sangue das porcas correspondentes aos leitões amostrados também foram coletadas, totalizando 330 porcas. Todas as amostras foram submetidas ao teste NP ELISA para detecção de anticorpos contra a nucleoproteína viral e ao teste de inibição de hemaglutinação para a detecção de anticorpos contra as amostras virais presentes nas vacinas utilizadas nas granjas. Um total de 82,7% e 89,7% das porcas e leitões apresentaram anticorpos anti-NP, respectivamente. Os perfis de anticorpos contra os vírus estudados variaram muito entre leitões e porcas e entre granjas e momentos amostrados. Além disso, o percentual de porcas com anticorpos protetores variou quando comparado ao percentual de leitões com anticorpos protetores ao longo do estudo. A presença de porcas soronegativas sugere ocorrência de falha vacinal que pode ter sido resultado de mau acondicionamento das vacinas, falhas na aplicação do produto, dentre outros fatores. Os resultados encontrados para leitões sugerem a ocorrência de falha na transferência de anticorpos passivos permitindo que estes animais ficassem suscetíveis à infecção pelo SIAV.

Abstract

Influenza virus (SIAV) is endemic in pig populations in North America and the subtypes H1N1, H1N2 and H3N2 co-circulate in swine herds. Immunization of sows protects against clinical disease and provides passive protection to neonatal piglets through colostrum. The objectives of this study were to evaluate SIAV vaccination response in breeding females and to determine the presence of passive antibodies against SIAV in their nursing piglets from the studied sows in farms using SIAV vaccination. Four breeding farms (farm 1, 2, 3, 4) from the same production system located in the Midwest United States that used IAV vaccination in the breeding herd were selected for the study. One hundred and thirty five serum samples were collected from 12-17 day old piglets in each farm, 540 samples per sampling and 4230 samples total. Serum samples were also collected from sows corresponding to the sampled piglets, for a total of 330 samples. All samples were submitted to NP ELISA assay to detect antibodies against the viral nucleoprotein and to hemagglutination inhibition to detect antibodies against vaccine strains used in the farms. A total of 82.7% and 89.7% sows and piglets had anti-NP antibodies, respectively. Antibodies profiles against studied viruses varied between piglets and sows and between farms and samplings. Furthermore, percentage of sows with protective antibodies varied when compared to the percentage of piglets over the study period. The presence of seronegative sows suggests the occurrence of vaccine failure that might be a result of poor

packaging of the vaccines, failure to apply the product, and other factors. The results for piglets suggest the occurrence of failure of passive transfer of immunity allowing these animals to stay susceptible to SIAV infection.

Introdução

Vírus da influenza dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 co-circulam nos rebanhos suínos na América do Norte (Vincent et al., 2008). Vacinas são normalmente utilizadas em rebanhos comerciais, mas vários fatores dificultam o sucesso desta medida no controle da doença (Sandbulte et al., 2014). Vacinas comerciais contra o SIAV contêm múltiplos subtipos virais, mas o nível de proteção cruzada entre isolados geneticamente diferentes é limitado (Platt et al., 2011). Na tentativa de acompanhar a rápida variação genética dos SIAV circulantes e visando aumentar a proteção dos animais, o uso de vacinas autógenas vem aumentando rapidamente nos Estados Unidos (Vincent et al., 2008).

A vacinação contra o SIAV é a principal forma de prevenção e controle da influenza suína e é mais comumente usada em porcas. A imunização das porcas protege contra a doença clínica e fornece também proteção passiva aos leitões via colostro (Choi et al., 2004). A placenta de suínos é do tipo epiteliocorial e por isso, imunoglobulinas não são transferidas aos fetos na vida intra-uterina (Sterzl et al., 1966). Dessa forma, leitões neonatos recebem altos níveis de anticorpos maternos por meio da ingestão do colostro especialmente nas primeiras quatro horas de vida (Loving et al., 2014).

Diversos estudos investigaram o papel dos anticorpos maternos na proteção contra o SIV (Blaskovic et al., 1970; Mensisk et al., 1971; Renshaw, 1975; Loeffen et al., 2003; Kitikoon et al., 2006). De acordo com resultados mais recentes, os anticorpos maternos podem proteger leitões contra o desenvolvimento da doença clínica, mas essa proteção é apenas parcial (Loeffen et al., 2003; Kitikoon et al., 2006) e não há redução na replicação e eliminação viral na presença desses anticorpos (Choi et al., 2004; Kitikoon et al., 2006).

Dentro de uma mesma leitegada, a infecção ou doença clínica podem variar dependendo da quantidade e qualidade dos anticorpos adquiridos passivamente. A circulação do SIAV em rebanhos suínos pode ocorrer devido à presença de leitões neonatos com níveis inadequados de anticorpos passivos, devido à presença de anticorpos não específicos contra o vírus circulante ou devido à introdução de novas amostras do SIAV no rebanho. (Allerson et al., 2013). Os objetivos deste trabalho foram avaliar a resposta vacinal em porcas imunizadas contra SIAV e pesquisar a presença de anticorpos passivos contra SIAV em seus leitões em granjas que utilizavam a vacinação no rebanho reprodutivo.

Material e Métodos

- Animais e amostras

Quatro granjas (G1 a G4) produtoras de leitões, com plantel variando entre 4200 e 6200 fêmeas e pertencentes ao mesmo sistema de produção no Meio-Oeste dos Estados Unidos foram selecionadas para o estudo (Figura 2). As fêmeas reprodutoras eram rotineiramente vacinadas contra influenza suína com duas doses por via intramuscular (três e seis semanas pré-parto) da vacina comercial *MaxiVac Excell*[®] 5.0 (Merck Animal Health) contendo as amostras virais H1N1- δ 2, H1N1- γ , H3N2- cluster I e H3N2- cluster IV, de acordo com o protocolo padrão recomendado pelo fabricante. Uma semana antes do início da coleta das amostras, as granjas 1,

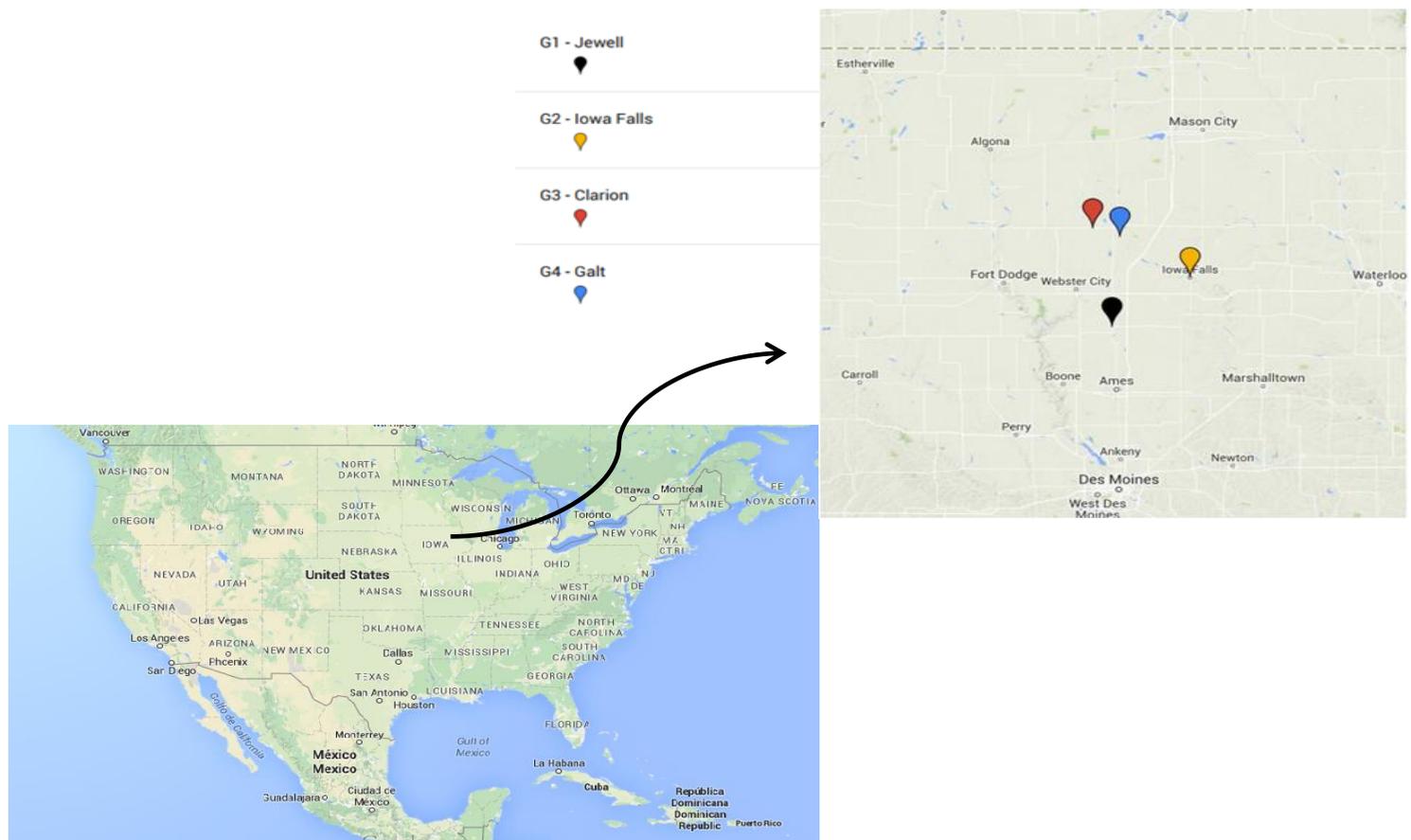


Figura 2: Localização geográfica das quatro granjas selecionadas para o estudo realizado no Meio-Oeste dos Estados Unidos.

2 e 3 iniciaram a imunização completa do rebanho reprodutivo com uma vacina de subunidade autógena (VSA) contendo H3- cluster IV, H1- δ 1 e H1- γ isolados do rebanho em 2012. Porcas da G4 receberam uma única dose da VSA aproximadamente 15 dias após as outras granjas. Uma segunda dose desta vacina foi administrada somente em porcas da G1, G2 e G3 aproximadamente quatro semanas após a primeira dose. As amostras foram coletadas a cada 15 dias em todas as granjas, no período de março a maio e de julho a agosto de 2013, totalizando oito coletas (Figura 3). Durante cada coleta, animais diferentes da coleta anterior eram amostrados, de maneira que nenhum animal foi amostrado mais de uma vez durante o estudo. Devido a um surto causado pelo vírus da diarreia epidêmica suína (PEDv) em diversas granjas no Meio-Oeste dos Estados Unidos, as granjas que participaram do experimento decidiram, por questões de biossegurança, suspender as coletas de amostras em maio e o experimento só foi retomado em julho de 2013.

Durante cada visita às granjas, 135 amostras de sangue de leitões de 12 a 17 dias de idade foram coletadas por punção da veia jugular em cada granja, totalizando 540 amostras em cada semana de coleta e 4.320 amostras no total. Amostras de sangue das porcas correspondentes aos leitões amostrados também foram coletadas, totalizando 330 porcas. Durante a coleta das amostras, todos os leitões de uma mesma leitegada eram submetidos à coleta de sangue, juntamente com a porca correspondente. Dessa forma, em média, 10 a 13 leitegadas em cada granja eram amostradas durante cada coleta. O estudo foi aprovado pelo *American Association for Laboratory Animal Science* (2-13-7504-S).

- Processamento das amostras

Amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 1500 x g por 20 minutos para a separação do soro e armazenadas a -80°C até o momento do uso. O processamento das amostras e os demais testes referentes a este estudo foram realizados no laboratório de Pesquisa em Influenza Suína do Animal Research Center (ARS), localizado no National Animal Disease Center (NADC), United States Department of Agriculture (USDA), Ames, Iowa, Estados Unidos.

- NP ELISA

Todas as amostras de soro foram avaliadas para a presença de anticorpos contra a nucleoproteína (NP) do vírus da influenza por meio do teste ELISA (MultiS-Screen Ab Test, Idexx) visando verificar a exposição natural ou a resposta vacinal em porcas e a transferência de anticorpos maternos em leitões. O kit utilizado foi desenvolvido para a espécie aviária e padronizado para o uso na espécie suína de acordo com Ciacci-Zanella et al., (2010).

- Hemaglutinação (HA)

Amostras isoladas das granjas estudadas e utilizadas para a produção da VSA foram submetidas ao teste de hemaglutinação para a detecção do título viral em unidades hemaglutinantes (UHA) de acordo com WHO (2002). O título viral foi determinado pela recíproca da última diluição onde ocorreu aglutinação completa das hemácias. Os mesmos vírus foram usados para retrotitulação no teste de inibição da hemaglutinação (HI).

- Inibição da hemaglutinação (HI)

Amostras de soro de porcas e leitões foram inativadas a 56°C por 30 minutos e tratadas com hemácia de peru para a remoção de inibidores inespecíficos da hemaglutinação e aglutininas naturais do soro de acordo com WHO (2002). Em seguida, foi realizado o teste (HI) para a

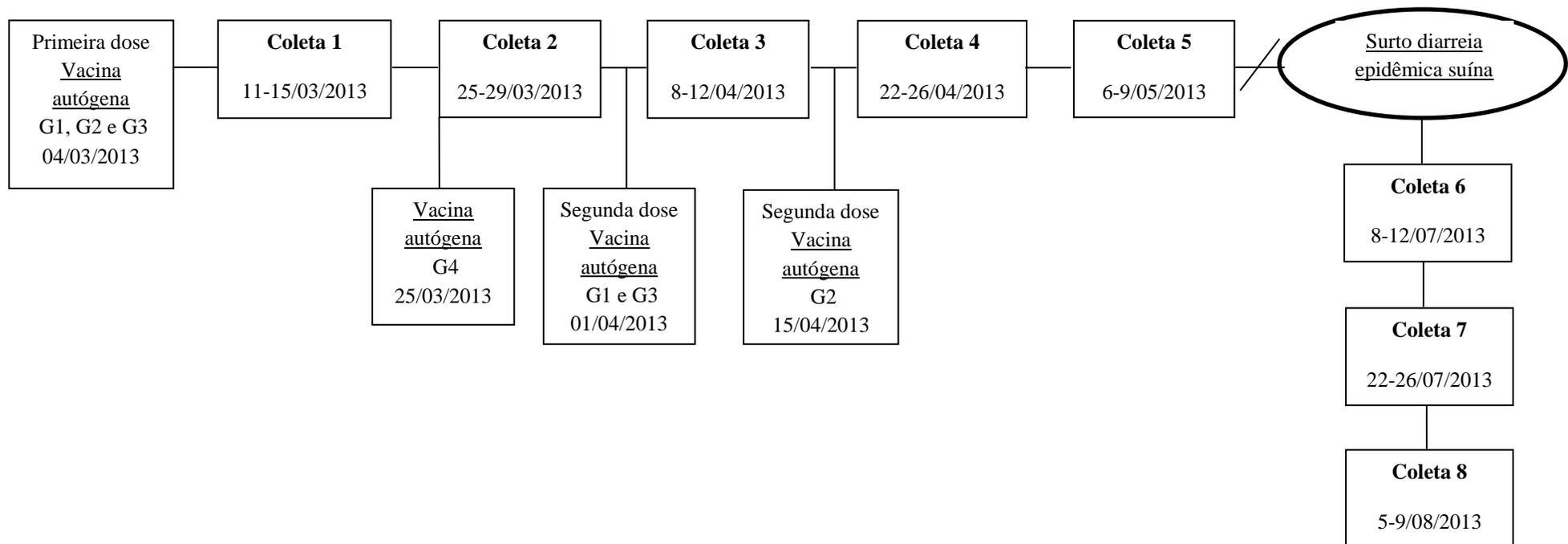


Figura 3: Cronograma geral do experimento realizado nas quatro granjas pertencentes ao mesmo sistema de produção do Meio- Oeste dos Estados Unidos durante o ano de 2013.

detecção de anticorpos contra os antígenos da VSA (H3- cluster IV, H1- δ 1 e H1- γ) utilizada nas granjas, de acordo com WHO (2002). Controle negativo contendo PBS e suspensão de hemácias e controle do soro para detectar hemaglutinação contendo somente soro e suspensão de hemácias foram devidamente realizados. Para a análise dos resultados, títulos foram transformados de acordo com a equação $X = \log_2(\text{título}/10)$ e para a análise da distribuição de anticorpos contra os três antígenos da VSA, títulos menores que 40 foram considerados negativos; entre 40 e 80, baixos; entre 160 e 320, médios e maiores ou iguais a 640, altos. Títulos maiores ou iguais a 40 foram considerados protetores. Diferenças entre grupos na correlação para títulos protetores contra as amostras virais foram avaliadas pelo teste exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95%.

- Isolamento viral

Os antígenos da VSA foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Diagnóstico da Iowa State University e utilizados nos testes de HI. As amostras H3 cluster IV e H1- δ 1 foram inoculadas em garrafas de cultivo celular contendo monocamada confluyente de células (MDCK), previamente cultivadas com meio mínimo essencial (MEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 100 IU/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina. No momento da inoculação viral, o meio contendo SFB foi descartado e a monocamada lavada três vezes com PBS. Em seguida, o vírus foi adicionado à garrafa, que foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C para adsorção viral por uma hora. Após a incubação, MEM suplementado com os mesmos antibióticos e 0,4% de albumina sérica bovina e tripsina TPCK na proporção 1:1000 foi adicionado à garrafa, que foi novamente mantida em estufa de CO₂ por até 48 horas ou quando se observasse 80% de efeito citopático (CPE) na monocamada celular. A suspensão viral foi submetida ao teste de hemaglutinação (HA) para detecção do título viral para posterior uso no teste de HI e congelada a -80°C.

O vírus H1- γ não apresentou crescimento satisfatório em cultivo celular e por isso foi inoculado em ovos embrionados com 10 dias de incubação. Os ovos foram inoculados na cavidade alantoide com 0,1 ml de inóculo e incubados a 35 – 37°C por dois dias. Os ovos foram avaliados diariamente quanto à viabilidade do embrião e após o período de incubação, o líquido alantoide foi coletado, clarificado a 1500 x g por 20 minutos, submetido ao teste de HA e posteriormente congelado a -80°C.

Resultados

- Detecção de anticorpos anti- nucleoproteína viral pelo teste NP ELISA

Um total de 82,7% (273/330) das fêmeas amostradas apresentaram anticorpos contra nucleoproteína do SIAV nos momentos amostrados. O percentual de porcas positivas para anticorpos anti-NP variou entre as quatro granjas e entre as coletas, sendo que o maior percentual foi observado na G2 (90,1%) seguido pela G1, G3 e G4, que apresentaram percentuais de porcas positivas de 85,9%, 80,5% e 74,4%, respectivamente (Figura 4). De forma geral, os percentuais de positividade na sexta coleta (C6) foram os menores para todas as granjas, com exceção da G4, que obteve o maior percentual nesta amostragem. Por outro lado, G4 apresentou os menores percentuais quando comparada às outras granjas em algumas coletas, justificando o menor percentual geral encontrado para essa granja no estudo.

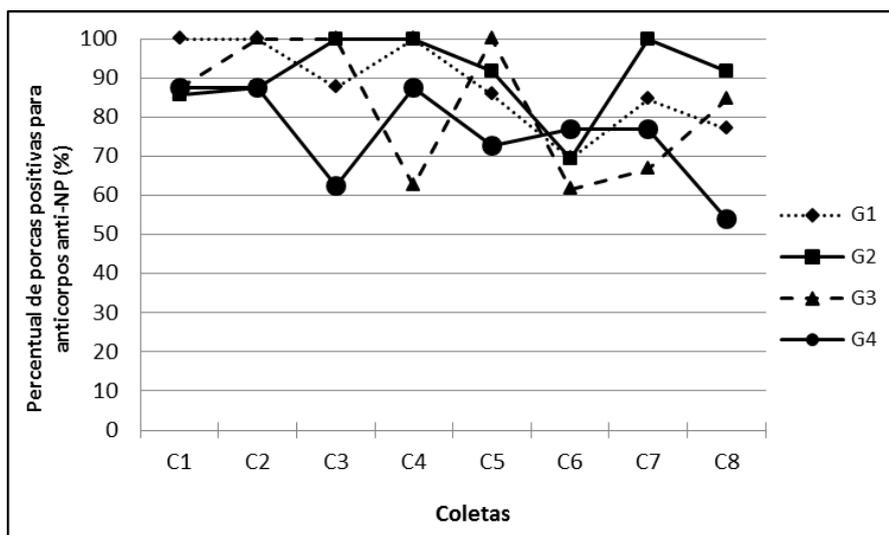


Figura 4: Percentual de porcas positivas para a presença anticorpos anti-NP nas quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas.

Dos leitões amostrados durante o estudo, 89,7% (3875/4320) apresentaram anticorpos anti-NP. De forma semelhante ao ocorrido em porcas, houve variação nos percentuais de leitões positivos para anticorpos anti-NP entre as quatro granjas e ao longo das coletas realizadas e G2 obteve o maior percentual de leitões positivos ao longo do estudo (93,3%), seguido por G1 (92%), G3 (87,6%) e G4 (86%) (Figura 5). Na avaliação por leitegadas, 67,83% destas demonstraram todos os leitões com anticorpos anti-NP, enquanto que 3,15% apresentaram todos os leitões negativos para a presença de anticorpos contra a nucleoproteína viral. Além disso, 29,02% das leitegadas apresentavam pelo menos um leitão com anticorpos anti-NP detectáveis no soro durante as coletas.

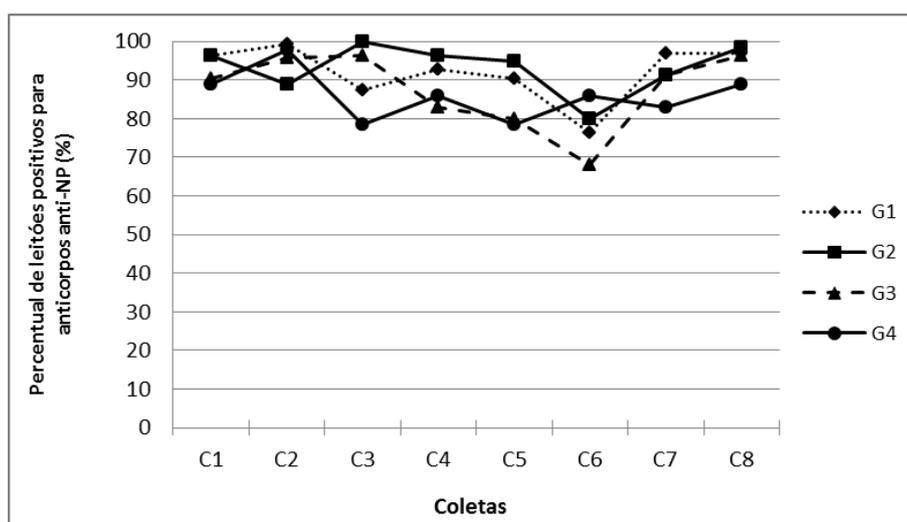


Figura 5: Percentual de leitões positivos para a presença de anticorpos anti-NP nas quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas.

- Detecção de anticorpos contra os antígenos vacinais pelo teste de HI

Os títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação variaram entre as quatro granjas e ao longo do estudo para os três antígenos avaliados (Figuras 6-8). Coletivamente, as médias de títulos de anticorpos foram menores para H1- δ 1 quando comparadas com anticorpos contra os outros antígenos vacinais (Figura 7).

De uma forma geral, G1 apresentou as maiores médias de títulos de anticorpos contra o antígeno H3 cluster IV (Figura 6), sendo considerada a granja com maior percentual de animais com títulos altos (Anexo 1A). Apesar disso, as médias decresceram ao longo do período amostrado, mostrando um aumento somente a partir de C7, sugerindo contato natural com o vírus. Por outro lado, as menores médias de títulos de anticorpos anti- H3 cluster IV foram da G4, o que pode ser justificado pelo aumento no percentual de animais com negativos e com títulos baixos nesta granja (Anexo 1D). G3 e G4 foram as únicas granjas a apresentarem animais soronegativos para H3 cluster IV (Anexo 1C e 1D). O aumento na média dos títulos de anticorpos na G4 a partir da quarta amostragem (C4) pode ser devido à resposta à vacinação, que ocorreu no momento da segunda coleta (C2).

Diferentemente da G1 e G4, que apresentaram um perfil com queda nas médias dos títulos de anticorpos ao longo do estudo, G2 e G3 tiveram aumento nas médias a partir da primeira coleta (C1), fato que pode estar relacionado à resposta vacinal, uma vez que a primeira dose da VSA foi administrada antes do início do estudo nessas granjas. O fato de G1 já apresentar médias elevadas de títulos de anticorpos desde o início do estudo poderia explicar a ausência de elevação nas médias desta granja, mesmo após a administração da segunda dose da vacina (entre C2 e C3). Além disso, o uso prévio de uma vacina comercial contendo a mesma amostra viral poderia contribuir para a manutenção dos títulos mesmo após a mudança da vacina na granja em questão.

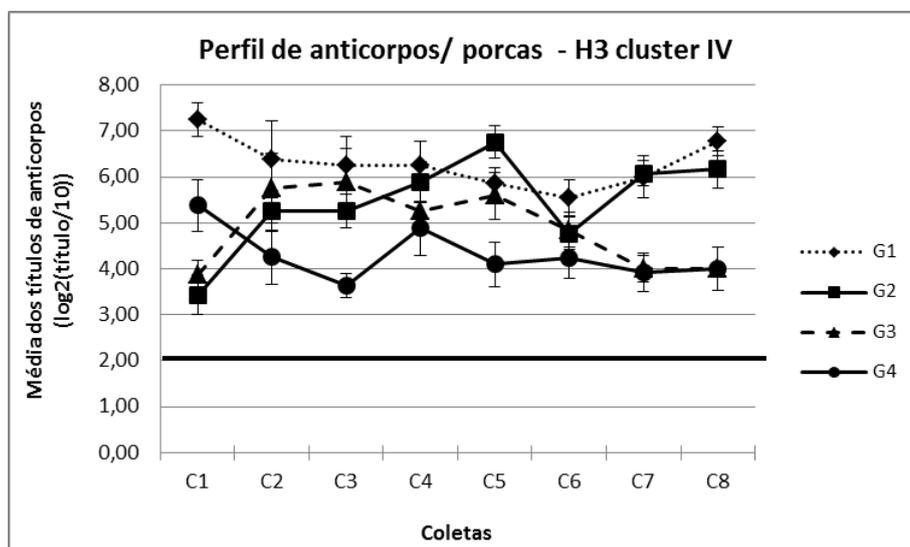


Figura 6: Perfil de anticorpos contra o antígeno H3 cluster IV em porcas das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal. Barras verticais indicam o erro padrão.

Dentre as quatro granjas estudadas, G4 foi a única a apresentar queda nas médias dos títulos de anticorpos contra H1- δ 1 a partir da primeira coleta (Figura 7). O aumento na média a partir de C3 pode ter ocorrido como resposta à vacinação realizada nesta granja entre a segunda e terceira coletas. No entanto, houve grande variação nas médias após a quarta coleta, fato que pode ter ocorrido devido à falha vacinal e/ou infecção natural do rebanho. G1 apresentou as maiores médias de títulos de anticorpos anti- H1- δ 1, justificando o elevado percentual de animais com altos títulos de anticorpos até a quarta coleta (Anexo 1A). G2 apresentou um considerável aumento na média entre a primeira e segunda coleta, com elevação no percentual dos títulos de baixos para médios (Anexo 1B) sugerindo uma resposta à vacinação. Em G3, as médias dos títulos de anticorpos variaram ao longo do estudo e apresentaram grande queda a partir de C5.

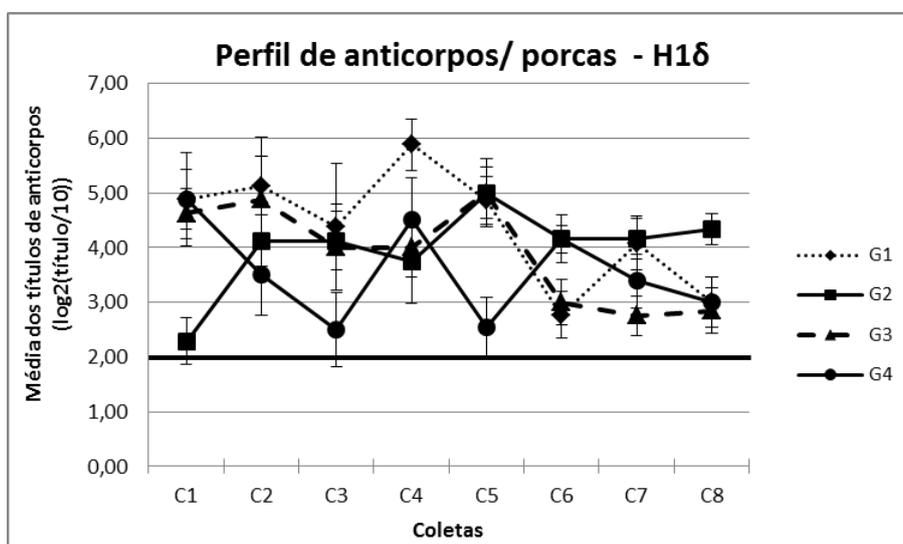


Figura 7: Perfil de anticorpos contra o antígeno H1- δ em porcas das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal. Barras verticais indicam o erro padrão

De forma semelhante ao ocorrido na resposta ao antígeno H1- δ 1, G1 apresentou as maiores médias de títulos de anticorpos contra o H1- γ quando comparadas às outras granjas (Figura 8). G2 e G3 apresentaram aumento nas médias entre a primeira e a segunda coleta (C1 e C2), provavelmente em decorrência da vacinação. No entanto, nas coletas subsequentes, as médias dos títulos de anticorpos anti-H1 γ sofreram quedas graduais até C7, quando ocorre um novo aumento que pode ser devido à infecção natural. Similar ao que ocorreu com os outros antígenos vacinais, G4 obteve as menores médias de anticorpos contra H1- γ ao longo do estudo, com predomínio de títulos baixo e médios (Anexo 1D).

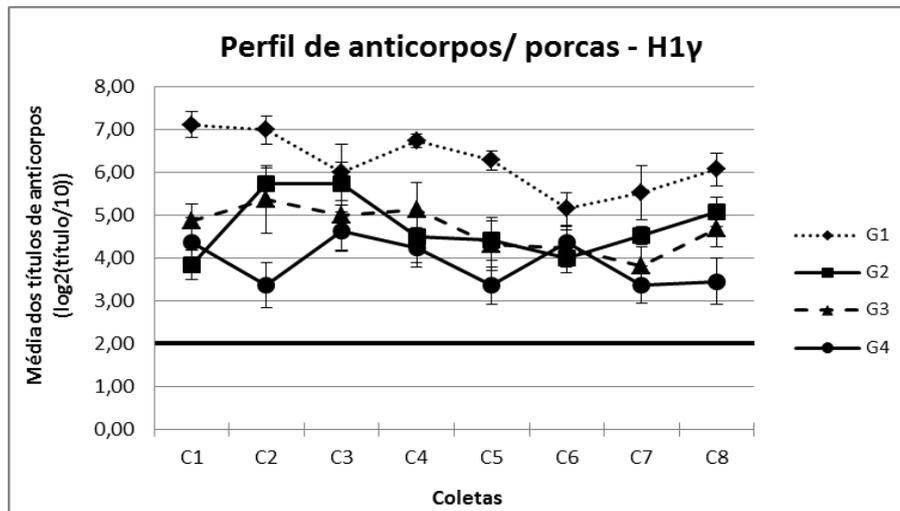


Figura 8: Perfil de anticorpos contra o antígeno H1- γ em porcas das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal. Barras verticais indicam o erro padrão.

A resposta sorológica à vacinação com a VSA em todo o rebanho reprodutivo deveria ser observada numa média de duas semanas após a administração desta (entre C1 e C2), apesar da vacinação prévia com vacina comercial ou exposição natural poder afetar o nível da resposta imune à VSA. De uma forma geral, G2 demonstrou aumento nos títulos de anticorpos para todos os antígenos vacinais avaliados na primeira e segunda coleta. O aumento inicial nos títulos pode ter sido influenciado pela infecção ativa com o vírus da influenza, uma vez que sinais clínicos da doença foram observados na granja durante a primeira e segunda coletas e vírus H1N2 e H3N2 foram detectados por PCR em suabes nasais de neonatos (resultados do capítulo 3).

Semelhante ao ocorrido no perfil sorológico das porcas, o perfil de leitões também variou entre as quatro granjas ao longo das oito coletas (Figuras 9-11). A maior variação nas médias dos títulos de anticorpos contra o antígeno H3 cluster IV ocorreu na G4 (Figura 9), que apresentou as menores médias em todo o estudo em C3 e C4 e consequentemente, os maiores percentuais de leitões soronegativos nesses momentos (Anexo 2D), evidenciando a suscetibilidade dos animais. G2 apresentou aumento nas médias dos títulos de anticorpos a partir de C3, acentuando-se ainda mais em C6. O aumento nos títulos de anticorpos na G2 também ocorreu em porcas na segunda coleta (C2) (Figura 6), mas a queda das médias de leitões nas coletas seguintes não acompanhou o perfil das porcas da mesma granja, sugerindo falha na transferência de imunidade passiva nessas leitegadas. Por outro lado, o perfil sorológico dos leitões da G3 foi semelhante ao das porcas, sendo que estes apresentaram títulos de anticorpos anti- H3 cluster IV predominantemente moderados a altos (Anexo 2C).

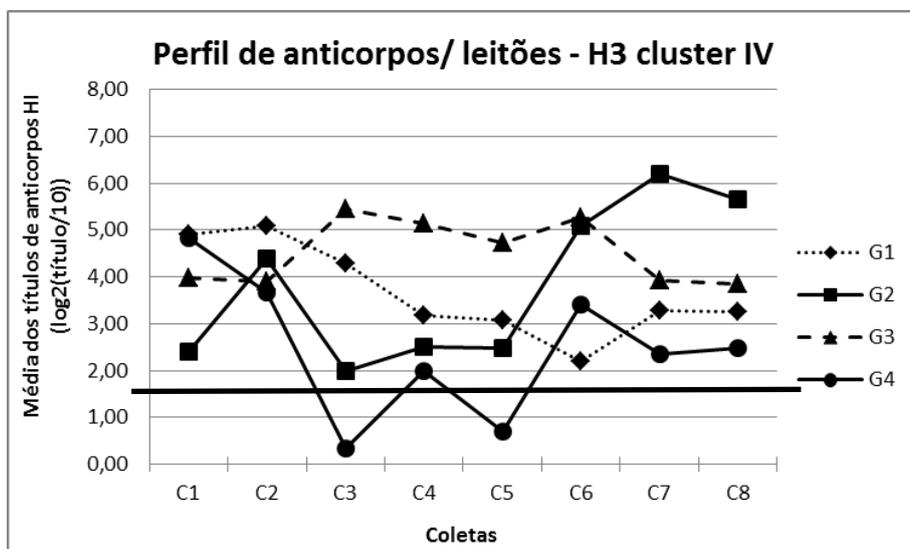


Figura 9: Perfil de anticorpos contra o antígeno H3 cluster IV em leitões das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal.

Houve um aumento nas médias dos títulos de anticorpos contra o H1- δ 1 nas primeiras coletas em G1 e G2, diferentemente do que ocorreu em G3 e G4 (Figura 10). De fato, o maior percentual de leitões soronegativos na G2 ocorreu no tempo C1 (Anexo 2B), que foi responsável pela menor média de títulos de anticorpos anti- H1 δ dentro as quatro granjas avaliadas e ao longo das coletas. O perfil de anticorpos contra H1- δ foi muito semelhante entre porcas (Figura 7) e leitões da G4, sugerindo que a transferência de anticorpos passivos nessa granja foi mais bem sucedida do que nas outras granjas. Coletivamente, G1 apresentou as maiores médias para o antígeno H1- δ , sendo responsável pelos maiores percentuais de animais com títulos elevados ao longo do estudo (Anexo 2A).

Semelhante à resposta observada para H1- δ , leitões da G1 apresentaram as maiores médias de títulos de anticorpos contra o antígeno vacinal H1- γ (Figura 11). O maior percentual de leitões soronegativos também foi observado em C1, em G2 (Anexo 2B), seguido por G4, que apresentou cerca de 50% de leitões soronegativos amostrados na terceira coleta (C3) (Anexo 2D). Além disso, G4 foi a granja com maior percentual de animais soronegativos ao longo das oito coletas. A transferência de anticorpos passivos foi menos efetiva na G3, onde porcas apresentaram títulos de anticorpos anti- H1 γ variando predominantemente de moderados a elevados enquanto que leitões apresentaram títulos predominantemente moderados a baixos, com razoável percentual de animais soronegativos (Anexo 2C).

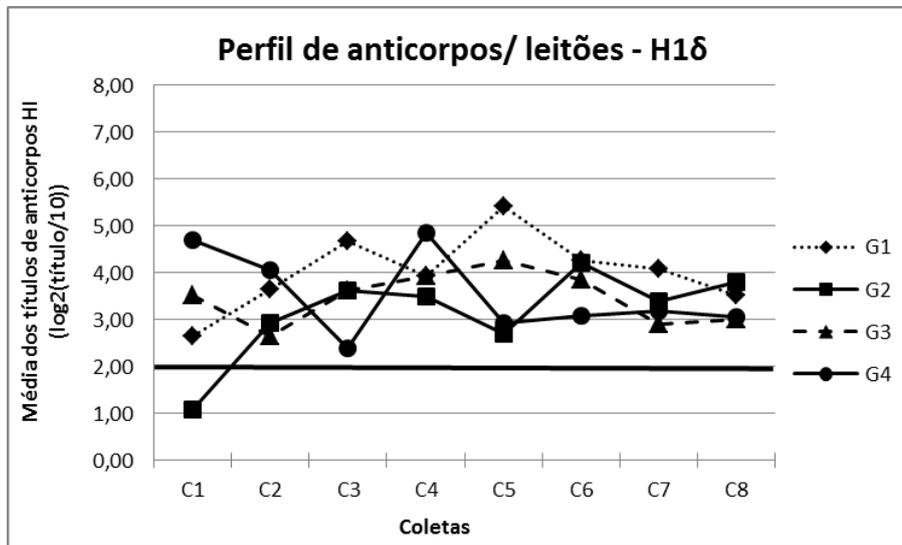


Figura 10: Perfil de anticorpos contra o antígeno H1-δ em leitões das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal.

De uma forma geral, G2 apresentou os menores percentuais de leitões soropositivos contra os três antígenos da VSA na primeira coleta (C1), apesar do aumento nos títulos a partir da segunda amostragem. No entanto, G4 apresentou os menores percentuais de leitões com anticorpos contra H3 cluster IV nos tempos C3 e C5 (Anexo 2D).

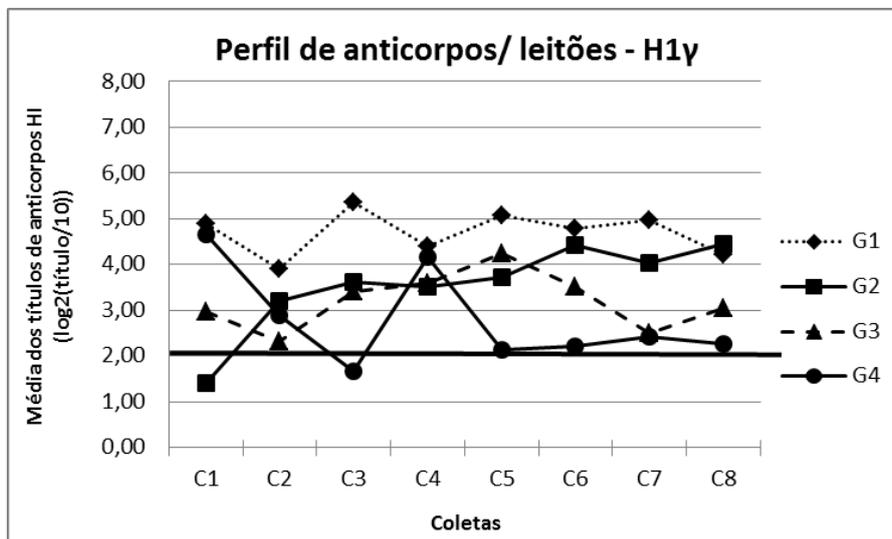


Figura 11: Perfil de anticorpos contra o antígeno H1-γ em leitões das quatro granjas amostradas ao longo das oito coletas. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal.

A correlação entre títulos de anticorpos protetores para porcas e leitões contra as três amostras virais avaliadas no estudo pode ser vista nas figuras 12 a 15. A Figura 12 mostra a correlação de

anticorpos protetores para porcas e leitões da G1 com relação às amostras virais utilizadas no teste de HI. Os percentuais de porcas e leitões com títulos protetores contra a amostra viral H3 cluster IV (Figura 12A) apresentou uma variação muito elevada apenas em um momento amostrado (C6; $P=0,038$). Com relação à amostra H1 δ (Figura 12B), a queda no percentual de porcas com títulos protetores entre C1 e C3 coincidiu com o aumento no percentual de leitões com títulos protetores no mesmo momento. Tal fato pode sugerir contato natural dos leitões com o vírus em questão. O aumento no percentual de porcas com títulos protetores a partir de C3 pode estar relacionado à segunda dose de vacina administrada nessa granja, aumentando então os títulos de anticorpos nesses animais. Os percentuais de porcas e leitões com títulos protetores contra o vírus H1 γ (Figura 12C) não sofreram grandes variações ao longo do estudo. Os menores valores de leitões quando comparados aos das porcas podem sugerir uma variação na transferência de imunidade passiva entre leitões e leitegadas.

Na G2, todas as porcas possuíam anticorpos protetores contra o vírus H3 cluster IV em todos os momentos estudados (Figura 13A). Por outro lado, o percentual de leitões com títulos protetores contra este vírus variou entre C1 e C5, atingindo maiores percentuais entre C6 e C8. O menor percentual de leitões com títulos protetores contra o vírus H1 δ foi encontrado na G2, na primeira coleta (Figura 13B; $P=0,0328$). Neste momento, porcas também apresentaram o menor percentual de anticorpos protetores contra o vírus. Exceto por C5, quando leitões e porcas apresentaram percentuais de anticorpos protetores divergentes ($P=0,0367$), as curvas de percentual de anticorpos oscilaram de forma semelhante ao longo do estudo. Semelhante ao que ocorreu com o H1 δ , apenas 42% dos leitões da C1 apresentaram anticorpos protetores contra o vírus H1 γ na G2, independente de 100% das porcas amostradas nesta mesma coleta terem apresentado anticorpos protetores (Figura 13C; $P=0,0031$). A maior correlação no percentual de porcas e leitões com títulos de anticorpos protetores para o vírus H1 γ ocorreu de C6 a C8.

De forma semelhante ao que aconteceu na G1, a menor variação no percentual de títulos de anticorpos protetores entre porcas e leitões na G3 ocorreu com o vírus H3 cluster IV (Figura 14A). Entre C4 e C7, todos os leitões e porcas amostradas apresentaram anticorpos protetores contra o vírus e a variação nos outros momentos amostrados foi muito pequena. Por outro lado, o percentual de leitões com títulos de anticorpos protetores contra o vírus H1 δ foi consideravelmente inferior ao das porcas na segunda coleta (Figura 14B), sugerindo falha na transferência de imunidade passiva. A curva de percentual de anticorpos protetores contra o vírus H1 γ para porcas e leitões foi muito semelhante entre C1 e C4, apesar de os valores para cada ponto da curva para cada grupo serem diferentes (Figura 14C). Uma queda acentuada no percentual de leitões com títulos protetores contra o H1 γ ocorreu na C7 ($P=0,0375$), com posterior aumento na C8, independente de todas as porcas apresentarem títulos protetores nesse momento.

A maior variação nos percentuais de leitões com anticorpos protetores contra o vírus H3 cluster IV ocorreu na G4 na terceira e quinta coletas, atingindo valores de 7% e 10%, respectivamente (Figura 15A; $P=0,0001$). Por outro lado, elevados percentuais de porcas com títulos protetores contra o vírus foram observados nos mesmos momentos, sugerindo falha na transferência de imunidade passiva. As curvas de percentual de animais com títulos protetores para o vírus H1 δ foram semelhantes para leitões e porcas em todos os momentos do estudo exceto em C2, quando houve uma pequena diferença entre os percentuais de porcas e leitões com títulos protetores contra o H1 δ (Figura 15B). De forma contrária, as curvas de percentual de títulos

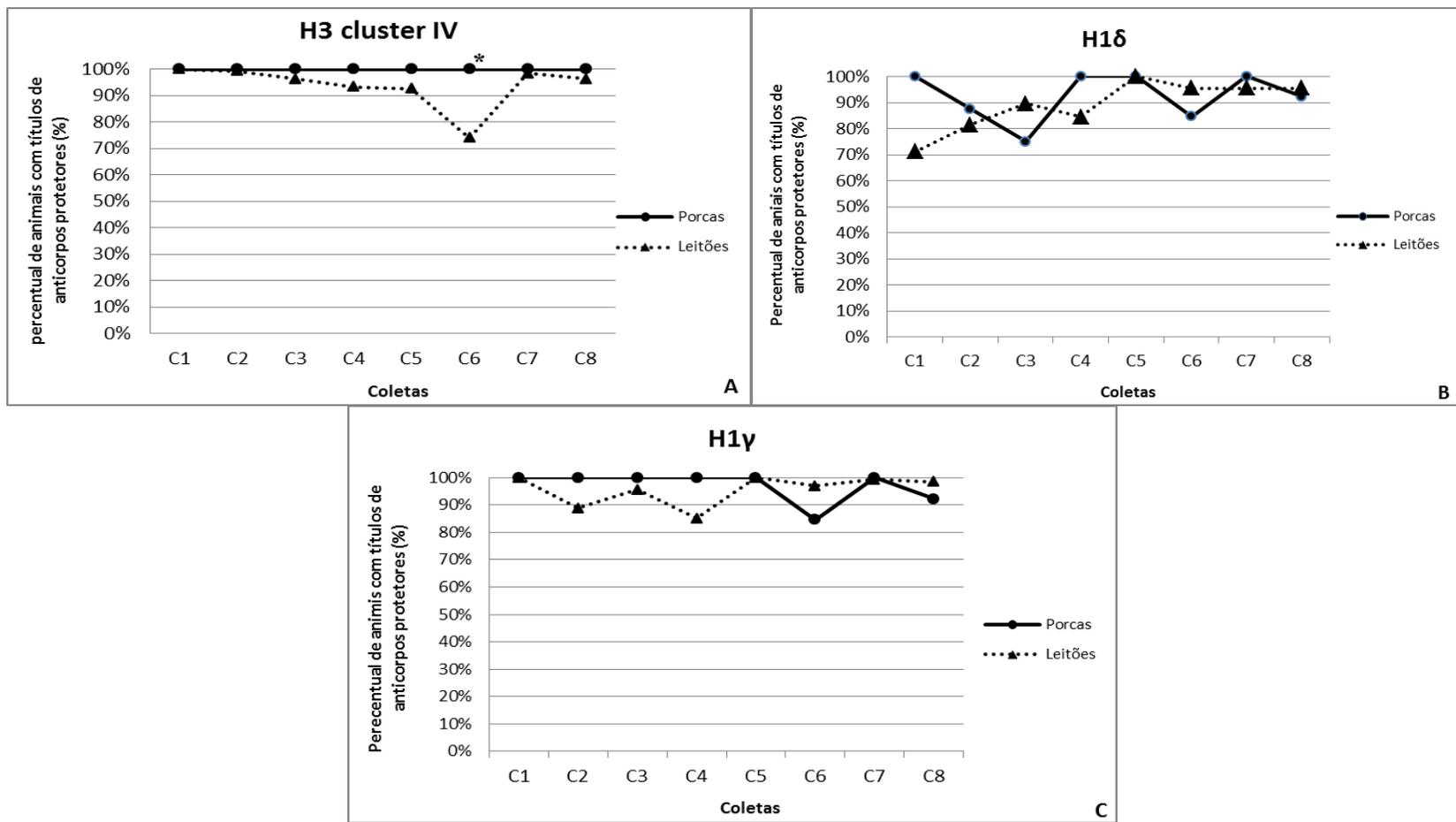


Figura 12: Percentual de porcas e leitões com títulos de anticorpos protetores na G1 em todas as coletas e para todas as amostras virais avaliadas. Letras A, B e C no canto inferior direito de cada gráfico referem-se às avaliações feitas para as amostras virais H3 cluster IV, H1δ e H1γ, respectivamente. *Diferença entre os grupos estudados (P<0,05).

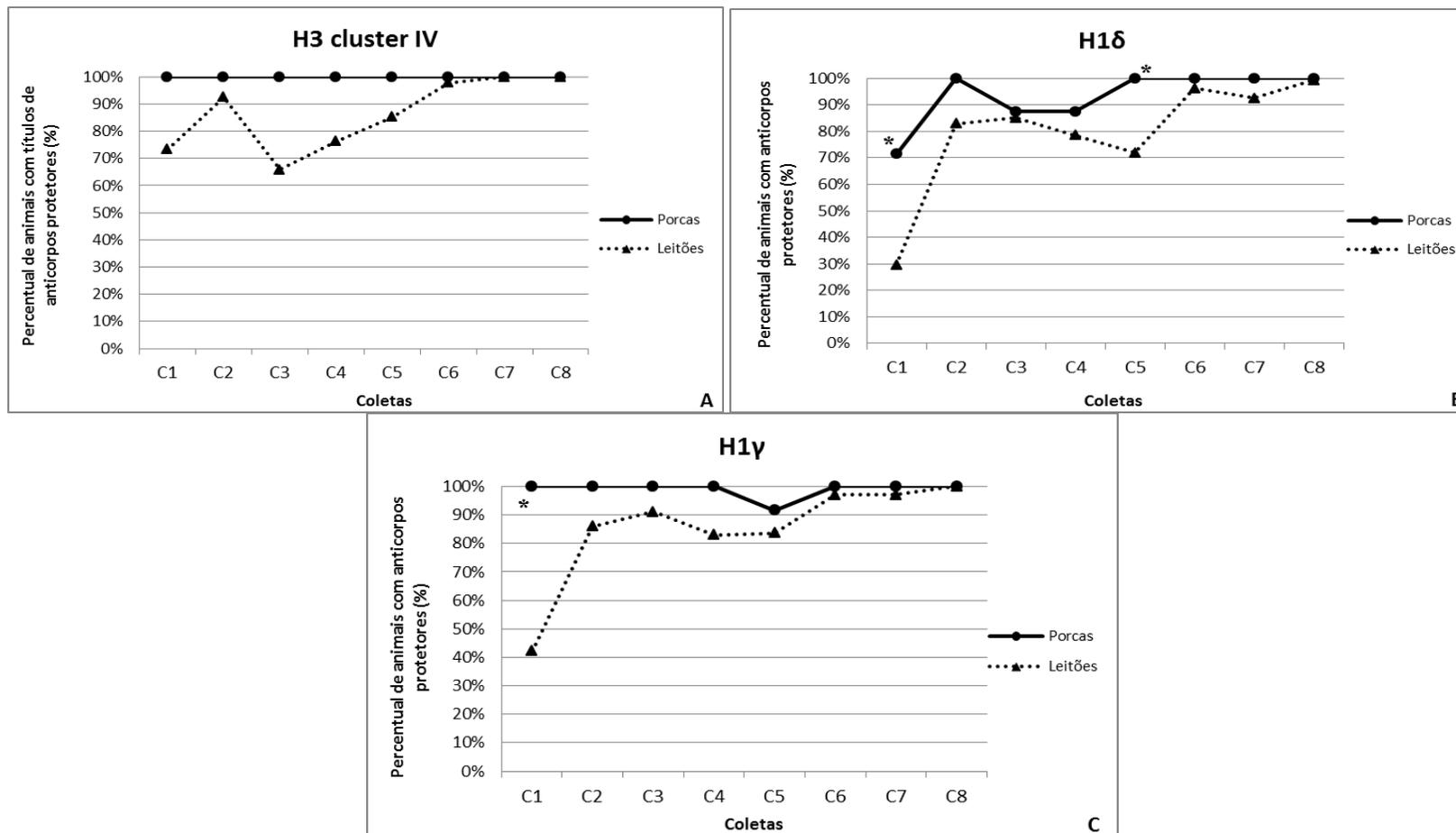


Figura 13: Percentual de porcas e leitões com títulos de anticorpos protetores na G2 em todas as coletas e para todas as amostras virais avaliadas. Letras A, B e C no canto inferior direito de cada gráfico referem-se às avaliações feitas para as amostras virais H3 cluster IV, H1δ e H1γ, respectivamente. *Diferença entre os grupos estudados ($P < 0,05$).

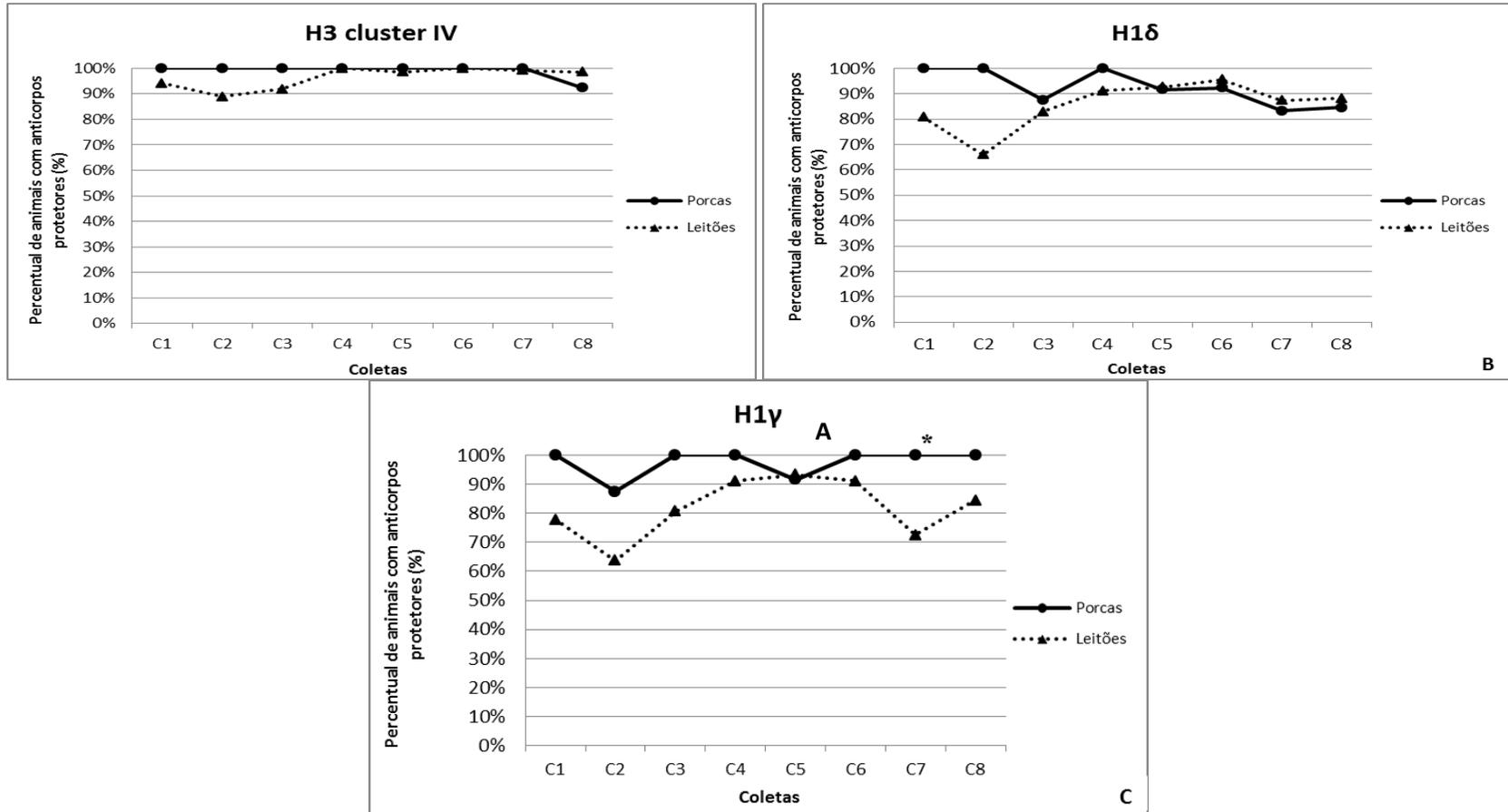


Figura 14: Percentual de porcas e leitões com títulos de anticorpos protetores na G3 em todas as coletas e para todas as amostras virais avaliadas. Letras A, B e C no canto inferior direito de cada gráfico referem-se às avaliações feitas para as amostras virais H3 cluster IV, H1 δ e H1 γ , respectivamente. *Diferença entre os grupos estudados ($P < 0,05$).

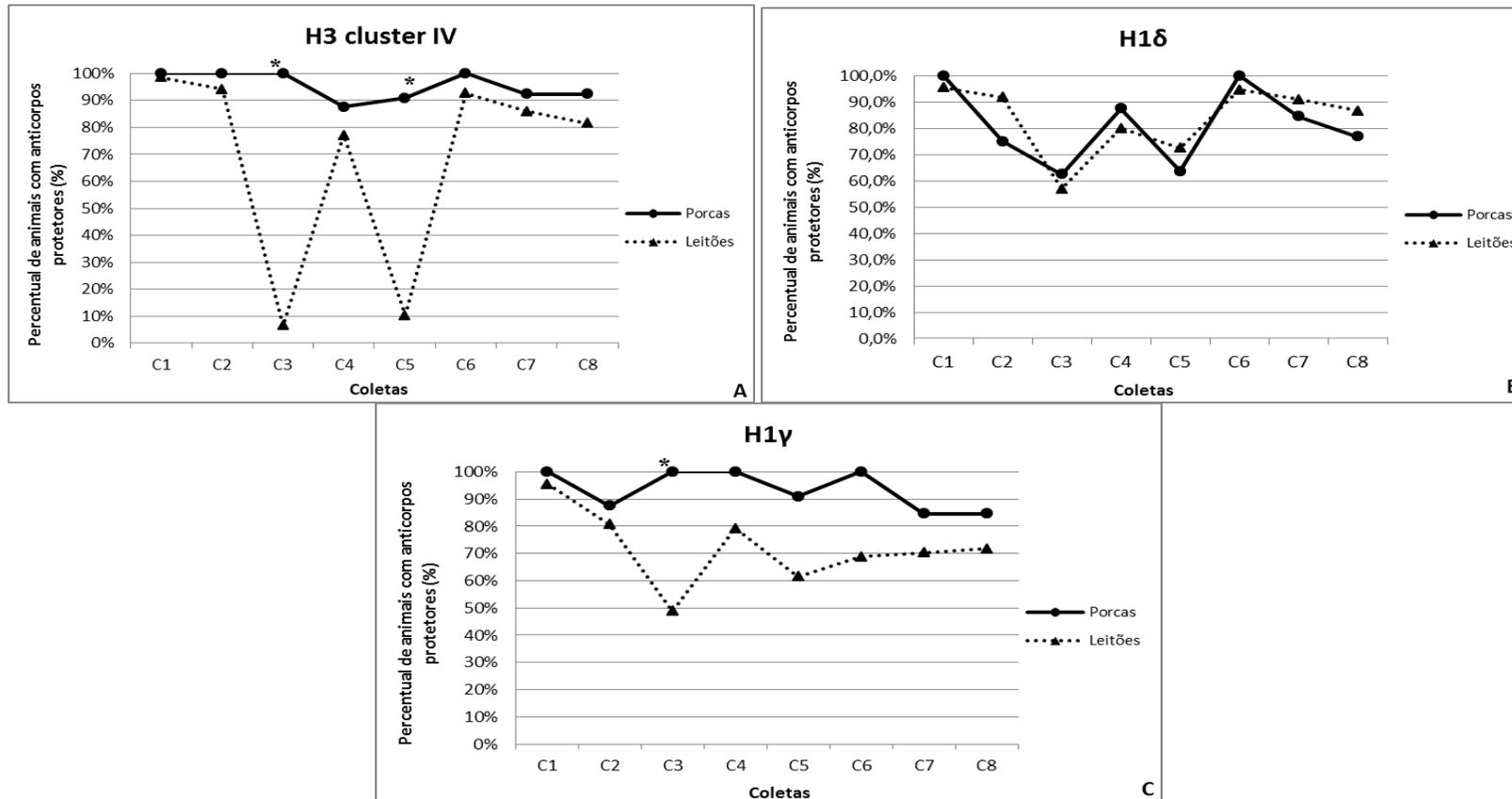


Figura 15: Percentual de porcas e leitões com títulos de anticorpos protetores na G4 em todas as coletas e para todas as amostras virais avaliadas. Letras A, B e C no canto inferior direito de cada gráfico referem-se às avaliações feitas para as amostras virais H3 cluster IV, H1δ e H1γ, respectivamente. *Diferença entre os grupos estudados (P<0,05).

protetores de porcas e leitões para o vírus H1 γ apresentaram um padrão semelhante apenas na C1 e C2, mostrando divergências nos percentuais ao longo do estudo. No entanto, a maior diferença foi encontrada na C3 (Figura 15C; P=0,0066), onde 100% das porcas apresentaram títulos protetores contra o H1 γ , enquanto somente 49% dos leitões tiveram títulos protetores contra o vírus detectáveis.

Discussão

Este estudo avaliou a presença de anticorpos anti- influenza em porcas e em seus leitões em quatro granjas pertencentes ao mesmo sistema de produção no Meio- Oeste dos Estados Unidos. As granjas 1, 2 e 3 iniciaram a utilização de uma vacina de subunidade autógena em todo o plantel reprodutivo uma semana antes do início das coletas, enquanto que G4 administrou uma única dose da mesma vacina cerca de três semanas após as outras granjas. Com exceção da G4, as demais granjas administraram a segunda dose da vacina aproximadamente quatro semanas após a primeira dose. Uma vacina comercial era utilizada em todas as granjas antes da decisão de produzir uma vacina de subunidade com amostras virais isoladas das granjas na tentativa de aumentar o sucesso no controle da influenza nos rebanhos.

Durante as coletas realizadas, porcas e leitões de maternidade da G2 demonstraram sinais clínicos sugestivos de infecção pelo SIAV, enquanto que nas demais granjas, nenhum sinal clínico sugestivo de doença foi observado ao longo das oito coletas. O pico de doença clínica observada na G2 ocorreu nas duas primeiras coletas, momentos em que foram observados os maiores percentuais de leitões soronegativos e com baixos títulos de anticorpos quando comparados ao restante das coletas, especialmente para as amostras vacinais H1- δ 1 e H1- γ . Semelhante ao ocorrido com leitões, porcas também apresentaram aumento nos títulos de anticorpos contra os três antígenos da vacina de subunidade no mesmo período. O aumento nos títulos de anticorpos na primeira e segunda coleta, acompanhado da ocorrência de doença clínica na G2 sugere que houve infecção ativa com vírus circulantes no rebanho, independente da utilização de vacina contra influenza como medida de controle e prevenção. As porcas amostradas foram anteriormente vacinadas com produto comercial inativado, que desencadeia uma resposta imune humoral e celular (Platt et al., 2011), mas fornece proteção parcial contra vírus heterólogos (Van Reeth et al., 2004). Desta forma, uma possível diferença entre amostras vacinais e amostras circulantes poderia explicar a presença de porcas com baixos títulos de anticorpos nos momentos amostrados, com consequente transferência de imunidade passiva inadequada aos leitões, que estavam, então, suscetíveis ao vírus circulante, apresentando doença clínica. O aumento nos títulos de anticorpos após a segunda coleta aliado ao desaparecimento de sinais clínicos até o final do estudo sugerem que a vacina de subunidade pode ter induzido melhor proteção contra os vírus circulantes, inibindo assim a ocorrência da doença clínica.

Vacinas de subunidade geralmente estimulam uma resposta imune protetora e específica, além de serem seguras devido à expressão somente dos genes heterólogos de interesse (Vander Veen et al., 2012). A associação entre a utilização de uma vacina de subunidade autógena, desaparecimento de sinais clínicos sugestivos de influenza suína e ausência de doença clínica ao longo do estudo sugere que a utilização da VSA foi eficiente na prevenção e controle da doença nos rebanhos. Bosworth et al. (2010) avaliaram se uma vacina derivada de um *Alphavirus* e expressando o gene da hemaglutinina H3 cluster IV poderia induzir imunidade e proteção contra vírus homólogos em animais com e sem anticorpos maternos. Neste estudo, a vacina de subunidade induziu uma resposta de anticorpos em leitões soronegativos antes da infecção com vírus homólogo. Além disso, animais vacinados apresentaram redução na carga viral em suabe

nasal e lavado broncoalveolar, ausência de febre e redução de lesões pulmonares após a infecção com vírus homólogo. Em outro estudo, suínos vacinados com vacina de subunidade contendo a hemaglutinina do H1N1 pandêmico (A/California/04/2009) e desafiados com vírus homólogo apresentaram maior resposta específica de anticorpos, redução de lesão pulmonar e da eliminação viral e maior média de ganho de peso diário comparado com animais não vacinados (Vander Veen et al., 2009). Estes resultados, associados aos encontrados no presente estudo, sugerem que vacinas de subunidade que utilizam a expressão de genes específicos em vetores podem ser eficientes ferramentas no controle e prevenção de doenças em rebanhos suínos.

Todas as granjas apresentaram anticorpos específicos contra antígenos presentes na vacina de subunidade autógena utilizada para a prevenção e controle da influenza suína. No entanto, de uma forma geral, as menores médias foram encontradas na G4, que utilizou somente uma dose da vacina no rebanho reprodutivo, ao contrário das outras granjas, que realizaram a vacinação em duas doses com intervalo de quatro semanas. O protocolo básico de vacinação contra influenza suína sugere o uso de duas doses do produto, com intervalo de duas a quatro semanas entre as doses (Easterday e Van Reeth, 1999). Além disso, a recomendação para a utilização de vacinas de subunidade também envolve o uso de duas doses (Vander Veen et al., 2009; Bosworth et al., 2010). Desta forma, a utilização de apenas uma dose da vacina de subunidade autógena no rebanho reprodutivo da G4 pode ter influenciado os níveis de anticorpos específicos contra as amostras vacinais nos animais amostrados quando comparado aos animais das outras granjas estudadas.

O nível de anticorpos detectado pelo teste NP ELISA ou anticorpos inibidores da hemaglutinação contra os vírus da vacina de subunidade autógena foi muito variável entre as granjas, leitegadas e entre cada leitão amostrado. Apesar do uso da vacinação em todo o rebanho reprodutivo com um produto específico produzido com amostras virais isoladas nos rebanhos estudados, os níveis de anticorpos variaram entre as porcas, independente do momento amostrado. No entanto, a vacina utilizada era de subunidade, contendo apenas a hemaglutinina de interesse, enquanto que a vacina comercial continha o vírus inteiro. Desta forma, a utilização do teste NP ELISA pode ter resultado na não detecção de resposta estimulada pela vacina de subunidade autógena, influenciando os níveis de anticorpos detectados. No entanto, apesar da utilização de vacina em todas as granjas, algumas porcas ainda não apresentaram anticorpos específicos contra os antígenos vacinais, sugerindo a ocorrência de falha vacinal nestes casos, que pode ser devido à conservação inadequada do estoque de vacinas, mau acondicionamento das vacinas durante o processo de vacinação dos animais ou falhas no momento da aplicação das vacinas.

A avaliação de anticorpos anti-NP por leitegadas mostrou que houve variação na ocorrência de leitões soronegativos dentro da mesma leitegada. Aproximadamente 29% das leitegadas avaliadas apresentaram pelo menos um leitão soronegativo, sugerindo que é comum ocorrer transferência incompleta de anticorpos passivos das porcas para os leitões. A falha na transferência de imunidade passiva também pode ser evidenciada pela diferença nos percentuais de porcas e leitões com títulos protetores contra as três amostras virais estudadas. Essas diferenças podem também estar associadas ao manejo da colostragem, uma vez que muitas granjas não realizam o acompanhamento completo do parto, não havendo assim um controle com o intuito de permitir que todos os leitões neonatos recebam a mesma quantidade de colostro.

A influenza suína ocorre geralmente em meses mais frios (Cox et al., 2004), mas a doença pode ser observada durante todo o ano em regiões onde haja grande variação térmica (Caron et al., 2010). Alguns estudos realizados na América do Norte demonstraram que a detecção viral durante todo o ano, com picos entre março/maio e setembro/novembro (Beaudoin et al., 2012; Anderson et al., 2013). De uma forma geral, a detecção de anticorpos anti-NP foi menor na sexta coleta (C6), que ocorreu no início de julho, quando as temperaturas apresentavam-se mais elevadas. O aumento na temperatura pode ter prejudicado a sobrevivência viral nas granjas estudadas, o que refletiu na menor detecção de anticorpos anti-nucleoproteína viral nesse período. Por outro lado, não foi observado o mesmo perfil de queda nos níveis de anticorpos contra antígenos presentes na vacina de subunidade autógena, uma vez que a vacinação regular com esse produto visava manter a resposta imune específica do rebanho.

Níveis de anticorpos em leitões neonatos geralmente são provenientes da transferência passiva da porca por meio do colostro. No entanto, anticorpos de leitões da G2 provavelmente foram provenientes de uma resposta imune primária à infecção natural. Independente da vacinação anterior com produto comercial, da ocorrência de infecção natural ou do uso de uma vacina de subunidade, deve-se atentar para o fato de que os níveis de anticorpos maternos em leitões são altamente variáveis e leitões suscetíveis podem ser responsáveis pela circulação viral nos galpões de maternidade. Subpopulações de porcas não imunes podem também existir em muitos sistemas de produção, diminuindo ainda mais os níveis de proteção adquiridos pelos leitões do colostro destas porcas. Os resultados encontrados sugerem que a melhoria nas vacinas utilizadas e até mesmo o método de vacinação a ser adotado podem ser úteis para fornecer não somente uma maior proteção cruzada contra diferentes amostras do SIAV, mas também um aumento na proteção para leitões neonatos.

A presença do SIAV em leitões lactentes pode ser influenciada por vários fatores como a qualidade da proteção passiva fornecida pela porca baseada na vacinação ou em infecções prévias, a quantidade de anticorpos passivos ingeridos pelos leitões ao nascimento, a introdução de uma nova amostra viral em um sistema de produção ou em uma granja individual, a utilização da vacinação como método de controle e prevenção, a qualidade da vacinação (correto armazenamento e administração), a resposta imune à vacinação ou à exposição. O mais importante, e muitas vezes negligenciado, é o fato de que anticorpos maternos podem prevenir a doença clínica, mas não impedem a infecção de leitões (Loeffen et al., 2003; Choi et al., 2004; Kitikoon et al., 2006;). Leitões neonatos podem se infectar, permanecendo subclínicos no rebanho até que algum fator desencadeie a doença clínica ou a queda de anticorpos maternos permita que esses animais tornem-se suscetíveis. Além disso, leitões com proteção inadequada podem permitir a circulação contínua dos vírus endêmicos nas granjas e ainda atuar como fonte de infecção para animais da creche após o desmame. O aperfeiçoamento de vacinas e/ou de rotas de administração mais eficazes podem proteger os animais da infecção e eliminação viral e vacinas que forneçam uma imunidade cruzada e consistente são necessárias para reduzir a prevalência das infecções com o SIAV em granjas de suínos. Os resultados encontrados poderão ajudar a orientar medidas de manejo, controle e biossegurança que possam afetar o nível de circulação do SIAV em granjas de rebanho reprodutivo, e ainda fornecer orientações para o uso de vacinas contra influenza em suínos.

Conclusões

Foram detectadas fêmeas soronegativas no rebanho reprodutivo, independente da administração de uma vacina contra influenza nestes animais. A transferência incompleta de imunidade

passiva pode ocorrer entre leitegadas e entre leitões de uma mesma leitegada e essa variabilidade pode acontecer independente do uso de vacinação de fêmeas como medida de controle para a influenza suína. Além disso, a variação nos níveis de anticorpos passivos em leitões neonatos ou níveis de anticorpos não protetores podem favorecer que estes animais atuem como reservatórios do vírus nos rebanhos suínos.

CAPÍTULO 3: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA EM LEITÕES LACTENTES E DE CRECHE EM GRANJAS VACINADAS DO MEIO-OESTE DOS ESTADOS UNIDOS

Resumo

O vírus da influenza é um dos agentes causadores de doença respiratória aguda em suínos, apresentando elevado potencial zoonótico. Vacinas inativadas utilizadas nos Estados Unidos têm ajudado na redução da doença clínica, mas sua habilidade em proteger contra a infecção e seu efeito sobre a eliminação viral ainda é inconsistente e reservatórios que possibilitam a circulação endêmica do SIAV são relativamente desconhecidos. Os objetivos deste estudo foram avaliar o nível de infecção pelo SIAV em leitões neonatos e de creche em granjas que utilizavam a vacinação contra influenza em rebanho reprodutivo; determinar os subtipos do SIAV presentes na população de suínos neonatos e de creche em um mesmo sistema de produção e caracterizar e comparar as sequências isoladas e a relação filogenética com as amostras vacinais utilizadas nos rebanhos. Quatro granjas produtoras de leitões, pertencentes ao mesmo sistema de produção no Meio-Oeste dos Estados Unidos e que utilizavam a vacinação rotineiramente contra influenza suína foram selecionadas para o estudo. Foram realizadas oito coletas em cada granja, com intervalo de 15 dias entre cada coleta. Em cada semana de amostragem, cento e trinta e cinco amostras de suabe nasal foram coletadas em cada uma das granjas, totalizando 540 amostras em cada semana de coleta e 4.320 amostras no total. Amostras de fluido oral foram coletadas dos mesmos grupos de leitões após a transferência destes para a creche, quando os animais tinham aproximadamente quatro semanas de idade. Sequências de vírus isoladas foram comparadas às amostras vacinais. SIAV foi detectado em 2,2% dos *pools* de suabe nasal e em 31% dos fluidos orais. O subtipo H1N2 foi o mais prevalente tanto para suabe nasal quanto para fluido oral, seguido pelo H3N2. Duas amostras de suabe nasal foram submetidas ao sequenciamento completo do genoma e análises das sequências obtidas revelaram que as duas amostras eram do subtipo H1N2 delta 1 (H1N2- δ 1) de origem humana com os segmentos PB1, PB2, PA, NS e NP provenientes do vírus H3N2 TRIG isolado em 1998 e o segmento M com origem no vírus H1N1 da pandemia de 2009. Os genes da hemaglutinina (H1- δ 1) destas amostras apresentaram uma taxa de similaridade entre sequências de nucleotídeos e aminoácidos de 97,6% e 97,5%, respectivamente, quando comparados ao vírus H1- δ da vacina de subunidade. Coletivamente, os resultados encontrados sugerem que leitões neonatos e de creche do sistema de produção estudado eram suscetíveis aos SIAV circulantes nas granjas.

Abstract

Swine influenza virus is one of the agents involved in acute respiratory disease affecting swine, with a zoonotic potential. Inactivated influenza vaccines in the United States have helped reducing clinical disease, but their ability to protect against infection and on virus shedding have been inconsistent, and reservoirs that allow the viral circulation are unknown. The objectives of this study were to evaluate the level of influenza infection in neonatal and nursery pigs on a farm using influenza vaccination in breeding females, determine the influenza subtype(s) present in these pigs in the same production system and compare the influenza sequences isolated and their phylogenetic relationship with the vaccine strains used in the sow herd. Four farms from the same production system in Midwest United States using influenza virus vaccination in the breeding females were selected. Samples were collected every other week, for

a total of eight samplings. A hundred and thirty five nasal swab samples were collected in each sampling, 540 per sampling and 4320 samples total. Oral fluid samples were collected from the same group of piglets after transport to the nursery at approximately four weeks of age. Genetic sequences were compared between influenza isolates and vaccine strains. SIAV was detected in 2.2% and 31% of pooled nasal swabs and oral fluid samples, respectively. H1N2 subtype was the most prevalent for nasal swab and oral fluid samples, followed by H3N2 subtype. Two nasal swab samples were submitted to complete genome sequencing and revealed they were a human delta 1 H1N2 subtype (H1N2- δ 1) with PB1, PB2, PA, NS e NP segments from TRIG H3N2 isolated in 1998 and M segment from pandemic H1N1 virus. HA gene was 97.6% and 97.5% similar to the nucleotide and amino acid sequences compared to the H1- δ virus in the subunit vaccine, respectively. Collectively, results suggest that neonatal and nursery pigs from the production system were susceptible to SIAV circulating in the farms.

Introdução

Influenza é uma doença viral zoonótica que acarreta prejuízos econômicos e à saúde de humanos e animais em todo o mundo. Em suínos, o vírus da influenza A (SIAV) é uma das causas primárias de doença respiratória e um componente importante do complexo de doença respiratória suína (PRDC). Três diferentes subtipos do vírus da influenza suína (H1N1, H1N2 e H3N2) circulam na população de suínos em todo o mundo e os vírus suínos têm origem e caracterização distinta nos diferentes continentes (Vincent et al., 2008). Nos EUA, o vírus está em constante circulação e acredita-se que cerca de 50% dos suínos possuam anticorpos contra H1N1 (Chambers et al., 1991) enquanto que, na Europa, os subtipos H1N1 e H3N2 se tornaram endêmicos em algumas regiões com prevalência atingindo 80% e 58%, respectivamente (Van Reeth et al., 2008).

Apesar de vacinas inativadas utilizadas nos Estados Unidos terem ajudado na redução da doença clínica, sua habilidade em proteger contra a infecção e seu efeito sobre a eliminação viral ainda é inconsistente. Reservatórios que possibilitam a circulação endêmica do SIAV são desconhecidos e a prevalência do vírus em populações de leitões lactentes não é bem caracterizada. Vacinas inativadas contra influenza usadas em rebanhos reprodutivos estimulam a produção de anticorpos, que são transferidos aos leitões lactentes no colostro durante as primeiras horas de vida (Choi et al., 2004). Anticorpos maternos podem proteger leitões neonatos e de creche da infecção pelo vírus da influenza dependendo da quantidade e qualidade dos anticorpos recebidos pelo colostro das porcas. A circulação viral em rebanhos reprodutivos pode ocorrer devido à reinfeção de leitões neonatos com níveis inadequados de anticorpos e, além disso, leitões infectados, mas sem doença clínica, podem ser responsáveis pela transmissão do SIAV aos outros leitões (Allerson et al., 2013), uma vez que a imunidade colostrual diminuiu ao longo do ciclo de produção (Liu et al., 2008).

Anticorpos adquiridos passivamente podem interferir com a resposta imune primária subsequente à vacinação contra influenza (Kitikoon et al., 2006) e estudos mostraram que anticorpos maternos raramente previnem a doença com o vírus da influenza, mas podem fornecer uma proteção parcial (Loeffen et al., 2003). A falta de proteção cruzada fornecida pelas vacinas inativadas contra as amostras geneticamente diferentes que circulam nos Estados Unidos pode contribuir para a redução da proteção fornecida pelos anticorpos maternos induzidos pela vacinação em suínos recém-nascidos. Existe chance de que a população de suínos esteja inadequadamente protegida e que esses animais possam servir como fonte de infecção pelo vírus da influenza em rebanhos suínos. No entanto, questões como prevalência da

infecção pelo vírus da influenza em leitões neonatos e de creche em rebanhos com circulação endêmica do vírus, bem como a possibilidade de existir múltiplos vírus contribuindo para infecções endêmicas e como estes vírus são detectados em populações não adequadamente protegidas contra a infecção pelo vírus da influenza ainda permanecem sem resposta.

Estudos recentes realizados na América do Norte com leitões de creche identificaram múltiplos subtipos do vírus da influenza em fluidos orais uma semana pós-desmame dentro de um sistema de produção usando a rotina de vacinação contra influenza em animais de reprodução (Brown et al, 2011, dados não publicados). Estes dados sugerem que o vírus da influenza pode circular em leitões de creche com doença subclínica, e vírus da influenza similares podem estar circulando endemicamente em um número limitado de leitões neonatos antes do desmame. No entanto, permanece desconhecido se a circulação dos vírus da influenza em suínos neonatos antes da desmama é similar à circulação na creche e se os vírus são geneticamente homogêneos ou variáveis. Além disso, não se sabe se esses vírus são similares aos vírus presentes nas vacinas usadas no rebanho reprodutivo. Evidências da circulação do SIAV em animais de creche com doença subclínica sugerem que suínos neonatos podem ser uma população sentinela, onde a transmissão inicial ocorre com potencial para a introdução de novas variantes ou para a ocorrência de rearranjos entre vírus circulantes, independente da presença de anticorpos maternos.

Os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar a ocorrência de infecção pelo SIAV em leitões lactentes e de creche em granjas que utilizavam a vacinação contra influenza em rebanho reprodutivo; 2) determinar os subtipos do SIAV presentes na população de suínos lactentes e de creche em um mesmo sistema de produção e 3) caracterizar e comparar as sequências isoladas das populações de leitões lactentes e de creche e a relação filogenética com as amostras vacinais utilizadas nos rebanhos.

Material e Métodos

- Animais e amostras

Quatro granjas (G1 a G4) produtoras de leitões, com plantel variando entre 4200 e 6200 fêmeas e pertencentes ao mesmo sistema de produção no Meio-Oeste dos Estados Unidos foram selecionadas para o estudo (Figura 2). As fêmeas reprodutoras eram rotineiramente vacinadas contra influenza suína com duas doses por via intramuscular (três e seis semanas pré-parto) da vacina comercial MaxiVac Excell® 5.0 (Merck Animal Health) contendo as amostras virais H1N1- δ 2, H1N1- γ , H3N2- cluster I e H3N2- cluster IV, de acordo com o protocolo padrão recomendado pelo fabricante. Uma semana antes do início da coleta das amostras, as granjas 1, 2 e 3 iniciaram a imunização completa do rebanho reprodutivo com uma vacina de subunidade autógena (VSA) contendo H3- cluster IV, H1- δ 1 e H1- γ isolados do rebanho em 2012. Porcas da G4 receberam uma única dose da VSA aproximadamente 15 dias após as outras granjas. Uma segunda dose desta vacina foi administrada somente em porcas da G1, G2 e G3 aproximadamente quatro semanas após a primeira dose. As amostras foram coletadas a cada 15 dias em todas as granjas, no período de março a maio e de julho a agosto de 2013, totalizando oito coletas (Figura 16). Durante cada coleta, animais diferentes da coleta anterior eram amostrados, de maneira que nenhum animal foi amostrado mais de uma vez durante o estudo. Devido a um surto causado pelo vírus da diarreia epidêmica suína (PEDv) em diversas granjas no Meio-Oeste dos Estados Unidos, as granjas que participaram do experimento decidiram, por questões de biossegurança, suspender as coletas de amostras em maio e o experimento só foi retomado em julho de 2013.

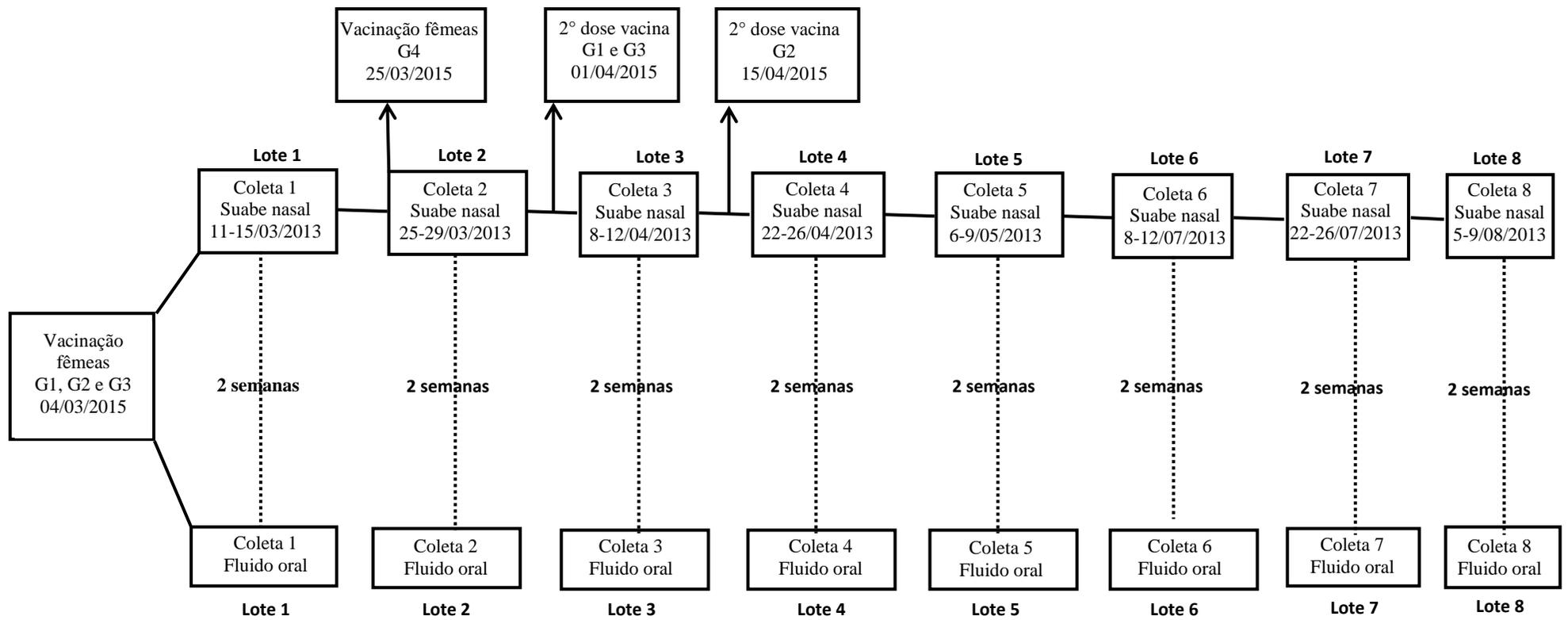


Figura 16: Fluxograma de coleta de amostras de suabe nasal de leitões neonatos e fluido oral de leitões de creche nas quatro granjas do Meio- Oeste dos Estados Unidos.

Amostras de suabe nasal de 135 leitões com 12 a 17 dias de idade foram coletadas em cada granja e em cada coleta, totalizando 540 amostras em cada semana de coleta e 4.320 amostras no total. Cada suabe nasal era colocado em um tubo de 5ml contendo meio de transporte (meio mínimo essencial – MEM) e todos os tubos eram mantidos em gelo até o processamento no laboratório. Todos os leitões de uma mesma leitegada eram submetidos à coleta de suabe nasal de forma que uma média de 10 a 13 leitegadas em cada granja eram amostradas durante cada coleta.

Amostras de fluido oral foram coletadas dos mesmos grupos de leitões após a transferência destes para a creche, quando os animais tinham aproximadamente quatro semanas de idade (Figura 16). Cordas de algodão de aproximadamente 1,3 metros com as pontas desfiadas foram amarradas nas baias, onde permaneceram por cerca de 30 minutos para que os suínos pudessem mastigá-las. Após esse período, as cordas foram retiradas e colocadas em sacos plásticos para a compressão manual e retirada do fluido oral (Schaefer et al., 2013). Um total de três a oito amostras de fluido oral foram coletadas em cada semana por funcionários das granjas. As amostras de fluido oral eram enviadas congeladas e mantidas a -80°C até o momento do uso.

As amostras de suabe nasal eram homogeneizadas por cerca de cinco a 10 segundos em vortex, filtradas em filtro de 0,22µm e imediatamente transferidas para microtubos de 1,5 ml. Um total de 200µl de três amostras de suabe nasal consecutivas (*pool*) foi coletado em um novo microtubo para posterior utilização no teste de triagem para detecção de RNA viral, totalizando 45 *pools* de amostras em cada granja e em cada coleta e 1440 *pools* no total. Todas as amostras originais e os *pools* de suabe nasal foram mantidas a -80°C até o momento do uso. O processamento das amostras e os demais testes referentes a este estudo foram realizados no laboratório de Pesquisa em Influenza Suína do Animal Research Center (ARS), localizado no National Animal Disease Center (NADC), United States Department of Agriculture (USDA), Ames, Iowa, Estados Unidos.

- *Extração do RNA viral*

Todas os *pools* de suabe nasal e fluido oral foram submetidos ao processo de extração de RNA por meio de um kit comercial (*MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit*, Life Technologies) e utilizando o equipamento *MagMAX™ Express-96*. O processo foi realizado de acordo com recomendações do fabricante. Após o processo de extração, as amostras foram mantidas a -80°C em placas de 96 poços até o momento do uso.

- *Detecção de RNA viral por RT-PCR em tempo real e subtipagem*

Os *pools* de suabe nasal de leitões neonatos e as amostras de fluido oral de leitões de creche com aproximadamente quatro semanas de idade foram submetidos a uma triagem por RT-PCR em tempo real por meio do uso do kit *Vet MAX™-Gold SIV Detection* (Ambion, Austin, Texas, USA) para avaliação da presença do vírus da influenza. Amostras com valores de $Ct \leq 38$ foram consideradas positivas.

Teste de subtipagem foi realizado em amostras individuais de suabe nasal de todos os *pools* positivos na triagem através da RT-PCR em tempo real com o uso do kit *Vet MAX™-SIV Subtyping RNA* (Ambion, Austin, Texas, USA). Amostras com valores de $Ct \leq 35$ foram consideradas positivas e $35.0 < Ct \leq 38.0$ foram consideradas suspeitas.

Amostras positivas na triagem foram também submetidas a uma RT-PCR em tempo real para a detecção dos genes da matriz do vírus pandêmico (pM) e do gene da matriz do vírus TRIG Norte Americano. Valores de $C_t \leq 40.0$ foram considerados positivos (Harmon et al., 2010).

- Isolamento viral

Amostras de suabe nasal positivas na PCR de triagem foram submetidas ao processo de isolamento viral. Placas de cultivo celular de 48 poços contendo monocamada confluyente de células (MDCK) foram lavadas três vezes com tampão fosfato salino (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ mM, pH7,4) e 200µl de amostra foram adicionados a cada poço. Após incubação por uma hora em estufa de CO₂ a 5%, a uma temperatura de 37°C, MEM suplementado com antibióticos (200U/mL de penicilina, 200µg/mL de estreptomicina e 1,25µg/mL de anfotericina B), tripsina TPCK (1µg/mL) e albumina sérica bovina foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas por 48 horas ou até as amostras apresentarem efeito citopático (CPE), caracterizado por arredondamento de células, formação de grumos e lise da monocamada (OIE, 2010). O sobrenadante foi recolhido e submetido à técnica de hemaglutinação (HA). Amostras que apresentaram hemaglutinação positiva foram consideradas positivas e na ausência de hemaglutinação, uma nova passagem em MDCK foi realizada.

O isolamento a partir de amostras de fluido oral positivas na PCR de triagem foi realizado em garrafas de 25cm² com monocamada confluyente de MDCK. Os procedimentos realizados seguiram o mesmo protocolo de isolamento utilizado para suabe nasal, com algumas modificações. Amostras de fluido oral foram submetidas à centrifugação a uma velocidade de 1500 x g por 10 minutos, a 4°C e 300µl do sobrenadante foram utilizados para inocular cada garrafa de cultivo celular, que foram previamente lavadas com PBS. Após o período de incubação, o inóculo foi retirado da garrafa e estas foram novamente lavadas três vezes com PBS. Finalmente, MEM suplementado foi adicionado a cada garrafa, que permaneceu em estufa de CO₂ a 5%, a uma temperatura de 37°C por até sete dias, ou até as garrafas apresentarem CPE. O sobrenadante foi submetido ao teste de HA e amostras negativas foram submetidas a uma nova passagem em cultivo celular. Amostras positivas no isolamento viral foram armazenadas a -80°C até momento do uso.

- Sequenciamento completo do genoma

Cinco amostras de suabe nasal e cinco amostras de fluido oral foram selecionadas para o sequenciamento completo do genoma do vírus da influenza. Para amostras de suabe nasal, duas amostras positivas no isolamento viral e com os maiores títulos virais no teste de inibição da hemaglutinação foram selecionadas. As três amostras restantes de suabe nasal foram selecionadas considerando-se os valores de $C_t \leq 32$ no teste de RT-PCR para subtipagem. Para fluido oral, amostras com diferentes subtipos e com valores de $C_t \leq 30$ no teste de RT-PCR de triagem e com valores de $C_t \leq 32$ no teste de RT-PCR para subtipagem foram selecionadas. Todas as amostras selecionadas foram submetidas ao sequenciamento completo do genoma pela plataforma *Ion Personal Genome MachineTM (PGMTM) System*, de acordo com Bowman et al.,(2014). Resumidamente, todos os segmentos das amostras selecionadas foram submetidos à amplificação por PCR, seguido da purificação do cDNA e preparação das bibliotecas utilizando o kit *Ion Plus Fragment Library kit* (Life Technologies), com posterior diluição e agrupamento das bibliotecas para amplificação. O DNA foi submetido ao sequenciamento e as sequências obtidas foram montadas usando procedimentos padrões. Estas sequências foram combinadas com todas as sequências originais com segmentos completos do vírus da influenza de suínos da América do Norte disponíveis no *Resource Database* (Squires et al., 2012). Sequências do gene

da hemaglutinina foram e alinhadas usando Clustal W. A análise filogenética foi realizada pelo método de distância *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987) utilizando o modelo de diferença de nucleotídeos através do software MEGA 4.0.2 (Tamura et al., 2011). Foi utilizado teste de bootstrap de 1000 replicatas e os valores acima de 60 foram indicados no nóculo correspondente (Tamura et al., 2011).

Resultados

- Detecção do RNA viral e subtipagem

SIAV foi detectado em 2,2% dos *pools* de suabe nasal (32/1.440) e a maioria das amostras de suabe nasal positivas foram detectadas nas duas primeiras coletas. G2 foi a granja com maior percentual de amostras positivas, seguida por G1 e não houve detecção viral em amostras de suabe nasal na G2 nas seis coletas restantes.

A avaliação dos subtipos nas amostras individuais de suabe nasal revelou 1,8% das amostras com subtipo detectável (76/4.320) e 0,2% das amostras (9/4.320) com valores de Ct classificados como suspeitos. A distribuição de amostras positivas no teste de subtipagem em cada granja pode ser vista na Tabela 2. De uma forma geral, 56 amostras eram do subtipo H1N2, três H3N2, 12 amostras foram identificadas como um *mix* de infecção pelos subtipos H1/H3 e cinco amostras foram positivas somente para o subtipo N2, sugerindo que o vírus estava presente em baixas quantidades nestas amostras, afetando assim a sensibilidade da detecção das hemaglutininas. Dentre os nove suabes nasais classificados como suspeitos cinco eram do subtipo H1N2, dois tiveram somente a hemaglutinina H1 detectada e os outros dois tiveram somente a H3 detectada. O maior número de amostras com subtipos H1N2, H3N2 e infecções mistas foi em C1 e C2, correspondendo ao período quando leitões lactentes apresentaram doença clínica sugestiva de infecção pelo vírus da influenza. O subtipo viral H1N2 foi o único detectado nas granjas 1, 3 e 4, com exceção de um H3 classificado como suspeito encontrado na G1 em C7. A G2 foi a única a apresentar infecções mistas em amostras de suabes nasais com os subtipos H1N2 e H3N2. O gene da matriz do vírus pandêmico (pM) foi detectado em 32,9% (25/76) das amostras positivas na triagem. Nenhuma amostra de suabe nasal avaliada apresentou o gene da matriz do vírus TRIG Norte Americano.

As amostras de fluido oral foram coletadas por funcionários das granjas e variaram em quantidade entre as quatro localidades. Um total de 158 amostras foi enviado pelas quatro granjas e destas, 31% apresentaram o vírus da influenza pelo teste de triagem na RT-PCR em tempo real. Similar aos resultados encontrados para suabes nasais, G2 apresentou o maior número de amostras de fluido oral positivas (51% - 25/49). As granjas 1, 3 e 4 demonstraram aproximadamente 14,2%, 10,2% e 24,5% de amostras de fluido oral positivas para SIAV, respectivamente. Das amostras de fluido oral positivas no teste de triagem, 28,6% (14/49) eram do subtipo H1N2, 6,1% (3/49) eram do subtipo H3N2 e 16,3% (8/49) tiveram somente a neuraminidase N2 detectada na RT-PCR em tempo real para detecção dos subtipos virais (Tabela 2). Um total de 18,4% (9/49) dos fluidos orais positivos foram considerados suspeitos no teste de subtipagem, sendo que seis amostras foram suspeitas para H1N2, uma para H3N2 e duas tiveram resultados suspeitos para infecções mistas de H1/H3. Aproximadamente 30,6% (15/49) das amostras de fluido oral positivas no teste de triagem não tiveram o subtipo detectável. Nenhuma amostra positiva no teste de triagem nas granjas 1 e 3 tiveram o subtipo detectado. Em geral, amostras de fluido oral apresentaram elevados valores de Ct, sugerindo limitada concentração viral. Somente 20,5% (8/49) das amostras positivas no teste de triagem

Tabela 2: Relação de amostras de suabe nasal e fluido oral positivos para o vírus da influenza nos testes de subtipagem, isolamento viral e sequenciamento completo do genoma provenientes das quatro granjas do Meio-Oeste dos Estados Unidos.

	Suabe nasal				Fluido oral				Isolamento viral	Sequenciamento completo
	H1N2	H3N2	H1/H3	N2	H1N2	H3N2	H1/H3	N2		
G1	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2	45	3	12	4	13	-	-	8	14*	2*
G3	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
G4	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-
Total	56	3	12	5	13	3	-	8	14	2

*Somente amostras de suabe nasal foram positivas no teste de isolamento viral e sequenciamento completo do genoma.

- Ausência de amostras positivas

tiveram valores de $Ct \leq 30.0$, o que pode interferir no sucesso do isolamento e sequenciamento viral. Diferente do que ocorreu com as amostras de suabe nasal, nenhuma amostra de fluido oral do subtipo H3N2 foi detectada na G2. Por outro lado, nenhuma amostra do subtipo H3N2 foi detectada em suabes nasais na G4.

Na avaliação do gene da matriz viral, 51% (25/49) das amostras de fluido oral positivas na triagem demonstraram o gene pM, sendo que estas amostras eram provenientes somente das granjas 2 e 4. Três amostras da G4 apresentaram o gene da matriz do vírus TRIG e estas amostras foram provenientes da terceira semana de coleta (C3). Vinte e uma amostras foram negativas para ambos os genes avaliados. A presença de amostras de suabe nasal e fluido oral negativas para ambos os genes da matriz do TRIG e pM pode estar relacionada à ausência de quantidade adequada de vírus na amostra.

- Isolamento viral

Amostras individuais dos *pools* de suabe nasal e amostras de fluido oral positivas na PCR de triagem foram submetidas ao isolamento viral. Um total de 96 amostras de suabe nasal provenientes dos 32 *pools* foram inoculados em monocamada confluyente de MDCK e aproximadamente 14,6% (14/96) das amostras foram positivas na segunda passagem, apresentando ECP em até 48 horas pós-inoculação. Todas as amostras eram provenientes da G2, referentes à segunda coleta (C2) e do subtipo H1N2. Nenhum vírus foi isolado de amostras das granjas 1, 3 e 4. Com relação às amostras de fluido oral positivas na PCR para triagem, nenhuma apresentou vírus viável capaz de causar efeito citopático em cultivo celular de MDCK.

- Sequenciamento completo do genoma

Todas as amostras de suabe nasal submetidas ao sequenciamento completo do genoma viral eram do subtipo H1N2. Dentre as cinco amostras selecionadas, três eram provenientes da G2 e as duas restantes eram provenientes da G1 e G3. As amostras utilizadas a partir do isolamento viral apresentaram títulos de 256UHA e 512 UHA na segunda passagem em cultivo celular. Para o sequenciamento completo do genoma do vírus da influenza a partir de fluido oral, duas amostras do subtipo H3N2 foram provenientes da G4, enquanto que as três amostras restantes eram da G2, sendo uma H3N2 e duas H1N2.

Entre as 10 amostras selecionadas somente as duas amostras de suabe nasal provenientes da segunda passagem em células apresentaram resultados de leitura suficientes para montar as sequências de genes completas. A caracterização de cada segmento para as duas amostras sequenciadas pode ser visto na Tabela 3. Análises das sequências obtidas revelaram que as duas amostras eram do subtipo H1N2 delta 1 (Figura 17) de origem humana que emergiu em 2004 após o rearranjo entre o H1N2 humano e o H3N2 TRIG (possui a hemaglutinina H1 do vírus humano e a N2 do vírus suíno).

Tabela 3: Caracterização dos oito segmentos genéticos do vírus da influenza provenientes do sequenciamento completo das duas amostras de suabe nasal com isolamento positivo para o vírus da influenza A isoladas da G2.

Amostra	HA1	N2	PB2	PB1	PA	NP	M	NS
1	Delta 1	2002	TRIG	TRIG	TRIG	TRIG	Pandêmico	TRIG
2	Delta 1	2002	TRIG	TRIG	TRIG	-	Pandêmico	TRIG

- não foi possível sequenciar

Os genes da hemaglutinina (H1- δ 1) das amostras submetidas ao sequenciamento apresentaram uma taxa de similaridade entre sequências de nucleotídeos e aminoácidos de 97,6% e 97,5%, respectivamente, quando comparados ao vírus H1- δ da vacina de subunidade.

Discussão

A detecção do SIAV variou dentro da mesma granja e entre granjas. No entanto, a reduzida detecção viral nas amostras sugerem que quantidades do vírus podem não ter sido suficiente para uma detecção consistente pela técnica de RT-PCR nas populações estudadas, ou que já havia passado a fase aguda da infecção nas granjas. O diagnóstico clínico da influenza suína em leitões lactentes é difícil e os dados obtidos neste estudo sugerem que pode ser necessária a análise de um grande número de amostras para confirmar a presença do SIAV nas granjas. É aceitável que os métodos de diagnóstico não detectem exatamente todos os animais que foram amostrados, apesar de o SIAV ter sido identificado pelo menos uma vez durante as coletas em cada granja. É muito difícil avaliar o impacto da infecção do SIAV endêmico nas granjas. No entanto, a presença do vírus nos mesmos grupos de leitões na fase de creche duas semanas após a coleta inicial sugere que o vírus foi transmitido de leitões lactentes para baias adjacentes de leitões suscetíveis ou vírus externos foram introduzidos durante o trânsito de animais da maternidade para a creche ou após a chegada destes nos galpões de creche.

O uso de fluido oral coletado em baias de suínos coletivas é uma técnica que vem sendo muito utilizada em levantamentos epidemiológicos por ser sensível, barata e por facilitar o monitoramento de um maior número de animais e de patógenos detectados (Detmer et al., 2011; Romagosa et al., 2011). Neste estudo, a prevalência do SIAV em fluidos orais provenientes de leitões de creche foi elevada quando comparada aos leitões lactentes. Cada amostra de fluido oral representa um grande número de suínos, o que pode ter influenciado o nível de detecção viral nessas amostras. Consistente com os resultados encontrados para suabe nasal, G2 apresentou o maior número de amostras de fluido oral infectadas pelo SIAV quando comparado com as outras granjas. Além disso, vírus do subtipo H3 foi detectado em amostras de fluido oral da G4, ao contrário do que aconteceu com as amostras de suabe nasal, onde somente vírus do subtipo H1 foram encontrados nesta granja. Curiosamente, títulos inibidores da hemaglutinação contra o vírus do subtipo H3 cluster IV em leitões lactentes foram menores na G4 (Capítulo 2) e podem sugerir a baixa proteção. Além disso, vírus H3 com o gene da matriz do TRIG foram detectados nas primeiras semanas de coleta de amostras na G4 e um H3 com o gene da matriz do vírus pandêmico foi detectado no final das coletas, sugerindo a introdução de um vírus potencialmente rearranjado. Diversos vírus foram detectados em amostras de fluido oral como suspeitos, o que não é incomum. Fluidos orais podem conter baixas concentrações do vírus influenza, comprometendo o isolamento e sequenciamento virais. A dificuldade em isolar o SIAV de amostras de fluido oral já foi observada em outros estudos (Wills et al., 1997; Detmer et al., 2011, Romagosa et al., 2011). Títulos virais em fluido oral podem ser afetados pelo tempo entre a coleta e o processamento e por artefatos presentes nas amostras (Romagosa et al., 2012), prejudicando assim o isolamento do vírus em cultivo celular.

Uma semana antes do início das coletas, as granjas 1, 2 e 3 iniciaram o uso de uma vacina de subunidade contendo as amostras virais H3- cluster IV, H1- δ 1 e H1- γ em todo o rebanho reprodutivo. Nas duas primeiras semanas de coleta, leitões neonatos da G2 apresentavam sinais clínicos sugestivos da infecção pelo SIAV e amostras de suabe nasal confirmaram a presença do vírus no momento do surto de doença respiratória observado nessa granja. Os subtipos virais detectados por RT-PCR na G2 incluíram H1N2 e H3N2 e após a segunda semana de coleta,

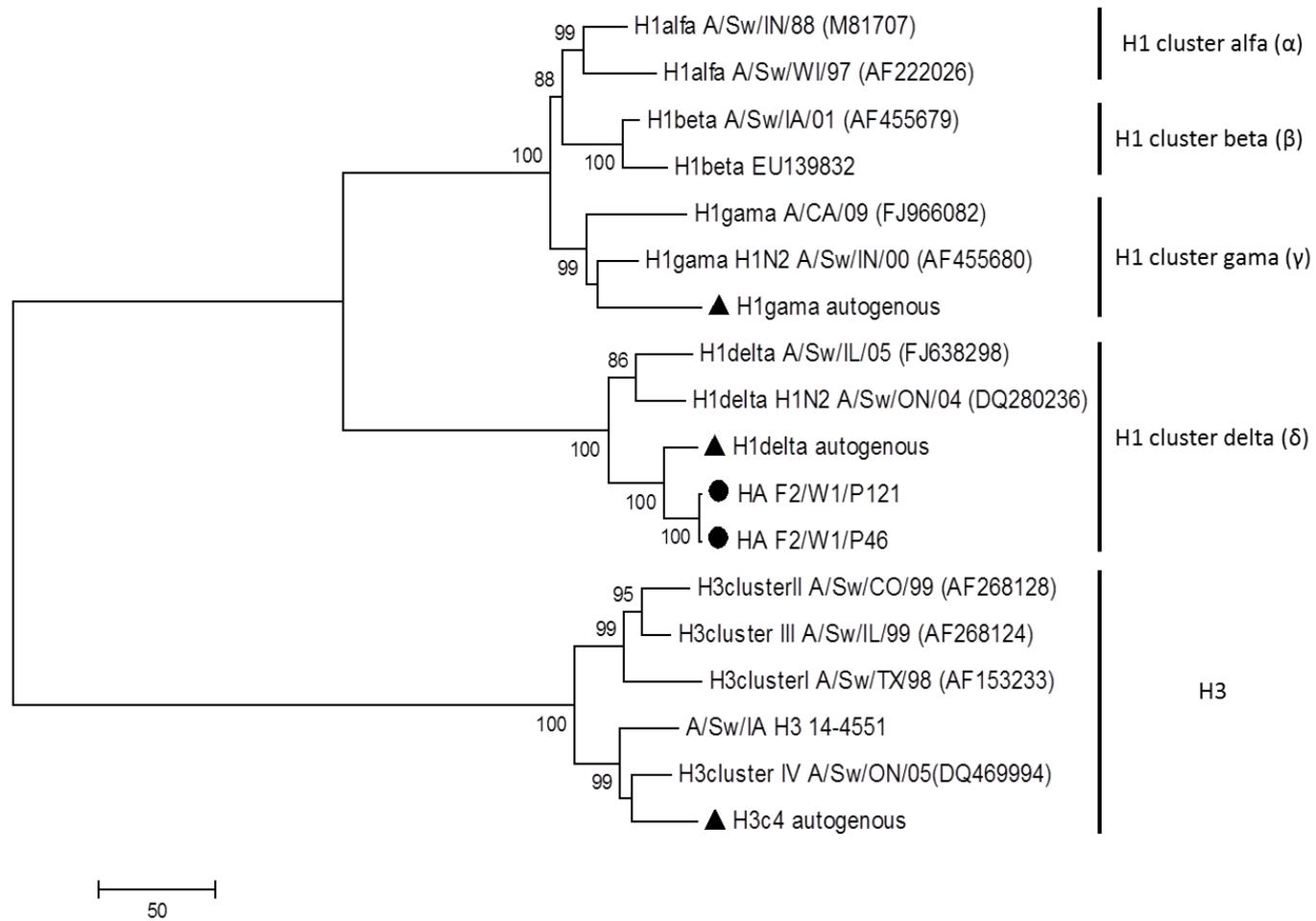


Figura 17: Árvore filogenética construída com base no sequenciamento do gene da hemaglutinina (HA) pelo método *Neighbor-joining* (usando a diferença de nucleotídeos) com repetição de bootstrap de 1000 por meio do software Mega 4.0.2. Somente valores de *bootstrap* maiores que 60% estão representados. Triângulo fechado: amostras virais usadas na produção da vacina autógena utilizada pelas granjas estudadas. Círculo fechado: amostras virais isoladas de suabes nasais das granjas estudadas.

todas as amostras de suabe nasal foram negativas para o SIAV até o final do estudo. Fatores como rápida variação genética viral e circulação de diferentes amostras virais em granjas de suínos faz com que a utilização de vacinas autógenas seja cada vez maior nos Estados Unidos. Essas vacinas são preparadas a partir de amostras de vírus isoladas do próprio rebanho (Vincent et al., 2008) promovendo assim uma proteção mais específica contra os vírus que circulam no rebanho, uma vez que a proteção contra vírus heterólogos é parcial ou nula (Cox et al., 2004). As amostras virais do H1N2 que circulavam na G2 durante a observação de doença clínica eram muito semelhantes à amostra viral da vacina de subunidade (H1- δ 1) utilizada no rebanho reprodutivo como medida preventiva da influenza suína. Assim, a redução na doença clínica a partir da segunda semana de coleta, seguida pela ausência de detecção viral em amostras provenientes de leitões neonatos no mesmo período sugerem que a vacina de subunidade forneceu uma boa proteção aos leitões via colostro, ajudando no controle da doença ao longo do estudo.

Os resultados encontrados sugerem que leitões de creche do sistema de produção estudado eram suscetíveis aos SIAV circulantes nas coletas 1 e 2 e podem não apresentar níveis de anticorpos passivos residuais adequados para a proteção ao longo do período de creche. No entanto, a introdução de SIAV antigenicamente distintos pode ocorrer independente dos níveis de anticorpos maternos nestes animais. Além disso, os resultados sugerem que leitões lactentes podem servir de reservatórios do SIAV ao longo do sistema de produção em granjas com imunidade inadequada contra o vírus e medidas de controle visando uma maior proteção dos animais torna-se extremamente importante nesses rebanhos. Neste sentido, a utilização de vacinas de subunidades em rebanhos reprodutivos suínos pode ser de grande utilidade, uma vez que a imunidade fornecida pelos anticorpos maternos será mais específica, aumentando o sucesso no controle e prevenção da doença clínica nos rebanhos.

Conclusões

Diferentes subtipos do SIAV podem circular e causar doença em populações de leitões lactentes em granjas que utilizam a vacinação no rebanho reprodutivo. Além disso, esses leitões podem servir de reservatórios do SIAV ao longo do sistema de produção em granjas com imunidade inadequada contra o vírus e a introdução de vírus antigenicamente diferentes ou o rearranjo entre vírus circulantes pode ocorrer independente do nível de proteção desses animais.

CAPÍTULO 4: DISTRIBUIÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS INFLUENZA EM SUÍNOS EM GRANJAS DE CICLO COMPLETO DE MINAS GERAIS*

Resumo

O vírus da influenza suína A (SIAV) foi identificado em suínos no Brasil em 1974 e após o surgimento do vírus pandêmico H1N1 em 2009 (H1N1pdm09), poucos estudos reportaram a presença do vírus da influenza em rebanhos suínos. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil sorológico para o vírus da influenza em granjas de ciclo completo no estado de Minas Gerais, Brasil. Trinta granjas sem histórico de vacinação para influenza suína pertencentes às quatro maiores mesorregiões produtoras de suínos em Minas Gerais (Zona da Mata, Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, Sul/Sudoeste e Região Metropolitana de Belo Horizonte) foram selecionadas. Amostras de sangue foram coletadas aleatoriamente de 20 animais por categoria do ciclo de produção: fêmeas de reprodução (porcas e marrãs), leitões de maternidade (2-3 semanas), leitões de creche (4-7 semanas), leitões de recria (8-14 semanas) e animais de terminação (15-16 semanas), totalizando 100 amostras por granja e 3.000 animais no estudo. As amostras foram testadas pela técnica de inibição da hemaglutinação contra o vírus H1N1 pdm09 e contra o H3N2 suíno (A/swine/Iowa/8548-2/99). Os percentuais de animais soropositivos para H1N1pdm09 e H3N2 foram 26,23% e 1,57%, respectivamente, e os percentuais de rebanhos positivos para ambos os vírus foram 96,6% e 13,2%, respectivamente. Os perfis sorológicos foram diferentes para ambos os vírus e entre as áreas estudadas, sugerindo uma elevada variabilidade na circulação viral no estado de Minas Gerais. Além disso, a presença de animais soronegativos sugere suscetibilidade à infecção pelo vírus da influenza, aumentando a possibilidade de surtos de doença respiratória nos rebanhos.

Abstract

Swine influenza A virus (SIAV) has been identified in pigs in Brazil since 1974 and after the emergence of pandemic H1N1 in 2009 (H1N1pdm09), few studies reported the presence of influenza virus in Brazilian herds. The objective of this study was to evaluate the serological profile for influenza virus in farrow-to-finish pig farms in Minas Gerais state, Brazil. Thirty farms with no SIAV vaccination history were selected from the four largest pig production areas in Minas Gerais state (Zona da Mata, Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, South/Southwest and Belo Horizonte metropolitan area). At each farm, blood samples were randomly collected from 20 animals in each production cycle category: breeding females (sows and gilts), farrowing crate (2–3 weeks), nursery (4–7 weeks), grower pigs (8–14 weeks), and finishing pigs (15–16 weeks), with 100 samples per farm and a total of 3,000 animals in the study. The samples were tested by hemagglutination inhibition assay against H1N1pdm09 and H3N2 SIAV (A/swine/Iowa/8548-2/99) reference strain. The percentages of seropositive animals for H1N1pdm09 and H3N2 were 26,23% and 1,57%, respectively, and the percentages of seropositive herds for both viruses were 96,6% and 13,2%, respectively. The serological profiles differed for both viruses and among the studied areas, suggesting a high variability of virus circulation around the state, as well as the presence of seronegative animals susceptible to influenza infection and, consequently, new respiratory disease outbreaks.

Introdução

O SIAV causa doença aguda respiratória que afeta suínos no mundo todo. A infecção pelo SIAV é caracterizada por febre, redução na ingestão alimentar, estresse respiratório, tosse, espirros, conjuntivite e descarga nasal (Alexander e Brown, 2000; Richt et al., 2003). A gravidade da doença é afetada por diversos fatores, incluindo amostra viral, mas o início da doença é tipicamente repentino. O período de incubação é de um a três dias, com recuperação rápida iniciando entre quatro a sete dias após o início dos sinais. A doença é caracterizada por alta morbidade e geralmente baixa mortalidade (Vincent et al., 2008).

Os vírus influenza A são membros da família *Orthomyxoviridae*, com 80–120 nm e genoma RNA de fita simples segmentado (Vincent et al., 2008). O genoma segmentado do vírus da influenza permite rearranjos entre diferentes vírus em células infectadas com dois ou mais vírus influenza diferentes e a troca de segmentos entre os vírus permite a formação de progênie contendo novas combinações de genes (Vincent et al., 2008). As glicoproteínas de superfície viral hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) são os principais alvos da resposta imune do hospedeiro e são importantes para a especificidade ao hospedeiro e virulência (Nicholls et al., 2008). A HA se liga ao receptor celular N- acetilneuramínico ácido- 2,3- galactose ou N- acetilneuramínico ácido-2,6- galactose para vírus aviários e mamíferos, respectivamente (Rogers e Paulson, 1983). Suínos são considerados um potencial sítio de mistura para a ocorrência de rearranjos virais ou “mixing vessel”, uma vez que possuem receptores celulares para vírus aviários e humanos (Ito, 2000).

Em 2009, um novo vírus influenza emergiu na população humana. O vírus pandêmico H1N1 (H1N1pdm09), que possui um genoma único com seis segmentos (PB1, PB2, PA, HA, NP e NS) provenientes do vírus suíno de rearranjo triplo da América do Norte e os segmentos M e NA derivados da linhagem suína dos vírus da Eurásia (Dawood et al., 2009), nunca havia sido identificado em suínos anteriormente. Imediatamente após a emergência do H1N1pdm09 em humanos, surtos em suínos foram relatados em vários países (Vincent et al., 2014).

O Brasil é o quinto maior produtor de suínos e quarto maior exportador de carne suína. A produção de suínos é de grande importância para a economia do país. No entanto, existem poucos estudos investigando a presença de anticorpos contra SIAV ou a presença de isolados em rebanhos suínos. O vírus da influenza foi inicialmente isolado no Brasil em 1974, em um suíno proveniente de uma granja no estado de Minas Gerais (Cunha et al., 1978). Brentano et al. (2002) relataram baixa prevalência de anticorpos contra os subtipos H1N1 e H3N2 em suínos de 10 estados brasileiros entre 1996 e 1999. Estudos adicionais demonstraram prevalência de anticorpos contra vírus influenza humanos (Mancini et al., 2006) e suínos (Rajão et al., 2013a) no sudeste do Brasil. Um estudo de soroprevalência no Paraná demonstrou que 46% das granjas amostradas apresentaram anticorpos anti-H3N2 e a prevalência de anticorpos contra o vírus H3N2 humano nestes suínos foi de 20% (Caron et al., 2010).

Após a pandemia de 2009, poucos estudos relataram a presença do SIAV em rebanhos suínos (Schaefer et al., 2011; Rajão et al., 2013b). Pouco se sabe sobre a prevalência de anticorpos contra o vírus da influenza suína em rebanhos brasileiros. No Brasil, a vacina contra influenza em suínos foi licenciada em Maio de 2014 e antes disso, a presença de anticorpos anti-influenza em suínos estava relacionada somente com infecção natural. Recentemente, surtos de doença respiratória foram relatados no país (Ciacci-Zanella et al., 2011) e a vacina representa uma importante ferramenta para reduzir perdas econômicas.

Análises de perfil sorológico podem fornecer informações sobre a circulação viral e podem ainda ser úteis para a implementação de estratégias de vacinação e medidas de controle efetivas de acordo com as características de cada rebanho. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil sorológico para o vírus da influenza em suínos em granjas de ciclo completo em Minas Gerais.

Material e Métodos

- Amostras

O estudo foi realizado entre Maio e Agosto de 2012. A seleção de rebanhos e animais foi feita pelo método de amostragem em estágios múltiplos, por meio da utilização de fichas de cadastros para a seleção em estágios sucessivos (Dohoo et al., 2003). Todas as granjas amostradas eram devidamente registradas no órgão responsável pela vigilância sanitária do estado (Instituto Mineiro de Agricultura – IMA) e pertenciam às quatro principais mesorregiões produtoras de suínos em Minas Gerais. O cálculo do número de granjas dentro de cada mesorregião foi feito por amostragem estratificada proporcional, uma vez que a distribuição de granjas de ciclo completo não é uniforme (Garcia e Gonçalves, 2012) e de modo que cada repetição teve peso máximo de 3,33% na amostra (Sampaio, 2010), em virtude da resposta ser expressa em percentual. Dessa forma foram selecionadas nove granjas na Zona da Mata, seis granjas na região do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, nove granjas na região Sul/Sudoeste e seis granjas na região Metropolitana de Belo Horizonte (Figura 18), totalizando 30 granjas que correspondem a aproximadamente 2,4% dos rebanhos do estado.

Amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular e centrifugadas para a obtenção do soro, que foi mantido a -20°C até o momento do uso. As amostras foram aleatoriamente coletadas de 20 animais por categoria do ciclo de produção: fêmeas de reprodução (porcas e marrãs), leitões de maternidade (2-3 semanas), leitões de creche (4-7 semanas), leitões de recria (8-14 semanas) e animais de terminação (15-16 semanas), totalizando 100 amostras por granja e 3.000 animais no estudo. Todas as granjas eram de ciclo completo, sem histórico de vacinação contra influenza e a maioria delas realizavam o Sistema de manejo “todos dentro- todos fora”. Os rebanhos variavam entre 160 e 1950 matrizes e três granjas relataram a ocorrência de surto de doença respiratória entre três e seis meses antes da coleta. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais e todos os proprietários permitiram a realização das coletas e utilização dos soros.

- Vírus e controles

Todas as amostras foram testadas para a presença de anticorpos contra a amostra viral pandêmica H1N1 (A/swine/Brazil/11/2009) e H3N2 suíno (A / swine / Iowa / 8548-2 / 99). Os mesmos vírus foram usados na retrotitulação durante o teste de inibição da hemaglutinação e tampão fosfato salino (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ mM, pH7,4) foi utilizado como controle negativo.

- Inibição da hemaglutinação

O teste de inibição da hemaglutinação (HI) foi realizado como previamente descrito por WHO (2002). Os soros foram utilizados na diluição inicial de 1:20 e diluição seriada na base dois foi realizada em PBS até a diluição final 1:640 em placas de fundo “V” com 96 poços. Títulos de anticorpos de cada amostra foram determinados como a recíproca da maior diluição na qual

nenhuma hemaglutinação foi observada. Amostras com títulos inibidores da hemaglutinação iguais ou maiores que 40 foram consideradas positivas. Os títulos foram classificados como ≤ 20 = negativo; 40-80= baixo; 160-320= médio; ≥ 640 = alto. Os valores foram expressos pela média dos títulos de anticorpos transformados em $\log_2(\text{título}/10)$. Um rebanho foi considerado positivo quando pelo menos um animal foi soropositivo no teste de inibição da hemaglutinação.



Figura 18: Mapa do estado de Minas Gerais mostrando todas as áreas amostradas no estudo e o número de granjas selecionadas em cada área. 1= Região Metropolitana de Belo Horizonte; 2= Zona da Mata; 3= Sul/Sudoeste; 4= Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba. N= número de granjas amostradas em cada área

Resultados

Os percentuais de animais apresentando anticorpos contra H1N1pdm09 e H3N2 foram 26.23% e 1.53%, respectivamente, considerando as 3000 amostras testadas no ensaio de inibição da hemaglutinação. O percentual de rebanhos soropositivos para ambos os vírus foi 96.6% e 10%, respectivamente. Os resultados encontrados no teste de inibição da hemaglutinação em cada área amostrada durante o estudo e por vírus podem ser vistos na Tabela 4.

O número de animais soropositivos para H1N1pdm09 variou entre as granjas amostradas. O perfil sorológico para este antígeno em cada área estudada pode ser visto na Figura 19. Uma granja pertencente à região Sul/Sudoeste (G16) apresentou a média de títulos de anticorpos contra H1N1pdm09 maior na categoria de leitões de maternidade quando comparada ao grupo de fêmeas de reprodução. Tal situação também ocorreu em duas granjas pertencentes à região da Zona da Mata (G10 e G15). Os perfis sorológicos da região Metropolitana de Belo Horizonte, Sul/Sudoeste e Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba seguiram o padrão de perfis sorológicos nos quais as médias dos títulos de anticorpos nas categorias de fêmeas de reprodução são maiores e diminuem ao longo de oito a 14 semanas de idade, quando geralmente ocorre a soroconversão pela infecção natural. Por outro lado, os perfis sorológicos da Zona da Mata mostraram grande variação, e em algumas granjas, a soroconversão ocorreu precocemente, entre quatro e sete semanas de idade. Além disso, algumas granjas apresentaram anticorpos anti-H1N1 detectáveis em todas as idades avaliadas e as médias de títulos de anticorpos não

atingiram valores negativos, sugerindo que o vírus circulou recentemente ou era endêmico em todas as categorias do ciclo de produção destas granjas. De forma semelhante, G10 apresentou médias de títulos de anticorpos relativamente constantes ao longo do ciclo de produção, sugerindo circulação viral em todas as categorias. Em contraste, nenhum animal das categorias amostradas na G8 apresentou anticorpos anti-H1N1pdm09, sugerindo que o vírus não circulava naquele rebanho no momento amostrado.

Tabela 4: Percentual de soropositividade para H1N1pdm09 e H3N2 nos rebanhos e animais amostrados em todas as áreas estudadas em Minas Gerais, Brasil.

Áreas	H1N1pdm09		H3N2	
	Rebanhos Positivo (%)*	Animais Positivo (%)**	Rebanhos Positivo (%)*	Animais Positivo (%)**
1	6/6 (20%)	95 (3,17%)	1/6 (3,3%)	18 (0.6%)
2	8/9 (26.6%)	348 (11,6%)	1/9 (3,3%)	2 (0.07%)
3	9/9 (30%)	190 (6,33%)	0	0
4	6/6 (20%)	154 (5,13%)	1/6 3,33%)	26 (0.86%)
Total	29/30 (96,6%)	787 (26,23%)	3/30 (10%)	46 (1.53%)

*número de rebanhos soropositivos/total de granjas da mesorregião (% sobre o total de 30 granjas)

**número de animais soropositivos (% sobre o total de 3000 animais)

1= Região Metropolitana de Belo Horizonte; 2= Zona da Mata; 3= Sul/Sudoeste; 4= Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba

O percentual de anticorpos anti- H1N1pdm09 em cada categoria do ciclo de produção também variou entre as granjas e as regiões estudadas (Figura 20). Na G30, pertencente à região do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, somente fêmeas de reprodução apresentaram anticorpos contra H1N1pdm09, enquanto que todas as outras categorias do ciclo de produção foram soronegativas. Além disso, 28 das 30 granjas amostradas (93.3%) apresentaram pelo menos um leitão de maternidade com títulos de anticorpos detectáveis contra o vírus pandêmico. Por outro lado, animais da recria e terminação de 17 granjas foram soronegativos para H1N1pdm09. Um total de 98.33% de animais da fase de recria (8-14 semanas) da região Metropolitana de Belo Horizonte e Sul/Sudoeste foram soronegativos para o vírus pandêmico e o percentual de animais soronegativos na fase de terminação (15-16 semanas) foi menor do que na fase de recria em todas as regiões estudadas. De forma geral, o percentual de animais soronegativos para H1N1pdm09 aumentou com a idade, mas os maiores valores foram observados em leitões de creche (4-7 semanas) nas regiões da Zona da Mata e Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba e em animais de recria nas regiões Metropolitana de Belo Horizonte e Sul/Sudoeste (Figura 20). Curiosamente, uma granja da região Metropolitana de Belo Horizonte (G6) e duas granjas do Sul/Sudoeste (G21 e G22) passaram por surtos de doença respiratória poucos meses antes do início das coletas e nas três granjas, o vírus da influenza foi confirmado como agente causador primário da doença. Além disso, a doença clínica observada nesses rebanhos durante os surtos ocorreu, em sua maioria, em animais de creche e recria, corroborando assim nossos achados que demonstraram suscetibilidade dos animais nestas categorias.

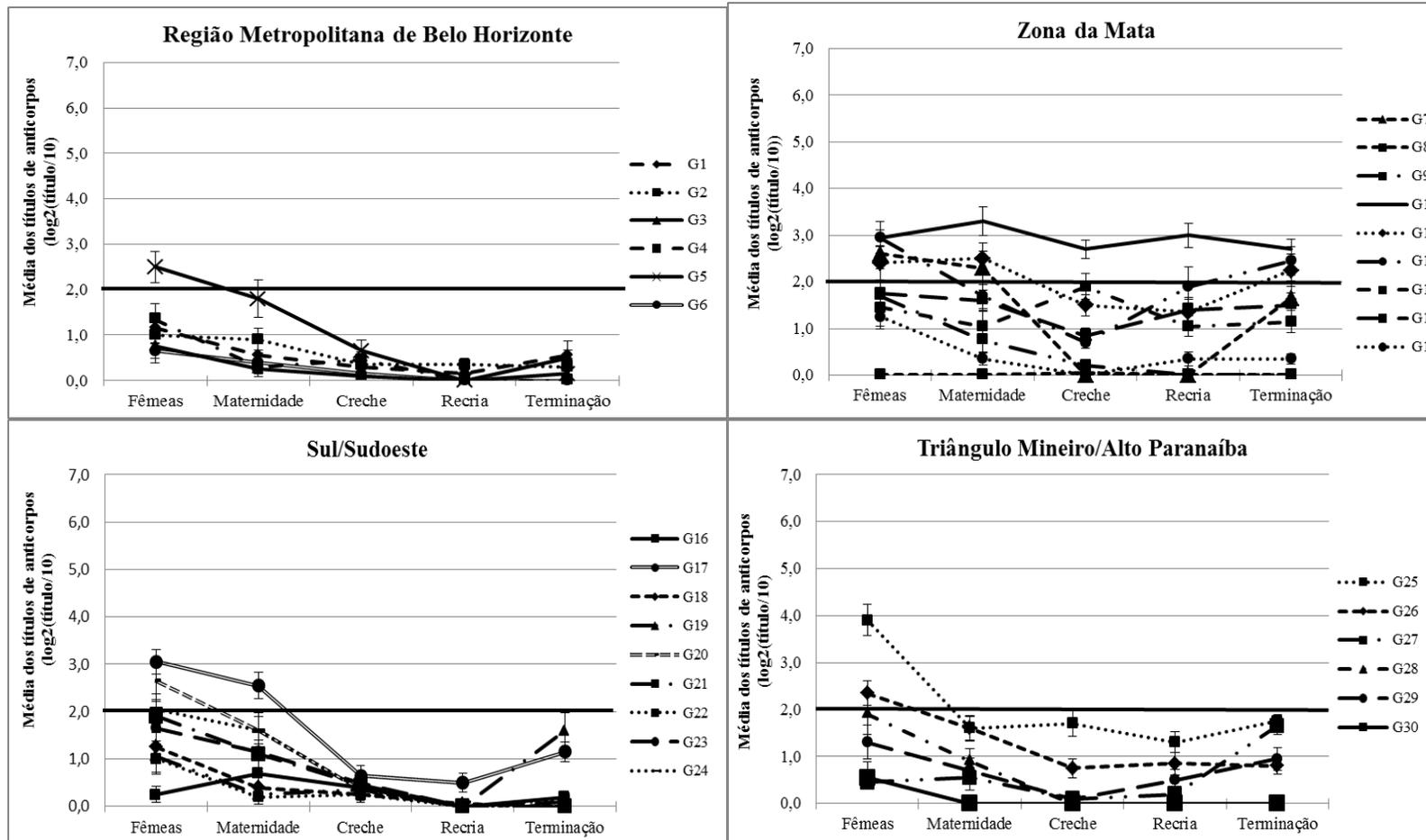


Figura 19: Perfis sorológicos para o vírus H1N1pdm09 de todas as granjas estudadas, organizados por mesorregião, em Minas Gerais. Valores estão demonstrados como média dos títulos de anticorpos transformados em log₂. Barras verticais indicam o erro padrão. O ponto de corte está representado pela linha contínua horizontal.

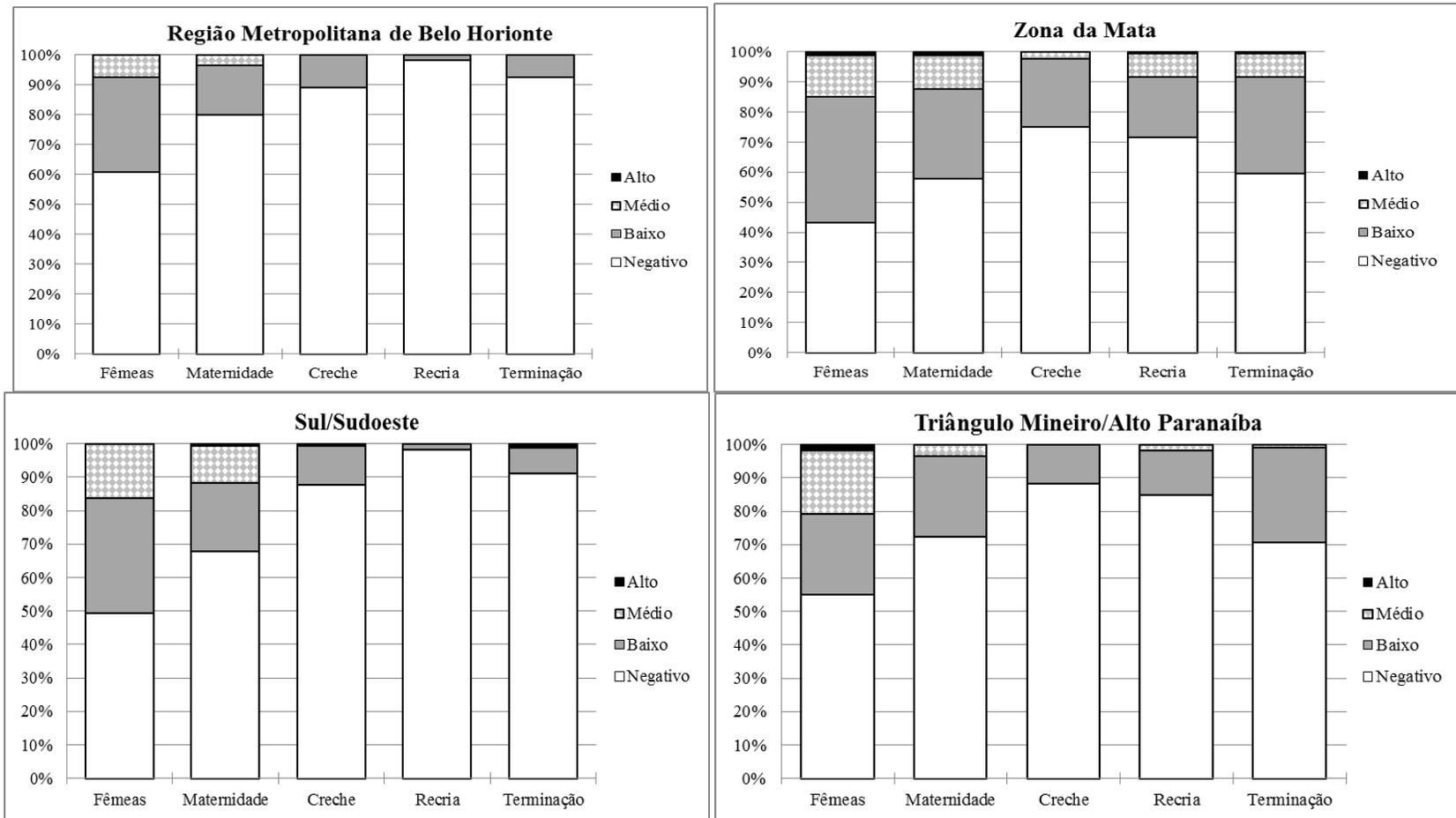


Figura 20: Distribuição de anticorpos anti-H1N1pdm09 em todas as quatro mesoregiões estudadas no estado de Minas Gerais de acordo com as categorias do ciclo de produção.

A Figura 21 mostra a distribuição de anticorpos em todas as três granjas que foram soropositivas para H3N2. O perfil de anticorpos mais variável foi observado na G25 (região do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba), na qual animais apresentaram títulos variando de baixos a médios. A G7 (região da Zona da Mata) teve somente duas porcas soropositivas para H3N2 e nenhum animal foi soropositivo para o vírus em questão em todas as outras categorias. Na G5, pertencente à região Metropolitana de Belo Horizonte, 18 dos 100 animais amostrados (18%) apresentaram títulos baixos de anticorpos anti-H3N2, e 82% dos animais não apresentaram anticorpos específicos para o H3N2.

Discussão

A detecção de anticorpos contra o vírus da influenza na maioria das granjas estudadas sugere que o vírus estava circulando nesses rebanhos, uma vez que vacinas contra o vírus ainda não eram licenciadas no Brasil durante o estudo. Outro motivo que também sugere a circulação do vírus da influenza em rebanhos suínos inclui a ocorrência de variação nos títulos de anticorpos entre as granjas e as categorias estudadas, fato que pode estar associado à soroconversão dos animais em algumas granjas.

Neste estudo, 26,2% e 1,53% dos animais amostrados e 96,6% e 10% dos rebanhos selecionados apresentaram anticorpos contra H1N1pdm09 e H3N2, respectivamente. De fato, as taxas de animais soropositivos observadas foram menores do que aquelas encontradas previamente em outros países. Um estudo realizado em granjas dos Estados Unidos observou que 66,3% dos animais avaliados apresentavam anticorpos contra o subtipo H1, enquanto apenas 33,7% dos animais foram positivos para o subtipo H3 (Choi et al., 2002). Outro estudo investigou a soroprevalência para H1N1, H3N2 e H1N2 em fêmeas de rebanhos europeus e detectou taxas que foram maiores do que 50% para H1N1 e H3N2 na Bélgica (80,8% e 53,8%, respectivamente) e na Alemanha (70,8% e 58,6%, respectivamente). No entanto, valores de prevalência foram menores na Itália (46,4% e 41,7%, respectivamente) e na Espanha (38,5% e 38%, respectivamente) (Van Reeth et al., 2008). Loeffen et al., 2009 investigaram a soroprevalência para os subtipos H1 e H3 em granjas de ciclo completo e granjas terminadoras e encontraram 44,3% e 6,6% de animais soropositivos para H1 e H3, respectivamente, em granjas de ciclo completo na Holanda. Apesar da prevalência de anticorpos para o subtipo H1 ser geralmente maior do que para o H3 na maioria dos países, a comparação de valores de prevalência é um desafio quando se analisa rebanhos vacinados e não vacinados, pois a circulação do vírus da influenza nessas granjas assumem diferentes rotas, dependendo do tipo de sistema de produção (Loeffen et al., 2009). Além disso, apesar de amostra viral do subtipo H3N2 utilizada em nosso estudo não ter sido isolada no Brasil, existe proteção cruzada entre vírus com o mesmo tipo de hemaglutinina. Sendo assim, nossos resultados poderiam ser úteis para mostrar a circulação do H3N2 no país.

Alguns trabalhos brasileiros também detectaram a presença de anticorpos anti-influenza em granjas de suínos. Um estudo de soroprevalência realizado em uma granja no estado de São Paulo encontrou taxas de 85,3% para ambos os vírus H1N1 e H3N2 (Mancini et al., 2006). No entanto, prevalências de 2,2% e 16,3% foram encontradas para os mesmos vírus em outro estudo realizado em vários estados brasileiros (Brentano et al., 2006). Em outro estudo, foi relatada uma prevalência de 20,1% para o vírus H3N2 em um rebanho do Paraná (Caron et al.,

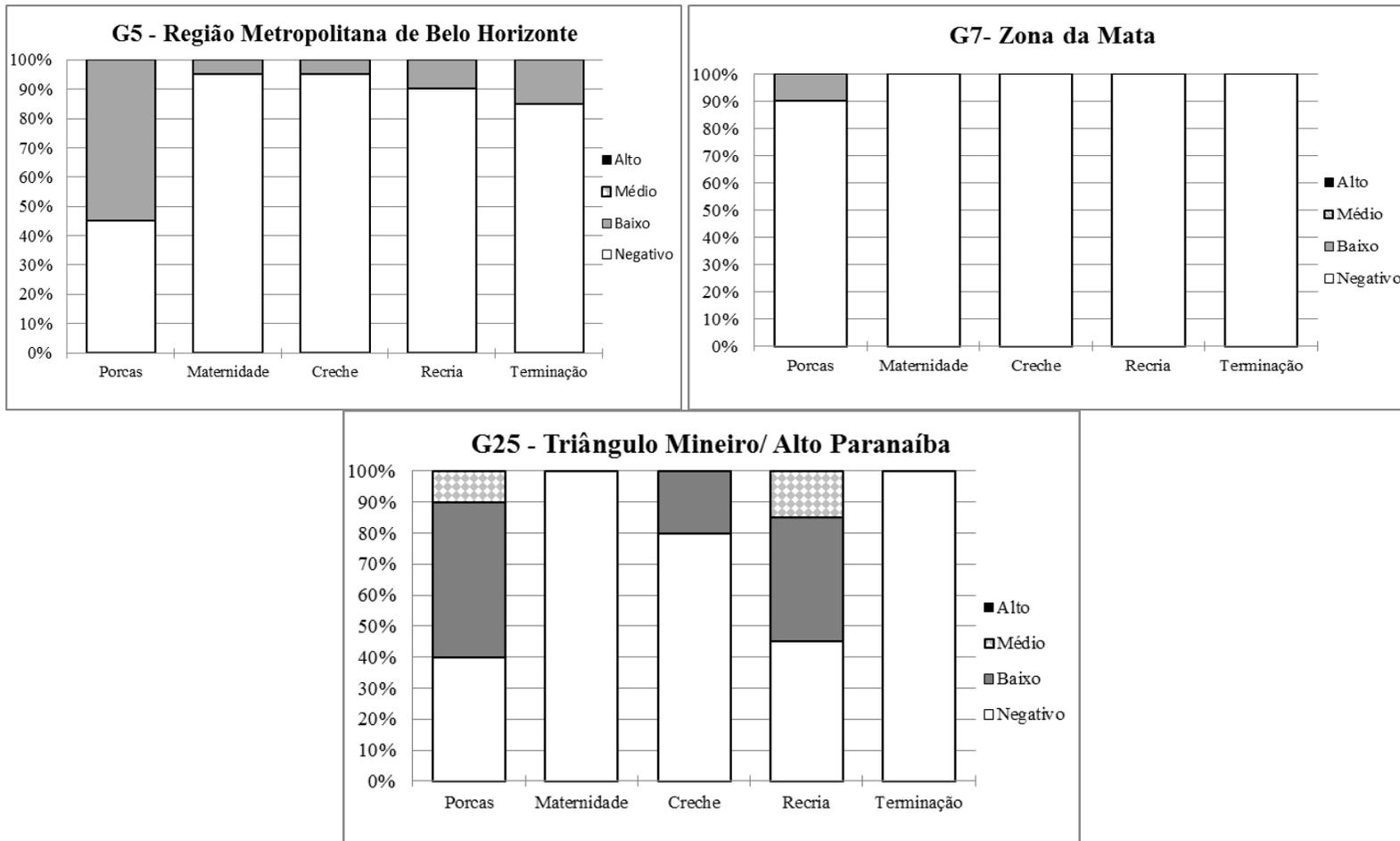


Figura 21: Distribuição de anticorpos anti-H3N2 nas granjas soropositivas de acordo com as categorias do ciclo de produção.

2010). Apesar de a maioria das prevalências em estudos brasileiros estarem relacionadas a vírus humanos, os valores encontrados neste estudo não foram semelhantes aos estudos previamente publicados. Em 2009, Rajão et al. (2013a) investigou a prevalência de anticorpos anti-influenza A em porcas de 17 granjas de ciclo completo de Minas Gerais e encontrou 44.5% e 10.1% de animais soropositivos para H1N1 e H3N2, respectivamente. Neste caso, apesar da prevalência ter sido maior do que a observada em nosso estudo, esta se aproxima mais dos valores encontrados quando comparados aos outros estudos realizados em outros estados do Brasil. Por outro lado, Caron et al., (2010) encontrou uma prevalência maior para anticorpos anti-H3N2 em um rebanho no sul do Brasil, sugerindo que pode haver diferença na circulação dos subtipos do vírus da influenza em diferentes regiões do país.

A vacinação contra influenza suína não era autorizada no Brasil pelo órgão competente durante a realização deste estudo. Sendo assim, a presença de anticorpos contra influenza em rebanhos suínos detectados confirma infecção natural. Apesar das evidências de circulação viral, uma granja foi soronegativa para H1N1pdm09 enquanto 27 granjas foram soronegativas para H3N2. Nestas granjas, os animais estavam suscetíveis à infecção pelo vírus da influenza devido à ausência de imunidade prévia contra o vírus. A introdução do vírus da influenza em um rebanho está geralmente associada à movimentação e introdução de novos animais (Olsen et al., 2006). Além disso, elevados valores de prevalência são associados com elevada densidade animal, o que pode levar ao aumento de contato entre suínos e facilitar a transmissão do vírus entre rebanhos (Maes et al., 2000). O estado de Minas Gerais é o quarto maior produtor de suínos no país e 22.6% do rebanho comercial mineiro é composto de 100 porcas ou mais, o que sugere que a alta densidade animal em granjas do estado pode ser um fator de risco para a infecção com o vírus da influenza suína, particularmente em rebanhos negativos.

As categorias de fêmeas e leitões de maternidade apresentaram os maiores percentuais de animais soropositivos. A categoria de fêmeas apresentou as maiores médias de títulos de anticorpos e o maior número de animais com títulos de anticorpos baixos a moderados, seguida pela categoria de leitões de maternidade. No caso das fêmeas, os resultados podem indicar frequente exposição dos animais ao vírus da influenza e contínua circulação viral, uma vez que esses animais permanecem por mais tempo no sistema de produção. A ocorrência de altos títulos de anticorpos em leitões de maternidade, em associação com a redução dos títulos de anticorpos ao longo do ciclo de produção, é similar ao encontrado em um estudo de perfil sorológico em granjas de ciclo completo em Taiwan (Liu et al., 2008). Neste estudo, menor quantidade de anticorpos maternos contra influenza foi observada em animais com idade média de 3-9 semanas, sugerindo que os animais podem ser mais suscetíveis no final do ciclo produtivo. Anticorpos maternos são capazes de proteger leitões parcialmente contra a doença clínica, mas não contra a infecção com o vírus da influenza (Kitikoon et al., 2006) e leitões lactentes podem ser infectados e eliminar o vírus nas secreções mesmo na presença de anticorpos passivos (Vincent et al., 2008). Nestes casos, leitões com anticorpos maternos poderiam assumir um papel importante na disseminação viral no rebanho.

A maioria dos animais das fases de recria (8-14 semanas) e terminação (15-16 semanas) foram soronegativos para H1N1pdm09 e H3N2. Os níveis de anticorpos anti-influenza diminuem ao longo do tempo e em alguns estudos, níveis de anticorpos maternos não foram detectados entre nove e 10 semanas de idade (Loeffen et al., 2003; Liu et al., 2008). Estes resultados podem explicar porque suínos são mais vulneráveis à infecção pelo vírus da influenza no final da creche e início da recria. Além disso, o momento de infecção pode variar de acordo com o tipo de sistema de produção (Loeffen et al., 2009). Um estudo comparou o tempo de infecção em

animais de terminação provenientes de rebanhos de ciclo completo e em rebanhos terminadores, ambos não vacinados, e observou que a infecção foi maior no começo do período de terminação em rebanhos de ciclo completo, enquanto que em rebanhos terminadores, a incidência de infecção foi maior no final da idade de terminação (Loeffen et al., 2009). Diferenças no momento da infecção pelo vírus da influenza podem requerer diferentes medidas de prevenção, e como anticorpos passivos podem interferir na resposta imune gerada pela vacinação ou infecção, diferentes estratégias de vacinação devem ser analisadas para aumentar a proteção contra a infecção com o vírus da influenza suína. Baseado em nossos resultados, não é possível sugerir um programa de vacinação geral para ser usado em todas as granjas, pois animais suscetíveis foram detectados em todas as categorias do sistema de produção. Estratégias de vacinação incluindo vacinação exclusiva para fêmeas ou vacinação de fêmeas e de leitões entre sete e oito semanas de idade poderia ser útil, dependendo da imunidade do rebanho.

Poucos meses antes do início da coleta, algumas granjas apresentaram surto de doença respiratória em animais de creche e recria devido à infecção pelo vírus da influenza. De acordo com os resultados encontrados em nosso estudo, o percentual de animais soronegativos para H1N1pdm09 aumentou com a idade e os maiores valores foram observados em animais de creche e recria. De uma forma geral, o vírus da influenza circula em rebanhos e pode causar doença em suínos suscetíveis, independente da idade (Loeffen et al., 2009). Apesar da ocorrência de surto respiratório em algumas granjas antes do início das coletas e da detecção da presença do vírus da influenza na maioria das granjas estudadas, animais de creche e recria foram soronegativos, sugerindo que no momento das coletas, o vírus não circulava mais nessas categorias.

Os percentuais de animais soropositivos para H1N1pdm09 e H3N2 encontrados no estudo diferem entre si, sendo que o vírus pandêmico mostrou maior circulação em rebanhos de Minas Gerais. Os perfis sorológicos foram diferentes para ambos os vírus estudados e entre as regiões geográficas amostradas, sugerindo elevada variabilidade na circulação viral dentro do estado, o que resultou em animais soronegativos que estavam suscetíveis à infecção pelo vírus da influenza e na possibilidade de ocorrência de surtos de doença respiratória relacionados ao vírus. Ainda existe pouca informação sobre os subtipos virais que circulam na população suína no Brasil e a possível ausência de proteção cruzada entre diferentes subtipos é um dos obstáculos para a produção de vacinas eficazes para a prevenção da influenza suína. Mais estudos são necessários para melhorar o conhecimento da circulação viral e assim, determinar as melhores estratégias para prevenir perdas econômicas relacionadas à infecção pelo vírus da influenza no Brasil. Estudos sobre levantamento sorológico para o vírus da influenza A em outras regiões do Brasil, detecção de vírus endêmicos circulantes em rebanhos suínos e monitoramento da evolução genética destas amostras por meio de sequenciamento poderia ser utilizada para fornecer informações sobre a epidemiologia molecular do SIAV e fornecer dados para a produção de vacinas e controle do vírus no Brasil.

Conclusões

O *status* sorológico das granjas amostradas para os subtipos virais H3N2 e H1N1pdm09 foi diferente nas granjas e regiões estudadas, sugerindo que os vírus utilizados tinham uma circulação diferente em cada granja. Além disso, a presença de animais e granjas soronegativas evidencia a suscetibilidade à infecção pelo SIAV e a possibilidade de ocorrência de surto de doença respiratória.

CONCLUSÕES

Este estudo avaliou a infecção de suínos pelo SIAV considerando a região geográfica, tipo de sistema de produção e idade dos suínos no momento da infecção. Os resultados encontrados nos estudos realizados em granjas do mesmo sistema de produção nos Estados Unidos mostraram que os leitões de maternidade podem ser um ponto chave na disseminação viral dentro das granjas, podendo servir como fonte de infecção e reservatórios dos SIAV para animais de outras idades, que podem apresentar maior suscetibilidade devido à diminuição da imunidade passiva. Sob esse ponto de vista, a imunidade passiva adquirida pelo colostro nas primeiras horas após o nascimento torna-se de extrema importância, uma vez que os anticorpos maternos podem proteger neonatos parcialmente contra a doença clínica, dependendo da quantidade e qualidade desses anticorpos. Assim, a utilização de vacinas que produzam uma resposta imune eficiente específica contra os vírus circulantes assume um papel importante no controle e prevenção da influenza suína, visto que leitões adequadamente imunizados estarão mais protegidos da doença clínica. Além disso, o constante monitoramento das condições sanitárias do rebanho e das amostras circulantes pode ajudar tanto na adoção de medidas de controle mais efetivas quanto na prevenção de rearranjo com vírus diferentes, cujo surgimento pode dificultar ainda mais o controle da doença em rebanhos suínos.

A influenza suína ainda não é extensivamente estudada no Brasil e por isso, pouco se sabe sobre a epidemiologia do vírus no país. Nosso estudo mostrou que mais de uma amostra do SIAV circula em rebanhos suínos do estado de Minas Gerais e que a maioria dos animais de produção encontra-se suscetível à infecção. A implementação da vacina como forma de controle da doença nas granjas brasileiras pode ser de grande utilidade, mas de acordo com os resultados obtidos nesse estudo, é importante que se conheça o perfil sorológico de cada granja e os subtipos virais presentes para que possam ser tomadas medidas de controle efetivas e adequadas para cada rebanho. O conhecimento prévio da atuação do vírus demonstrado em trabalhos anteriores realizados em todo mundo pode ser de grande utilidade no estudo e controle da influenza no Brasil, uma vez que alguns fatores da epidemiologia viral podem ser extrapolados para diferentes regiões, sistemas de produção e situação epidemiológica. No entanto, o conhecimento da epidemiologia do vírus no país ainda é a melhor ferramenta para auxiliar no controle efetivo específico para amostras virais presentes nos rebanhos brasileiros.

Assim, a combinação dos resultados obtidos nesse estudo pode ser de grande importância para a realização de estudos futuros sobre a influenza suína no Brasil. Além disso, uma maior participação da pesquisa brasileira na área pode abrir portas para a inserção do país em grupos de pesquisa e órgãos mundiais atuantes, facilitando o trabalho da pesquisa no Brasil e contribuindo para o maior conhecimento mundial da influenza suína.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O IAV é um importante agente relacionado com doença respiratória em granjas de suínos em todo o mundo. A presença do vírus nas granjas, o conhecimento dos subtipos virais circulantes e da epidemiologia do vírus de acordo com o tipo de sistema de produção são fatores que podem facilitar no momento da escolha das medidas de prevenção e controle da doença nas granjas.

Vacinas contra o vírus da influenza para suínos são amplamente utilizadas em diversos países e foi recentemente autorizada no Brasil. Apesar de reduzirem a doença clínica, vacinas não devem ser utilizadas de forma indiscriminada e padronizada. Sua utilização deve depender do perfil sorológico de cada granja e do subtipo viral presente. Além disso, a idade adequada para receber a vacinação também vai depender da dinâmica da infecção em cada granja e em cada fase de produção, visando oferecer uma proteção forte e duradoura até o final do sistema de produção, quando os animais são encaminhados ao abate.

Apesar disso, a vacina não deve ser considerada a única forma, ou a forma mais importante de prevenção e controle da influenza suína. Medidas de manejo incluindo controle de ventilação e da densidade animal, manejo nutricional, medidas de biossegurança e higiene, acompanhamento da colostragem, redução do estresse, controle na aquisição de novos animais, utilização de quarentena, isolamento e tratamento de animais doentes, afastamento de funcionários doentes, dentre outras, podem reduzir e até eliminar a necessidade de utilização de vacina nas granjas. Desta forma, é importante que se faça um rígido acompanhamento das granjas, visando atender às necessidades de cada uma delas e adotar medidas específicas para o controle das doenças em cada rebanho.

Na América do Norte, a epidemiologia da influenza suína é amplamente conhecida e estudos na área já estão muito avançados. Os rebanhos são endemicamente infectados e a utilização de vacinas é muito mais intensa do que em outros países. Esse conhecimento sobre o comportamento viral facilitou o desenvolvimento de vacinas que controlam melhor a doença nos rebanhos suínos, especialmente pelo uso de vacinas autógenas, elaboradas com amostras virais circulantes em cada rebanho. Apesar disso, pesquisas são rotineiramente realizadas visando o melhor entendimento do vírus e da sua dinâmica nos rebanhos. Informações geradas nestas pesquisas na América do Norte e em todo o mundo são muito importantes para o Brasil, uma vez que nosso conhecimento sobre o vírus da influenza ainda não é muito expressivo quando comparado a outros países que já pesquisam o vírus há mais tempo.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de carne suína e essa produção influencia expressivamente o setor agropecuário no país. Apesar dos investimentos em estudos na área de sanidade animal facilitarem a atuação dos grupos de pesquisa brasileiros, a educação e a conscientização dos governos, bem como dos proprietários de granjas e dos funcionários diretamente ligados à produção poderia contribuir para minimizar os impactos causados pela introdução de agentes e doenças nos rebanhos suínos, reduzindo assim os impactos econômicos da produção no mercado interno e mundial. Além disso, a participação e interação consciente de todos os segmentos envolvidos na produção de suínos contribuiria não somente para melhorias na saúde animal, mas também na saúde pública do país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, D.J.; BROWN, I.H. Recent zoonosis caused by influenza A viruses. *Rev. Sci. Tech.*, v. 19, p.197-225, 2000.
- ALLERSON, M.; DEEN, J.; DETMER, S.; GRAMER, M.; JOO, H.S.; ROMAGOA, A.; TORREMORELL, M. The impact of maternally derived immunity on influenza A virus transmission in neonatal pig populations. *Vaccine*, v. 31 (3), p. 500 – 505, 2013.
- ANDERSON, T.K.; NELSON, M.I.; KITIKOON, P.; SWENSON, S.L.; KORSLUND, J.A.; VINCENT, A.L. Population dynamics of cocirculating swine influenza A viruses in the United States from 2009 to 2012. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013 Dec;7 Suppl 4:42-51. doi: 10.1111/irv.12193.
- BABIUK, S.; MASIC, A.; GRAHAM, J.; NEUFELD, J.; VAN DER LOOP, M.; COPPS, J.; BERHANE, Y.; PASICK, J.; POTTER, A.; BABIUK, L.A.; WEINGARTL, H.; ZHOU, Y. An elastase-dependent attenuated heterologous swine influenza virus protects against pandemic H1N1 2009 influenza challenge in swine. *Vaccine* 29: 3118– 3123, 2011.
- BEAN, B.; MOORE, B.M. STERNER, B. et al. Survival of influenza viruses on environmental surfaces. *J. Infect. Dis.*, v.146, p. 47-51, 1982.
- BEAUDOIN, A.; JOHNSON, S.; DAVIES, P.; BENDER, J.; GRAMER, M. Characterization of influenza a outbreaks in Minnesota swine herds and measures taken to reduce the risk of zoonotic transmission. *Zoonoses Public Health*. 2012 Mar;59(2):96-106.
- BEARE, A. S.; WEBSTER, R. G. Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch. Virol.*, v. 119, p. 37-42, 1991.
- BIONDO, N.; SCHAEFER, R.; GAVA, D. et al. Genomic analysis of influenza A virus from captive wild boars in Brazil reveals a human-like H1N2 influenza virus. *Vet. Microb.*, v. 168 (1), p. 34-40, 2014.
- BLASKOVIC, D., RATHOVA, V., KOCISKOVA, D., KAPLAN, M.M., JAMRICOVA, O., SADECKY, E. Experimental infection of weanling pigs with A-swine influenza virus. 3. Immunity in piglets farrowed by antibody-bearing dams experimentally infected a year earlier. *Bull. World Health Organ.* v. 42, p. 771–777, 1970.
- BOSWORTH, B.; ERDMAN, M.M.; STINE, D.L.; HARRIS, I.; IRWIN, C.; JENS, M.; LOYNACHAN, A.; KAMRUD, K.; HARRIS, D.L. Replicon particle vaccine protects swine against influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. Dec;33(6):e99-e103. doi: 10.1016/j.cimid.2010.05.002, 2010.
- BOWMAN, A.S.; NELSON, S.W.; PAGE, S.L.; NOLTING, J.M.; LKILLIAN, M.L.; SREEVATSAN, S.; SLEMONS, R.D. Swine-to-human transmission of influenza A (H3N2) virus at agricultural fairs, Ohio, USA, 2012. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 20 (9), p. 1472-1480, 2014.
- BRANKSTON, G.; GITTERMAN, L.; HIRJI, Z. et al. Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect. Dis.*, v. 7, p.257–265, 2007.
- BRENTANO, L.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N. et al. Levantamento Soroepidemiológico para Coronavírus Respiratório e da Gastroenterite Transmissível e dos

Vírus de Influenza H3N2 E H1N1 em Rebanhos Suínos no Brasil. In: COMUNICADO TÉCNICO, 306. 2002, Concórdia. *Comunicado Técnico...* Concórdia: Embrapa Suínos e Aves 2002. 6 p.

BRIDGES, C.B.; KUEHNERT, M.J.; HALL, C.B. Transmission of influenza: implications for control in health care settings. *Clin. Infect. Dis.*, v. 37, p. 1094- 1101, 2003.

BROWN, I. H., DONE, S.H.; SPENCER, Y.I. et al. Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. *Vet. Rec.*, v. 132, p. 598-602, 1993.

BROWN, I.H. History and Epidemiology of swine influenza in Europe. *Curr. Top. Microb. Immu.*, v. 370, p. 133 – 146, 2013.

CAPPUCCIO, J. A., PENA, L.; DIBARBORA, M.; RIMONDI, A.; PINEYRO, P.; INSARRALDE, L.; QUIROGA, M. A.; MACHUCA, M.; CRAIG, M. I.; OLIVEIRA, V.; CHOCKALINGAM, A.; PERFUMO, C. J; PEREZ, D. R.; PEREDA, A. Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a non-contemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. *J. Gen. Virol.* 92(Pt 12), 2871–2878, 2011.

CARON, L.F.; JOINEAU, M.E.G.; SANTIN, E. et al. Seroprevalence of H3N2 influenza a virus in pigs from Paraná (South Brazil): interference of the animal management and climatic conditions. *Virus Rev. Res.*, v. 15, n.1, 2010.

CARRAGHER, D.M., KAMINSKI, D.A., MOQUIN, A., HARTSON, L., RANDALL, T.D. A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus. *J. Immunol.* 181 (6), 4168–4176, 2008.

CASTRUCCI, M. R.; DONATELLI, I.; SIDOLI, L. et al. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology*, v., p.503–506, 1993.

CHAMBERS, T. M.; HINSHAW, V. S.; KAWAOKA, Y. et al. Influenza viral infection of swine in the United States 1988–1989. *Arch. Virol.*, v.116, p.261-265, 1991.

CHEN, Q.; MADSON, D.; MILLER, C.L.; HARRIS, D.L. Vaccine development for protecting swine against influenza virus. *Anim Health Res Rev.*, Dec; 13(2), p. 181-95, 2012.

CHOI, Y.K., GOYAL, S.M., JOO, H.S. Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States. *Arch Virol*, v. 147, p.1209–1220, 2002.

CHOI, Y.K.; GOYAL, S.M.; JOO, H.S. Evaluation of transmission of swine influenza type A subtype H1N2 virus in seropositive pigs. *Am. J. Vet. Res.*, v. 65, p.303-306, 2004.

CHOI, Y.K.; GOYAL, S.M.; JOO, H.S. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can. Vet. J.*, v.44, p.735-737, 2003.

CHOPIN, P. W.; TAMM, I. Studies of two kinds of virus particles which comprise Influenza A2 virus strains. *J. Exp. Med.*, v. 112, p. 895-920, 1960.

CIACCI-ZANELLA, J.R.C.; VINCENT, A.L.; SCHAEFER, R. et al. Influenza em suínos no Brasil: o problema e o que pode ser feito para manter a infecção controlada nas granjas afetadas.

In: Simpósio Internacional de Suinocultura, 6, 2011, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: [s.n.] 2011, 85-94, 2011.

CIACCI-ZANELLA, J.R.C.; VINCENT, A.L.; PRICKETT, J.R.; ZIMMERMAN, S.M.; ZIMMERMAN, J.J. Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. *J Vet Diagn Invest.*, Jan; 22(1), p. 3-9, 2010.

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

CONENELO, G.M.; PALESE, P. Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch. *Cell Host Microbe*, v. 2 (4), p. 207-209, 2007.

CORZO, C.A.; CULHANE, M.; DEE, S.; MORRISON, R.B.; TORREMORELL, M. Airborne Detection and Quantification of Swine Influenza A Virus in Air Samples Collected Inside, Outside and Downwind from Swine Barns. *PLOS One*, v.8 (8), acesso e71444, 2013.

COUCEIRO, J.N.S.S.; PAULSON, J. C.; BAUM, L. G. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res.*, v. 29, p. 155-165, 1993.

COX, R. J.; BROKSTAD, K. A.; OGRA, P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand. J. Immunol.*, v. 59, p. 1-15, 2004.

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. *Rev. Bras. Biol.*, v.38., p. 13 – 17, 1978.

DAWOOD, F. S., JAIN, S.; FINELLI, L.; SHAW, M. W.; LINDSTROM, S.; GARTEN, R. J.; GUBAREVA, L. V.; XU, X.; BRIDGES, C. B.; UYEKY, T. M. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.*, 360, 2605–2615, 2009.

DETMER, S.E.; PATNAYAK, D.P.; JIANG, Y.; GRAMER, M.R.; GOYAL, S.M. Detection of Influenza A Virus in Porcine Oral Fluid Samples. *J Vet Diagn Invest*, v. 23, p. 241 – 247, 2011.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown: AVC Inc., 2003. 706p.

EASTERDAY, B.C.; VAN REETH, K. Swine Influenza. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELIN, W.L.; TAYLOR, D. J. (Ed). *Diseases of swine*. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 277-290.

GAMBARYAN, A.; YAMNIKOVA, S.; LVOV, D. et al. Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. *Virology*, v. 334, p. 276-83, 2005.

GARCIA, S.K.; GONÇALVES, J.P.M. The scenery of pig industry in Minas Gerais state. *Revista V&Z em Minas - Jul./Aug./Sept.*, Ano XXII: 44-53, 2012.

- GAUGER, P.C.; VINCENT, A.L.; LOVING, C.L.; LAGER, K.M.; JANKE, B.H.; et al. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. *Vet. Pathol.*, v. 49 (6), 2012.
- GAUGER, P.C.; VINCENT, A.L.; LOVING, C.L.; LAGER, K.M.; JANKE, B.H.; KEHRLI JR, M.E. et al. Enhanced pneumonia and disease in pigs vaccinated with an inactivated human-like (delta cluster) H1N2 vaccine and challenged with pandemic 2009 H1N1 influenza virus. *Vaccine*, v. 29 (15), 2011.
- GIBBS, J. S.; MALIDE, D.; HORNING, F. et al. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J. Virol.*, v. 77, p. 7214-7224, 2003.
- GUAN, Y., SHORTRIDGE, K. F.; KRAUSS, S.; LI, P. H.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G. Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. *J. Virol.* 70, 8041–8046, 1996.
- HAESEBROUCK, F., PENSAERT, M. 1986. Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunized with an inactivated influenza H1N1 vaccine. *Vet Microbiol*, v. 11, p. 239 - 249, 1986.
- HAMPSON, A. W. Influenza virus antigens and ‘antigenic drift’. In: POTTER, C. W. (Ed). *Influenza*. London: Elsevier, 2002. p. 49–85.
- HARMON, K.; BOWER, L.; KIM, W.; PENTELLA, M.; YOON, K. A matrix gene-based multiplex real-time RT-PCR for detection and differentiation of 2009 pandemic H1N1 and other influenza A viruses in North America. *Infl. Oth. Resp. Dis.*, v. 4 (6), p. 405 – 410, 2010.
- HAWKINS, P.A., WINKELMAN, N., STROBEL, M. & MONDACA, E. (2010) Effect of ibuprofen, aspirin or saline water medications on pigs challenged with swine influenza virus (SIV). Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress, Vancouver, Canada, July 18 to 21, 2010, p. 269.
- HERMAN, M.; HAUGERUD, S.; MALIK, Y. S.; GOYAL, S. M. Improved In Vitro Cultivation of Swine Influenza Virus. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.*, v. 3, p.124-128, 2005.
- HINSHAW, V. S.; WEBSTER, R. G.; NAEVE, C. W. et al. Altered tissue tropism of human-avian reassortant influenza viruses. *Virology*, v. 128, p. 260-263, 1983.
- HOFT, D.F.; BABUSIS, E.; WORKU, S. et al. Live and inactivated influenza vaccines induce similar immune responses, but only live vaccines induce diverse T-cells responses in young children. *J. Infect. Dis.*, v.204 (6), p. 845-853, 2011.
- HOWDEN, K. J., E. J. BROCKHOFF, F. D. CAYA, L. J. MCLEOD, M. LAVOIE, J. D. ING, J. M. BYSTROM, S. ALEXANDERSEN, J. M. PASICK, Y. BERHANE, M. E. MORRISON, J. M. KEENLISIDE, S. LAURENDEAU, AND E. B. ROHONCZY. An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. *Can. Vet. J.* 50, 1153–1161, 2009.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), 2014. Virus Taxonomy: 2014 Release. Disponível *on line* no endereço <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acessado em 09 de março de 2015.

ITO, T. Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A viruses. *Microbiol. Immunol.*, v. 44, p. 423-30, 2000.

ITO, T.; KAWAOKA, Y. Host-range barrier of influenza A viruses. *Vet. Microbiol.*, v. 74, p. 71-75, 2000.

IWASAKI, A.; PILLAI, P. Innate immunity to influenza vírus infection. *Nat Ver Immunol.*, v. 14 (5), p. 315 – 328, 2014.

JANKE, B.H. Clinicopathological features of swine influenza. *Curr Top Microbiol Immunol.*, v. 370, p. 69–83, 2013.

JO, S. K.; KIM, H. S.; CHO, S. W. et al. Pathogenesis and inflammatory responses of swine H1N2 influenza viruses in pigs. *Virus Res.*, 2007.

JONG, J. C.; SMITH, D. J.; LAPEDES, A. S. et al. Antigenic and Genetic Evolution of Swine Influenza A (H3N2) Viruses in Europe. *J. Virol.*, v. 81, n. 8, p. 4315-4322, 2007.

JULKUNEN, I.; PYHALA, R.; HOVI, T. Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B virus infections. Purified hemagglutinin in subtype-specific diagnosis. *J. Virol. Methods*, v.10, p.75–84, 1985.

KARASIN, A.I.; LANDGRAF, J.; SWENSON, S. et al. Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p. 1073– 1079, 2002.

KITIKOON, P.; NILUBOL, D.; ERICKSON, B.J.; et al. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 112, p.117–128, 2006.

KOEN, J.S. A practical method for field diagnosis of swine diseases. *Am. J. Vet. Med.*, v.14, p.468-70, 1919.

KOTHALAWALA, H.; TOUSSAINT, M.J.; GRUYS, E. An overview of swine influenza. *Vet. Q.*, v. 28, p. 46-53, 2006.

KREIJTZ, J.H.C.M.; FOUCHIER, R.A.M.; RIMMELZWAAN, G.F. Immune response to influenza vírus infection. *Virus Research*, v. 162, p. 19- 30, 2011.

KYRIAKIS, C. S., I. H. BROWN, E. FONI, G. KUNTZ-SIMON, J. MALDONADO, F. MADEC, S. C. ESSEN, C. CHIAPPONI, and R. K. VAN, Virological surveillance and preliminary antigenic characterization of influenza viruses in pigs in five European countries from 2006 to 2008. *Zoonoses Public Health* 58, 93–101, 2011.

LA GRUTA, N. L.; KEDZIERSKA, K.; STAMBAS, J.; DOHERTY, P.C. A question of self-preservation: Immunopathology in influenza virus infection. *Immunol. Cell Biol.*, v. 85, p.85-92, 2007.

LAM, T.; HON, C.; WANG, Z. et al. Evolutionary analyses of European H1N2 swine influenza A virus by placing timestamps on the multiple reassortment events. *Virus Res.*, v.131, p.271–278, 2008.

LAMB, R.A.; KRUG, R.M. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. and Eds. *Fields Virology*, 4th edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1216–1253.

LEE, C. S., KANG, B. K.; KIM, H. K.; PARK, S. J.; PARK, B. K.; JUNG, K.; SONG, D. S. Phylogenetic analysis of swine influenza viruses recently isolated in Korea. *Virus Genes* 37, 168–176, 2008.

LIN, K.L., SUZUKI, Y., NAKANO, H., RAMSBURG, E., GUNN, M.D. CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. *J. Immunol.* 180 (4), 2562–2572, 2008.

LIPATOV, A. S.; KWON, Y. K.; SARMENTO, L. V. et al. Domestic Pigs Have Low Susceptibility to H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *PLoS Pathog.*, v. 4, 2008.

LIU, H.T.; CHAUNG, H.C.; CHANG, H.L. et al. Decay of Maternally Derived Antibodies and Seroconversion to Respiratory Viral Infection in Pig Herds. *Taiwan Vet J* v. 34, p. 127-141, 2008.

LIU, H.T.; CHAUNG, H.C.; CHANG, H.L. et al. Decay of Maternally Derived Antibodies and Seroconversion to Respiratory Viral Infection in Pig Herds. *Taiwan Vet. J.*, v. 34, p. 127-141, 2008.

LOEFFEN, W.L.A.; HEINEN, P.P.; BIANCHI, A.T.J. et al. Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 92, p. 23-35, 2003

LOEFFEN, W.L.A.; HUNNEMAN, W.A.; QUAK, J. et al. Population dynamics of swine influenza virus in farrow-to-finish and specialized finishing herds in the Netherlands. *Vet. Microbiol.*, v. 137, p.45–50, 2009.

LORUSSO, A.; VINCENT, A. L.; HARLAND, M. L. et al. Genetic and antigenic characterization of H1 influenza viruses from United States swine from 2008. *J. Gen. Virol.*, v. 92, p. 919–930, 2011.

LOVING, C.L.; BROCKMEIER, S.; VINCENT A.L.; GAUGER, P.C.; ZANELLA, E.L.; LAGER, K.M.; KEHLI JR, M.E. Cross-fostering to prevent maternal cell transfer did not prevent vaccine-associated enhanced respiratory disease that occurred following heterologous influenza challenge of pigs vaccinated in the presence of maternal immunity. *V. Immun.*, v. 27 (7), p. 334 – 342, 2014.

LUND, J.M., ALEXOPOULOU, L., SATO, A., KAROW, M., ADAMS, N.C., GALE, N.W., IWASAKI, A., FLAVELLI, R.A. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (15), 5598–5603, 2004.

- MA, W.; KAHN, R. E.; RICHT, J. A. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. *J. Mol. Genet. Med.*, v. 3, p. 158-166, 2009.
- MA, W.; RICHT, J. A. Swine influenza vaccines: current status and future perspectives. *Anim. Health Res. Rev.*, v. 11, p. 81–96, 2010.
- MAES, D.; DELUYKER, H.; VERDONCK, M. et al. Herd factors associated with the seroprevalences of four major respiratory pathogens in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. *Vet. Res.*, v. 31, p. 313-327, 2000.
- MAES, L.; HAESBROUCK, F.; PENSAERT, M. Experimental reproduction of clinical disease by intratracheal inoculation of fattening pigs with swine influenza virus isolates. *Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc.*, v. 8, p. 60, 1984.
- MANCINI, D. A. P.; CUNHA, E. M. S.; MENDONÇA, R. M. Z. Evidence of swine respiratory infection by influenza viruses in Brazil. *Virus Res.*, v. 11, p. 39-43, 2006.
- MATROSOVICH, M. N.; MATROSOVICH, T. Y.; GRAY, T. et al. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J. Virol.*, v. 78, p. 12665-12667, 2004.
- MAZANEC MB, COUDRET CL, FLETCHER DR. Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies. *J Virol.*, v. 69, p. 1339–44, 1995.
- MENSIK, J., POKORNY, J. Development of antibody response to swine influenza virus in pigs. I. The influence of experimental infection of pregnant sows on serum antibody production by their progeny during postnatal development. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, v. 18, p. 177–189, 1971.
- MOZDZANOWSKA, K., MAIESE, K., FURCHNER, M., GERHARD, W. Treatment of influenza virus-infected SCID mice with nonneutralizing antibodies specific for the transmembrane proteins matrix 2 and neuraminidase reduces the pulmonary virus titer but fails to clear the infection. *Virology*, 254 (1), 138–146, 1999.
- MURPHY BR, CLEMENTS ML. The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. In: Mestecky J, McGhee JR, eds. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. New York, NY: Springer Verlag, 107–16, 1989.
- NAYAK, D. P.; HUI, E. K.; BARMAN, S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res.*, v. 106, p. 147-165, 2004.
- NAYAK, D. P.; TWIEHAUS, M. T.; KELLEY, G. W.; UNDERDAHL, N. R. 1965. Immunocytologic and histopathologic development of experimental swine influenza infection in pigs. *Am J Vet Res*, v. 26, p.1271- 1282, 1965.
- NEROME, K., ISHIDA, M.; NAKAYAMA, M.; OYA, A.; KANAI, C.; SUWICHA, K. Antigenic and genetic analysis of A/Hong Kong (H3N2) influenza viruses isolated from swine and man. *J. Gen. Virol.* 56(Pt 2), 441–445, 1981.

NGO, L. T., HIROMOTO, Y.; PHAM, V. P.; LE, H. T.; NGUYEN, H. T.; LE, V. T.; TAKEMAE, N.; SAITO, T. Isolation of novel triplereassortant swine H3N2 influenza viruses possessing the hemagglutinin and neuraminidase genes of a seasonal influenza virus in Vietnam in 2010. *Influenza Other Respi. Viruses* 6, 6–10, 2012.

NICHOLLS, J.M.; CHAN, R.W.; RUSSELL, R.J. et al. Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol*, 2008; 16: 149-157.

OIE, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Swine influenza*. Paris: World Organisation for Animal Health, p. 1128-1138, 2010.

OLSEN, C.W.; BROWN, I.H.; EASTERDAY, B.C. et al. Swine influenza. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Ed). *Diseases of swine*. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 2006.

PASICK, J., HANDEL, K.; ROBINSON, J. et al. Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *J. Gen. Virol.*, v. 86, p.727-31, 2005.

PEIRIS, J. S. M., GUAN, Y.; GHOSE, P.; MARKWELL, D.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G.; SHORTRIDGE, K. F. H3N2, H9N2 and H1N1 subtype influenza viruses cocirculate in pigs in southeastern China. In: Osterhaus, A. D. M. E., N. Cox, and A. W. Hampson (eds), *Options for the Control of Influenza IV*, pp. 195– 200. Excerpta Medica, International Congress Series 1219, Amsterdam, 2001.

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

PEREDA, A., RIMONDI, A.; CAPPUCCHIO, J.; SANGUINETTI, R.; ANGEL, M.; YE, J.; SUTTON, T.; DIBARBORA, M.; OLIVERA, V.; CRAIG, M. I.; QUIROGA, M.; MACHUCA, M.; FERRERO, A.; PERFUMO, C.; PEREZ, D. R. Evidence of reassortment of pandemic H1N1 influenza virus in swine in Argentina: are we facing the expansion of potential epicenters of influenza emergence? *Influenza Other Respi. Viruses* 5, 409–412, 2011.

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

PLATT, R.; VINCENT, A.L.; GUGER, P.C.; LOVING, C.L.; ZANELLA, E.L.; LAGER, K.M.; KEHRLI JR, M.E.; KIMURA, K.; ROTH, J.A. Comparison of humoral and cellular immune responses to inactivated swine influenza virus vaccine in weaned pigs. *Vet. Immun. Immunop.*, v. 142, p. 252 – 257, 2011)

RAJÃO D.S., ALVES F., DEL PUERTO H.L., BRAZ G.F., OLIVEIRA F.G., CIACCI-ZANELLA J.R., SCHAEFER R., DOS REIS J.K., GUEDES R.M., LOBATO Z.I., LEITE R.C. Serological evidence of swine influenza in Brazil. *Influenza Other Respir Viruses*, 7(2):109-12, 2013a.

RAJÃO, D.R.; COSTA, A.T.R.; BRASIL, B.S.F.A.; DEL PUERTO, H.L.; OLIVEIRA, F.G.; ALVES, F.; BRAZ, G.F.; REIS, J.K.P.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, Z.I.P. & LEITE, R.C. 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*, 7(5):783-90, 2013b.

RAJÃO, D.S.; LOVING, C.L.; GAUGER, P.C.; KITIKOON, P.; VINCENT, A.L. Influenza A vírus hemagglutinin protein subunit vaccine elicits vaccine-associated enhanced respiratory disease in pigs. *Vaccine*, v.32, p. 5170-5176, 2014.

RENSHAW, H.W. Influence of antibody-mediated immune suppression on clinical, viral, and immune responses to swine influenza infection. *Am. J. Vet. Res.* v. 36, p. 5–13, 1975.

RICHT, J. A.; LAGER, K. M.; JANKE, B. H. et al. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, p. 3198-3205, 2003.

RITCHEY, M.B.; PALESE, P.; SCHULMAN, J.L. Mapping of the influenza virus genome. III. Identification of genes coding for nucleoprotein, membrane protein, and nonstructural protein. *J. Virol.*, v. 20, p. 307-313, 1976.

ROGERS, G.N.; PAULSON, J.C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*; v. 127(2), p. 361–373, 1983.

ROMAGOSA, A.; ALLERSON, M.; GRAMER, M. et al. Vaccination of influenza A virus decreases transmission rates in pigs. *Vet. Res.*, 42:120, 2011

ROSE, N.; HERVÉ, S.; EVENO, E.; BARBIER, N.; EONO, F.; DORENFOR, V.; ANDRAUD, M.; CAMSUSOU, C.; MADEC, F.; SIMON, G. Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pigs farms: evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and reassortment events. *Vet Res*, 44: 72, 2013.

RUMSCHLAG-BOMM, E.; RONG, L. Influenza A vírus entry: implications in virulence and future therapeutics. *Adv. Virol.*, doi: [10.1155/2013/121924](https://doi.org/10.1155/2013/121924), 2013.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBHARA, S., KURICHH, A., MIRANDA, R., TUMPEY, T., ROWE, T., RENSCHAW, M., ARPINO, R., TAMANE, A., KANDIL, A., JAMES, O., UNDERDOWN, B., KLEIN, M., KATZ, J., BURT, D. Heterosubtypic immunity against human influenza A viruses, including recently emerged avian H5 and H9 viruses, induced by FLU-ISCOM vaccine in mice requires both cytotoxic T-lymphocyte and macrophage function. *Cell. Immunol.* 211 (2), 143–153, 2001.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 3ª edição. Belo Horizonte. FEP MVZ. 2010.

- SANDBULTE, M.R.; PLATT, R.; ROTH, J.A.; HENNINGSON, J.N.; GIBSON, K.A.; RAJÃO, D.S.; LOVING, C.L.; VINCENT, A.L. 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*, 464-465, 45 – 54, 2014.
- SCHAEFER, R.; RECH, R.R.; GAVA, D. et al. A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. *Arch. Virol.*, v. 160 (1), p. 29-38, 2015.
- SCHAEFER, R.; RECH, R.R.; SILVA, M.C.; GAVA, D.; CIACCI-ZANELA, J.R. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 33 (1), p. 61-73, 2013.
- SCHAEFER, R., ZANELLA, J.R.C., BRENTANO, L., et al. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, p. 761-767, 2011.
- SELLECK, P. W.; LOWTHER, S. L.; RUSSELL, G. M.; HOOPER, P. T. Rapid Diagnosis of Highly Pathogenic Avian Influenza Using Pancreatic Impression Smears. *Avian Dis.*, v. 47, p.1190–1195, 2003.
- SHINYA, K.; EBINA, M.; YAMADA, S.; ONO, M.; KASAI, N.; KAWAOKA, Y. Influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, Vol 440, 23 March 2006.
- SHOPE, R. E.; FRANCIS JR, T. The susceptibility of swine to the virus of human influenza. *J. Exp. Med.*, v. 64, p. 791–801, 1936.
- SHOPE, R.E. Swine influenza. III. Filtration experiments and aetiology. *J. Exp. Med.*, v.54, p.373-380, 1931.
- SKEHEL, J.J.; WILEY, D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 69, p. 531-569.
- SOUZA AP, HAUT L, REYES-SANDOVAL A et al. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. *Braz J Med Biol Res*, v. 38, p.509–522, 2005.
- SQUIRES, R.B.; NORONHA, J.; HUNT, V.; GARCIA-SASTRE, A.; MACKEN, C.; BAUMGARTH, N. et al. Influenza Research Database: an integrated bioinformatics resource for influenza research and surveillance. *Influenza Other Respir Viruses*. 2012 6:404–16. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00331.x>.
- STERZL, J.; REJNEK, J.; TRAVNICEK, J. Impermeability of pig placenta for antibodies. *Folia Microbiologica*, v. 11, 1966.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- TAMURA, S., TANIMOTO, T., KURATA, T. Mechanisms of broad crossprotection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Jpn. J. Infect. Dis.* v. 58, p. 195–207, 2005.

- TIAN, Z. J.; ZHOU, G.; ZHENG, B. et al. A recombinant pseudorabies virus encoding the HA gene from H3N2 subtype swine influenza virus protects mice from virulent challenge. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 111, p. 211-218, 2006.
- TOMODA, T.; MORITA, H.; KURASHIGE, T.; MAASSAB, H.F. Prevention of influenza by the intranasal administration of cold-recombinant, live-attenuated influenza virus vaccine: importance of interferon gamma production and local IgA response. *Vaccine*, v. 13 (2), p. 185-190, 1995.
- TONG, S.; LI, Y.; RIVAILLER, P.; A distinct lineage of influenza A virus from bats. *PNAS Journ.*, v. 109 (11), p. 4269-4274; 2012.
- TONG, S.; ZHU, X.; LI, Y.; et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog.*, v. 9(10): e1003657. doi:10.1371/journal.ppat.1003657, 2013.
- ULICH, T. R.; YIN, S.; GUO, K. et al. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am. J. Pathol.*, v. 138, p. 1485-1496, 1991.
- USDA (2007). Swine 2006 Part II: Reference of Swine Health and Health Management Practices in the United States, 2006. Fort Collins, CO:USDA:APHIS:VS. Available online at http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/swine/downloads/swine2006/Swine2006_dr_PartII.pdf . Acessado em 30 de agosto de 2014).
- VAN POUCKE, S. G.; NICHOLLS, J. M.; NAUWYNCK, H. J. et al. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. *Virology*, v. 7, 2010.
- VAN REETH, K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet. Res.*, V. 38, P. 243–260, 2007.
- VAN REETH, K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet. Microbiol.*, v.74, p. 109-116, 2000.
- VAN REETH, K.; BROWN, I. H.; DURRWALD, R. et al. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002–2003. *Influenza Other Respi. Viruses*, 2, 99–105, 2008.
- VAN REETH, K.; BROWNB, I.; ESSEN, S.; PENSAERT, M. Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs. *Virus Res.*, v. 103, p. 115–124, 2004.
- VAN REETH, K.; MA, W. Swine influenza virus vaccines – to change or not to change: that’s the question. *Curr Top Micro Immu*, doi: 10.1007/82_2012_266, 2012.

VANDER VEEN R, KAMRUD K, MOGLER M, LOYNACHAN AT, MCVICKER J, BERGLUND P, OWENS G, TIMBERLAKE S, LEWIS W, SMITH J, HARRIS DL. Rapid development of an efficacious swine vaccine for novel H1N1. *PLoS Curr.*, Oct 29;1, 2009.

VANDER VEEN, R.L.; HARRIS, D.L.; KAMRUD, K.I. Alphavirus replicon vaccines. *Animal Health Research Reviews* 13: 1–9, 2012.

VINCENT, A. L., LAGER, K. M.; FAABERG, K. S.; HARLAND, M.; ZANELLA, E. L.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; KEHRLI, M. E. JR.; JANKE, B. H.; KLIMOV, A. Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. *Influenza Other Respi. Viruses* 4, 53–60, 2010.

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

VINCENT, A. L.; MA, W.; LAGER, K. M.; JANKE, B. H.; RICHT, J. A. Swine Influenza Viruses: A North American Perspective. In: MARAMOROSCH, K.; SHATKIN, A.J.; MURPHY, F. A. (Eds). *Advances in Virus Research*. Vol. 72. Burlington: Academic Press, p.127-154, 2008.

VINCENT, A.L.; AWADA, L.; BROWN, I.; CHEN, H.; CLAES, F.; DAUPHIN, G.; DONIS, R.; CULHANE, M. et al. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoo. Publ. Health*, v. 61, p. 4- 17, 2014.

VINCENT, A.L.; MA, W.; LAGER, K.M.; JANKE, B.H.; WEBBY, R.J.; GARCIA-SASTRE, A.; RICHT, J.A. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza vaccine in swine. *Vaccine*, v. 25 (47), p. 7999- 8009, 2007.

VINCENT, L. L.; JANKE, B. H.; PAUL, P. S.; HALBUR, P. G. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 9, p.191-195, 1997.

WANG, C.; TAKEUCHI, K.; PINTO, L.; LAMB, R.A. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: Characterization of the amantadine block. *J. Virol.*, v. 67 (9), p. 5585-5594, 1993.

WANG, R.; TAUBENBERGER, J.K. Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther.* v. 8 (5), p. 517–527, 2010.

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

WEBBY, R. J.; SWENSON, S. L.; KRAUSS, S. L. et al. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J. Virol.*, v.74, p.8243-51, 2000.

WEBSTER, R. G.; BEAN, W. J.; GORMAN, O. T. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.*, v. 56, p. 152-179, 1992.

WESLEY, R.D.; LAGER, K.M. Overcoming maternal antibody interference by vaccination with human adenovirus 5 recombinant viruses expressing the hemagglutinin and the nucleoprotein of swine influenza virus. *Veterinary Microbiology*, v. 118, p. 67–75, 2004.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. 2° ed., 2002.

WILLS, R.W.; ZIMMERMAN, J.J.; YOON, K.J.; SWENSON, S.L.; HOFFMAN, L.J.; MCGINLEY, M.J.; HILL, H.T.; PLATT, K.B. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet Microbiol.* Jun 30; 57(1):69-81, 1997.

WOOD, J.M.; GAINES-DA, S R.E.; TAYLOR, J.; CHAKRAVERTY, P. Comparison of influenza serological techniques by international collaborative study. *Vaccine*, v. 12, p. 167–174, 1994.

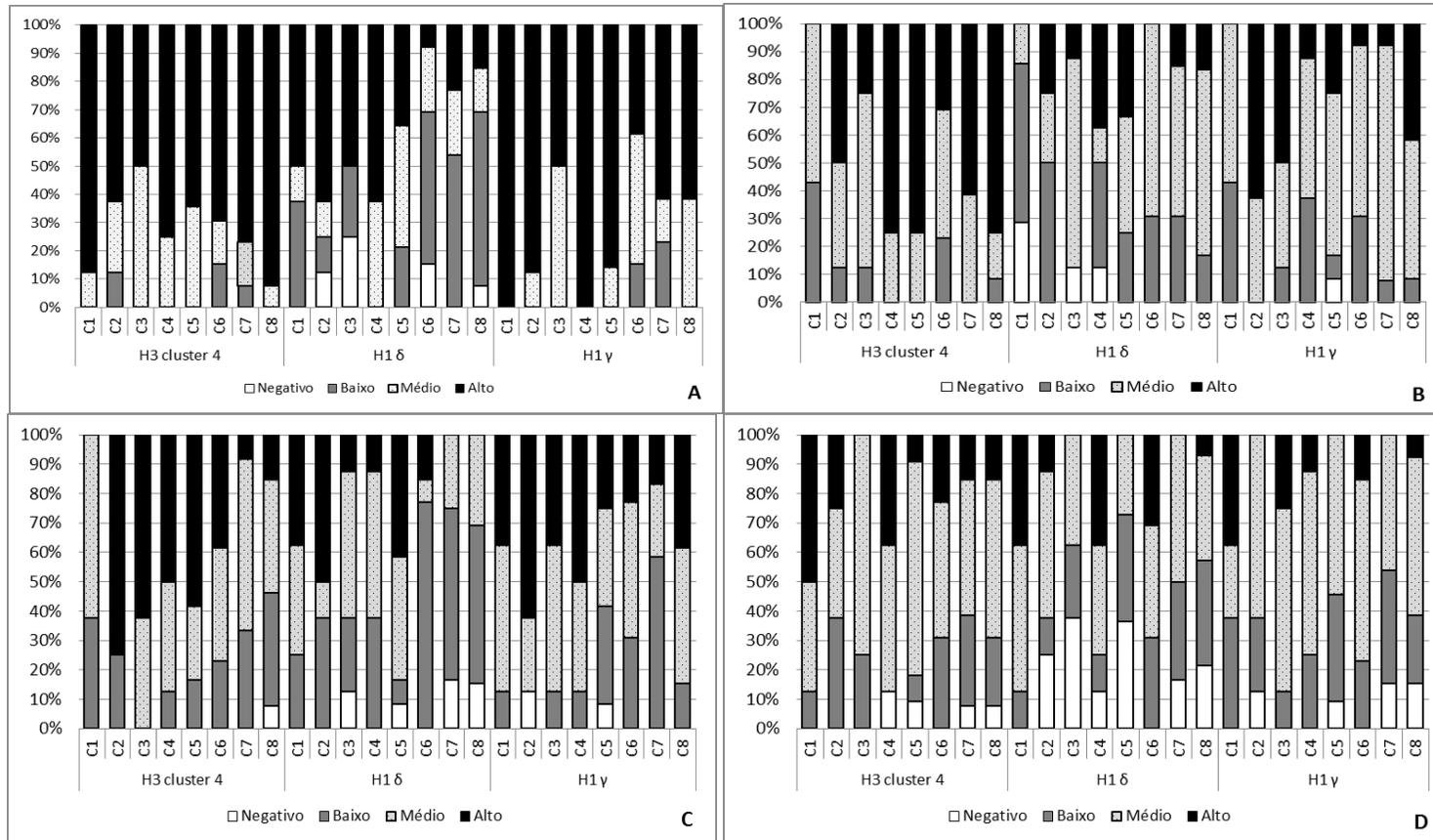
ZHOU, N. N.; SENNE, D. A.; LANDGRAF, J. S. et al. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J. Virol.*, v. 73, p. 8851–8856, 1999.

ZOETIS, 2012. FluSure Pandemic. Disponível *on line* no endereço <https://www.zoetis.com/products/pages/flusure/UMVDL-surveillance-results>. Acessado em 23 de janeiro de 2015.

ZOETIS, 2014. UMVDL SIV Surveillance, Zoetis Inc. United States, Disponível *on line* no endereço <https://www.zoetis.com.br/FluSure%20Pandemic>. Acessado em 30 de agosto de 2014.

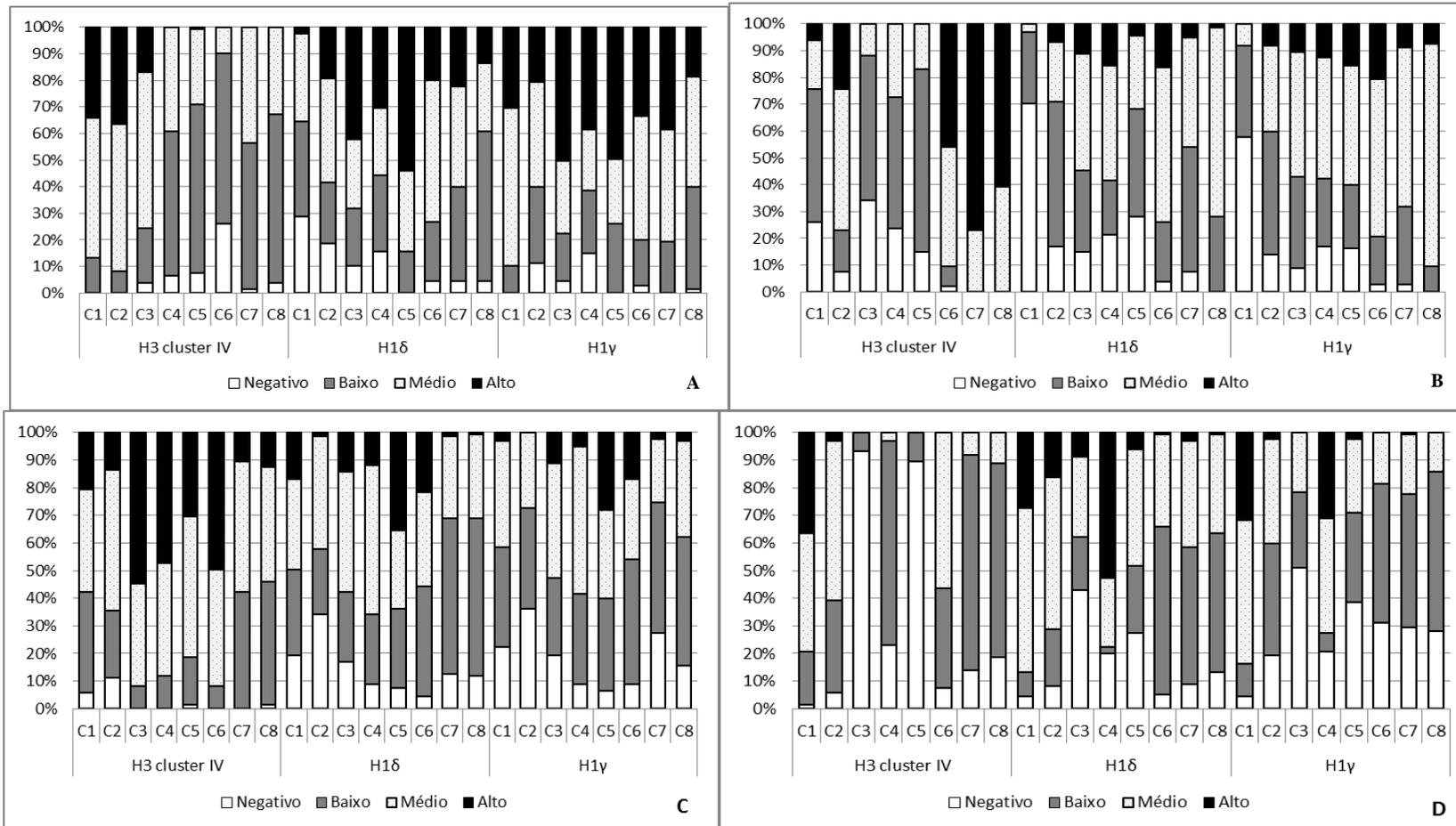
ANEXOS

Anexo 1: Distribuição de anticorpos contra os antígenos da vacina de subunidade autógena no soro de porcas amostradas durante o estudo realizado nas quatro granjas selecionadas no Meio-oeste dos Estados Unidos.



*A= G1, B= G2, C=G3 e D=G4

Anexo 2: Distribuição de anticorpos contra os antígenos da vacina de subunidade autógena no soro de leitões lactentes amostrados durante o estudo realizado nas quatro granjas seleccionadas no Meio-oeste dos Estados Unidos



*A= G1, B= G2, C=G3 e D=G4