

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

**FORMULAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE VACINAS PARA INFLUENZA A  
EM SUÍNOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O AUMENTO DA DOENÇA  
RESPIRATÓRIA**

**Tese de Doutorado**

**CARINE KUNZLER SOUZA**

**Porto Alegre**

**2015**

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

**Formulação e administração de vacinas para Influenza A em suínos e  
sua associação com o aumento da doença respiratória**

**Carine Kunzler Souza**

**Carine Kunzler Souza**

**Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de doutora em Ciências Veterinárias,  
Especialidade: Imunologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal**

**Co-orientadora: Dra. Janice Reis Ciacci Zanella**

**Porto Alegre**

**2015**

Souza, Carine Kunzler  
FORMULAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE VACINAS PARA  
INFLUENZA A EM SUÍNOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O AUMENTO  
DA DOENÇA RESPIRATÓRIA / Carine Kunzler Souza. --  
2015.

141 f.

Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Coorientadora: Janice Reis Ciacci-Zanella.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2015.

1. influenza A. 2. vacina. 3. suíno. 4. doença  
respiratória. 5. falha vacinal. I. Canal, Cláudio  
Wageck, orient. II. Ciacci-Zanella, Janice Reis,  
coorient. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARINE KUNZLER SOUZA**

**Formulação e administração de vacinas para Influenza A em suínos e sua  
associação com o aumento da doença respiratória**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela comissão formada pelos doutores:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal  
Orientador e Presidente da Comissão

Dra. Janice Reis Ciacci Zanella  
Co-orientadora

Dra. Rejane Schaefer  
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite  
Membro da Comissão

Prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes  
Membro da Comissão

Porto Alegre  
2015

**CARINE KUNZLER SOUZA**

**FORMULAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE VACINAS PARA INFLUENZA A  
EM SUÍNOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O AUMENTO DA DOENÇA  
RESPIRATÓRIA**

19 MAR 2015

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Dra. Janice Reis Ciacci Zanella  
Co-orientadora

---

Dra. Rejane Schaefer  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio, paciência, compreensão e palavras de incentivos que ajudaram a completar mais esta etapa da minha vida profissional, sem vocês eu não teria realizado tudo isso.

À minha irmã Bárbara e colega de profissão, que sempre participou de todos os momentos durante o doutorado me incentivando e me ajudando a superar as dificuldades.

Ao Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal, pela oportunidade, orientação e auxílio com seu conhecimento. Agradeço também aos colegas do Laboratório de Virologia que fizeram parte do meu crescimento profissional.

À Dra. Janice Reis Ciacci Zanella e sua equipe pela oportunidade de trabalhar em colaboração com a Embrapa, co-orientação e auxílio com seu conhecimento.

À Dra. Amy L. Vincent do National Animal Disease Center – USDA pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, pela excelente orientação, e por todos os ensinamentos que contribuíram muito para o meu crescimento profissional na pesquisa. Além disso, agradeço a toda equipe da Dra. Amy, em especial à Dra. Daniela Rajão, Dra. Crystal L. Loving e Dr. Phillip C. Gauger (Iowa State University) que tiveram uma participação efetiva nos experimentos. Não menos importantes, um agradecimento especial à eficiente equipe técnica (Michelle Harland, Gwen Nordholm e Zahra Olson) e pela assistência no estudo com os animais (Tyler Standley, Jason Huegel e Jason Crabtree). Assim como, agradeço aos demais amigos do NADC.

Ao Prof. Dr. Itabajara Vaz e sua equipe que me ajudaram com muito *expertise* nos experimentos do projeto inicial. Em especial, à Daiane Oldiges pela grande ajuda nos experimentos, paciência, amizade e pelos ensinamentos oferecidos.

Ao Rodrigo, por estar presente nos momentos em que mais precisei, pela paciência e estímulo, não sabe o quanto você é importante para mim.

Agradeço também ao meu “irmão emprestado” Diego por todo o apoio e estímulo em todos esses anos de estudo.

Aos demais amigos e familiares que sempre me apoiaram nessa empreitada científica.

À CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

*“Success usually comes to those who are too busy to be looking for it”*

*Henry David Thoreau*

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 1</b> - Eletromicrografia da morfologia do IAV.....  | 15 |
| <b>FIGURA 2</b> - Desenho esquemático da estrutura do vírus da influenza A.....                              | 15 |
| <b>FIGURA 3</b> - Epidemiologia dos IAV de suínos na América do Norte desde 1918 .....                       | 20 |
| <b>FIGURA 4</b> - Ciclo de replicação do IAV.....  | 23 |
| <b>FIGURA 5</b> - Análise filogenética de isolados norte-americanos dos SIV H1.....                          | 30 |
| <b>FIGURA 6</b> - Lesões macroscópicas e microscópicas de pneumonia típicas de SIV.....                      | 35 |
| <b>FIGURA 7</b> - Lesões macroscópicas indicativas de aumento da doença respiratória associada à vacina..... | 49 |
| <b>FIGURA 8</b> - Lesões microscópicas indicativas de aumento da doença respiratória associada à vacina..... | 49 |



## SUMÁRIO

|   |            |
|---|------------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>12</b>  |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>14</b>  |
| 2.1 Caracterização e organização genômica.....                                | 14         |
| 2.2 Histórico das pandemias .....   | 17         |
| 2.3 Replicação viral.....   | 21         |
| 2.4 Transmissão e Patogenia.....  | 24         |
| 2.5 Epidemiologia .....   | 27         |
| 2.5.1 América do Norte .....  | 27         |
| 2.5.2 Europa.....   | 31         |
| 2.5.3 Ásia.....   | 31         |
| 2.5.4 América do Sul.....   | 32         |
| 2.6 Sinais clínicos e patológicos .....                                       | 34         |
| 2.7 Imunidade .....   | 36         |
| 2.8 Diagnóstico .....   | 41         |
| 2.9 Vacinas .....   | 44         |
| 2.10 Aumento da doença respiratória associado à vacina (VAERD) em suínos .... | 47         |
| <b>3. Manuscrito 1 .....</b>  | <b>54</b>  |
| <b>4. Manuscrito 2 .....</b>  | <b>92</b>  |
| <b>5. CONCLUSÕES FINAIS .....</b>   | <b>120</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>121</b> |

## RESUMO

Vacinas inativadas de vírus inteiro (WIV) são amplamente utilizadas para o controle de influenza A em suínos (SIV) nos Estados Unidos e Europa e conferem proteção contra cepas homólogas à vacina reduzindo a doença clínica. Porém, a proteção da WIV pode ser limitada contra um desafio heterólogo. O aumento da doença respiratória associado à vacina (VAERD) foi descrito em suínos vacinados com uma WIV contendo uma cepa  $\delta$ 1-cluster-H1N2 e desafiado com uma cepa heteróloga contendo a mesma hemaglutinina, H1N1pdm09. Nesse contexto, os suínos apresentaram pneumonia severa com aumento das lesões pulmonares associado ao uso da WIV. No primeiro manuscrito foi avaliado se a formulação da WIV, o tempo entre o reforço vacinal e o desafio, e a idade de vacinação tinham impacto em VAERD. Suínos foram vacinados com duas vacinas bivalentes, WIV- $\delta$ 1H1N2/H3N2 (MN08-TX98) ou WIV- $\delta$ 1H1N2/H1N1pdm09 (MN08-CA09), administradas em duas doses com intervalo de três semanas, e desafiados com H1N1pdm09, três semanas após o reforço. Além disso, dois grupos foram vacinados com uma WIV- $\delta$ 1H1N2 (MN08) e desafiados três ou seis semanas após o reforço. Em um estudo subsequente, dois grupos vacinados com uma WIV- $\delta$ 1H1N2 com duas doses da vacina em diferentes idades: a primeira dose com 4 ou 9 semanas de idade e o reforço com 7 ou 12 semanas de idade. E um grupo vacinado com uma vacina viva atenuada de influenza (LAIV). Os animais foram desafiados com H1N1pdm09 às 15 semanas de idade. Com exceção dos grupos MN08-CA09, LAIV e controles, todos os grupos WIV apresentaram lesões pulmonares consistentes com VAERD. Nenhum grupo induziu anticorpos neutralizantes para o H1N1pdm09, exceto MN08-CA09. No entanto, grupos vacinados com a WIV-MN08 em diferentes idades induziram anticorpos IgG não-neutralizantes com reatividade cruzada com o H1N1pdm09 no soro e no pulmão, comparado com LAIV e controles. Esses dados sugerem que a idade da primeira dose da vacina, a formulação com a vacina bivalente MN08-TX98 e o desafio seis semanas após o reforço vacinal, não preveniram o desenvolvimento de VAERD. Em contraste, a vacinação com a LAIV demonstrou proteção até oito semanas após reforço. No segundo manuscrito foi avaliado o impacto dos adjuvantes na formulação da WIV no modelo de VAERD. Cinco grupos foram vacinados com WIV- $\delta$ 1H1N2 formuladas com diferentes adjuvantes comerciais: óleo em água 1 (OW1), OW2, nano-emulsão (NE), gel polímero (GP) e partículas imuno-estimulantes aquosa (IMP). O protocolo vacinal/desafio foi utilizado com três semanas de intervalo entre as doses. Os grupos vacinados com WIV-OW apresentaram lesões macroscópicas nos pulmões consistentes com VAERD comparado com WIV-NE, WIV-GP e controles. Nenhum dos grupos induziu anticorpos neutralizantes contra o vírus do desafio (H1N1pdm09). Similarmente, os grupos WIV-OW, WIV-NE e WIV-GP induziram anticorpos não neutralizantes IgG de reatividade cruzada contra o H1N1pdm09 no soro e pulmão. Apesar dos anticorpos não neutralizantes com reatividade cruzada nos grupos WIV-NE e WIV-GP, não apresentaram lesões pulmonares tão severas como os grupos OW. Além disso, os adjuvantes tiveram um papel significativo na imunogenicidade da WIV e no desenvolvimento de VAERD.

Palavras-chave: influenza, suínos, doença respiratória, vacina.

## ABSTRACT

*Whole inactivated virus (WIV) vaccines reduce clinical disease against homologous influenza A virus (IAV) infection and are widely used in swine; however, WIV has been associated with vaccine-associated enhanced respiratory disease (VAERD) when challenged with heterologous IAV of the same hemagglutinin subtype. Here, we evaluated the impact of age at vaccination and timing between vaccination and challenge on development of VAERD using a model with a human-like 1 $\delta$  cluster swine MN08 H1N2 as the vaccine component and pandemic H1N1 (H1N1pdm09) virus as the challenge strain. Pigs were vaccinated with bivalent WIV vaccine containing H1N2-MN08/H3N2-TX98 or H1N2-MN08/H1N1pdm09-CA09. All groups were challenged with H1N1pdm09 at 3 weeks post-boost (wpb). In addition, a monovalent WIV MN08 H1N2 group was challenged at 6 wpb to determine if time post-vaccination played a role on VAERD. In a follow up study, we compared the time of first WIV vaccination (4 or 9 weeks of age) and the boost three weeks later (7 or 12 weeks of age) to determine if age at first vaccination or if 8 weeks duration between vaccination and challenge impacted VAERD. A live-attenuated influenza virus (LAIV) vaccine administered at 4 and 7 weeks of age was also included. Pigs from study 2 were challenged with H1N1pdm09 at 15 weeks of age. All mismatched WIV groups had significantly higher macroscopic and microscopic lung lesions compared with LAIV, bivalent MN08-CA09 and non-vaccinated challenge controls. These data suggest that the age of first vaccination or length of time between booster dose and subsequent challenge do not alter the development VAERD in WIV vaccinated pigs. In the second paper, we evaluated the impact of adjuvant in WIV vaccine on VAERD-affected pigs. Pigs were vaccinated with WIV containing swine MN08/H1N2 that were formulated with five different commercially available adjuvants: OW1, OW2, nano-emulsion (NE), gel polymer (GP), and aqueous immunostimulating particulate (IMP). Pigs were vaccinated with 2 doses, 3 weeks apart, by the intramuscular (WIV-OW1, -OW2, -NE, and -GP) or intranasal (WIV-IMP) routes. Non-vaccinated and challenged pigs (NV/C) and non-vaccinated, non-challenged pigs (NV/NC) were included as controls. Following challenge with H1N1pdm09, WIV-OW1 and WIV-OW2 groups had significantly higher percentages of macroscopic lung lesions consistent with VAERD compared to the NV/C controls, and in contrast to WIV-NE, WIV-GP and WIV-IMP. Prior to challenge, WIV-OW, NE and GP groups had the hemagglutination inhibition antibody (HI) titers to the vaccine strain compared with controls. The WIV-IMP group had HI mean titers below the positive cut-off, with no response to any immune parameter measured, so it could not be implicated or excluded in the VAERD model. None of the groups had cross-reactive HI antibodies against the H1N1pdm09. WIV-OW groups had significantly higher levels of IgG antibody in serum against homologous and heterologous virus; however, the WIV-NE and WIV-GP groups also had serum IgG antibody against both viruses, so presence of total virus IgG alone did not explain the different VAERD outcomes. Adjuvant played a significant role in WIV immunogenicity and in VAERD; however the mechanism requires further investigation.*

*Keywords: influenza, swine, respiratory disease, vaccine*

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus da influenza A (IAV) causa uma importante doença respiratória em mamíferos e aves resultando em significativas perdas econômicas no setor suinícola e avícola a cada ano. Além disso, o IAV é uma ameaça global contínua e grave para humanos e muitas espécies de animais. Em suínos, o IAV causa uma doença respiratória aguda altamente contagiosa, que afeta todas as idades e categorias. As aves aquáticas representam o reservatório natural para o IAV e o suíno tem um papel importante na epidemiologia da doença. Além de ser uma doença respiratória altamente contagiosa e zoonótica, pode levar a infecções secundárias, e com isso pode afetar o desempenho dos suínos acarretando em prejuízos na produção animal. Como o suíno possui receptores nas células do trato respiratório que permitem a infecção com IAV de origem humana e aviária, a recombinação de segmentos gênicos destes vírus pode gerar uma grande diversidade genética e antigênica. Com isso, o controle da doença e a produção de vacinas tornam-se mais complicados devido a frequente introdução de novas variantes nos rebanhos.

Em 2009, com a emergência do vírus H1N1 pandêmico (H1N1pdm09) em humanos, contendo segmentos gênicos de origem suína, aviária e humana de diferentes continentes, foi transmitido globalmente de humanos para suínos causando preocupação para a saúde pública e animal. Devido à pandemia de 2009, o monitoramento de suínos quanto à infecção pelo IAV faz parte de um plano mundial preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) para o controle da infecção em humanos. Esse evento destacou ainda mais a necessidade de desenvolver métodos de diagnóstico rápidos e vacinas para o controle deste vírus. Após a introdução e disseminação do vírus H1N1pdm09 na população suína, a variabilidade genética e antigênica aumentou entre as cepas do vírus da influenza suína (SIV), o que possibilitou a sua persistência na população. Suínos infectados com SIV apresentam sinais clínicos típicos de influenza como febre alta de curta duração, inapetência anorexia, tosse, secreção nasal e dispneia, levando a uma elevada taxa de morbidade e baixa taxa de mortalidade no rebanho.

O SIV é endêmico em suínos em muitos países, o que desafia o seu controle e diagnóstico devido à emergência de novos subtipos virais com potencial de causar novas pandemias de influenza. As vacinas comerciais existentes nos Estados Unidos e Europa são produzidas com vírus inteiro inativado com adjuvante baseado em óleo e água, contendo as cepas que circulam nos rebanhos do seu país de origem. Devido alta

variabilidade antigênica dos SIVs, as vacinas comerciais americanas e européias podem não ser efetivas para controlar os vírus circulantes em outras regiões geográficas. Vacinas inativadas são eficazes na redução da doença clínica contra SIVs homólogos ou antígenicamente relacionados, induzindo uma resposta de anticorpos contra as glicoproteínas de superfície do vírus, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). No entanto, essas vacinas inativadas têm sido associadas com o aumento de doença respiratória em suínos frente a um desafio com uma cepa heteróloga contendo a mesmo subtipo da HA. Esse aumento da doença respiratória foi caracterizado por pneumonia severa com alta percentagem de lesões nos pulmões, uma resposta de anticorpos não-neutralizantes de reatividade cruzada e desregulação das citocinas no pulmão. Apesar das vacinas inativadas induzirem uma resposta imune protetora contra vírus homólogos em suínos, quando os animais são desafiados com um vírus heterólogo, pode levar de falha vacinal a patologia severa dos pulmões, o que dificulta o diagnóstico a campo. Portanto, é importante avaliar os benefícios e riscos quanto ao uso das vacinas inativadas contra SIV, devido à alta variabilidade de cepas virais circulantes no rebanho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Caracterização e organização genômica

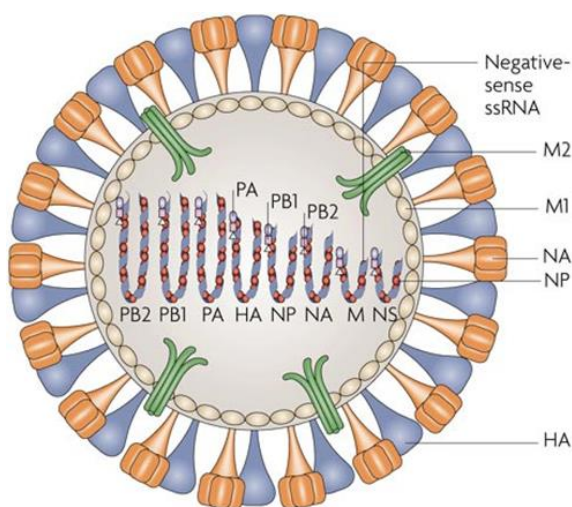
O vírus influenza (VI) pertence à família *Orthomyxoviridae* e inclui os gêneros: vírus da *Influenza A*, *Influenza B*, *Influenza C*, *Isavirus*, *Quaranjavirus* e *Thogotovirus* (ICTV, 2011). O vírus da influenza A (IAV) infecta uma variedade de espécies de aves e de mamíferos, já o vírus da Influenza B infecta apenas humanos e o Influenza C foi identificado em humanos, porém já foi detectado também em suínos e cães. O Isavirus causa anemia infecciosa no peixe salmão acarretando importantes prejuízos na produção. O Quaranjavirus, recentemente classificado na família *Orthomyxoviridae*, infecta artrópodes e vertebrados e o Thogotovirus abrange vírus encontrados em carrapatos, sem doença descrita em vertebrados (ICTV, 2011). A nomenclatura das cepas de IAV segue um padrão universal, considerando o tipo de vírus, hospedeiro de origem (quando não for de humanos), origem geográfica, número da cepa, ano de isolamento e o subtipo da HA e NA (entre parênteses) (ICTV, 2011). Um exemplo é de um IAV isolado de humanos durante a pandemia de 1968, A/Hong Kong/1/68 (H3N2); ou a cepa isolada de suíno como A/swine/Iowa/15/30 (H1N1). Os virions podem apresentar formas esféricas com contorno pouco regular, apresentam envelope, forma pleomórfica e com genoma de RNA fita simples com sentido negativo e segmentado (Figura 1 e 2). Os virions são sensíveis a temperaturas elevadas, apresentando curta viabilidade em condições ambientais. A infectividade é inativada por 30 minutos a 56°C ou em pH 3,0; e são sensíveis a solventes lipídicos (éter/clorofórmio) e detergentes. O genoma do vírus consiste de oito segmentos que devido aos erros introduzidos pela polimerase viral durante o processo de replicação podem acumular mutações pontuais. Estas geram uma grande variabilidade antigênica dos IAVs, possibilitando também a evolução dos mecanismos de escape viral do reconhecimento pelo sistema imune (BUSH et al., 1999).

A organização gênica dos oito segmentos de RNA consiste no gene na região central, flanqueado por seqüências não-codificantes altamente conservadas na extremidade 3' contendo 12 nucleotídeos (nt), e na extremidade 5' contendo 13 nt. Essas regiões terminais também possuem sinais para o início da transcrição e replicação. Cada segmento genômico encontra-se recoberto por múltiplas cópias da nucleoproteína (NP) e está associado com algumas cópias das proteínas que formam o

complexo transcriptase/replicase (RNP) composto pelas proteínas da polimerase (polimerase básica 1 – PB1, polimerase básica 2 – PB2, polimerase ácida – PA e nucleoproteína - NP) (NODA et al., 2006).



**Figura 1. Eletromicrografia mostrando a morfologia de virions do IAV.** Figura disponível em: <http://virologyhistory.wustl.edu/influenza.htm>.



**Figura 2. Desenho esquemático da estrutura do virion da influenza A.** A figura mostra o envelope com as glicoproteínas de superfície, as proteínas internas e os oito segmentos gênicos de RNA. Adaptado de NELSON; HOLMES, 2007.

A proteína da matriz (M1) participa da morfogênese viral e atua como um espaçador entre o envelope e o nucleocapsídeo. A M2 é uma proteína integral do envelope, atuando essencialmente no desnudamento viral, e é gerada a partir do *splicing* alternativo de RNAm que codifica a proteína M1. Ela funciona como um canal de íons e facilita o influxo de íons de H<sup>+</sup> na partícula de vírus, resultando no desencapsulamento do complexo RNP e a sua liberação no citoplasma da célula, fundamental no ciclo de replicação (SAFO et al., 2014). Além disso, a proteína M2 é o alvo da amantadina, classe de drogas anti-virais para IAV, a qual bloqueia a atividade do canal de íons e evita o desnudamento viral (WHARTON et al., 1994). As duas proteínas não-estruturais (NS1 e NS2) também são expressas nas células infectadas, sendo que a NS1 é uma proteína multifuncional e atua como antagonista da cascata de produção de interferon do tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ), já a NS2 está envolvida com o transporte do complexo RNP (JIA et al., 2010).

O IAV é tipificado de acordo com a hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), apresentando 16 diferentes tipos de HA e 9 tipos de NA já descritos, no entanto, mais dois subtipos de IAV foram recentemente identificados em morcegos (TONG et al., 2013). As duas glicoproteínas de superfície (HA e NA) são inseridas e se projetam a partir do envelope viral (Figura 2). A HA é uma proteína multifuncional, responsável pela ligação dos vírions ao receptor da célula do hospedeiro (ácido siálico). A proteína é sintetizada como um precursor polipeptídico (HA0) que requer uma clivagem proteolítica em duas subunidades: HA1 e HA2. A subunidade HA1 possui o formato de cabeça globular (*globular head*) e contém uma região aprofundada como um “bolso” para a sua ligação ao receptor da célula do hospedeiro. A subunidade de HA2 é relativamente conservada, e consiste da região da haste (*stalk*) que contém o peptídeo de fusão. Este peptídeo de fusão desempenha um papel importante na fusão do envelope viral com a membrana da vesícula endossomal dependente de pH (LAMB; KRUG; KNIPE, 2001; WORCH, 2014). Já a proteína NA atua como uma enzima destruidora de receptor, desempenhando um papel importante no ciclo de replicação do vírus após o brotamento de novos vírions da célula infectada. A proteína NA cliva os resíduos de ácido siálico e promove a liberação das partículas virais recentemente produzidas a partir da célula infectada. Além disso, a NA é alvo para o desenvolvimento de drogas antivirais (SHTYRYA; MOCHALOVA; BOVIN, 2009).

Os diferentes subtipos de IAV possuem uma alta variabilidade genética e antigênica nas glicoproteínas de superfície, o que permite a adaptação e persistência do



vírus na população hospedeira. A grande variabilidade genética dos IAV é devido a dois mecanismos genéticos principais: mutações pontuais ou “*antigenic drift*” e rearranjo gênico ou “*antigenic shift*” (BOKHARI; JANIES, 2010). As mutações pontuais ocorrem devido à baixa fidelidade da polimerase viral, que introduz nucleotídeos incorretos durante a síntese das novas moléculas de RNA. Quando essas mutações pontuais ocorrem nos genes que codificam as glicoproteínas de superfície (HA e NA), podem ocorrer alterações nos sítios reconhecidos por anticorpos neutralizantes, permitindo ao vírus escapar da resposta imune do hospedeiro, garantido a sua perpetuação e transmissão a novos hospedeiros. Devido à natureza segmentada do genoma dos IAVs, também podem ocorrer trocas de segmentos gênicos entre vírus parentais, quando uma célula do hospedeiro é infectada por dois (ou mais) IAVs diferentes. Esse mecanismo de rearranjo gênico permite a geração de uma progênie de vírus com uma nova combinação (constelação) de genes e possibilita uma rápida evolução viral (OLSEN, 2002; VINCENT et al., 2008a; ZHOU et al., 1999a).

## 2.2 Histórico das pandemias

A pandemia de influenza ocorrida entre 1918 e 1920, mais conhecida como gripe espanhola, matou aproximadamente 50 milhões de pessoas durante a Primeira Guerra Mundial (JOHNSON; MUELLER, 2002; TAUBENBERGER; MORENS, 2006). Em 1930, o vírus foi primeiramente isolado de suíno e pertencia a linhagem H1N1 (SHOPE, 1931). Estudos subsequentes indicaram que os vírus descendentes do vírus H1N1 de 1918 ainda persistiam enzooticamente em suínos. Provavelmente estes vírus também circularam continuamente em humanos, sofrendo mutações pontuais graduais e causando epidemias anuais até os anos 50.

A emergência da pandemia da “*gripe asiática*” (H2N2) de 1957 começou no Sul da Ásia e logo se espalhou para Singapura, Hong Kong, Japão, Estados Unidos e Reino Unido, totalizando mais de um milhão de óbitos na população humana. Essa pandemia foi causada por um vírus que sofreu um rearranjo com segmentos de vírus aviários e humanos e que introduziu os genes H2 e o N2 na população humana. Além disso, o gene PB1 do H2N2 era de origem aviária (NEUMANN; NODA; KAWAOKA, 2009). Com isso, os vírus descendentes da cepa pandêmica de 1918 (H1N1) desapareceram completamente da população humana, no entanto linhagens geneticamente relacionadas persistiram enzooticamente em suínos (TAUBENBERGER; MORENS, 2006). Os IAVs H2N2 foram substituídos por outro vírus recombinante de humano/aves que possuíam

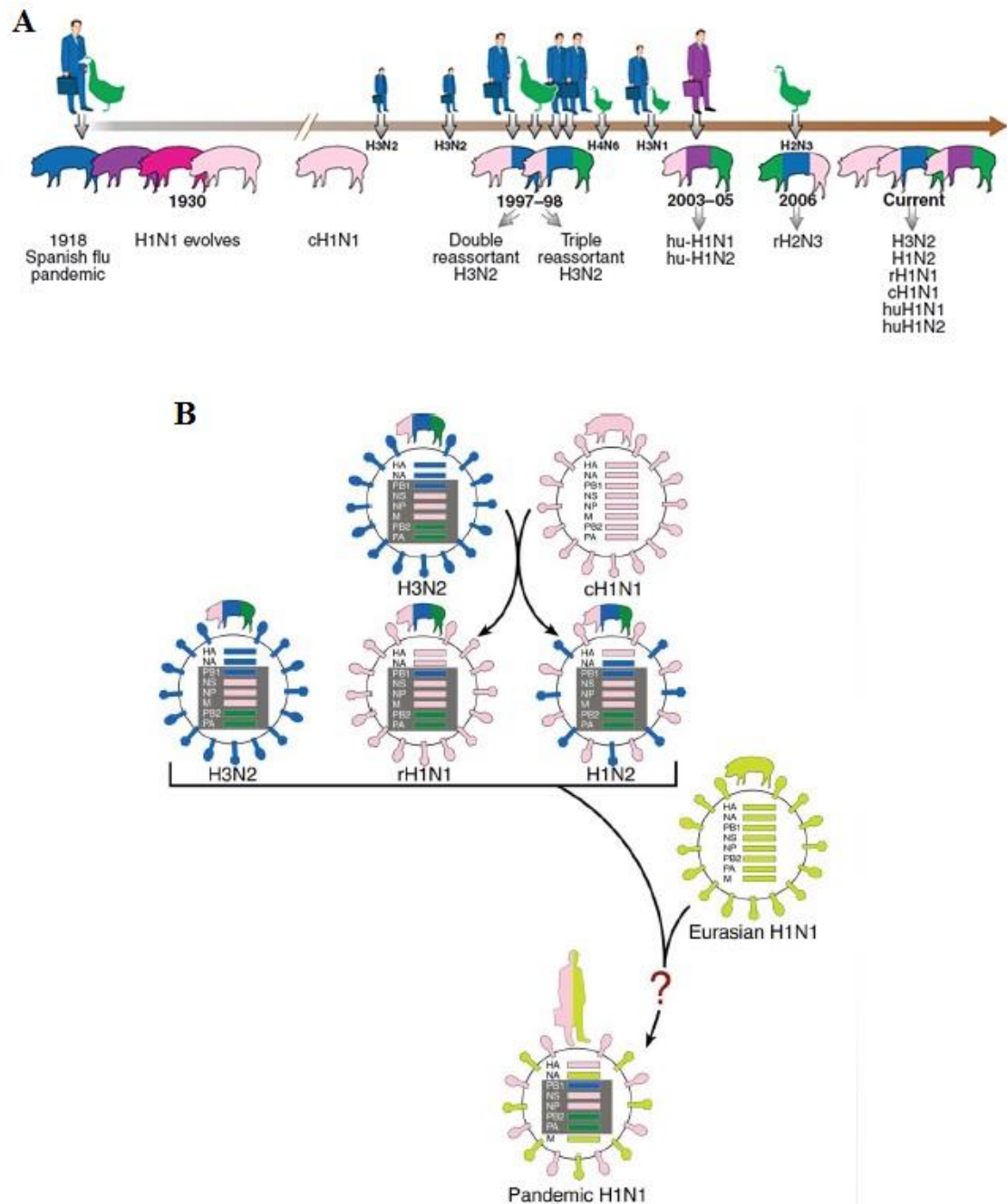
os genes de um H3N2 humano, mas os genes H3 e PB1 eram de origem aviária. Assim, emergiu a pandemia de 1968, “*Hong Kong flu*”, causada pelo vírus H3N2, em Hong Kong que causou a morte de meio milhão de pessoas. Portanto, as pandemias de 1957 e 1968 foram caracterizadas pela introdução do gene PB1 e de novos segmentos gênicos das proteínas de superfície (HA/NA) de origem aviária na constelação original que continham segmentos gênicos de vírus humanos (FANG et al., 1981; KAWAOKA; KRAUSS; WEBSTER, 1989; SCHOLTISSEK et al., 1978). Estudos filogenéticos mostraram que o vírus H2N2 que emergiu em 1957 foi um recombinante genético entre H1N1 humano que circulou entre 1918 e 1930 e um vírus de origem aviária, como doador do novo H2 e os genes N2 e PB1 derivados de fontes de influenza A aviária (*avian influenza virus – AIV*) da Eurásia (KILBOURNE, 2006). Além disso, um estudo baseado na análise bayesiana do tempo do ancestral comum mais recente estimou que a introdução desses três genes previamente mencionados (PB1, HA e NA) na população humana, ocorreu entre 2 e 6 anos antes da pandemia de 1957. Já os segmentos gênicos H3 e PB1 do vírus pandêmico de 1968 (H3N2/1968) foram introduzidos entre os anos de 1966 e 1968 (SMITH et al., 2009a). Assim, esses vírus podem ter cocirculado na população humana cerca de 1 a 3 anos antes do surgimento da pandemia. Estes vírus pandêmicos estabeleceram-se em humanos como a causa da gripe sazonal por muitos anos, até serem substituídos por um novo vírus pandêmico.

A partir disso, o H1N1 proveniente da pandemia de 1918 adaptou-se e evoluiu em suínos e, atualmente, é denominado H1N1 clássico (cH1N1). O cH1N1 continuou circulando na população suína causando surtos de doença respiratória aguda nos Estados Unidos. Em 1977, o IAV cH1N1 humano reemergiu e continuou a circular nas formas endêmica e epidêmica na população humana (KENDAL et al., 1978). O cH1N1, que circulava na população humana entre 1918 e 1957 e depois novamente a partir de 1977 até os dias de hoje, teve um impacto epidemiológico importante em humanos. Além disso, de 1930 até o final dos anos 90 os vírus cH1N1 circularam em suínos e permaneceram relativamente estáveis antígenicamente (VINCENT et al., 2006b).

Em 1998, foi identificado um vírus em suínos resultado de rearranjo entre o cH1N1 e um H3N2 contemporâneo de linhagem humana e mais uma linhagem de AIV americana de um subtipo desconhecido, resultando o surgimento de um vírus H3N2 triplo-recombinante (“*Triple Reassortant Internal Genes – TRIG*”) (rH3N2) na população suína de toda a América do Norte (KARASIN et al., 2000; ZHOU et al., 1999a). Após a detecção inicial do vírus H3N2, ocorreu um rearranjo gênico

subsequente entre o vírus H3N2 e o vírus cH1N1 e acredita-se que este rearranjo gênico resultou na geração de outros vírus contendo TRIG, como o rH1N1 e H1N2 (VINCENT et al., 2006b) (Figura 3). Além da detecção destes vírus recombinantes na população de suínos dos EUA, desde a década de 1990, SIVs da linhagem norte-americana contendo o TRIG também foram detectados em populações de suínos na Ásia (CHEN et al., 2008; SONG et al., 2007). Desde 1999, uma grande variabilidade antigênica foi identificada nos vírus triplo-recombinantes H1, demonstrado no título viral observado no ensaio de inibição da hemaglutinação (HI) com até 16 vezes de diferença antigênica quando comparado com os soros de suínos infectados com cepas de IAV emergidas anteriormente à introdução da constelação de genes do TRIG (VINCENT et al., 2006a).

Em março de 2009, o vírus A/CA/04/H1N1pdm/2009 (H1N1pdm09) nunca detectado antes em suínos ou outras espécies, emergiu no México e nos Estados Unidos infectando humanos (INTELLI et al., 2009a). Esse vírus apresentou uma alta divergência antigênica quando comparado com a gripe sazonal humana, H1N1. Com isso, a população humana não possuía imunidade protetora contra esse novo vírus. Logo após a sua emergência, o vírus espalhou-se rapidamente pelos continentes caracterizando a primeira pandemia de influenza do século XXI. Em termos de mortalidade, a infecção pelo H1N1pdm09 foi relativamente branda em humanos, e, preferencialmente, afetou jovens adultos. A caracterização filogenética demonstrou que a maioria dos segmentos gênicos do H1N1pdm09 derivavam do H3N2 e/ou vírus triplo-recombinantes H1N2, encontrados pela primeira vez em suínos na América do Norte em 1998 (ZHOU et al., 1999b). Enquanto que os segmentos gênicos M e NA eram estreitamente relacionados a um vírus H1N1 *avian-like* encontrado primeiramente em suínos na Europa em 1979, e posteriormente na Eurásia, derivando do *pool* de genes de um AIV da Eurásia (LUDWIG et al., 1995). O H1N1 da Eurásia recombinau com outros vírus H3N2 circulantes em suínos e humanos na Europa e Ásia (PEIRIS et al., 2001; SCHULTZ et al., 1991). Especificamente, o vírus H1N1 *avian-like* da Eurásia sofreu recombinação com um H3N2 de origem humana em meados da década de 1980 e resultou na geração de um vírus europeu duplo-recombinante H3N2 em suínos (com os genes HA e NA de origem humana e os genes internos de origem aviária) (SCHULTZ et al., 1991). O vírus H1N2 isolado pela primeira vez de suínos em Hong Kong em 2004 mostrou que apenas o seu gene NA era diferente do vírus pandêmico H1N1pdm09, destacando a possibilidade de que a cepa pandêmica pode ter sido gerada anos antes de sua emergência em humanos.



**Figura 3. Epidemiologia dos IAV de suínos na América do Norte desde 1918.** (A) Os vírus de linhagem suína estão em cor rosa, de linhagem aviária na cor verde, e humana na cor azul ou roxa. Os eventos cronológicos de transmissão de IAVs levaram à recombinação dos vírus com genes de linhagens suína, humana e aviária. A gripe espanhola foi transmitida de humanos/aves para suínos evoluindo no H1N1 clássico (cH1N1), como indicado nas cores dos suínos de azul para roxo e de rosa escuro para rosa claro. As figuras humanas e aviárias acima da linha do tempo horizontal representam a origem de espécies de segmentos de genes virais doados para dar origem aos SIVs recombinantes listados abaixo da linha do tempo horizontal. (VINCENT et al., 2008a). (B) A recombinação entre os vírus H3N2 contendo o TRIG e cH1N1 gerou os vírus recombinantes rH3N2, rH1N1 e H1N2. A recombinação desses vírus com os segmentos de uma cepa H1N1 *avian-like* de suíno da Eurásia gerou o H1N1pdm09.

Cortesia: NADC-USDA-ARS/Amy L. Vincent, Virus and Prion Diseases of Livestock Unit, Ames, IA.

### 2.3 Replicação viral

Os receptores celulares de ácido siálico encontrados na superfície da célula hospedeira são reconhecidos pelos IAVs para a sua ligação e entrada na célula durante o processo de replicação viral. Os receptores de ácido siálico são compostos por ácidos monossacarídeos com nove átomos de carbono normalmente encontrados nos terminais de muitos glicoconjugados. Esses receptores são ubíquos em muitos tipos de células e em muitas espécies de animais. O terminal do carbono-2 do ácido siálico pode se ligar ao átomo de carbono-3 ou de carbono-6 da galactose, formando as ligações  $\alpha$ -2,3 ou  $\alpha$ -2,6. Assim, a porção de ácido siálico é reconhecida e ligada pela cabeça globular da HA sobre a superfície do IAV, que têm uma especificidade preferencial ( $\alpha$ -2,3 ou  $\alpha$ -2,6).

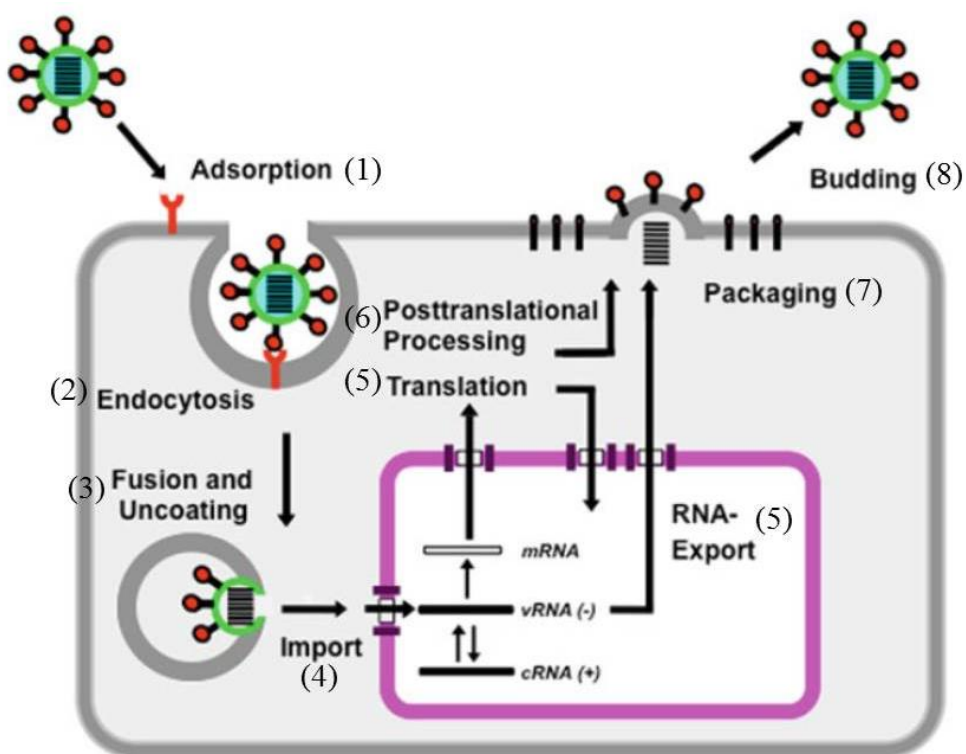
A partir da estrutura cristalografada, a molécula de HA, compreende um trímero com duas regiões estruturalmente diferentes: uma haste, compreendendo uma espiral enrolada de cadeia tripla da alfa-hélices, e uma cabeça globular com folhas-beta antiparalelas posicionada no topo da haste (WILSON; SKEHEL; WILEY, 1981). A cabeça globular contém os determinantes antigênicos variáveis de cada subtipo viral. Durante a replicação viral, a proteína HA é clivada por proteases celulares em subunidades HA1 e HA2. A porção HA1 possui especificidade para se ligar à célula do hospedeiro, enquanto que a porção HA2 tem a função de mediar a fusão do envelope do vírus com as membranas da célula do hospedeiro (STEINHAEUER, 1999).

Após a ligação da proteína HA do vírus no receptor de ácido siálico da célula hospedeira, ocorre a endocitose do vírus. Nesse momento, a acidez do compartimento endossomal é crucial para o desnudamento viral. Primeiramente, o pH baixo do endossomo desencadeia uma mudança conformacional da HA, expondo o peptídeo de fusão que media a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, abrindo um poro através do qual as proteínas do complexo polimerase, as RNPs virais, são liberadas para o citoplasma da célula hospedeira (SIECZKARSKI; WHITTAKER, 2005; SUN; WHITTAKER, 2013). Assim, os íons de hidrogênio do endossomo são bombeados para a partícula viral através dos canais de íons da proteína M2. A acidificação interna do virion via canal de íons da proteína M2 rompe as interações entre as proteínas internas permitindo que as RNPs virais sejam liberadas no citoplasma da célula (MARTIN; HELENIUS, 1991; YORK; FODOR, 2013). Quando as RNPs são liberadas do virion, elas trafegam em direção ao núcleo da célula hospedeira por meio de sinais de

localização nuclear de proteínas virais (Nuclear Localization Signals – NLS), que auxiliam o transporte dos RNPs e de outras proteínas virais até o núcleo da célula hospedeira (MARTIN; HELENIUS, 1991). No núcleo da célula é onde ocorre a síntese de RNA do vírus, tanto do RNAm que atua como molde para a tradução das proteínas virais, quanto dos segmentos de RNA viral (RNA<sub>v</sub>) que formam as cópias dos segmentos gênicos virais. A RNA polimerase viral dependente de RNA utiliza o sentido negativo do RNA<sub>v</sub> como molde para sintetizar duas espécies de RNA de sentido positivo: moldes de RNAm para a síntese de proteínas virais e de RNA complementar (cRNA) que intermedia a posterior transcrição das cópias de sentido negativo do RNA<sub>v</sub> genômico. A poliadenilação ocorre através da adição de um trecho de cinco a sete resíduos de uracila (U) codificado pelo RNA<sub>v</sub> de sentido negativo e transcrito no sentido positivo como uma sequência de adenosinas que formam a cauda poli-A (RESA-INFANTE et al., 2011). Além disso, é adicionada uma estrutura Cap 5' ao RNAm, em que as proteínas PB1 e PB2 capturam os iniciadores do Cap 5' dos transcritos de pré-RNA do hospedeiro. Uma vez que o RNAm foi poliadenilado e a estrutura Cap 5' adicionada, o RNAm viral pode ser exportado e traduzido como RNAm do hospedeiro. No entanto, a exportação nuclear de segmentos de RNA<sub>v</sub> é mediada pelas proteínas virais M1 e NEP/NS2 (CROS; PALESE, 2003). A proteína M1 interage tanto com o RNA<sub>v</sub> como com a NP, assim formando o complexo RNP; M1 também interage com a proteína de NEP para exportação nuclear para o citoplasma, através de nucleosporinas (O'NEILL et al., 1995; YORK; FODOR, 2013).

A síntese das proteínas de envelope HA, NA e M2 ocorre a partir do RNAm de origem viral em ribossomos ligados à membrana no retículo endoplasmático, onde eles são dobrados e transportados para o aparelho de Golgi onde ocorrem as modificações pós-traducionais. Apesar de ser pouco elucidada a tradução e triagem das outras proteínas, acredita-se que a M1 desempenhe um papel na interação entre o complexo RNP-NEP e as proteínas HA, NA e M2 ligadas ao envelope para o empacotamento viral na membrana celular do hospedeiro (LAMB; KRUG; KNIPE, 2001). Ao contrário do que se pensava sobre a montagem dos virions de forma aleatória, recentemente foi sugerido que a montagem dos virions é um processo seletivo, no qual sinais de montagem asseguram que todos os segmentos de RNA<sub>v</sub> sejam incorporados na maioria das partículas virais (BANCROFT; PARSLOW, 2002; DE WIT et al., 2006; HUTCHINSON et al., 2010).

Após o empacotamento dos virions, o vírus está pronto para ser liberado da célula, por brotamento. Assim, o brotamento ocorre na membrana celular, provavelmente iniciada por uma acumulação de proteínas da matriz M1 no lado citoplasmático da bicamada lipídica. Quando o brotamento é completado, a cabeça globular da HA liga-se aos receptores de ácido siálico na superfície das células até que as partículas de vírus sejam liberadas pela atividade da proteína NA. A proteína NA é um tetrâmero em forma de cogumelo, ancorado ao envelope viral por um domínio transmembrana (COLMAN; VARGHESE; LAVER, 1983) e possui a atividade de destruir o receptor celular, clivando os resíduos de ácido siálico para liberar a nova progênie de vírus da célula hospedeira (AIR, 2012; FANNING; REID; TAUBENBERGER, 2000). A NA também remove os resíduos de ácido siálico do próprio envelope do vírus, o que impede a agregação das partículas virais e aumenta a sua infectividade (ROSSMAN; LAMB, 2011).



**Figura 4. Ciclo de replicação do IAV.** (1) O virion liga-se ao receptor determinante da célula do hospedeiro. (2) O vírus entra na célula via endocitose. (3) Após a fusão viral, o genoma é liberado no citoplasma. (4) As RNPs são transportadas para dentro do núcleo onde ocorre a replicação e transcrição dos segmentos gênicos de RNA viral. (5, 6) Os RNAm são exportados para o citoplasma e traduzidos nas proteínas virais. (7) As proteínas virais são empacotadas e os virions montados. (8) As partículas virais são liberadas da célula por brotamento da superfície celular. Figura adaptada de ALLISON, 1975.

## 2.4 Transmissão e Patogenia

De acordo com a espécie, o IAV tem especificidade pelos receptores celulares. O trato respiratório superior humano possui receptores com ligações do tipo  $\alpha$ -2,6, enquanto que no trato intestinal das aves são encontrados os receptores do tipo  $\alpha$ -2,3 (ROGERS; PAULSON, 1983). Em humanos, o trato respiratório inferior também possui células epiteliais com receptores do tipo  $\alpha$ -2,3, no entanto, em menor quantidade (SHINYA et al., 2006). Assim, os humanos e outros primatas podem ser infectados por AIV, mas com menor eficiência (BEARE; WEBSTER, 1991; MALIK PEIRIS, 2009).

Como os suínos expressam ambos receptores  $\alpha$ -2,3 (aves) e  $\alpha$ -2,6 (humanos) nas células epiteliais do trato respiratório, podem se infectar tanto com vírus de origem humana quanto de origem aviária, possibilitando a troca de segmentos gênicos de vírus originários de espécies distintas, sendo denominados “*mixing vessels* - panela de mistura” (ITO et al., 1998). Os suínos são infectados por IAV pela inalação de aerossóis ou pelo contato direto ou indireto com animais ou secreções contaminadas. A infecção geralmente é limitada ao trato respiratório e a ocorrência de viremia é raramente detectada (SCHRAUWEN; FOUCHIER, 2014). A distribuição geográfica das cepas de IAVs em suínos provenientes da América do Norte, Europa e Ásia são geneticamente distintas devido às introduções independentes e manutenção de linhagens genômicas de origem aviária, humana e suína (MA et al., 2009; VAN REETH, 2007; VINCENT et al., 2008a). O suíno é considerado um grande reservatório de IAV do subtipo H1 com potencial para causar doença respiratória significativa em humanos, podendo também facilitar a adaptação dos IAV de origem aviária e a emergência de vírus recombinantes (GARTEN et al., 2009; INTELLI et al., 2009a).

Além dos suínos, as aves também podem ser grandes reservatórios de IAV, principalmente aves aquáticas que abrigam AIV de baixa patogenicidade (*Low Pathogenic Avian Influenza* – LPAI). Os AIV LPAI são capazes de se espalhar através da migração das aves. Patos e gansos domésticos servem como uma “ponte” para a transmissão de AIV para aves domésticas (HATCHETTE et al., 2004). Tanto as aves selvagens quanto as domésticas são hospedeiras de AIV que, na maioria das vezes, apresentam infecções assintomáticas, apesar da alta replicação viral. Os IAVs de origem aviária representam uma ameaça para a saúde humana. No entanto, os subtipos de AIV H5 e H7 são notáveis, pois eles evoluem em aves domésticas e tornam-se altamente patogênicos (*High Pathogenic Avian Influenza* – HPAI), causando uma doença severa em aves com alta mortalidade (DE JONG et al., 2006; NGUYEN-VAN-TAM et al.,



2006). O surto do H5N1 em aves domésticas, em 1997 em Hong Kong, resultou no primeiro caso de transmissão direta de vírus aviário para humanos (SNACKEN et al., 1999). Assim, desde 2003, o H5N1 HPAI espalhou-se pela Ásia, Rússia, Europa e África causando surtos expressivos em aves domésticas (OLSEN et al., 2006).

Os IAVs carregam traços genéticos responsáveis pelo aumento da gama de hospedeiros e virulência em mamíferos. Assim é importante identificar os traços genéticos e fenotípicos associados aos hospedeiros e virulência para estimar os riscos à população humana (SCHRAUWEN; FOUCHIER, 2014). No caso das aves, o fenótipo de alta patogenicidade dos vírus H5 e H7 é caracterizado pela introdução de sítios de clivagem na proteína HA (*Multibasic Cleavage Site - MBCS*) que estão diretamente associados com a alta letalidade de AIV em aves domésticas e como consequência disso o vírus replica de forma sistêmica nas aves. Um estudo que removeu os MBCS da HA de um vírus H5N1 HPAI, resultou em uma doença respiratória branda em camundongos, em contraste com a replicação sistêmica apresentada quando a proteína HA continha os MBCS, indicando que os MBCS foram os principais fatores de virulência neste experimento (HATTA et al., 2001). No entanto, H5N1 HPAI também pode causar doença grave e/ou fatal em uma ampla gama de espécies de mamíferos, mas a associação entre os MBCS da proteína HA e a replicação sistêmica do vírus é mais complexa para os IAV de mamíferos em comparação com os AIV, existindo outros fatores associados à virulência (SCHRAUWEN et al., 2011; SUGUITAN et al., 2012).

De acordo com alguns estudos de reconstrução do vírus H1N1 de 1918, baseados em arquivos de tecidos congelados, revelaram algumas propriedades patogênicas do vírus (GEISS et al., 2002; KOBASA et al., 2004; TAUBENBERGER et al., 2005; TUMPEY et al., 2005). O vírus completo H1N1 mostrou-se 100 vezes mais letal para camundongos do que um vírus H1N1 recombinante com as polimerases (PB1, PB2 e PA) do H3N2 humano (TUMPEY et al., 2005). Apenas 10 aminoácidos do H1N1 de 1918 do complexo da polimerase distinguiram-se do consenso do complexo polimerase de AIV. Dentre essas substituições, uma delas é no segmento da PB2 no aminoácido E627K (TAUBENBERGER et al., 2005). Este resíduo tem sido descrito como um determinante da patogenicidade dos vírus HPAI H5N1 e H7N7, podendo ter tido um papel na patogenicidade no vírus de 1918. Além disso, as glicoproteínas de superfície HA e NA também são importantes determinantes da patogenicidade do vírus de 1918, embora o mecanismo esteja pouco elucidado (KOBASA et al., 2004;

TUMPEY et al., 2005, 2007). Já a NA do vírus de 1918 é incomum em sua capacidade de facilitar a replicação do vírus, na ausência de tripsina em cultura dos tecidos (TUMPEY et al., 2005). O segmento NS1 do vírus 1918 é um inibidor potente da via do IFN-I, e pode ter sido um fator que contribuiu na patogenicidade (BASLER et al., 2001; GEISS et al., 2002).

Vários subtipos de IAV provenientes de animais reservatórios, como as aves, tem a habilidade de infectar o hospedeiro humano, mas a maioria desses vírus não tem a capacidade de transmissão via aerossóis entre humanos. Assim é importante elucidar os mecanismos que os IAV emergem e se adaptam aos hospedeiros e adquirem habilidade de transmissão por aerossóis entre humanos e outros mamíferos. Acreditava-se que os AIVs não pudessem causar diretamente uma nova pandemia de gripe, já que os suínos eram considerados um hospedeiro intermediário necessário para facilitar o rearranjo entre os IAV de origem aviária, suína e humana. Além disso, os suínos foram considerados como um hospedeiro mamífero crítico para a adaptação inicial dos IAVs. No entanto, como humanos podem se infectar com os IAVs de origem aviária, o papel dos suínos pode não ser único como “panela de mistura” para IAVs de origem humana e aviária (JACKSON et al., 2009). No entanto, mais recentemente, experimentos realizados em modelos de cobaias demonstrou que variantes do vírus H5N1 recombinante foram transmitidos através da via aérea entre essas cobaias (ZHANG et al., 2013). Este vírus H5 que apresentava dupla especificidade para os receptores de aves e humanos tinha necessariamente os genes PA e NS do vírus H1N1pdm09 para adquirir a transmissibilidade por aerossóis entre as cobaias. Além disso, os genes de NP, M e NA do H1N1pdm09 também foram importantes para aumentar a transmissibilidade pelo ar entre os mamíferos. No entanto, em outro estudo no qual utilizou um vírus recombinante natural com a proteína HA mutante de um vírus H5, com especificidade para o receptor do vírus humano H1N1pdm09, observou-se que não ocorreu transmissão por via aérea entre furões. Contudo, após a adição de mutações na proteína HA, o vírus recombinante foi transmitido entre furões (IMAI et al., 2012). Sendo assim, esses estudos demonstraram que é possível a transmissão pelo ar de vírus rearranjados entre IAVs humanos e aviários. Apesar do rearranjo de vírus aviários H5, H7 e H9 e IAV humanos contemporâneos ter baixa probabilidade de ocorrer em coinfeções, esses rearranjos podem possibilitar novas oportunidades de pandemias.

Um estudo demonstrou a avaliação da patogenicidade e transmissibilidade em furões, utilizando cepas IAV triplo-recombinantes de H1N3 e H3N2 de suínos coreanos

geneticamente relacionadas às cepas Norte Americanas em furões. A cepa de H1N2 desse estudo demonstrou-se altamente virulenta em furões e foi eficientemente transmitida por contato. Com isso, mutações na HA (Asp-225-Gly) e NA (Ser-315-Asn) foram encontradas nessa cepa, o que pode ser um indicativo de substituições que contribuiriam substancialmente para a virulência e transmissibilidade (PASCUA et al., 2012). Após a infecção experimental de suínos com o vírus H1N1pdm09 em um estudo de patogenia foi demonstrado uma excreção viral um dia após desafio e sintomas típicos de influenza, além disso foi transmitido para o suíno contato causando sintomas similares ao do suíno inoculado (LANGE et al., 2009a). Com a emergência dos SIVs H1N2 e H3N2v, salienta-se que as populações de suínos devem ser cuidadosamente monitoradas para o surgimento de cepas com potencial pandêmico.

## **2.5 Epidemiologia**

### **2.5.1 América do Norte**

O IAV causa uma doença respiratória zoonótica que representa uma ameaça à saúde e economia para os humanos e animais, sendo que os IAVs estão distribuídos mundialmente infectando uma ampla gama de espécies de mamíferos e aves. Anualmente ocorrem epidemias/epizootias em humanos e animais, e ocasionalmente pode ocorrer pandemias em humanos, dependendo da evolução molecular dos IAVs que dão origem as novas variantes antigênicas (VAN REETH, 2007). O SIV cH1N1 era considerado o principal subtipo causador de doença respiratória em suínos nos EUA. Nos anos 80, os SIVs estavam relativamente estáveis e controlados na indústria suína na América do Norte. No entanto, com a introdução do H3N2 contendo o TRIG, identificado em isolados de suínos na América do Norte em 1998, resultou em um aumento na taxa de mutações pontuais e recombinações, que permitiu a evolução dos SIV em diferentes grupos genéticos e antigênicos (VINCENT et al., 2009a). Uma vez estabelecido na população suína os SIVs do subtipo H3N2 que evoluíram através de mutação genética e rearranjo com o SIV cH1N1, deram origem a uma série de cepas recombinantes, incluindo os genótipos H3N2 (WEBBY et al., 2000, 2004), H1N2 (CHOI et al., 2002; KARASIN et al., 2002), H1N1 recombinantes (rH1N1) (WEBBY et al., 2004), e H3N1 (LEKCHAROENSUK et al., 2006; MA et al., 2006). Os SIVs H3N2, rH1N1, e H1N2 tornaram-se endêmicos e cocirculam na maioria das granjas produtoras de suínos nos EUA e Canadá (WEBBY et al., 2004). Além disso, introduções de cepas H1 humanas geneticamente e antigenicamente distintas da

linhagem H1 suína clássica foram identificadas em suínos no Canadá (KARASIN; CARMAN; OLSEN, 2006).

A partir disso, novos subtipos e variantes genéticos de SIV emergiram e dificultaram o controle da doença indicando que o vírus estava em constante evolução na América do Norte (VINCENT et al., 2008a). Os SIVs recombinantes que se tornaram endêmicos na população de suínos nos EUA têm sido caracterizados por conter a constelação de genes do TRIG com os genes PA e PB2 da linhagem aviária, os genes NS, NP, e M de linhagem suína clássica, e os genes HA, NA e PB1 da linhagem humana (ZHOU et al., 1999b). Com isso, os SIVs com a constelação de genes do TRIG podem “aceitar” vários segmentos de HA e NA, podendo ter uma vantagem seletiva por possuírem esta constelação de genes. Em contraste com o cH1N1, que se manteve relativamente estável antígenicamente por quase 80 anos (OLSEN et al., 1993), a aquisição dos genes PA e PB2 de origem aviária e PB1 humana nos SIVs atuais contendo o TRIG parecem ter aumentado a taxa de mutação e rearranjo gênico, e assim aumentando a capacidade do vírus de evadir ao sistema imune. Nos Estados Unidos, atualmente, os SIVs são considerados endêmicos nos suínos, tendo os subtipos H1N1, H3N2 e H1N2 como os mais prevalentes (VINCENT et al., 2009b), assim como as suas variantes, como o H3N2v que foi identificado recentemente na população suína (NELSON et al., 2012a).

Com a introdução do H1, contendo o gene HA de origem humana (*human-like* - H1) na constelação de genes do TRIG resultou em uma diversidade genética e antigênica ainda maior entre os SIVs H1 clássicos. Assim foi proposta uma classificação dos SIVs H1 americanos baseada na composição genética do gene HA por grupos (*clusters*)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  (VINCENT et al., 2009b). Vírus provenientes da linhagem do cH1N1 evoluíram ao longo do tempo gerando os clusters:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , enquanto que as cepas do subtipo H1-com genes mais semelhantes ao H1 humano sazonal, formou o cluster  $\delta$  (LORUSSO et al., 2011) (Figura 5). Em 2009, com a emergência da pandemia em humanos causada pelo vírus H1N1pdm09, contendo segmentos gênicos do TRIG norte americano de linhagem suína e os genes M e NA originários do SIV H1N1 *avian-like* da Eurásia, o papel do suíno foi ressaltado na evolução viral (GARTEN et al., 2009; SMITH et al., 2009b). Assim, foi testada a reatividade sorológica cruzada entre os isolados recentes de H1N1pdm09 e soros de suínos infectados com SIV entre 2007-2008 (cluster- $\gamma$ ) e foi demonstrada uma relação antigênica limitada (VINCENT et al., 2010a).

A influenza pandêmica de 2009 tornou-se conhecida como “influenza suína” devido à origem filogenética dos segmentos de genes. No entanto, desde o reconhecimento do surto causado pelo H1N1pdm09, a infecção em humanos não foi relacionada com exposição a suínos (INTELLI et al., 2009b). Mas o H1N1pdm09 demonstrou uma replicação eficiente no trato respiratório superior e inferior de suínos infectados e causou uma doença clínica comparável a doença tipicamente observada durante a infecção pelo vírus da influenza comum enzoótica em suínos (LANGE et al., 2009a). O H1N1pdm09 foi detectado em humanos, várias semanas antes do primeiro processo de zoonose inverso (transmissão de humano para suínos) relatado em um rebanho suíno canadense (HOWDEN et al., 2009). Os suínos demonstraram ser altamente suscetíveis a este vírus humano com segmentos de origem suína (HOFSHAGEN et al., 2009; LANGE et al., 2009b) causando surtos nesta espécie em diversos países (NELSON et al., 2012).

HA



**Figura 5. Análise filogenética dos SIV H1 isolados norte-americanos.** Análise HA e seus cinco clusters representados por: diamante aberto - H1 $\alpha$ , triângulo fechado -H1 $\beta$ , diamante fechado -H1 $\gamma$ , círculo fechado H1- $\delta$ 1 and  $\delta$ 2. O símbolo triângulo aberto representa o H1N1pdm09 e o  $\delta$ 1-H1N2 (human-like) como círculo fechado (destacados com a seta vermelha). O método utilizado na árvore filogenética foi neighbour-joining.

Continuação da legenda da Figura 5. A barra indica o número estimado de substituições de nucleotídeos por sítio. Figura adaptada de LORUSSO et al., 2011.

### 2.5.2 Europa

Na Europa, os SIVs H1N1 predominantes são inteiramente de origem aviária, introduzidos em suínos em 1979 a partir de aves aquáticas (PENSAERT et al., 1981). O H3N2 foi introduzido em suínos europeus logo após a pandemia de 1968 (Hong Kong) causada por um vírus H3N2 humano de Hong Kong em 1968, mas somente se disseminou em suínos depois que o vírus rearranjou com o vírus H1N1 no início de 1980 (CASTRUCCI et al., 1993; DE JONG et al., 1999). Essa cepa recombinante H3N2 *human-like* contém um dos genótipos mais comuns em suínos europeus. Além disso, outra cepa recombinante com o subtipo H1N2 foi detectada em 1994. Esse H1N2 *human-like* também exibe genes internos do vírus suíno H1N1, mas o gene HA foi adquirido do H1N1 humano a partir de 1980 (BROWN et al., 1998). Assim, as três principais linhagens de vírus compartilham genes internos comuns, mas possuem divergências genéticas e antigênicas (KYRIAKIS et al., 2011). Estes três SIVs têm co-circulado na população de suínos da Europa, mesmo que a prevalência e incidência de subtipos individuais variem de um país para outro (KYRIAKIS et al., 2011, 2013). Além disso, novos vírus recombinantes foram detectados desde 2000, com rearranjos entre estes três SIVs e IAVs humanos sazonais (KYRIAKIS et al., 2013; ZELL et al., 2008). Até a emergência do H1N1pdm09, a situação nos rebanhos suínos europeus era bastante estável.

A produção animal aumentou consideravelmente na Ásia devido à necessidade de alimentar a grande população asiática. Isso levou ao aumento do contato entre suínos e humanos e entre suínos e aves domésticas, assim como o contato com aves selvagens da Ásia. Devido à elevada densidade de produção animal bem como às práticas de manejo na China, podem ser encontrados diversos subtipos de IAV em suínos (GUAN et al., 1996; PENSAERT et al., 1981). Com isso, os suínos são considerados como um importante hospedeiro intermediário no processo de adaptação dos vírus aviários para hospedeiros mamíferos (SCHOLTISSEK et al., 1985; SCHULTZ et al., 1991).

### 2.5.3 Ásia

Os AIVs H5N1 HPAI e o H9N2 LPAI tornaram-se enzoóticos na Ásia e com transmissão para humanos (BEARE; WEBSTER, 1991; LIN et al., 2000; PEIRIS et al.,

2001). Apesar do cH1N1 ter sido isolado e identificado por volta de 1930 nos Estados Unidos (SHOPE, 1931), este foi isolado pela primeira vez na Ásia em 1974. A partir disso o vírus foi amplamente detectado em muitas regiões da Ásia. Em geral, o cH1N1 permaneceu geneticamente estável e mostrou menor diversidade antigênica nos países asiáticos. No entanto, um H1N2 recombinante causou um grande surto no sul do Japão de 1989 a 1990. Esse vírus continha o segmento da N2 originário de um vírus humano H3N2 e os outros segmentos eram remanescentes do vírus cH1N1 (SUGIMURA et al., 1980). Vírus recombinantes semelhantes também foram detectados em Hong Kong a partir de suínos provenientes da China entre 1999 e 2004 (VIJAYKRISHNA et al., 2011). O H3N2 parece ser o resultado de várias transmissões de vírus de humanos para suínos. Eles foram isolados pela primeira vez em suínos na Ásia em Taiwan, logo após a pandemia de Hong Kong. Variantes contemporâneas do H3N2 foram regularmente isoladas ou detectadas em suínos de países asiáticos (SHORTRIDGE et al., 1977; VIJAYKRISHNA et al., 2011). As primeiras duas variantes mais prevalentes do H3N2 foram A/Port Chalmers/1/73(H3N2) e A/Victoria/3/75(H3N2). A transmissão interespecie para suínos destes dois vírus ocorreu em muitos países asiáticos, incluindo a China, Coreia do Sul e Japão (SHORTRIDGE; WEBSTER, 1979; SONG et al., 2003; YU et al., 2008). Desde 2005, no entanto, as cepas de H3N2 foram detectadas em suínos, segundo o programa de vigilância de Hong Kong (VIJAYKRISHNA et al., 2011). Já as variantes de H3N2 humanos contemporâneos foram isoladas de suínos em toda a região (HAUSE et al., 2010; LEKCHAROENSUK et al., 2010; VIJAYKRISHNA et al., 2011). Desde a pandemia de 2009, IAV do tipo H1N1pdm09 (*pmd/09-like*) foi também isolados em suínos em muitos países asiáticos (SONG et al., 2010; VIJAYKRISHNA et al., 2010). A maioria destes isolados *pdm/09-like* resultaram de diferentes introduções diretas do vírus de humanos para suínos.

#### **2.5.4 América do Sul**

Na Colômbia, estudos indicaram que IAV foi primeiramente detectado em 1971 com uma prevalência de 14%, mas a cepa não foi definida. Em 2005, as cepas circulantes na Colômbia demonstraram reatividade com o subtipo H3N2 (CUCAITA et al., 2005). Além disso, mais recentemente estudos relataram uma evidência de 45% de prevalência de H3N2 das 71 granjas analisadas no estudo. E o vírus H1N1 foi encontrado em 3 das 71 granjas (4,23%) (MANCIPE, 2012). Após a pandemia de 2009 o vírus H1N1pdm09 foi detectado em granjas de suínos na Colômbia. Um estudo



sorológico conduzido no Chile, baseados em 11 companhias de produção de suínos com uma amostragem de 382 animais, revelou a prevalência SIV de 48% do subtipo H1N1 e 22% do subtipo H3N2 (RUIZ et al., 2011). O Chile foi o primeiro país da América do Sul a identificar o vírus H1N1pdm09 em perus, do qual foi reportado o primeiro caso de transmissão do vírus de aves para humanos, o primeiro caso detectado em outra espécie além de humanos e suínos (MORENO, 2010). Na América do Sul, o monitoramento de IAV foi conduzido pela Argentina entre os anos de 2008 e 2011. No final de 2008, um vírus H3N2 de origem humana foi isolado de suínos com sinais típicos de influenza na Argentina (CAPPUCCIO et al., 2011). Em 2009, infecção de H1N1pdm09 foi reportado em suínos (PEREDA et al., 2011) e entre 2010 e 2011 foi isolado um vírus rearranjado com os genes internos do H1N1pdm09 e os genes de superfície (HA e NA) provenientes de um vírus H1 humano. Isso demonstrou evidências indiretas da circulação de vírus H1 humano em suínos na Argentina (CAPPUCCIO et al., 2011).

No Brasil, em 1974, foi isolado o primeiro SIV de um suíno de três meses de idade proveniente de Minas Gerais (CUNHA RG, VINHA VR, 1978). Um estudo sorológico indicou a presença de anticorpos contra os subtipos H1N1 (2,2%) e H3N2 (16,7%) (BRENTANO et al., 2002) e quatro anos após, outro estudo determinou que uma prevalência de anticorpos ainda maioru contra o subtipo H1N1 (85,29%) e H3N2 (85,29%) (MANCINI; CUNHA; CASTRO, 2006). Outro estudo relatou que 46% das granjas de suínos do Estado do Paraná foram consideradas positivas, com 20% dos animais apresentando anticorpos para o subtipo H3N2 (CARON et al., 2010). A análise de 281 de secreção nasal de suínos coletados no período de 2005-2006, provenientes de 29 granjas do Estado de Santa Catarina revelou que somente 1,06% das amostras apresentaram positividade para SIV por RT-PCR (SCHAEFER; TREVISOL; PALUDO, 2008). Outro estudo realizado com a análise por inibição da Hemaglutinação (HI) de soros coletados de suínos no Brasil, antes e depois de 2009, demonstrou que antes da pandemia de 2009 não foram detectados anticorpos contra H1N1pdm09 em suínos (CIACCI-ZANELLA, 2011). O H1N1pdm09 foi isolado de um pulmão de suíno, confirmado pelo teste de hemaglutinação (título de HA de 128) e por RT-PCR. A análise das sequências de nucleotídeos dos genes da hemaglutinina (HA) e proteína da matriz (M) demonstrou que a cepa isolada era o H1N1pdm09, que circulou em humanos no mesmo período (SCHAEFER et al., 2011). No entanto, coincidindo com a pandemia de H1N1pdm09 em humanos, foram relatados no Brasil inúmeros surtos de infecção respiratória aguda em suínos de várias faixas etárias. Posteriormente, um estudo

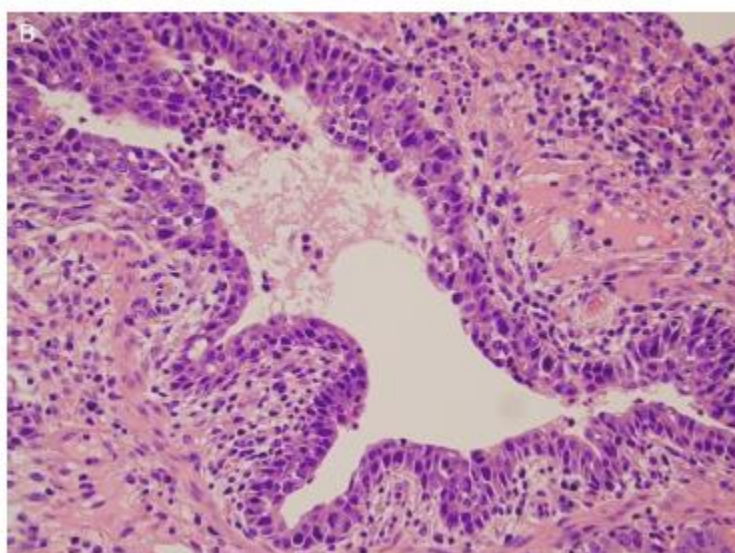
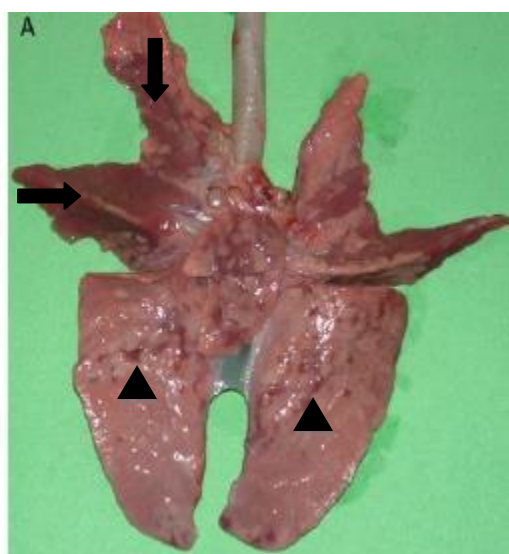
realizado a partir de 355 amostras de soro de suínos provenientes de 17 granjas de suínos do Estado de Minas Gerais analisou a presença de anticorpos contra IAV em soros de suínos utilizando o teste de HI para avaliar os subtipos mais prevalentes. O estudo revelou anticorpos contra os subtipos H1N1 suíno, H3N2 suíno e o H1N1 humano (RAJÃO et al., 2013a). Além disso, a caracterização filogenética realizada entre 2009 e 2010 demonstrou que o H1N1pdm09 era o vírus predominante no período analisado (RAJÃO et al., 2013b). Recentemente, foi detectado um novo vírus H1N1 recombinante em suínos detectado durante um surto de infecção respiratória aguda, após a pandemia de 2009. Os segmentos gênicos HA e NA eram de origem humana e os genes internos provenientes do H1N1pdm09, evidenciando que o rearranjo gênico está ocorrendo entre vírus endêmicos de suínos e o vírus H1N1pdm09 (SCHAEFER et al., 2015).

## **2.6 Sinais clínicos e patológicos**

Os sinais clínicos de influenza em suínos são semelhantes aos observados em humanos, sendo o suíno um modelo de hospedeiro natural importante para estudar a patogênese do IAV (SHOPE, 1931). Especificamente, os sinais clínicos típicos de infecção por IAV são febre alta (40°C) de curta duração, inapetência, letargia, tosse, espirro, dispneia, conjuntivite e secreção nasal (ALEXANDER; BROWN, 2000; RICHT et al., 2003). Apesar dos sinais clínicos e lesões apresentarem geralmente uma regressão rápida, ocasionalmente pode ocorrer casos de pneumonia severa podendo ser fatal. Enquanto a doença em suínos adultos é geralmente caracterizada por um quadro febril auto-limitado e com alta morbidade (100%) em leitões podendo causar redução do crescimento e aumentar a taxa de mortalidade. A gravidade da infecção varia de acordo com a cepa viral, idade do animal, condição imunológica e presença de infecções concomitantes. O período de incubação da doença é curto (entre 1 e 3 dias) com recuperação rápida entre 4-7 dias após o início da infecção (BROWN, 2000; DEA et al., 1992; HAESEBROUCK; PENSAERT, 1986).

As lesões macroscópicas causadas por SIV são caracterizadas pela consolidação pulmonar multifocal de coloração vermelho-púrpura, predominantemente nas porções crânio-ventrais dos pulmões (Figura 6A). As lesões microscópicas são caracterizadas por alterações no pulmão que consistem em necrose das células epiteliais bronquiais e bronquiolares, com descamação destas células para o lúmen das vias aéreas, que muitas vezes contém detritos celulares, fluido protéico e alguns leucócitos (Figura 6B). A

necrose é acompanhada por infiltração linfocítica peribronquiolar e pneumonia intersticial de gravidade variável (DEA et al., 1992; HAESEBROUCK; PENSAERT, 1986). Em animais em recuperação, o epitélio bronquiolar torna-se proliferativo e com acúmulo de linfócitos mais proeminente. A influenza faz parte do complexo de doença respiratória dos suínos (PRDC), atuando em conjunto com outros patógenos, tais como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, *Pasteurella multocida*, vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV) e circovírus suíno do tipo 2 (PCV-2) (ELLIS et al., 2004; THACKER; THACKER; JANKE, 2001).



**Figura 6. Lesões macroscópicas e microscópicas de pneumonia típicas de SIV.** (A) Lesões macroscópicas de pneumonia caracterizadas por consolidação pulmonar vermelho-púrpura focalmente extensivas nos lobos craniais e mediais (seta) e multifocais nos lobos caudais e acessórios do pulmão (cabeça da seta). (B) Broquiolite necrozante em um suíno após três dias de infecção com SIV. Proliferação de células epiteliais com descamação destas células para o lúmen das vias respiratórias, que

contém restos celulares, fluido protéico e alguns leucócitos. Figura adaptada de VINCENT et al., 2008a.

## 2.7 Imunidade

O principal alvo do IAV são as células epiteliais do trato respiratório. Com isso, o controle e eliminação do vírus pela imunidade inata e adaptativa pode ser acompanhada por reações inflamatórias no trato respiratório infectado. A recuperação da infecção por IAV requer que estas respostas inflamatórias sejam bem controladas para minimizar a imunopatologia no pulmão no processo de eliminação viral. Assim vários mecanismos do sistema imunológico auxiliam a controlar essas respostas inflamatórias durante a infecção por IAV.

A imunidade inata forma a primeira linha de defesa contra a infecção por IAV, sendo constituída por diversos componentes, tais como muco, colectinas e proteínas de fase aguda, que desempenham o papel de prevenir a infecção das células epiteliais do trato respiratório do hospedeiro (BARBÉ; ATANASOVA; VAN REETH, 2011; VAN REETH; NAUWYNCK, 2000). Portanto, células da imunidade inata como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (DC) e as células assassinas naturais (*Natural Killer – NK*) são recrutadas com o objetivo de controlar a replicação viral, a disseminação viral e também auxiliam a orquestrar a resposta imune (CROUSE et al., 2015). Portanto, as DC e macrófagos localizadas no trato respiratório são também infectadas pelo IAV e desempenham um papel importante na resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. Estas células secretam mediadores químicos, tais como citocinas que podem ativar as células de linfócitos T (LT) e induzir sua diferenciação em células de memória ou induzir uma resposta adaptativa mediada por anticorpos e por LT (CRISCI et al., 2013; WAGGONER et al., 2011).

O IAV é reconhecido por receptores celulares que reconhecem *motifs* específicos dos vírus, como os receptores RIG-I RNA helicase, MDA-5 e proteínas sinalizadoras *toll-like receptors* (TLR3 e TLR7) (BOWIE; FITZGERALD, 2007). As células NK apresentam potente atividade citotóxica e produção de citocinas, podendo reconhecer as células infectadas com IAV ligadas a anticorpos e lisar essas células pelo processo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (*antibody dependent cell cytotoxicity – ADCC*) (MANDELBOIM et al., 2001). Anticorpos produzidos contra o IAV podem mediar uma gama de funções não neutralizantes, incluindo a lise celular mediada pela ativação do complemento (O'BRIEN et al., 2011), fagocitose (HUBER et al., 2001) e

ADCC (JEGASKANDA et al., 2013). ADCC é iniciada pelos anticorpos IgG ligados aos antígenos na superfície das células-alvo. As células efetoras (NK, neutrófilos e monócitos), que em humanos expressam o receptor CD16 (FcγRIIIa), são capazes de se ligar à região Fc do anticorpo ligado à superfície da célula (TAMM; SCHMIDT, 1997). Essa ligação resulta na liberação de granzima B e perforinas para destruição da célula infectada. Além disso, essa ligação do receptor Fc na célula efetora pode resultar na secreção de citocinas antivirais e quimiocinas, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e quimiocinas- $\beta$ , das quais tem importantes propriedades antivirais e imunopatológicas (JEGASKANDA et al., 2013).

Os interferons (IFN) constituem uma classe de citocinas conservadas evolutivamente que possuem várias funções fisiopatológicas, principalmente pela notável atividade antiviral. Os IFNs são agrupados em dois tipos principais: o tipo I e tipo II. O IFN-I é produzido pelas células em resposta direta à infecção viral, responsável pelas atividades antivirais e o IFN-II ou IFN- $\gamma$  é produzido após estimulação mitogênica de linfócitos T e células NK. Muitos destes receptores possuem vias que convergem para o aumento da expressão ‘*upregulation*’ de IFN- $\alpha/\beta$ , que compartilham o mesmo receptor celular e, por sua vez, sinalizam para outras células para a produção de citocinas e quimiocinas. Além disso, a presença de IFN-I aumenta a produção de proteínas antivirais no hospedeiro para a eliminação do vírus (VAN REETH; NAUWYNCK, 2000).

Os genes *Interferon-stimulated* (ISGs) codificam uma gama de proteínas com diversos efeitos biológicos que possuem a capacidade de bloquear o ciclo de replicação viral, a entrada do vírus na célula, tradução de proteínas e montagem de novas partículas virais. Assim, os ISGs têm funções imunomoduladoras, incluindo efeitos no recrutamento de leucócitos e ativação da imunidade adaptativa. A produção do IFN-I é induzida por enzimas que ativam a cascata do IFN-I, como a proteína quinase ativada por RNA - PKR, o sistema ribonuclease L e oligoadenilato sintetase OAS/RNase L e a proteína do Mixoma 1 Mx-1 (HALLER; KOCHS; WEBER, 2007). Muitos desses fatores são componentes de uma resposta antiviral ampla induzida pelos ISGs. No entanto, muitos patógenos, incluindo o IAV, evoluíram de modo a interferir na cascata de sinalização do IFN  $\alpha/\beta$ , como parte de seus mecanismos de escape ao sistema imune. No caso do IAV, a proteína NS-1 apresenta propriedades antagonistas que bloqueiam a via PKR (BERGMANN et al., 2000) e assim inibe a síntese de IFN- $\alpha/\beta$  (GARCÍA et al., 2006). No entanto, algumas proteínas da família de proteínas transmembranas

indutoras de IFN (*IFN-induced Transmembrane protein - IFITM*), as quais tem sua expressão ubíqua nas células epiteliais e atuam como a primeira linha de defesa antiviral da célula do hospedeiro, principalmente a proteína IFITM3, demonstrou ter efeitos antivirais contra o IAV (BRASS et al., 2009; DIAMOND; FARZAN, 2013). As proteínas IFITMs restringem a infecção viral pela interferência na entrada do vírus na célula hospedeira. Estudos demonstraram que o a IFITM3 restringe o vírus nos compartimentos do endossomo bloqueando a formação do poro da membrana de fusão, afetando os próximos passos da replicação viral (LI et al., 2013; SMITH et al., 2014). Esse mecanismo pode contribuir para a diminuição da severidade da doença limitando a morbidade e mortalidade por IAV (BAILEY et al., 2012; EVERITT et al., 2012). Também foram identificados transcritos dos genes IFITM em linfonodos traqueobronqueais de suínos infectados com SIV (MILLER et al., 2014), atuando na inibição da replicação de SIV (LANZ et al., 2014).

A infecção por IAV induz uma produção de citocinas abundante tanto em humanos como em suínos. Após a infecção por IAV, os macrófagos são ativados e fagocitam as células infectadas para limitar a propagação viral (KIM et al., 2008). Além disso, estudos demonstraram que as citocinas pro-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  são induzidas pelos macrófagos alveolares, sendo que a citocina TNF- $\alpha$  foi detectada em maiores níveis (SEO; WEBBY; WEBSTER, 2004). Um estudo de infecção experimental com cepas representativas de SIV H1N1, H1N2 e H3N2, com inoculação intratraqueal em suínos sorologicamente negativos para SIV, demonstraram significativa correlação entre os sinais clínicos e os níveis de citocinas pro-inflamatórias IFN- $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 no fluido de lavagem bronco-alveolar (BALF) (VAN REETH; VAN GUCHT; PENSAERT, 2002). Semelhantes aos humanos, as citocinas IFN- $\alpha$  e IL-6 foram produzidas mais abundantemente, seguido da infecção viral, e seus níveis foram fortemente correlacionados com a replicação do vírus nos pulmões e os sinais clínicos da doença (VAN REETH; VAN GUCHT; PENSAERT, 2002). Um estudo de infecção por SIV em modelo experimental de suínos demonstrou que os títulos virais no BALF foram fortemente correlacionados com as citocinas IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12 no pulmão bem como IL-6, IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no soro, associando essas citocinas à infecção aguda por SIV (BARBÉ; ATANASOVA; VAN REETH, 2011). As citocinas pro-inflamatórias têm seu papel no recrutamento de neutrófilos para os pulmões para a fagocitose do vírus. No entanto, a liberação de

enzimas pelo neutrófilo pode ter uma importante contribuição na patologia nos pulmões (PATTON et al., 1995).

As células dendríticas e macrófagos também saem do trato respiratório via linfa aferente para os nódulos linfáticos regionais ou através do sangue para o baço, para sinalizar a presença do vírus aos linfócitos B (LB) e LT. Assim essas subpopulações de células são estimuladas para a produção de anticorpos (imunoglobulinas – Ig) que atingem a circulação sanguínea e mucosa. Apesar dos títulos de anticorpos diminuírem com o tempo, as populações de células de memória (LB e LT) são mantidas nos tecidos linfóides. A resposta imune humoral desempenha um papel significativo na neutralização viral e prevenção da doença causada por IAV, como foi mostrado pela capacidade protetora do colostro (RENEGAR; SMALL, 1991) e vacinas inativadas (BIKOUR; CORNAGLIA; ELAZHARY, 1996). As respostas de anticorpos desenvolvem-se principalmente contra as proteínas virais HA, NA, M e NP. No entanto, apenas anticorpos contra a glicoproteína de superfície do vírus mais variável, a HA, podem bloquear a ligação do vírus aos receptores da célula hospedeira e, assim, neutralizar a infecção viral (WEBSTER et al., 1992).

Anticorpos neutralizantes podem ser medidos pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI) ou pelo ensaio de vírus-neutralização (VN). Assim a proteção clínica contra IAV está diretamente correlacionada com o título de inibição da hemaglutinação (HI) no soro de um animal individual, ou seja, um elevado título de HI (anticorpos neutralizantes) fornece melhor proteção contra o desafio do que um título de HI baixo (KYRIAKIS et al., 2010; VINCENT et al., 2008a). Esta informação conduziu à sugestão de que a presença e a magnitude de um título de HI pode predizer a proteção. No entanto, isso só parece válido quando a indução de anticorpos neutralizantes contra a proteína HA do antígeno primário for antigenicamente relacionado à HA do vírus do desafio (PLATT et al., 2011b; VINCENT et al., 2008b). Anticorpos neutralizantes, principalmente contra proteína HA, são claramente o principal fator de contribuição para proteção homosubtípica, assim as proteínas de superfície do vírus, HA e NA, são os principais alvos da vacinação contra a gripe.

Os anticorpos específicos contra a proteína NA também têm mostrado reduzir os títulos virais, a morbidade e disseminação do vírus (FANNING; REID; TAUBENBERGER, 2000). Já o papel dos anticorpos contra a NP e M ainda não estão bem elucidados, mas estudos demonstraram que anticorpos anti-NP e anti-M podem contribuir para a eliminação de células infectadas através do processo de ADCC, mas

não podem impedir a infecção (LAMERE et al., 2012). A resposta de anticorpos baseada na imunoglobulina A (IgA) está correlacionada com proteção contra IAV na mucosa, ou seja, no trato respiratório (CLEMENTS et al., 1986; TAMURA et al., 1990). Os anticorpos no soro são predominantemente do tipo IgM e IgG, enquanto que a IgA foi o principal isotipo encontrado em lavagens nasais e BALF (GAUGER et al., 2011; HEINEN; BOER-LUIJTZE; BIANCHI, 2001; PLATT et al., 2011a). Além disso, níveis substanciais de IgA também foram encontrados em BALF e em lisados pulmonares de suínos infectados por SIV (KHATRI et al., 2010; LARSEN et al., 2000) sugerindo que os anticorpos também podem ser produzidos localmente no parênquima pulmão. Títulos de anticorpos podem ser detectados no soro 7-10 dias após a infecção com pico em 2 a 3 semanas após infecção (HEINEN et al., 2000; LARSEN et al., 2000; VAN REETH; LABARQUE; PENSAERT, 2006). Já os anticorpos no soro contra NA, NP (HEINEN; BOER-LUIJTZE; BIANCHI, 2001), M1 e M2 podem ser detectados no soro em títulos mais baixos (KITIKOON; STRAIT; THACKER, 2008). Além disso, os anticorpos contra NP também foram encontrados em secreções nasais e fluidos orais (HEINEN et al., 2000; PANYASING et al., 2013, 2014). A resposta de anticorpos específicos exerce uma pressão seletiva sobre os IAVs circulantes e propicia a emergência de novos subtipos com variabilidade antigênica, especialmente na molécula HA. Essa deriva antigênica impõe uma atualização regular das vacinas contra a gripe sazonal.

Os LT são classificados em auxiliares (*helper - LTh*)  $CD4^+$ , que ajudam na resposta dos LB para a produção de anticorpos, ou na resposta dos LT citotóxicos (*citotoxic - LTc*)  $CD8^+$ , que contribuem para a eliminação do vírus nos pulmões. Após a infecção por IAV, as células apresentadoras de antígeno, principalmente as DC  $CD103^+$  presentes no pulmão, migram para os linfonodos e apresentam o antígeno para os LT *naive*  $CD4^+$  e  $CD8^+$  para a sua subsequente ativação, diferenciação e atividade efetora no pulmão. Estudos demonstraram que, para promover a proliferação e sobrevivência das células de memória LT  $CD8^+$  vírus-específicas no pulmão, é importante a interação com as DCs e a co-estimulação com dos LT  $CD28^+$  (DOLFI et al., 2011; MCGILL; VAN ROOIJEN; LEGGE, 2008, 2010). Após a migração das células efetoras LT  $CD8^+$  para o pulmão, citocinas regulatórias como IL-10 são ativadas para diminuição da inflamação nos pulmões e eliminação do vírus (SUN et al., 2009). As células efetoras  $CD8^+$  também expressam citocinas antivirais e quimiocinas que podem atrair células da imunidade inata e adaptativa com o objetivo de facilitar a eliminação viral. Um estudo sugeriu que essas células LT  $CD8^+$  efetoras podem usar mecanismos efetores múltiplos



redundantes, incluindo a morte da célula-alvo por perforinas e produção de citocina e quimiocinas efetoras para proteger o hospedeiro contra a infecção por IAV (HAMADA et al., 2013). Além de fornecer sinalização para a proliferação e sobrevivência das células LT CD8<sup>+</sup> efetoras, as células apresentadoras de antígenos também produzem citocinas que direcionam a diferenciação dessas células efetoras no pulmão (SUN et al., 2009). A resposta dos LT CD8<sup>+</sup> é principalmente direcionada aos epitópos da NP do vírus, que é relativamente conservada entre os IAVs (BUI et al., 2007). Com isso, podem apresentar reatividade cruzada com uma variedade antigênica de subtipos de IAV e, portanto, contribuir para a imunidade heterosubtípica (GREBE; YEWDELL; BENNINK, 2008; QUAN et al., 2008). Atualmente, alvos virais que induzem a imunidade heterosubtípica têm sido estudados e identificados com o objetivo de desenvolver vacinas de ampla proteção (NABEL; FAUCI, 2010; QUIÑONES-PARRA et al., 2014). A resposta de LT CD4<sup>+</sup> também está envolvida na recuperação da infecção por IAV, promovendo a produção de anticorpos pelos LB e citocinas como IL-2 na sinalização para os LT CD8<sup>+</sup> efetores para a produção de IL-10 (SUN et al., 2011). Um estudo identificou que os LT CD4<sup>+</sup> IAV-específicos induzem a expressão de moléculas como granzimas B e perforinas, sugerindo que o micro-ambiente do pulmão promove a geração dessas células LT CD4<sup>+</sup> citotóxicas. Essas células expressam a assinatura Th1 e citocina IFN- $\gamma$ , fornecendo proteção contra a infecção por IAV (BROWN et al., 2012). Portanto, as células LT CD4<sup>+</sup> são capazes de proteger contra a infecção por IAV através de múltiplos mecanismos, atuando de maneira sinérgica, tanto de forma direta com a atividade efetora citolítica dependente, como de forma indireta sinalizando para outras células do sistema imune para auxiliar na eliminação da infecção viral.

## 2.8 Diagnóstico

Os achados clínico-patológicos de pneumonia causados por influenza em suínos não são confirmatórios da doença, como influenza faz parte do PRDC é necessária a confirmação do patógeno por métodos de diagnóstico laboratorial. Assim, para definir o diagnóstico do SIV é necessária a análise laboratorial de acordo com a amostra coletada do suíno. Os testes laboratoriais comumente utilizados para o diagnóstico de SIV são o isolamento viral para a detecção do agente, testes moleculares para a detecção de material genético viral, testes sorológicos para a detecção de anticorpos, análise histopatológica e imunohistoquímica para a identificação de lesões microscópicas e detecção do antígeno viral no tecido infectado. A imuno-histoquímica (IHQ) e

imunofluorescência (IFA) são utilizadas para detecção do IAV em tecidos (pulmão e traquéia) congelados ou fixados com formalina, utilizando diferentes anticorpos para a detecção do antígeno (GUARNER et al., 2000; LAROCHELLE; SAUVAGEAU; MAGAR, 1994). A coleta de amostras na fase aguda da doença é importante para realização do isolamento em cultivo celular ou em ovos embrionados, a partir de amostras biológicas como suabe nasal, BALF e tecido de pulmões com lesões de IAV.

O isolamento viral (VI) é utilizado para a multiplicação e identificação de vírus a partir de secreção nasal, fluido oral ou pulmão (CHRISTOPHER-HENNINGS et al. 2012). Assim, o isolamento viral é amplamente utilizado para identificação do vírus a partir de secreção nasal, fluido oral ou pulmão. O isolamento viral pode ser realizado em ovo embrionado ou em cultivo celular com células de rim canino (*Madin-Darby Canine kidney cells - MDCK*). Essa amplificação das partículas virais facilita a tipificação por testes moleculares como RT-PCR (ALVAREZ et al., 2008; JINDAL et al., 2009; SPACKMAN; SUAREZ, 2008) e para o sequenciamento dos segmentos gênicos do vírus (CHANDER et al., 2010).

As provas sorológicas são cruciais para o diagnóstico de IAV, pois auxiliam no diagnóstico da doença clínica, na avaliação do perfil imunológico do rebanho para calendário de vacinação, estudos sobre a eficácia da vacina e estudos epidemiológicos com base em soroprevalência. Por isso recomenda-se que as amostras de soro de suínos sejam coletadas no momento da infecção e 3-4 semanas após o aparecimento dos sinais clínicos para comparar a fase aguda da doença e a resposta quando os suínos estão convalescentes (ROSSOW et al., 2003). Os testes sorológicos utilizados para detecção de anticorpos contra o IAV são os testes de HI, VN e ELISA. Os alvos mais utilizados em testes sorológicos para IAV são os anticorpos contra a proteína NP que podem ser utilizados para detecção de todos os subtipos de IAV, devido ao seu genoma conservado entre os subtipos virais. Já a proteína HA é mais subtipo específica, sendo utilizada para diferenciar os subtipos de IAV. O teste de HI e a VN são os ensaios sorológicos mais utilizados para a detecção de anticorpos neutralizantes contra o vírus, sendo o teste de HI o padrão ouro para o IAV. Como o IAV tem propriedade hemaglutinante da HA, a reação de aglutinação ocorre entre o vírus e os eritrócitos provenientes de um hospedeiro heterólogo, como cobaio. No entanto, se o suíno for soropositivo para IAV, vai causar a inibição dessa reação de aglutinação. A diluição seriada de base 2 do soro do animal é preparada em microplacas de 96 poços com fundo em formato de “U” ou “V”, seguido da adição de 4-8 unidades hemaglutinantes (HAU) de um único subtipo de

influenza (PEDERSEN, 2008a). Títulos de HI superiores ou iguais a 40 são considerados protetivos (HANCOCK et al., 2009). Recentemente, a técnica de aglutinação em látex foi estabelecida para detecção de anticorpos contra SIV, sendo um teste rápido e barato (ZHANG et al., 2014). Já o teste de VN necessita de células de cultivo para sua realização e o soro do animal também é diluído serialmente na base 2 para a detecção de um subtipo específico de IAV. Anticorpos neutralizantes no soro bloqueiam a infecção viral, prevenindo o efeito citopático nas células. O ensaio de inibição da neuraminidase (NI) também é utilizado para a tipificação do vírus. O ensaio NI utiliza o vírus cultivado entre 4 e 32 HAU, dependendo da concentração do vírus. Além disso inclui um painel de anti-soros previamente padronizados (N1-N9). Os ácidos utilizados no teste revela uma cor escura quando não há inibição da NA e, quando houver inibição, a coloração do resultado é clara (PEDERSEN, 2008b). Uma das vantagens desses testes é que demonstram a atividade biológica dos anticorpos presentes no soro e podem ser utilizados para tipificação do vírus. Algumas das desvantagens dos ensaios descritos são que dependem de reagentes biológicos não padronizados, como hemácias no caso do HI, o teste de VN depende de cultivo celular, pode demorar até 72 horas para a obtenção do resultado, e o teste de NI necessita de um painel de anti-soros padronizado, que pode ser um fator limitante para a realização do ensaio.

Existem testes de ELISAs comerciais para detecção de IAV em suínos e outras espécies. O teste de ELISA comercial para SIV H1N1 utiliza um antígeno preparado a partir do cH1N1 e, portanto, tem um alcance de detecção limitado a subtipos H1 de suínos. Embora o ensaio com H1N1 não seja o ideal para detectar outros subtipos de SIV, pode ter reação cruzada com H3N2 devido alguns epítomos comuns entre H1N1 e H3N2. Além disso, esse teste não tem detectado animais com infecções recentes (YOON et al., 2004). Já o teste de ELISA para o subtipo H3N2 foi desenvolvido a partir de uma cepa do *cluster* I levando a menor reatividade com o vírus H3N2 de *cluster* IV (YOON et al., 2004). O ELISA comercial Avian Influenza multispecies ELISA (AI-MS ELISA, FlockChek<sup>TM</sup>, Idexx, Westbrook, ME) foi desenvolvido para detectar anticorpos contra o AIV em amostras de soro. Esse teste foi estabelecido com um epitopo altamente conservado entre os subtipos de IAV, da proteína NP para *screening* de AIV em aves. Posteriormente, esse teste comercial foi validado para amostras de soro de suínos, a partir de suínos infectados experimentalmente com diferentes subtipos: H1N1, H1N2, H2N3, H3N2 para avaliar o desempenho do teste, o qual demonstrou ter

uma boa sensibilidade na detecção de anticorpos contra esses subtipos (CIACCI-ZANELLA et al., 2010). O fluido oral (saliva e transudato mucoso oral) tem sido recentemente utilizado para detecção de anticorpos e agentes infecciosos na suinocultura (PRICKETT; ZIMMERMAN, 2010). Uma das vantagens da coleta do fluido oral é que não é um método invasivo e é prático, uma vez que o suíno morde facilmente cordas de algodão, das quais o fluido oral será depositado e utilizado para a colheita da amostra por grupo de suínos. Mesmo o fluido oral sendo coletado por grupos de suínos foi considerado um método sensível para a detecção do vírus (DETMER et al., 2011). Além disso, pode ser detectado níveis de anticorpos em fluido oral de suínos, como o teste de ELISA utilizado para detecção de imunoglobulinas anti-NP (PANYASING et al., 2013, 2014).

## 2.9 Vacinas

As vacinas comercialmente disponíveis contra SIV utilizadas nos Estados Unidos e Europa são compostas pelo vírus inteiro inativado (*whole inactivated virus – WIV*), onde as cepas virais são produzidas em ovos embrionados ou em cultivo celular são inativadas e acrescidas de adjuvante baseado em óleo em água (*oil in water - OW*). As principais cepas de SIV que compõem as vacinas inativadas são baseadas nos subtipos H1N1 e/ou H3N2 e/ou H1N2. Devido às diferenças antigênicas e genéticas entre os SIVs de cada continente, as vacinas são produzidas e utilizadas localmente contendo as cepas de seu país/continente (VAN REETH; VAN GUCHT; PENSAERT, 2003; VINCENT et al., 2008b). Geralmente, essas vacinas inativadas são administradas em duas doses com um intervalo de 2 a 4 semanas entre as doses. O calendário vacinal pode variar mas, geralmente, as leitoas são vacinadas duas vezes antes da primeira cobertura e as porcas são vacinadas trimestralmente antes da parição. Já os leitões são vacinados geralmente após 12 a 16 semanas de idade para evitar a interferência de anticorpos maternos (*maternally derived antibodies – MDA*) (KITIKOON et al., 2006).

O uso de vacina autógena contra o SIV tem aumentado devido à diversidade das cepas que circulam na população de suínos dos EUA (USDA, 1995) e também devido à dificuldade da indústria de imunobiológicos para alterar a composição da vacina tão rapidamente quanto o vírus evolui. No entanto, as vacinas autógenas preparadas a partir de culturas de vírus que foram inativadas podem ser utilizadas somente no rebanho de origem, sob a supervisão de um veterinário. Ao contrário de vacinas humanas, as vacinas de influenza para suínos, não existe um sistema formal para recomendar cepas

para a formulação da vacina e, assim, as atualizações e seleção de novas cepas complica a produção e, conseqüentemente, a eficiência das vacinas.

Nos EUA, de acordo com cada vacina comercial, a composição de cepas virais varia, no entanto os principais subtipos de SIV nas vacinas são: H3N2 e H1N1 de diferentes *clusters*. Além disso, existe uma vacina monovalente para o H1N1pdm09 e uma quadrivalente contendo adicionalmente o H1N2. E as vacinas contra SIV da Europa também contêm os subtipos H3N2, H1N1, e uma das formulações contém adicionalmente a cepa H1N2, no entanto, essas cepas diferem antigenicamente e geneticamente das cepas americanas. Em estudos de eficácia de vacinas comerciais, o desafio em suínos é geralmente realizado com a inoculação do vírus via intranasal e/ou intratraqueal 14 dias após a segunda dose vacinal. Na maioria dos estudos, os suínos são eutanasiados cinco dias após o desafio. Com isso, são investigados os sinais clínicos, títulos virais nos pulmões e vias nasais para análise da excreção viral assim como a resposta imune vacinal.

Devido à ampla variabilidade antigênica entre as linhagens de SIV H1 e H3 e na Europa e na América do Norte, não se sabe o quanto de diversidade antigênica é necessária para recomendar uma nova cepa na vacina. Assim, a eficácia das vacinas contra SIV pode ser limitada quando o vírus do desafio for heterólogo aos vírus da vacina (VINCENT et al., 2010b). A eficácia de uma vacina comercial baseada nas cepas A/swine/New Jersey/8/76 (H1N1) e A/swine/Port Chalmers/1/73 (H3N2) foi testada com um desafio heterólogo, o SIV do subtipo H1N2 em suínos. Nesse estudo a vacina não induziu título de anticorpos neutralizantes adequado para proteção completa contra o vírus heterólogo H1N2 europeu (VAN REETH; VAN GUCHT; PENSAERT, 2003). Outro estudo avaliou a imunogenicidade e eficácia de 4 vacinas comerciais contra o desafio com uma cepa de H1N1-*avian like* recente na Europa. As cepas vacinais utilizadas nesse estudo apresentavam uma similaridade genética da proteína HA entre 77 a 95% em relação à cepa do desafio. Duas destas vacinas formuladas com um adjuvante O/W e contendo cepas de 93 e 89% de similaridade com o vírus do desafio induziram uma resposta imune protetora. No entanto, a outra vacina que continha uma cepa com alta similaridade (95%) com a cepa do desafio, mas foi formulada com um adjuvante à base de cabômero não ofereceu uma resposta imune protetora completa (KYRIAKIS et al., 2010). Esse estudo ressaltou que somente o grau de similaridade entre a cepa vacinal e a cepa do desafio não é o único fator que determina a eficácia da

vacina inativada, ou seja, também se destaca a importância de outros fatores como o papel do adjuvante na indução da resposta imune.

Outras plataformas vacinais têm sido desenvolvidas visando o aumento das mesmas frente aos diferentes subtipos de SIV, a fim de gerar uma vacina com ampla proteção. Um estudo contendo as proteínas M2 e NP fusionadas como vacina foi utilizada para imunizar suínos, seguido de um desafio. Como resultado, a vacina induziu resposta imune, mas os animais não apresentaram redução da excreção viral e os sinais clínicos foram mais severos do que o grupo controle de animais não-vacinados (HEINEN et al., 2002). Outra vacina experimental baseada na M2 sozinha ou em combinação com uma vacina inativada contendo H1N1 foi utilizada para imunização de suínos, seguido do desafio com uma cepa heteróloga H1N2. Animais vacinados com a vacina inativada contendo o H1N1 combinada com a M2 apresentaram maior proteção em relação aos vacinados com a proteína M2 sozinha (KITIKOON et al., 2009), destacando a importância das proteínas de superfície (HA) na indução de anticorpos neutralizantes. Uma vacina que utilizou um vetor de adenovírus expressando as proteínas HA e NP em combinação ou sozinhas utilizadas para imunização de suínos seguido do desafio com o SIV H3N2, demonstrou uma resposta imune protetora completa em suínos imunizados com a HA sozinha ou HA+NP, com ausência de excreção viral e lesões nos pulmões, em contraste com o grupo vacinado com o vetor contendo somente com a NP (WESLEY; TANG; LAGER, 2004).

Além disso, outra plataforma vacinal desenvolvida para o controle de influenza com o objetivo de superar a eficácia variável da vacina inativada, e induzir uma imunidade local ou celular mais ampla, é a vacina viva atenuada de influenza (*Live-Attenuated Influenza Vaccine – LAIV*). A LAIV (*Flumist®*) é administrada via intranasal e é amplamente utilizada com sucesso em humanos na América do Norte. Nessa plataforma de LAIV, as cepas apresentam propriedades de replicação eficiente a 25 °C, e são adaptadas ao frio (*cold-adapted - ca*), ou seja essa temperatura é restritiva para a maioria das cepas selvagens. Além dessa, existem cepas de LAIV sensíveis à temperatura (*temperature-sensitive – ts*) que replicam em temperaturas mais altas a 37 ou 39 °C e também existem as LAIV atenuadas geradas a partir com mutações pontuais em determinados genes (*attenuated – att*). Essa plataforma é gerada através da técnica de genética reversa que usa a estrutura de um vírus doador para as proteínas internas e as proteínas de superfície (HA e NA) são originárias de

um outro vírus de subtipo específico para a vacina (GASPARINI et al., 2011; LEE et al., 2014). A conversão de um sítio de clivagem de um *motif* da proteína HA de um IAV em um *motif* sensível à elastase, resultou na atenuação de uma cepa de SIV para a geração de uma LAIV elastase dependente (*ed*) (MASIC; BABIUK; ZHOU, 2009). Suínos imunizados com a LAIV-*ed* contendo os genes da HA e NA da variante antigênica H1N1 (A/Sw/Saskatchewan/ 18789/02), tiveram proteção completa quando desafiados com um vírus homólogo ao da vacina e proteção parcial quando desafiados com um vírus heterólogo (H3N2). A proteção foi caracterizada por redução significativa de lesões pulmonares, baixos títulos virais nos pulmões, assim como baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias (MASIC et al., 2009).

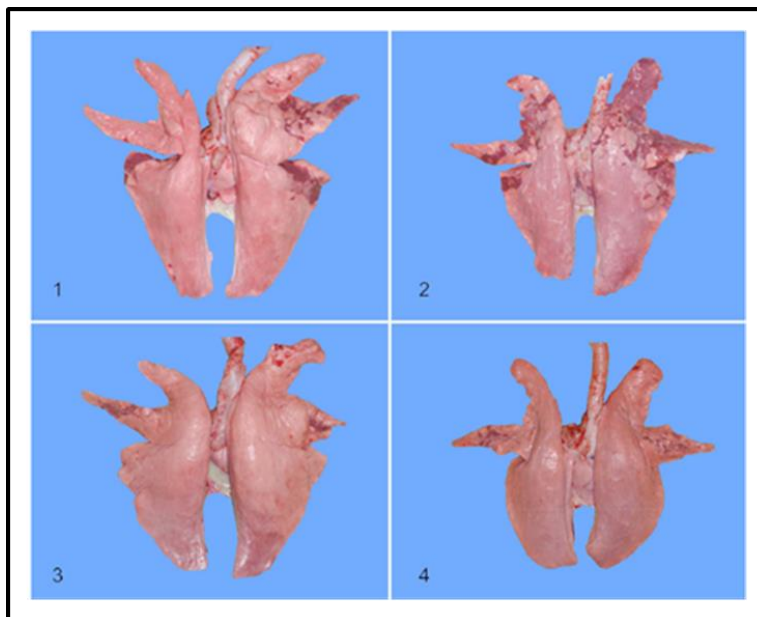
Outra estratégia utilizada para geração de LAIV é a atenuação da proteína NS-1, que é antagonista da produção de interferons tipo I. Uma LAIV*att* que expressa a proteína NS-1 truncada de um SIV do subtipo H3N2 (sw/Texas/4199-2/98, Tx/98) foi gerada por genética reversa (SOLÓRZANO et al., 2005). A vacinação de suínos via intratraqueal com essa LAIV*att*, seguida de um reforço vacinal três semanas após a primeira dose resultou na proteção contra um desafio homólogo e proteção parcial contra o vírus heterosubtípico H1N1 (RICHT et al., 2006). Estudos subsequentes mostraram que a rota intranasal de administração da vacina foi mais eficiente que a intramuscular resultando na indução da resposta de anticorpos na mucosa nasal, devido a indução de níveis de IgA no pulmão (VINCENT et al., 2007). Além disso, duas doses dessa LAIV*att* H3N2 SIV (Tx/98 NS1Δ126) conferiram aos suínos uma proteção completa frente ao desafio com vírus homólogo e proteção quase completa ao desafio heterovariante de SIV sw/Colorado/23619/99 (H3N2) antigenicamente distante (VINCENT et al., 2007). No entanto, apesar da ausência de anticorpos neutralizantes no soro contra a cepa heteróloga do desafio, a vacina proporcionou uma resposta protetora contra vírus heterovariantes e heterosubtípicos indicando que tanto a resposta imune humoral como celular contribuíram para uma ampla proteção.

## **2.10 Aumento da doença respiratória associado à vacina (VAERD) em suínos**

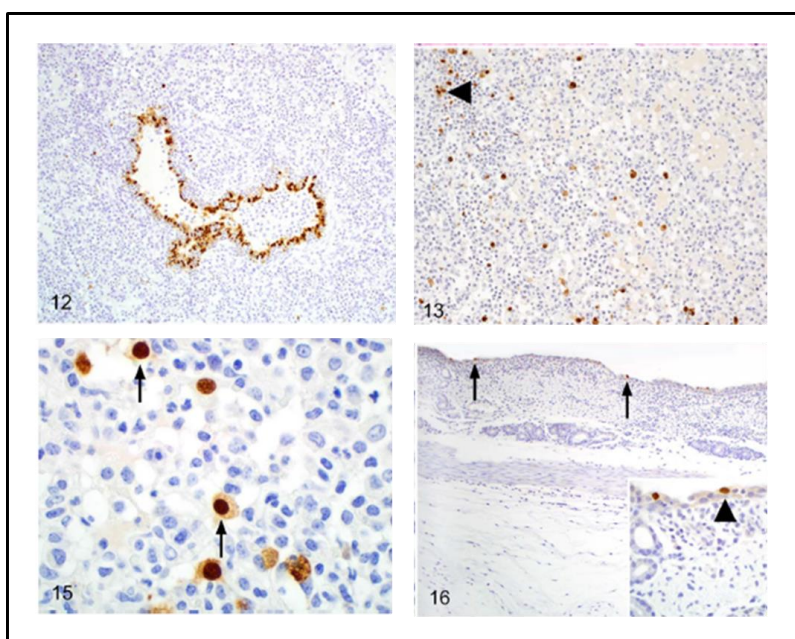
As vacinas WIV utilizadas contra SIV para suínos disponíveis no mercado tanto na Europa como nos Estados Unidos são formuladas com adjuvante O/W e conferem uma proteção adequada contra SIVs homólogos ou antigenicamente relacionados (REETH; MA, 2013). No entanto, com a emergência do H1N1pdm09 e introduções recorrentes de novos SIVs antigenicamente distintos (NELSON et al., 2014b;

VINCENT et al., 2008a, 2008b), a proteção cruzada induzida pelas WIVs pode ser limitada (GAUGER et al., 2011). Com isso, vacinas incapazes de induzir uma resposta imune capaz de prevenir a infecção viral podem exacerbar os sinais clínicos e a severidade da doença. Recentemente, estudos demonstraram a associação dessas vacinas com o aumento da doença respiratória em suínos quando os animais foram desafiados com SIV homosubtípico/heterólogo ao da vacina, por exemplo, contendo o mesmo subtipo da proteína HA (GAUGER, 2012; GAUGER et al., 2011). Nesse estudo foi observado o aumento da doença respiratória associado à vacina (*Vaccine-Associated Enhanced Respiratory Disease - VAERD*) da qual suínos demonstraram sinais clínicos severos de pneumonia com consolidação pulmonar acentuada e alta percentagem de lesões macroscópicas e microscópicas nos pulmões quando vacinados com uma WIV monovalente contendo  $\delta 1$ -cluster H1N2 e desafiados com uma cepa homosubtípica/heteróloga, como o H1N1pdm09 (GAUGER et al., 2012, 2013). O aumento da diversidade genética e antigênica demonstrada nos SIVs H1 circulantes em suínos combinado com o aumento do uso de vacinas WIV favorece a ocorrência de incompatibilidade do vírus da vacina com o vírus circulante, potencializando o desenvolvimento de VAERD na população suína. Assim, VAERD em suínos é um fenômeno recentemente reconhecido que pode estar correlacionado com o aumento da diversidade antigênica dos IAVs H1 que circulam nos suínos norte-americanos (LORUSSO et al., 2011; NELSON et al., 2014b). A consolidação pulmonar em suínos característica de VAERD apresenta uma coloração roxa na região cranioventral do pulmão típico de infecção por IAV em suínos. No entanto, as lesões macroscópicas estendem-se para a região cranial do lobo direito, esquerdo e no meio e região diafragmática demonstrando uma percentagem significativamente maior de lesões em animais vacinados quando comparados com os animais controle (não vacinados/desafiados – NV/C) (Figura 7) (GAUGER, 2012). Lesões microscópicas de edema interlobular pronunciado e abundante inflamação supurativa infiltrada nos brônquios e broquíolos foram observadas em suínos afetados por VAERD. No entanto, os suínos afetados por VAERD apresentaram necrose epitelial moderada nos brônquios e broquíolos, similar ao grupo controle (NV/C) (GAUGER et al., 2012).





**Figura 7. Lesões macroscópicas indicativas de VAERD.** 1) Suíno vacinado e desafiado afetado por VAERD demonstrando consolidação pulmonar cranioventral e diafragmática de coloração vermelho-púrpura, um dia após infecção. 2) Suíno vacinado e desafiado afetado por VAERD, com consolidação pulmonar cranioventral e diafragmática de coloração vermelho-púrpura mais espalhada atingindo aproximadamente 21% do pulmão, cinco dias após infecção. 3) Pulmão do grupo controle de suínos (não vacinado e desafiado - NV/C) apresentando lesões pulmonares típicas de infecção por SIV com consolidação pulmonar significativamente menor do que o grupo vacinado. 4) Pulmão do grupo controle de suínos não-vacinados e não-desafiados (NV/NC) não apresentou lesões. Figura adaptada de GAUGER et al., 2012.



**Figura 8. Lesões microscópicas indicativas de VAERD.** Corte histológico corado com peroxidase marcado pelo complexo streptavidina-hematoxilina no aumento 200x, de pulmão de suíno vacinado com WIV-18H1N2 (V/C) seguido de um desafio

heterólogo demonstrou uma coloração marrom escura nas células dos bronquíolos em 1 dia após infecção (dpi) com H1N1pdm09 (12). Sinais aumentados de IAV intersticial difusa detectado no septo alveolar ou lúmen caracterizando suínos afetados por VAERD 1 e 2 dpi. A seta indica broquiolite necrozante no epitélio (13). Setas indicando células interpretadas como macrófagos ou pneumócitos localizados no lúmen alveolar entre debris celulares de neutrófilos em pulmão de suínos V/C 2 dpi (15). Sinais de epitélio necrosado na traquéia de suíno V/C indicado com a seta (16). Figura adaptada de GAUGER et al., 2012.

Outros exemplo de aumento da doença respiratória, é a vacina inativada por formalina contra o vírus respiratório sincicial humano (RSV), o qual quando esta vacina foi administrada em crianças gerou uma doença ainda mais severa no trato respiratório inferior seguido de uma infecção natural com RSV (KIM et al., 1969). Adicionalmente, o vírus da dengue (DENV) e o vírus do sarampo (MV) têm sido associados com um aumento de replicação ou da doença em humanos após a infecção sequencial com diferentes sorotipos (COHEN; HALSTEAD, 1966). O aumento da doença imuno-mediada requer uma indução primária de anticorpos sub-neutralizantes que pode consistir na indução de anticorpos com baixa afinidade (UBOL; HALSTEAD, 2010). Assim a patogênese associada ao aumento da doença respiratória é complexa, multifatorial e envolve a resposta imune humoral e celular, formação de imuno-complexos, citocinas e outros mediadores da resposta imune contra o vírus. Geralmente está associada à resposta de anticorpos não protetores, ou reações antígeno-anticorpo que podem aumentar a replicação viral ou induzir inflamação acentuada (TAKADA; KAWAOKA, 2003). Os imuno-complexos também foram associados com doença severa em humanos na pandemia de 2009 com o H1N1pdm09. Anticorpos pré-existentes não protetores e com baixa avidéz em adultos de meia idade foram correlacionados com a severidade da doença respiratória causada pelo H1N1pdm09. Além disso, esses pacientes demonstraram ativação do complemento mediada por IC, confirmado pela deposição de C4d nos pulmões. Em contraste, adultos jovens que não tinham anticorpos pré-existentes para IAV não apresentaram a pneumonia severa (MONSALVO et al., 2011).

Estudos experimentais de vacinação e desafio em suínos, utilizando uma WIV contra SIV demonstraram que existem alguns fatores que podem estar associados com o desenvolvimento VAERD em suínos. Esses estudos sugerem que a indução de anticorpos IgG não neutralizantes com reatividade cruzada ao vírus heterólogo no soro e nos pulmões, e a incapacidade da WIV em gerar uma resposta imune protetora de

mucosa (LOVING et al., 2013b; VINCENT et al., 2008b), pode ter contribuído para o aumento da patologia nos pulmões (GAUGER et al., 2013). Além disso, um mapeamento de epítomos demonstrou que os anticorpos IgG com reatividade cruzada induzidos pela WIV em suínos afetados por VAERD foram direcionados para o domínio mais conservado da haste da proteína HA2 (KHURANA et al., 2013). Sendo assim, estudos *in vitro* em células MDCK demonstraram que esses anticorpos anti-HA2 promoveram o aumento da atividade de fusão do H1N1pdm09 e da infectividade, sugerindo que esses anticorpos podem estar relacionados com o aumento da patologia pulmonar em suínos. Conforme já descrito a infecção por SIV causa uma resposta inflamatória aguda e pode estar relacionada com a replicação viral, doença e patologia do pulmão (BARBÉ; ATANASOVA; VAN REETH, 2011; VAN REETH; NAUWYNCK, 2000). Em suínos afetados por VAERD ocorre uma desregulação das citocinas, caracterizada pelo um aumento dos níveis de citocinas pro-inflamatórias nos pulmões que pode estar correlacionado com o aumento da severidade da patologia nos pulmões (GAUGER et al., 2012, 2013). Com isso, suínos afetados por VAERD apresentaram níveis elevados de IL-2, IL-4, IL-12p70, IFN- $\gamma$  e IL-10 no pulmão 5 dias após infecção, em comparação com os grupos controles (GAUGER et al., 2013). Esse perfil de citocinas sugere a indução da proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, consistente com a presença de IL-2 e IFN- $\gamma$  no pulmão (VAN REETH; NAUWYNCK, 2000). Essa desregulação das citocinas foi observada em outros estudos de VAERD, que além dos níveis elevados das citocinas já descritas, níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  também foram encontrados em animais que desenvolveram VAERD (GAUGER et al., 2014b).

Um outro estudo que utilizou uma vacina de subunidade da proteína HA do H1N1pdm09 formulada com um adjuvante O/W, seguido do desafio com  $\delta 1$ -cluster H1N2 (o modelo inverso de VAERD) demonstrou que a resposta imune gerada pela vacinação somente com a proteína HA foi suficiente para causar VAERD (RAJÃO et al., 2014). Nesse mesmo estudo um outro grupo de suínos foi vacinado com uma tsLAIV contendo a HA e NA do vírus H1N1pdm09, no entanto os suínos não apresentaram lesões consistentes com VAERD, demonstrando que a tsLAIV reduziu a excreção viral, a eliminação do vírus do organismo foi mais rápida e ofereceu uma proteção local nos pulmões com altos níveis de IgA. Além disso a comparação entre a eficácia das vacinas experimentais tsLAIV e WIV, demonstrou que os suínos vacinados com a LAIV tiveram uma resposta celular e humoral mais efetiva contra SIV (LOVING

et al., 2012b). Um outro estudo que comparou as plataformas vacinais WIV e tsLAIV revelou que os anticorpos IgG não neutralizantes induzidos pela vacina tsLAIV não apresentavam preferência pelos epitopos mais conservados do domínio HA2 como a WIV. Assim, esses anticorpos não neutralizantes de reatividade cruzada induzidos pela WIV apresentavam epitopos direcionados para a porção da proteína HA2. Isso promoveu o aumento da infectividade viral em ensaios de cultivo celular, consistente com os altos títulos virais no pulmão e suabes nasais dos suínos, demonstrando a falta de proteção contra a infecção viral (GAUGER et al., 2014b).

Além disso, a presença de MDA em suínos vacinados com WIV afetou negativamente a eficácia da vacina, com a exacerbação dos sinais clínicos e aumento de pneumonia, quando comparado com suínos vacinados com WIV sem a presença de MDA (KITIKOON et al., 2006). Além disso, um estudo que avaliou a eficácia das vacinas WIV e LAIVatt contendo a cepa A/suíno/Texas/4199-2/1998 (TX98) (H3N2) em suínos com e sem MDA específicos para o vírus TX98 frente a desafios com vírus homólogo e heterólogo. Nesse estudo, ambas as plataformas vacinais demonstraram a redução na eficácia com a presença de MDA. No entanto, os animais vacinados com a LAIVatt não apresentaram lesões pulmonares consistentes com VAERD, em contraste a vacina WIV induziu o desenvolvimento de VAERD (VINCENT et al., 2012a).

Apesar de suínos afetados por VAERD apresentarem a capacidade de responder imunologicamente ao desafio heterólogo, em animais sem evidência de anticorpos pré-existentes, apresentam efeitos significativos da pneumonia severa levando à diminuição do crescimento e com potencial de perdas no rebanho de suínos por infecções secundárias. Portanto, a prevenção da infecção por SIV vai continuar a contar com o uso de vacinas na suinocultura; no entanto, a eficácia da vacina depende da indução de uma ampla proteção cruzada contra os SIVs antígenicamente diferentes que circulam na granja. Para isso é necessário compreender como é induzida a resposta imune vacinal frente à infecção de um vírus heterólogo ao presente na vacina. Além disso, no contexto do desenvolvimento de VAERD descrito em suínos pode levar os suínos de pneumonia severa a falha vacinal, e muitas vezes sendo difícil de diagnosticar a campo.

Portanto, o objetivo da presente tese foi avaliar se diferentes formulações e administração de vacinas para influenza em suínos alterariam o desenvolvimento de VAERD. O primeiro manuscrito objetivou a avaliação da WIV monovalente versus bivalente e se o tempo entre vacinação e desafio interfeririam no desenvolvimento de VAERD. Adicionalmente foi avaliada a idade de vacinação com a vacina WIV e a outra

plataforma vacinal, a LAIV, foi avaliada seguido de um desafio de oito semanas após o reforço vacinal. No segundo manuscrito, foi avaliado se diferentes adjuvantes utilizados na formulação da WIV tiveram impacto no desenvolvimento de VAERD. Esses estudos forneceram mais conhecimento sobre os cenários de vacinação e infecção de suínos por SIV que podem levar ao desenvolvimento de VAERD.

### **3. Manuscrito 1**

**Age at vaccination and timing of infection do not alter vaccine-associated enhanced respiratory disease in influenza A virus infected pigs**

---

O artigo foi submetido à revista *Clinical and Vaccine Immunology*.

**Age at vaccination and timing of infection do not alter vaccine-associated enhanced respiratory disease in influenza A virus infected pigs**

Carine K. Souza<sup>1,2</sup>, Daniela S. Rajão<sup>1</sup>, Crystal L. Loving<sup>1</sup>, Phillip C. Gauger<sup>3</sup>, Daniel R. Pérez<sup>4</sup>, Amy L. Vincent<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Virus and Prion Diseases of Livestock Research Unit, USDA-ARS, 1920 Dayton Avenue, P.O. Box 70, Ames, IA 50010, USA; <sup>2</sup>Laboratorio de Virologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul–UFRGS, Av. Bento Goncalves, 9090, CEP: 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. <sup>3</sup>Iowa State University -ISU, Ames, IA 50010. <sup>4</sup>Poultry Diagnostic and Research Center, University of Georgia, Athens, Georgia, USA.

Corresponding author: Amy L. Vincent, Virus and Prion Diseases of Livestock Research Unit, USDA-ARS, 1920 Dayton Avenue, P.O. Box 70, Ames, IA 50010, USA, [amy.vincent@ars.usda.gov](mailto:amy.vincent@ars.usda.gov)

Running Title: Age at vaccination and timing of infection in VAERD

Keywords: Influenza A, vaccine, pigs, respiratory disease, immunity, age.

## Abstract

Whole inactivated virus (WIV) vaccines are widely used in swine industry to reduce clinical disease against homologous influenza A virus (IAV) infection. In pigs experimentally challenged with antigenically distinct heterologous IAV of the same hemagglutinin subtype, WIV vaccinates have been shown to develop vaccine-associated enhanced respiratory disease (VAERD). We evaluated the impact of vaccine valency, age at vaccination, and duration between vaccination and challenge on development of VAERD using vaccine containing  $\delta$ 1-H1N2 and challenge with pandemic H1N1 (pH1N1) virus. Pigs were vaccinated with monovalent WIV MN08 ( $\delta$ 1-H1N2) and bivalent ( $\delta$ 1-H1N2/H3N2) or ( $\delta$ 1-H1N2/pH1N1) vaccines then were challenged with pH1N1 at 3 weeks post-boost (wpb). Another group was vaccinated with the same monovalent WIV followed by challenge at 6 wpb to determine if time post-vaccination plays a role in development of VAERD. In a follow up study, the impact of age of first WIV vaccination (4 versus 9 weeks of age) with a boost three weeks later (7 versus 12 weeks of age) was evaluated. A monovalent live-attenuated influenza virus (LAIV) vaccine administered at 4 and 7 weeks of age was also included. All mismatched WIV groups had significantly higher lung lesions compared to LAIV, bivalent MN08-CA09 and controls groups. Age of first vaccination or length of time between booster dose and subsequent challenge did not alter the development of VAERD in WIV vaccinated pigs. Importantly, the mismatched component of the bivalent MN08-CA09 WIV did not override the protective effect of the matched vaccine component.



## Introduction

Influenza A virus (IAV) causes an acute respiratory disease in swine worldwide which leads to significant economic losses to pork producers. Classical H1N1 (cH1N1) was the major cause of influenza in swine in North America until 1998 (VINCENT et al., 2008a). Between 1997 and 1998, human seasonal H3N2 influenza viruses were introduced in the U.S. swine population in the form of double and triple reassortant viruses. The triple reassortant viruses containing the H3, N2 and PB1 gene segments derived from, human strains, the PB2 and PA from avian strains, and the rest of the segments from the North American cH1N1 swine strains quickly spread and became endemic in U.S. swine populations. Eventually, the six internal gene constellation of the triple reassortant viruses became dominant in swine influenza viruses in North America and were defined as the triple reassortant internal gene (TRIG) cassette. The circulation of both H3N2 and cH1N1 viruses in swine population led to additional reassortments that generated H1N2 viruses (KARASIN; OLSEN; ANDERSON, 2000). This was closely followed by the introduction of human seasonal H1 around 2002, which further contributed to H1 IAV diversity in swine populations in the U.S. and resulted in multiple distinct phylogenetic clusters ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta 1$  and  $\delta 2$ ) (LORUSSO et al., 2011; MA et al., 2010; VINCENT et al., 2009a). In 2009, the H1N1 pandemic virus (pH1N1) emerged from reassortment of gene segments from North American cH1N1, TRIG, and Eurasian avian-origin H1N1 IAV lineages (INTELLI- et al., 2009b; SMITH et al., 2009b) and was transmitted from humans to swine globally (NELSON et al., 2012).

Commercial vaccines available for use in pigs in North America and Europe are primarily based on whole inactivated viruses (WIV) delivered in combination with proprietary adjuvants. WIV vaccines are effective at reducing clinical disease against

homologous and antigenically related viruses by inducing an antibody response against the surface glycoproteins proteins hemmagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) (KYRIAKIS et al., 2010; VINCENT et al., 2010b). However, vaccines with oil-in-water adjuvants have been associated with enhanced respiratory disease in swine following challenge with antigenically divergent heterologous IAV of the same hemagglutinin subtype (GAUGER et al., 2011). A vaccine-associated enhanced respiratory disease (VAERD) model was previously reported in which pigs vaccinated with a monovalent WIV  $\delta$ 1-cluster (H1N2) vaccine and challenged with heterologous virus (pH1N1) demonstrated severe lung pathology in association with the absence of cross-neutralizing antibodies (GAUGER et al., 2011, 2012, 2013; VINCENT et al., 2010b). The mechanisms that lead to VAERD are still unclear, but a lack of neutralizing antibodies and local cytokine dysregulation have been implicated (GAUGER et al., 2012, 2013). Antibodies elicited following WIV vaccination were shown to bind to the HA2 domain of the heterologous challenge virus and are able to increase viral infectivity by enhancing fusion of the heterologous virus (KHURANA et al., 2013). The vaccination and challenge model described here is relevant to the current field situation in the U.S. and other regions with similar endemic virus lineages due to the prevalence of the  $\delta$ 1 H1 IAV lineages in swine in the U.S. (ANDERSON et al., 2015) and the frequent spillover of pH1N1 from humans to swine (NELSON; VINCENT, 2015; NELSON et al., 2015), as well as the use of these strains in monovalent or multivalent inactivated commercial or autogenous vaccines.

Our initial objective was to explore the impact of monovalent versus bivalent WIV and duration between vaccination and challenge on the development of VAERD. Based on results of study 1, we initiated a second study to evaluate the impact of age at

WIV vaccination on the development of VAERD. Additionally, since experimental live-attenuated influenza virus vaccines (LAIV) can elicit protective immunity in pigs (PENA et al., 2011) and also provide partial protection against heterologous challenge (LOVING et al., 2013b; MASIC et al., 2009; RAJÃO et al., 2014), a temperature sensitive (ts) LAIV vaccine was included in the follow up study to compare with WIV platform with an 8 week duration between booster and challenge in a two dose vaccination regimen. The results described here provide further understanding of the relevant vaccination and infection scenarios that can lead to the VAERD.

## **Material and Methods**

### ***Study design, vaccination and challenge***

Pigs were obtained from a herd free of IAV and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Upon arrival, pigs were treated prophylactically with ceftiofur (Pfizer Animal Health, New York, NY) according to label directions to reduce potential respiratory bacterial pathogens. Pigs were housed in biosafety level 2 (BSL2) containment during the vaccine and challenge phases of the study. Pigs were cared for in compliance with the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the National Animal Disease Center (NADC).

IAV strains A/California/04/2009 (pH1N1) (CA09), A/swine/Minnesota/02011/2008 ( $\delta$ 1-H1N2) (MN08) and A/swine/Texas/4199-2/1998 (H3N2) (wild-type TX98) were grown in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells with OptiMEM (Life Technologies, California, CA). Clarified virus from infected culture was inactivated by UV irradiation, using the “sterilize” setting in a UV cross-linking chamber (GS Gene Linker; Bio-Rad, Hercules, CA). A commercial adjuvant

(Emulsigen-D; MVP Laboratories, Inc., Ralston, NE) was mixed with inactivated virus at a 1:5 ratio (v/v) in a 2 ml dose delivered by the intramuscular route. Each dose of WIV contained approximately 128 hemagglutination units (HAU) of virus as previously described (VINCENT et al., 2012b).

In study 1, the WIV vaccines included were bivalent H1N2 (MN08)/H3N2 (TX98) WIV or bivalent H1N2 (MN08)/pH1N1 (CA09) WIV and monovalent H1N2 (MN08) WIV. In this study, a total of 40 3-week-old cross-bred pigs were randomly assigned to 5 groups. Pigs were vaccinated with either a MN08-TX98 (n=5) and or bivalent MN08-CA09 (n=5). Both groups were challenged at 3 weeks post boost (wpb), 10 weeks-of-age, with pH1N1 which is consistent with our previous studies (GAUGER et al., 2012). In addition, pigs (n=14) were vaccinated with a monovalent WIV H1N2 (MN08) to evaluate the impact of time between boost and challenge. Subsequently, pigs were boosted with one group (n=8) receiving a second vaccine dose at 3 weeks (3wpb-MN08) and the other group (n=6) at 6 weeks (6wpb-MN08). Subsequently, control pigs were included non-vaccinated/challenged (NV/C) (n=8) and non-vaccinated/non-challenged (NV/NC) (n=8). At 3 or 6 wpb, pigs were challenged with 2 mL of  $10^6$  50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>/mL) of pH1N1 intratracheally and 1 mL intranasally, as previously described (GAUGER et al., 2012).

Based on results of the 3wpb-MN08 and 6wpb-MN08 groups, a further question arose regarding the impact of age at first vaccination in the context of a longer duration between vaccination and challenge in older pigs than our previously published model. To address this question, pigs were vaccinated with the monovalent MN08 WIV as described above in study 1 or with a tsLAIV vaccine. The tsLAIV vaccine included in this study was generated by reverse genetics technique using the HA and NA gene

segments from the MN08 strain cloned on a swine-lineage H3N2 backbone with modifications in the polymerase genes to render the strain temperature-sensitive, as previously described (GAUGER et al., 2014a; PENA et al., 2011). Pigs were vaccinated with WIV at 4 weeks of age and boosted at 7 weeks of age (WIV-4/7) (n=10) or LAIV (LAIV-4/7) (n=10). One group of pigs was vaccinated with WIV at 9 weeks of age and boosted at 12 weeks of age (WIV-9/12) (n=10). Control groups were included as non-vaccinated, challenged pigs (NV/C) (n=10) and non-vaccinated, non-challenged pigs (NV/NC) (n=6). At 15 weeks of age, pigs were challenged with 2 mL of  $10^6$  TCID<sub>50</sub> of pH1N1 as done in study 1 (described above). The experimental designs of study 1 and 2 are summarized in Table 1.

For both studies, clinical signs were observed daily. Nasal swabs (Fisherbrand Dacron swabs, Fisher Scientific, Pittsburg, PA) were taken on 0, 3 and 5 dpi to evaluate nasal virus shedding. After serum collection, pigs were humanely euthanized with a lethal dose of pentobarbital (Fatal Plus, Vortech Pharmaceuticals, Dearborn, MI) at 5 dpi to evaluate lung and trachea lesions, cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and virus titers in the lungs.

#### ***Evaluation of macroscopic pneumonia***

At 5 dpi, the percentage of the lung affected with purple-red consolidation typical of influenza in swine was visually estimated as previously described (GAUGER et al., 2012; HALBUR et al., 1995). Tissue samples from the trachea and right middle or affected lung lobe were fixed in 10% buffered formalin for histopathologic examination. Tissues were processed by routine histopathologic procedures and slides stained with hematoxylin and eosin (H&E) or stained by immunohistochemistry (IHC) for IAV antigen (VINCENT et al., 1997). Slides were evaluated by a veterinary pathologist

blinded to treatment group and microscopic lesion severity was scored as previously described (GAUGER et al., 2012).

### ***Microbiological assays***

All pigs were screened for antibody against influenza A nucleoprotein (NP) by a commercial ELISA (MultiS ELISA, IDEXX, Westbrook, ME) upon arrival to ensure absence of preexisting immunity from prior exposure or passively acquired maternal antibody. BALF samples were cultured for aerobic bacteria on blood agar and Casmin (NAD enriched) plates to indicate the presence of concurrent bacterial pneumonia. Polymerase chain reaction (PCR) assays were conducted for PCV2 (OPRIESSNIG et al., 2003). Commercial PCR assays for *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV were conducted with the VetMax<sup>TM</sup> *M. hyopneumoniae* reagents or the NA and EUPRRSV-specific PCR assay (Life Technologies, Carlsbad, CA), respectively, according to manufacturer's recommendations to exclude other causes of pneumonia.

### ***Virus titration on lung and nasal samples***

Nasal swabs and BALF were collected and titrated on MDCK cells to evaluate virus shedding and replication in the nose lungs as previously described (GAUGER et al., 2012). MDCK-inoculated monolayers were evaluated for cytopathic effect (CPE) between 48 and 72 h post-infection and subsequently fixed with 4% phosphate-buffered formalin and stained using immunocytochemistry (ICC) with anti-influenza A NP monoclonal antibody (KITIKOON et al., 2006). A TCID<sub>50</sub>/ml titer was calculated for each sample using a described method of Reed & Muench (REED; MUENCH, 1938).

### ***Hemmagglutination Inhibition and whole virus ELISA assays***

Serum samples from all pigs were collected prior to the first vaccination, prior to boost, pre-challenge and at 5 dpi. Sera from WIV-4/7 and LAIV-4/7 groups were also collected at 4 weeks post-boost. Sera were heat inactivated at 56 °C for 30 min and hemagglutination inhibition (HI) assays were conducted with  $\delta$ 1-H1N2 (MN08) or pH1N1 (CA09) virus as antigen and turkey RBCs as indicators using standard techniques as previously described (COX et al., 2005; KITIKOON P, GAUGER PC, 2014). Reciprocal titers were divided by 10,  $\log_2$  transformed, analyzed, and reported as the geometric mean.

IAV-specific IgG in serum samples and IAV-specific IgA and IgG in BALF samples were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Immulon-2HB 96-well plates (Dynex, Chantilly, VA) were coated with whole virus (MN08 or CA09) preparations at 100 HA units (50  $\mu$ L/well), grown in serum-free OptiMEM, and incubated at room temperature overnight as previously described (GAUGER et al., 2013). Serum samples were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) at 1:2000 and BALF samples were incubated at 37°C for 1 h with an equal volume of 10mM dithiothreitol (DTT) to disrupt mucus. Then, BALF samples were diluted at 1:4 in PBS.

The assays were performed on each BALF or serum sample in duplicate. Plates were blocked for 1 h with 100  $\mu$ l of 10% BSA in PBS and washed three times with 0.05% Tween 20 in PBS (PBS-T). Plates were incubated with samples (serum or BALF) at room temperature for 1 h, washed three times with PBS-T, then incubated with peroxidase-labeled goat anti-swine IgA (Bethyl, Montgomery, TX), IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) at 37 °C for 1 h. The substrate 2,20-Azino-di(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonate) (ABTS)-peroxide (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) was added and incubated at 37 °C for 8 minutes.

To stop the color development, 50  $\mu$ l of stop solution (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) was added in each well and the optical density (OD) was measured at 405 nm wavelength with an automated ELISA reader. Antibody levels were reported as the mean OD for each duplicate and the mean OD of each treatment group was compared.

### *Cytokine assays*

Aliquots of BALF from study 1 and 2 were analyzed for a panel of cytokine proteins. Study 2 BALF aliquots were centrifuged at 400 g for 15 min at 4 °C to pellet cellular debris and cell-free lung lavage (CF-LL) was used in the analysis; however, it was not possible to retrospectively run the study 1 BALF in this manner. Cytokine concentrations for IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were determined by multiplex ELISA performed according to the manufacturer's recommendations (SearchLight, Aushon Biosystems, Billerica, MA) as previously described (GAUGER et al., 2012). Cytokine concentrations were reported as the mean of duplicate samples for statistical analysis.

### *Statistical analysis*

Lung lesions scores, log<sub>10</sub> transformed virus titers, log<sub>2</sub> transformed HI reciprocal titers, mean OD ELISA of IgA or IgG levels and cytokine concentrations were analyzed using analysis of variance (ANOVA) with a p value  $\leq$  0.05 considered significant (GraphPad Prism software version 6.00, San Diego, CA). Response variables shown to have a significant effect by treatment group were subjected to pair-wise comparisons using the Tukey–Kramer test.

## **Results**



### *Lung lesions*

All pigs were negative for IAV NP-specific antibodies prior to vaccination and 5 dpi all pigs were negative for PCV2, *M. hyopneumoniae* and PRRSV, nucleic acids in BALF. In addition, aerobic bacterial pathogens were not detected in the BALF on 5 dpi in either study.

In the bivalent WIV groups of study 1, MN08-TX08 pigs had significantly higher percentages of macroscopic lung lesions (12.1%) characteristic of VAERD (GAUGER et al., 2012), whereas, in contrast, MN08-CA09 pigs did not display VAERD. The presence of the mismatched H1N2 strain in the WIV vaccine did not interfere with the protective response provided by the homologous vaccine antigen, yet the presence of the H3N2 in the WIV vaccine did not alter the VAERD resulting from MN08 mismatched H1 component of the WIV (Figure 1A). The differences between microscopic lesions scores for the different groups were consistent with the macroscopic lesions (Figure 1B). The 3 versus 6 week period between boost and challenge did not alter the VAERD outcome in the monovalent WIV groups, as both the 3wpb-MN08 and 6wpb-MN08 groups had significantly higher percentages of macroscopic (17.7% and 15.4%, respectively) and microscopic (15.7% and 13.8%, respectively) lung lesions compared to NV/C control (6.1% and 6.0%, respectively) and were not statistically different from each other (Figure 1A and 1B).

To determine if age at time of WIV vaccination has an effect on the development of VAERD, and further define the impact of timing between boost and challenge for WIV in the VAERD model, study 2 was conducted. Similar to the mismatched WIV groups above, both the WIV-4/7 and WIV-9/12 groups had significantly higher percentages of macroscopic lung lesions (20.2% and 16.6%, respectively) compared to

the NV/C control (4.4%). In contrast, pigs in the LAIV-4/7 group did not demonstrate macroscopic (6.2%) consistent with VAERD (Figure 1C). In addition, the microscopic lesion scores of WIV-4/7 (15%) and WIV-9/12 (12.6%) groups were significantly higher when compared to LAIV-4/7 (5.3%) and NV/C control (3.9%) groups (Figure 1D). These data indicate that the animal's age at the time of vaccination (4 or 9 weeks of age) did not alter the development nor pathologic aspects of VAERD.

### ***Virus levels in nasal secretions and in lungs***

All pigs were negative for IAV in nasal swabs at 0 dpi. In study 1, virus was recovered at 3 and 5 dpi in nasal swabs and in BALF (5dpi) from nasal swabs collected from MN08-TX08 and 3 or 6wpb-MN08 groups. However, MN08-CA09 vaccinated pigs did not shed virus and BALF were negative for virus, again demonstrating the absence of interference by the mismatched heterologous virus vaccine antigen with the matched homologous response in the bivalent WIV (Figure 2A, 2B and 2C).

However, virus titers in vaccinated pigs from study 2 were significantly lower in nasal swabs and BALF at 5 dpi compared with NV/C group (Figure 2D, 2E and 2F). Despite the few pigs with detectable virus (1/9) pigs at  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL at 3 dpi in WIV-9/12 and (3/10) pigs at  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL at 5 dpi in WIV-4/7, the presence of challenge virus (CA09) in the lungs was confirmed by IAV-specific IHC (Figure 1E). Virus was not detected at any time in nasal swabs or BALF in the NV/NC control group.

### ***HI antibody responses***

In study 1, HI antibodies against TX98 and CA09 were only detected in the MN08-TX98 and MN08-CA09 groups prior to challenge, respectively (Figure 3A and 3B). All vaccinated groups had significant HI titers against MN08 compared to control

groups (NV) and the MN08-CA09 group had the lowest HI titers against MN08 (Figure 3C).

In study 2, WIV-4/7 and LAIV-4/7 groups demonstrated significantly higher HI titers against MN08 virus from 7 weeks of age until the necropsy day (15 weeks of age) when compared to control groups. Although the WIV-9/12 group had significantly higher HI titers when compared to non-vaccinated controls, this group had significantly lower HI titers in all equivalent post-vaccination time points evaluated compared to WIV-4/7 group (Figure 3D). NV/C and NV/NC groups HI mean titers remained below the detection threshold (HI titer < 40). None of the groups had cross-reacting HI antibodies to the heterologous challenge (CA09) virus at 0 dpi.

#### ***Systemic IgG levels against whole MN08 and CA09 virus***

The IAV-specific antibody response following vaccination was further explored by measuring IgG antibodies in sera to the priming (MN08) and challenge (CA09) viruses using a whole-virus ELISA. In study 1, MN08-TX98, MN08-CA09 and 3 or 6wpb-MN08 groups showed significantly higher levels of anti-MN08 and anti-CA09 IgG in serum prior to challenge (dpi 0) (Figure 4A and 4C) and post challenge (dpi 5) (Figure 4B and 4D) when compared to controls. In study 2, both WIV groups had significantly higher anti-MN08 and cross-reactive anti-CA09 IgG levels in serum compared to LAIV-4/7 group and control groups prior to challenge (0 dpi) (Figure 4E and 4G) and post challenge (5 dpi) (Figure 4F and 4H), consistent with previous studies (GAUGER et al., 2013). Following challenge, LAIV-4/7 had significantly higher levels of anti-MN08 and anti-CA09 IgG in serum when compared to control groups, but had lower levels of IAV-specific IgG when compared to WIV groups (Figure 4F and 4H).

### ***Local IgA and IgG levels against whole MN08 and CA09 virus***

To evaluate local immune response, IgA and IgG antibodies in the lungs (BALF) by the following vaccination with different WIV formulations (relative to time of vaccination) and heterologous challenge was assessed. In study 1, levels of anti-MN08 IgA were significantly higher in MN08-TX98 and 3wpb-MN08 groups compared to controls (Figure 5A). Levels of cross-reactive anti-CA09 IgA were significantly higher in both bivalent groups as well as the 3wpb-MN08 group compared to controls (Figure 5B). All vaccinated groups had significantly levels of anti-MN08 and cross-reactive anti-CA09 IgG compared to controls (Figure 5C and 5D).

In study 2, both WIV and LAIV groups had significantly higher levels of anti-MN08 IgA compared to controls (Figure 5E). In contrast, cross-reactive anti-CA09 IgA levels were very low in all vaccinated groups (Figure 5F). Both WIV and LAIV groups had significantly higher anti-MN08 and cross-reactive anti-CA09 IgG levels compared to NV controls (Figure 5G and 5H).

### ***Cytokine concentrations in lungs***

The concentrations of cytokines in the lungs were evaluated for association with the immunopathology, a characteristic feature of VAERD affected-pigs (GAUGER et al., 2012, 2013). In study 1, the concentrations of cytokines in BALF were only significantly higher than the NV/C control group in the monovalent 6wpb-MN08 group challenged at 6wpb, which was at 13 weeks of age. This group showed significantly elevated levels (mean) of IL-1 $\beta$  (1243.5 pg/mL), IL-2 (121.8 pg/mL), IFN- $\gamma$  (142.7 pg/mL), TNF- $\alpha$  (13.5 pg/mL) and IL-4 (16.7 pg/mL) (Figure 6A, 6B, 6C, 6D and 6E) compared to NV/C and NV/NC controls. In addition, the 6wpb-MN08 group had an increased level of anti-inflammatory IL-10 (133.4 pg/mL) (Figure 6F). In study 2, the

cytokine concentrations in cell-free BALF samples were measured. The WIV-4/7 group demonstrated significantly higher cytokine protein levels of IL-1 $\beta$  (299.7 pg/mL) and IFN- $\gamma$  (75.9 pg/mL) and the anti-inflammatory cytokine IL-10 (174.3 pg/mL) (Figure 6G, 6H and 6I) compared to NV/C and NV/NC controls.

## **Discussion**

Contemporary IAV in swine is rapidly evolving and increasing in antigenic diversity, so the need for improved vaccines that induce cross-protection against heterologous viruses is important to reduce rates of infection in swine and transmission between species (GARTEN et al., 2009; NELSON et al., 2012). The efficacy of WIV vaccines can be limited when pigs are challenged with heterologous viruses (KYRIAKIS et al., 2010; MA et al., 2009; VAN REETH et al., 2004; VINCENT et al., 2010b); as demonstrated by the VAERD model. When pigs were vaccinated with a WIV containing a  $\delta$ 1-cluster H1N2 (MN08) virus and challenged with a mismatched virus of the same HA subtype, pH1N1, demonstrated enhanced lung pathology (GAUGER et al., 2011, 2012).

The VAERD model traditionally used prior to these studies were based on naïve pigs receiving the first dose of WIV vaccine at approximately 4 weeks of age, a boost at 7 weeks of age and challenge at 10 weeks of age. The objectives of the current studies were to determine if the age at the time of WIV vaccination, WIV valency formulation, or time between vaccination and challenge would alter the development of VAERD.

Other vaccine platforms, such as LAIV, have been approved and broadly used in humans (CDC, 2013; CHEN; SUBBARAO, 2009) but are not currently licensed for use in swine. Experimental LAIV vaccines have been shown to induce a broadly cross-protective immune response against antigenically different IAV in pigs (19, 22, 36, 37).

In addition, LAIV or natural infection can induce more efficient cross-protective response due to the activation of antibody- and cell-mediated immunity (HEINEN; BOER-LUIJTZE; BIANCHI, 2001). A tsLAIV using a contemporary swine-lineage IAV strain with the TRIG backbone developed by reverse genetics (PENA et al., 2011) demonstrated efficacious induction of cell-mediated and humoral responses in pigs against an homologous virus (LOVING et al., 2012a). Another vaccine study using tsLAIV containing pH1N1 and challenged with heterologous virus, as  $\delta$ 1-H1N2 IAV (the reverse order of the study here) (RAJÃO et al., 2014) demonstrated a similar cross-protective immune response that was shown in the present study. However, when the reverse order is used with a WIV vaccine (WIV containing pH1N1) and challenge ( $\delta$ 1-H1N2 IAV virus) VAERD still occurred (BRAUCHER et al., 2012).

Pigs were previously shown to develop VAERD in the course of the IAV infection, as early as 24 hours post infection (GAUGER et al., 2012). Microscopic lung lesions in VAERD are characterized by widespread interlobular edema with hemorrhage as observed in pigs co-infected with PCV2 and PRRSV (GAUGER et al., 2011; HALBUR et al., 1995); however, the VAERD-affected pigs in our experimental model are free of these additional viral pathogens. In the current study, regardless of the age of vaccination or duration between boost and challenge, pigs vaccinated with WIV formulated with the MN08 virus demonstrated significant macro- and microscopic pneumonia consistent with VAERD (GAUGER et al., 2012, 2013, 2014a). The only exception was the bivalent MN08-CA09 group, which was formulated with the homologous challenge strain as well. In addition, mismatched monovalent and bivalent WIV vaccines did not protect pigs from shedding and virus replication in lungs, as observed at 3 and 5 dpi in study 1. Despite the low virus titers in nasal swabs and lungs

of pigs in WIV groups in study 2, virus was detected in lungs by IHC. Limited pH1N1 virus shedding at 3 and 5 dpi of WIV-H1N2 vaccinated pigs was similarly observed when challenged at 10 weeks of age (GAUGER et al., 2014a); however, another study using the reverse order of viruses with a subunit vaccine (pH1N1) and challenge with  $\delta$ 1-H1N2 IAV virus at 15 weeks of age demonstrated high virus titers in nasal swabs and lungs (RAJÃO et al., 2014). So, the age of challenge (15 weeks of age) may be combined with variation between virus strains and variation between outbred pigs in an interaction that contributed to the limited virus shedding at 3 and 5 dpi in WIV groups from study 2. In contrast to WIV vaccinates, virus antigen was not detected in the lungs of pigs in the LAIV group by IHC, suggesting cross-protection against pH1N1 even at 8 weeks following boost, similar to what was observed previously for the inverse combination of CA09 LAIV and MN08 challenge (RAJÃO et al., 2014). This study confirmed that LAIV vaccine induced a protective immune response against heterologous infection longer than observed in previous studies with pigs challenged at 3 wpb (10 weeks of age) (GAUGER et al., 2014a).

Study 2 demonstrated that vaccinating naïve pigs with MN08-WIV at 4 weeks of age (WIV-4/7) in direct comparison with administering the priming dose at 9 weeks of age (WIV-9/12) elicited an HI antibody response increased in magnitude, and this was a consistent trend with other immune parameters discussed below. However, this increased HI response was not appreciable in study 1 in either monovalent WIV groups (3wpb-MN08 and 6wpb-MN08) that received the first dose at 4 weeks of age similar to study 2. Both of these groups had HI antibody responses similar to our previous studies at the pre-challenge time point (GAUGER et al., 2012, 2013). With the exception of

WIV MN08-CA09 group, none of vaccinated groups developed detectable HI antibodies against the heterologous challenge.

All WIV vaccinated and challenged pigs demonstrated high levels of anti-MN08 and cross-reactive anti-CA09 IgG in serum and BALF, irrespective the age of vaccination, time of infection and vaccine valency (mono or bivalent WIV), which is a consistent immune parameter in WIV vaccinated pigs that develop VAERD. In contrast, LAIV vaccination followed by challenge resulted in minimal cross-reactive serum IgG antibodies in pre- and post-challenge (BALF). This lower level of cross-reactive IgG response observed in LAIV group in comparison to WIV groups may be correlated with the absence of enhanced lung lesions, corroborating with previous findings that compared WIV and LAIV platforms with a heterologous challenge at 10 weeks of age (GAUGER et al., 2014a). Although the precise contribution of these cross-reactive, non-neutralizing antibodies to the VAERD outcome remains unclear, it is hypothesized that they may contribute to antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) (VELLA et al., 1980) or activate the complement cascade (KOPF et al., 2002). Moreover, it was found that the non-neutralizing cross-reactive IgG elicited following WIV vaccination and associated with the development of VAERD upon challenge were targeted to the conserved HA2 stalk domain of the challenge virus (KHURANA et al., 2013). These cross-reactive anti-HA2 antibodies also increased pH1N1 virus infectivity *in vitro* in MDCK cells, likely by promoting virus fusion (KHURANA et al., 2013). Although MN08-WIV induces high levels of cross-reacting IgG anti-pH1N1 directed to HA2 domain, LAIV vaccinated pigs did not show an exclusively HA2 domain binding preference (GAUGER et al., 2014a).



Robust IAV-specific IgA responses in the lung are not consistently observed with following experimental WIV vaccination and heterologous challenge; however MN08-specific IgA in the BALF of WIV/C groups was detected in study 1. MN08-specific IgA in BALF was mainly detected in challenged pigs vaccinated with the bivalent MN08-TX98 and monovalent MN08 when challenged at 3wpb. This may be explained by a rapid booster response post-challenge related to priming with these vaccines. In contrast, pigs vaccinated with MN08-CA09 did not demonstrate marked levels of IgA response in BALF, likely due to the consumption of the IgA directed against homologous CA09 challenge virus. Intranasal LAIV vaccines consistently prime a mucosal IgA and IgG response associated with cross-protection (GAUGER et al., 2014a; PENA et al., 2011; RAJÃO et al., 2014; VINCENT et al., 2012b). In our study 2, LAIV vaccination and challenge resulted in a relative increase in IAV-specific IgA in BALF against the vaccine strain over the WIV platform. Although a cross-reactive anti-CA09 IgA response was not observed at 5 dpi, the LAIV vaccine provided significant cross-protection even 8 wpb, similar to other studies that demonstrated LAIV provided cross-protective immune response over WIV platform without the risk of VAERD at 3 or 8 wpb (GAUGER et al., 2014a; RAJÃO et al., 2014).

Cytokines play a role in the regulation of the lymphocyte activation, T and B cell proliferation and differentiation during IAV infection in pigs (BARBÉ; ATANASOVA; VAN REETH, 2011; JULKUNEN et al., 2000). Elevated pulmonary pro-inflammatory cytokines are associated with excessive inflammation (VAN REETH; NAUWYNCK; PENSAERT, 1998; VAN REETH; VAN GUCHT; PENSAERT, 2002) and likely play a role in the lung damage in VAERD affected pigs (GAUGER et al., 2013). Despite the severe lung pathology observed in all WIV-MN08 mismatched vaccinated groups, only

the monovalent MN08-WIV group challenged at 6 wpb showed marked increased levels of IL-2, IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$ , and IL-10 cytokines in BALF. In contrast, although TNF- $\alpha$  and IL-4 were found in significant levels in BALF, the increase was not as marked. Although an increased cytokine profile was not found in all WIV groups that developed VAERD in study 1, such cytokine dysregulation as previously observed (GAUGER et al., 2013, 2014a) may have a role in the neutrophil recruitment and exacerbation of inflammatory response that may be linked with the immunopathology of the lungs (BARBÉ; ATANASOVA; VAN REETH, 2011; VAN REETH; NAUWYNCK; PENSAERT, 1998). Likewise, in study 2, the WIV group primed at 4 weeks of age, boosted at 7 weeks of age and challenged at 8wpb demonstrated a cytokine profile of increased IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 in BALF. The difference in the magnitude of cytokine protein levels between study 1 and 2 may be due to the switch to using cell-free BALF in study 2, giving lower but less variable results by targeting protein released into the interstitium and reducing the detection of intracellular proteins. However, the 6wpb pigs from study 1 demonstrated higher virus titers in BALF that may also be related to the higher cytokine profile in these pigs.

Age at first vaccination seemed to impact the WIV immunogenicity as well as the cytokine responses when comparing the WIV-4/7 and the WIV-9/12 groups. Thus, although the age of vaccination did not appear to significantly influence the development of VAERD following WIV vaccination, there was a trend of increased severity of lung pathology in the pigs first vaccinated at a younger age. This potentially interesting trend should be further explored in the context of basic neonatal immunity, as its relation to commercial vaccine application, albeit with the knowledge that most piglets in farm settings would have some degree of passive maternal immunity at this

age due to vaccine usage or natural exposure in their dams and very few would likely be naïve as in this experimental model.

In conclusion, these data indicate that the age at first vaccination or length of time between booster dose and subsequent heterologous challenge did not alter the development of VAERD in WIV vaccinated pigs. In addition, the inclusion of an H3N2 in a bivalent WIV vaccine with MN08 did not alter the induction of VAERD, whereas the inclusion of the mismatched MN08 strain with the matched pH1N1 in a bivalent WIV vaccine did not abrogate the protective response to the homologous virus. This is consistent with previous findings in which anti-sera from WIV-pH1N1 vaccinated pigs blocked pH1N1-MDCK infectivity compared to the increased infectivity of pH1N1 in the presence of anti-sera from WIV-MN08 vaccinated pigs (KHURANA et al., 2013).

Although WIV vaccines induce a robust peripheral immune response and are efficacious against homologous virus, vaccine antigen/challenge virus mismatch can lead to a vaccine failure ranging from loss of cross-protection to severe lung pathology (VAERD) that is difficult to diagnose in the field. Therefore, it is necessary to understand the benefits versus risk of inactivated vaccines used by the swine industry due to potential mismatch of circulating IAV strains and if the immune response can be improved by other vaccine platforms that induce balanced cross-protective antibody and cellular immune responses against IAV.

### **Funding**

C.K.S was a Capes-Brazil fellowship recipient of a PhD sandwich scholarship through Science without Borders Program. DSR was a CNPq-Brazil fellowship recipient. Funding was provided by USDA-ARS. USDA is an equal opportunity provider and employer.

## Acknowledgements

The authors thank Michelle Harland, Gwen Nordholm, and Zahra Olson for technical assistance and Tyler Standley, Jason Huegel, and Jason Crabtree for assistance with animal studies. Assistance with microbiologic screening from Dr. Susan Brockmeier is appreciated. Mention of trade names or commercial products in this article is solely for the purpose of providing specific information and does not imply recommendation or endorsement by the U.S. Department of Agriculture.

## References

1. **Vincent AL, Ma W, Lager KM, Janke BH, Richt JA.** 2008. Swine influenza viruses a North American perspective. *Adv Virus Res* **72**:127–154.
2. **Karasin AI, Olsen CW, Anderson GA.** 2000. Genetic characterization of an H1N2 influenza virus isolated from a pig in Indiana. *J Clin Microbiol* **38**:2453–2456.
3. **Lorusso A, Vincent AL, Harland ML, Alt D, Bayles DO, Swenson SL, Gramer MR, Russell CA, Smith DJ, Lager KM, Lewis NS.** 2011. Genetic and antigenic characterization of H1 influenza viruses from United States swine from 2008. *J Gen Virol* **92**:919–30.
4. **Vincent AL, Swenson SL, Lager KM, Gauger PC, Loiacono C, Zhang Y.** 2009. Characterization of an influenza A virus isolated from pigs during an outbreak of respiratory disease in swine and people during a county fair in the United States. *Vet Microbiol* **137**:51–59.
5. **Ma W, Vincent AL, Lager KM, Janke BH, Henry SC, Rowland RR, Hesse RA, Richt JA.** 2010. Identification and characterization of a highly virulent triple reassortant H1N1 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes* **40**:28–36.
6. **Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghvani J, Bhatt S, Peiris JSM, Guan Y, Rambaut A.** 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **459**:1122–5.
7. **Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM.** 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* **360**:2 605–2615.

8. **Nelson MI, Gramer MR, Vincent AL, Holmes EC.** 2012. Global transmission of influenza viruses from humans to swine. *J Gen Virol* **93**:2195–203.
9. **Kyriakis CS, Gramer MR, Barbé F, Van Doorselaere J, Van Reeth K.** 2010. Efficacy of commercial swine influenza vaccines against challenge with a recent European H1N1 field isolate. *Vet Microbiol* **144**:67–74.
10. **Vincent AL, Ciacci-Zanella JR, Lorusso A, Gauger PC, Zanella EL, Kehrli ME, Janke BH, Lager KM.** 2010. Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs. *Vaccine* **28**:2782–2787.
11. **Gauger PC, Vincent AL, Loving CL, Lager KM, Janke BH, Kehrli ME, Roth JA.** 2011. 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* **29**:2712–9.
12. **Gauger PC, Vincent AL, Loving CL, Henningson JN, Lager KM, Janke BH, Kehrli ME, Roth JA.** 2012. 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* **49**:900–12.
13. **Gauger PC, Loving CL, Lager KM, Janke BH, Kehrli ME, Roth JA, Vincent AL.** 2013. Vaccine-associated enhanced respiratory disease does not interfere with the adaptive immune response following challenge with pandemic A/H1N1 2009. *Viral Immunol* **26**:314–21.
14. **Khurana S, Loving CL, Manischewitz J, King LR, Gauger PC, Henningson J, Vincent AL, Golding H.** 2013. Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease. *Sci Transl Med* **5**:200–114.
15. **Anderson TK, Campbell BA, Nelson MI, Lewis NS, Janas-Martindale A, Killian ML, Vincent AL.** 2015. Characterization of co-circulating swine influenza A viruses in North America and the identification of a novel H1 genetic clade with antigenic significance. *Virus Res* **201**:24–31.
16. **Nelson MI, Stratton J, Killian ML, Janas-Martindale A, Vincent AL.** 2015. Continual Re-introduction of human pandemic H1N1 influenza A viruses into US swine, 2009-2014. *J Virol JVI.00459–15*.
17. **Nelson MI, Vincent AL.** 2015. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human–animal interface. *Trends Microbiol* **23**:142–153.
18. **Pena L, Vincent AL, Ye J, Ciacci-Zanella JR, Angel M, Lorusso A, Gauger PC, Janke BH, Loving CL, Perez DR.** 2011. Modifications in the polymerase

genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 viruses. *J Virol* **85**:456–69.

19. **Masic A, Booth JS, Mutwiri GK, Babiuk LA, Zhou Y.** 2009. Elastase-dependent live attenuated swine influenza A viruses are immunogenic and confer protection against swine influenza A virus infection in pigs. *J Virol* **83**:10198–10210.
20. **Loving CL, Lager KM, Vincent AL, Brockmeier SL, Gauger PC, Anderson TK, Kitikoon P, Perez DR, Kehrli ME.** 2013. Efficacy in pigs of inactivated and live attenuated influenza virus vaccines against infection and transmission of an emerging H3N2 similar to the 2011-2012 H3N2v. *J Virol* **87**:9895–9903.
21. **Rajão DS, Loving CL, Gauger PC, Kitikoon P, Vincent AL.** 2014. Influenza A virus hemagglutinin protein subunit vaccine elicits vaccine-associated enhanced respiratory disease in pigs. *Vaccine* **32**:5170–6.
22. **Vincent AL, Ma W, Lager KM, Richt JA, Janke BH, Sandbulte MR, Gauger PC, Loving CL, Webby RJ, García-Sastre A.** 2012. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease. *J Virol* **86**:10597–605.
23. **Gauger PC, Loving CL, Khurana S, Lorusso A, Perez DR, Kehrli ME, Roth JA, Golding H, Vincent AL.** 2014. Live attenuated influenza A virus vaccine protects against A (H1N1) pdm09 heterologous challenge without vaccine associated enhanced respiratory disease. *Virology* **471-473**:93–104.
24. **Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng XJ, Lum MA, Andrews JJ, Rathje JA.** 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol* **32**:648–660.
25. **Vincent LL, Janke BH, Paul PS, Halbur PG.** 1997. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest* **195**:191–195.
26. **Opriessnig T, Yu S, Gallup JM, Evans RB, Fenaux M, Pallares F, Thacker EL, Brockus CW, Ackermann MR, Thomas P, Meng XJ, Halbur PG.** 2003. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol* **40**:521-9.
27. **Kitikoon P, Nilubol D, Erickson BJ, Janke BH, Hoover TC, Sornsen SA, Thacker EL.** 2006. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* **112**:117–128.

28. **Reed LJ, Muench H.** 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* **27**:493–497.
29. **Cox N, Webster RG, Krauss S, Guan Y, Hay A, Yu K, Shortridge K, Peiris M, Kida H, Brown I, Stöhr K.** 2005. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, 2nd edition. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev 1 94 pages.
30. **Kitikoon P, Gauger PC, Vincent AL.** 2014. Hemagglutinin Inhibition assay with swine sera. *Methods Mol Biol* **1161**:295–301.
31. **Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, Sessions WM, Xu X, Skepner E, Deyde V, Okomo-Adhiambo M, Gubareva L, Barnes J, Smith CB, Emery SL, Hillman MJ, Rivaller P, Smagala J, de Graaf M, Burke DF, Fouchier R AM, Pappas C, Alpuche-Aranda CM, López-Gatell H, Olivera H, López I, Myers CA, Faix D, Blair PJ, Yu C, Keene KM, Dotson PD, Boxrud D, Sambol AR, Abid SH, St George K, Bannerman T, Moore AL, Stringer DJ, Blevins P, Demmler-Harrison GJ, Ginsberg M, Kriner P, Waterman S, Smole S, Guevara HF, Belongia EA, Clark PA, Beatrice ST, Donis R, Katz J, Finelli L, Bridges CB, Shaw M, Jernigan DB, Uyeki TM, Smith DJ, Klimov AI, Cox NJ.** 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* **325**:197–201.
32. **Van Reeth K, Brown I, Essen S, Pensaert M.** 2004. Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs *Virus Res* **103**:115–124.
33. **Ma W, Lager KM, Vincent AL, Janke BH, Gramer MR, Richt JA.** 2009. The role of swine in the generation of novel influenza viruses. *Zoonoses Public Health* **56**:326–37.
34. **Chen GL, Subbarao K.** 2014. Live attenuated vaccines for pandemic influenza. *Cur Top Microbiol Immunol* **386**:181-204.
35. **CDC.** 2013. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices--United States, 2013-2014. *MMWR* **62**:1,5,28.
36. **Richt JA, García-Sastre A.** 2009. Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins. *Cur Top Microbiol Immunol* **333**:177-95.
37. **Hughes HR, Vincent AL, Brockmeier SL, Gauger PC, Pena L, Santos J, Braucher DR, Perez DR, Loving CL.** 2015. Oral fluids as a live-animal sample for evaluating cross-reactivity and cross-protection following intranasal influenza A virus vaccination in pigs. *Clin Vaccine Immunol* **CVI 00358-15**.

38. **Heinen PP, Boer-luijtze EA De, Bianchi ATJ.** 2001. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. *J Gen Virol* **82**:2697–2707.
39. **Loving CL, Vincent AL, Pena L, Perez DR.** 2012. Heightened adaptive immune responses following vaccination with a temperature-sensitive, live-attenuated influenza virus compared to adjuvanted, whole-inactivated virus in pigs. *Vaccine* **30**:5830–5838.
40. **Braucher DR, Henningson JN, Loving CL, Vincent AL, Kim E, Steitz J, Gambotto AA, Kehrli ME.** 2012. Intranasal vaccination with replication-defective adenovirus type 5 encoding influenza virus hemagglutinin elicits protective immunity to homologous challenge and partial protection to heterologous challenge in pigs. *Clin Vaccine Immunol* **19**:1722–9.
41. **Vella S, Rocchi G, Resta S, Marcelli M, De Felici A.** 1980. Antibody reactive in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity following influenza virus vaccination. *J Med Virol* **6**:203–211.
42. **Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M, Bachmann MF.** 2002. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nat Med* **8**:373–378.
43. **Julkunen I, Melén K, Nyqvist M, Pirhonen J, Sareneva T, Matikainen S.** 2000. Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine* **19 Suppl 1**:S32–S37.
44. **Barbé F, Atanasova K, Van Reeth K.** 2011. Cytokines and acute phase proteins associated with acute swine influenza infection in pigs. *Vet J* **187**:48–53.
45. **Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M.** 1998. Bronchoalveolar interferon-alpha, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and inflammation during acute influenza in pigs: a possible model for humans? *J Infect Dis* **177**:1076–1079.
46. **Van Reeth K, Van Gucht S, Pensaert M.** 2002. Correlations between lung proinflammatory cytokine levels, virus replication, and disease after swine influenza virus challenge of vaccination-immune pigs. *Viral immunol* **15**:583–94.



## Tables and Figures

TABLE 1. Experimental designs of study 1 and 2.

| <b>Study 1</b> |          |                          |                             |                        |                        |                     |                         |
|----------------|----------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------|
| <b>Group</b>   | <b>N</b> | <b>Vaccine / valency</b> | <b>Vaccine virus</b>        | <b>Challenge virus</b> | <b>Age* at priming</b> | <b>Age at boost</b> | <b>Age at challenge</b> |
| MN08-TX98      | 5        | WIV bivalent             | MN08 (H1N2)<br>TX98 (H3N2)  | CA09 (pH1N1)           | 4                      | 7                   | 10                      |
| MN08-CA09      | 5        | WIV bivalent             | MN08 (H1N2)<br>CA09 (pH1N1) | CA09 (pH1N1)           | 4                      | 7                   | 10                      |
| 3wpb-MN08      | 8        | WIV monovalent           | MN08 (H1N2)                 | CA09 (pH1N1)           | 4                      | 7                   | 10                      |
| 6wpb-MN08      | 6        | WIV monovalent           | MN08 (H1N2)                 | CA09 (pH1N1)           | 4                      | 7                   | 13                      |
| NV/C           | 8        | none                     | none                        | CA09 (pH1N1)           | n.d.                   | n.d.                | 10                      |
| NV/NC          | 8        | none                     | none                        | n.d.                   | n.d.                   | n.d.                | n.d.                    |
| <b>Study 2</b> |          |                          |                             |                        |                        |                     |                         |
| WIV-4/7        | 10       | WIV monovalent           | MN08 (H1N2)                 | CA09 (pH1N1)           | 4                      | 7                   | 15                      |
| WIV-9/12       | 10       | WIV monovalent           | MN08 (H1N2)                 | CA09 (pH1N1)           | 9                      | 12                  | 15                      |
| LAIV-4/7       | 10       | LAIV monovalent          | MN08 (H1N2)                 | CA09 (pH1N1)           | 4                      | 7                   | 15                      |
| NV/C           | 10       | none                     | none                        | CA09 (pH1N1)           | n.d.                   | n.d.                | 15                      |
| NV/NC          | 6        | none                     | none                        | n.d.                   | n.d.                   | n.d.                | n.d.                    |

n.d. = not done

\*Age in weeks

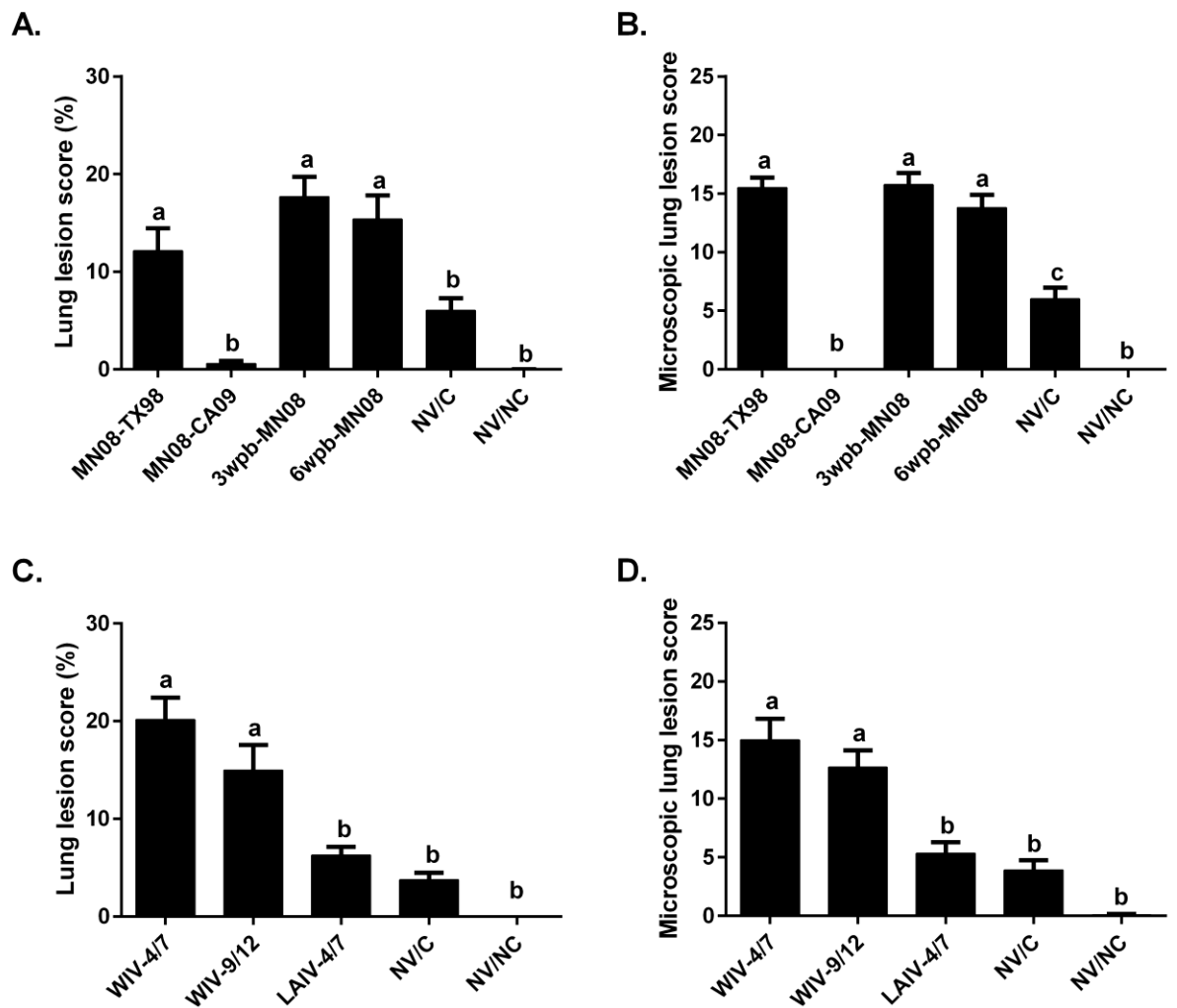


FIG 1. Macroscopic and microscopic lung lesions. Study 1: vaccinated pigs with bivalent MN08-TX98 and monovalent MN08 3 and 6 wpb showed significantly higher percentage of macroscopic (A) and microscopic lung lesions (B) with a subsequent heterologous challenge (CA09) compared with controls. Study 2: vaccinated pigs with WIV-4/7 and WIV-9/12 showed significantly higher percentage of macroscopic (C) and microscopic (D) lung lesions with a subsequent heterologous challenge compared with

controls. Statistically significant differences between treatment groups and controls are identified by different lowercase letters ( $P \leq 0.05$ ).

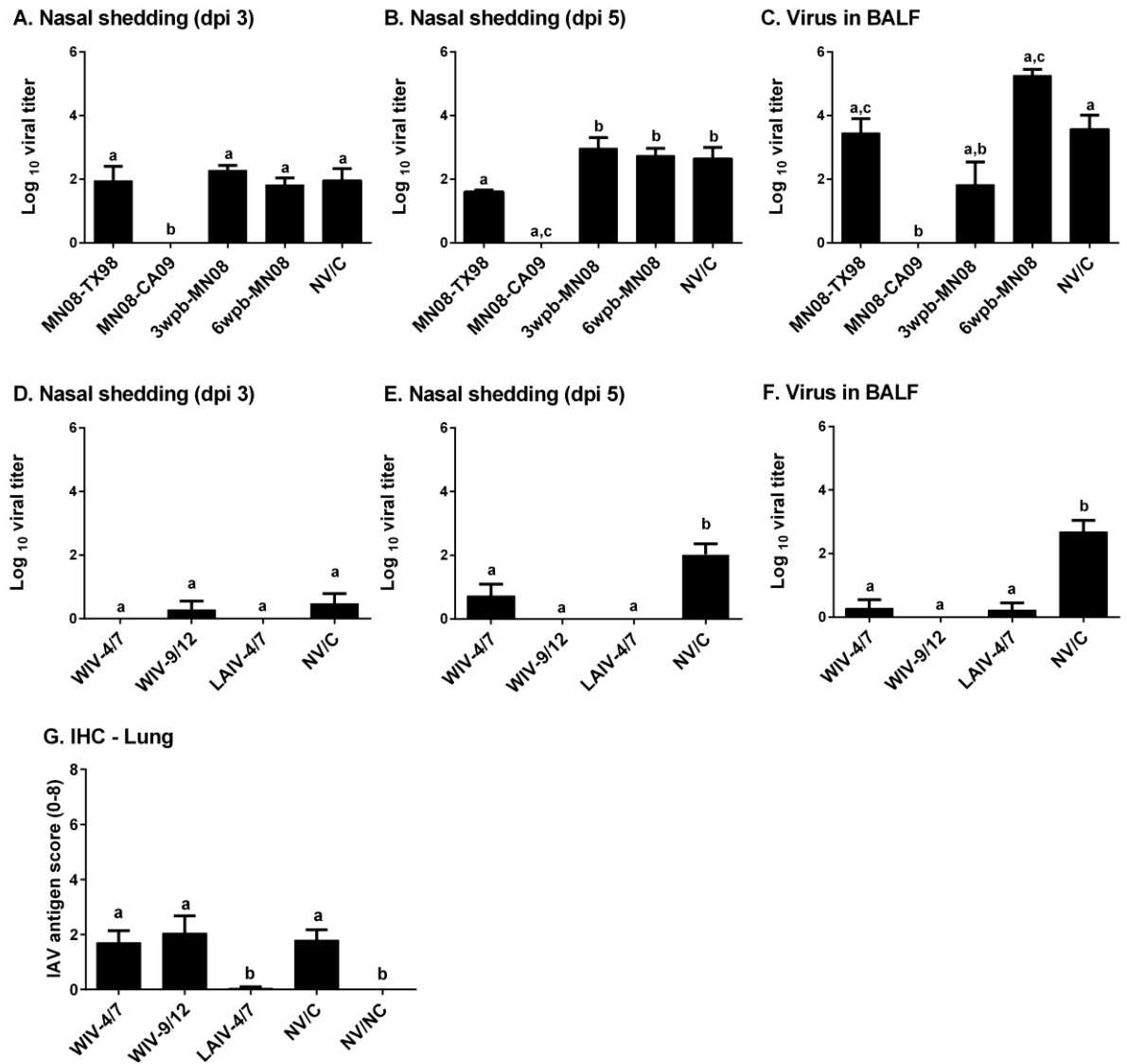


FIG 2. Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> virus titers in vaccinated/challenged pigs compared with controls (NV/C) in nasal swabs at 3 dpi (A and D) and 5 dpi (B and E) and in the lungs (BALF) (C and F) in Study 1 (A-C) and Study 2 (D-F). Immunohistochemical (IHC) staining for IAV antigen (G) confirmed infection due to low virus titers recovered from the 15

week-old-pigs in study 2. Statistically significant differences between treatment groups and controls are identified by different lowercase letters ( $P \leq 0.05$ ).

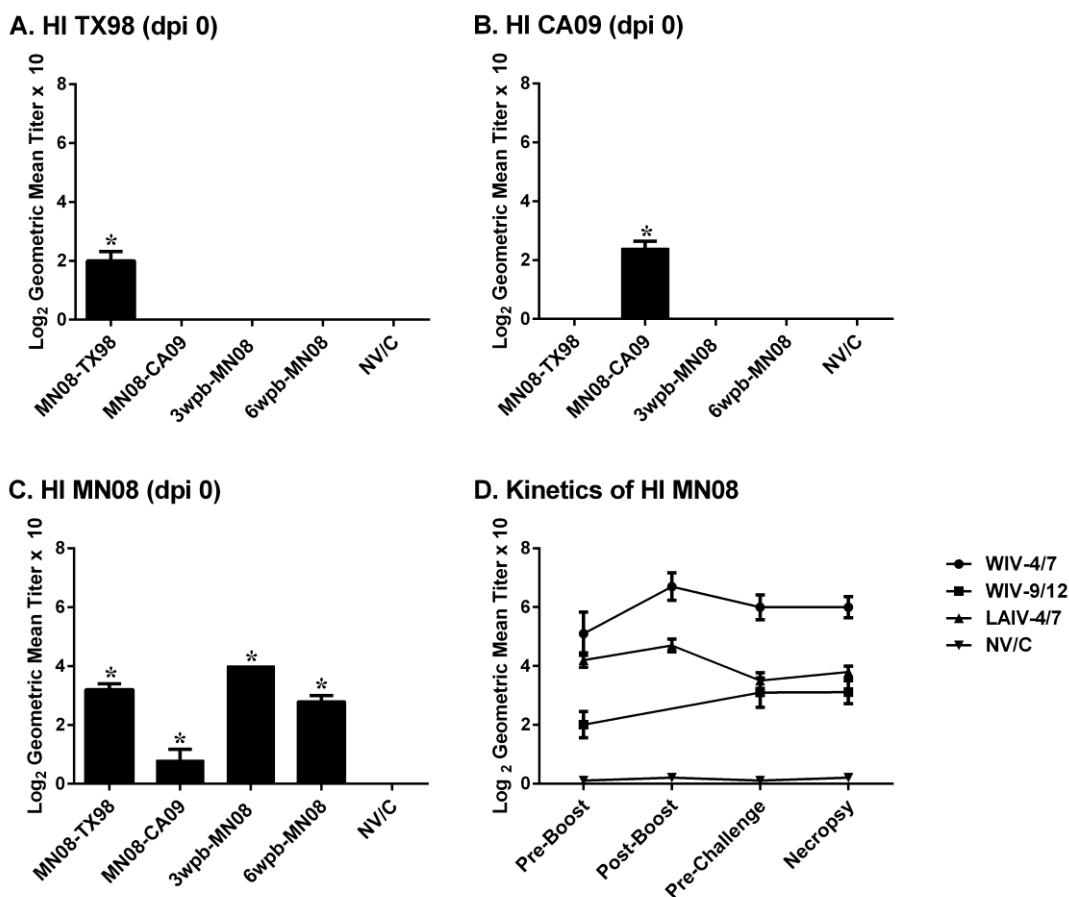


FIG 3. Log<sub>2</sub> serum antibody hemagglutination inhibition (HI) geometric mean reciprocal titers after vaccination with WIV at pre challenge Study 1: (A) TX98 (H3N2) HI response detected in bivalent MN08-TX98 group. (B) CA09 (pH1N1) response detected only in the bivalent MN08-CA09 group. (C) MN08 (H1N2) HI response was significantly higher in all vaccinated groups compared to controls (NV/C). Study 2: (D) Kinetics of HI antibody log<sub>2</sub> response to the vaccine virus strain (MN08) starting at pre-

boost until the time of necropsy. The first name in the *X* axis is related to the immunization of WIV-4/7 and LAIV-4/7 groups and the second name is related to WIV-9/12 group. WIV-4/7 group had significantly higher HI titers at each bleeding post-priming compared to WIV-9/12 and LAIV-4/7 groups (indicated with lowercase a). Statistical differences between treatment groups compared to controls (NV/C) are indicated with asterisks in each timepoint ( $P \leq 0.05$ ).

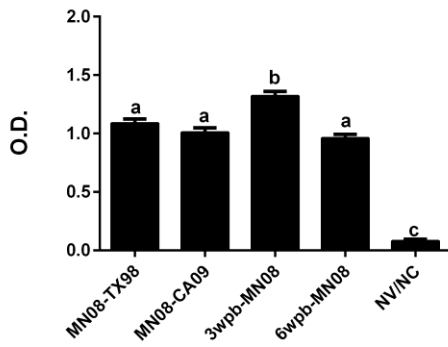
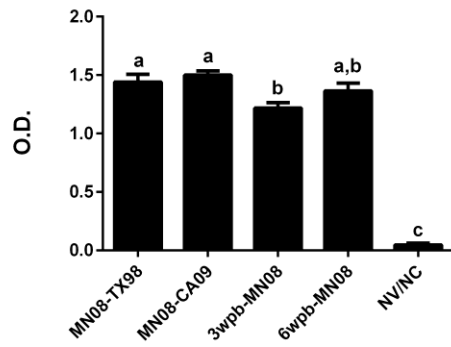
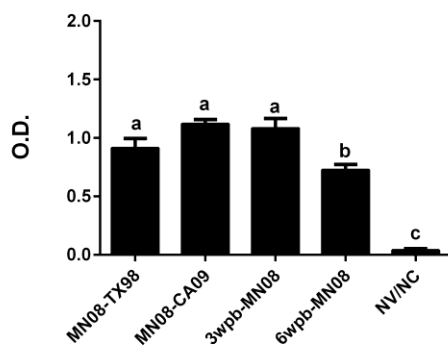
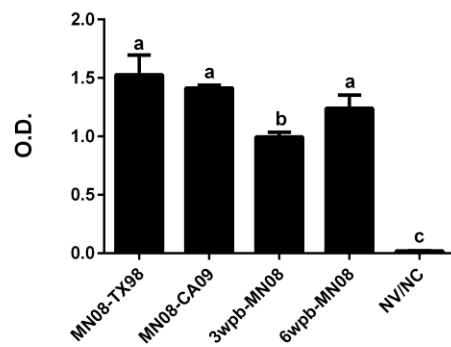
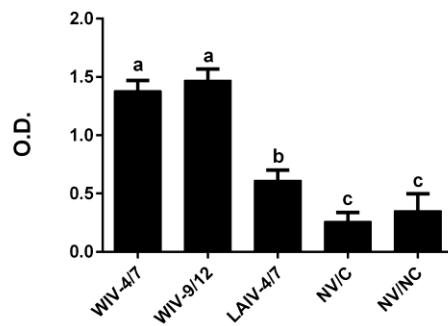
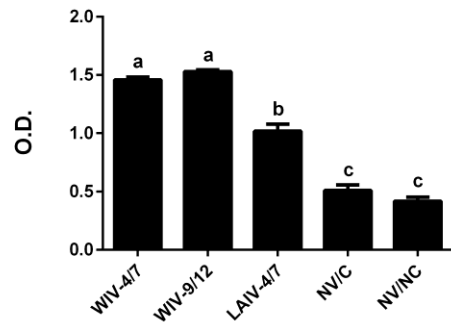
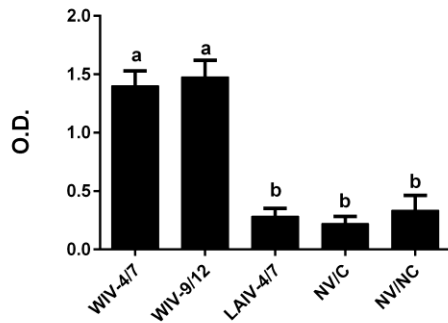
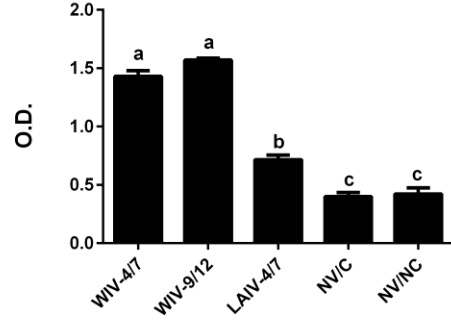
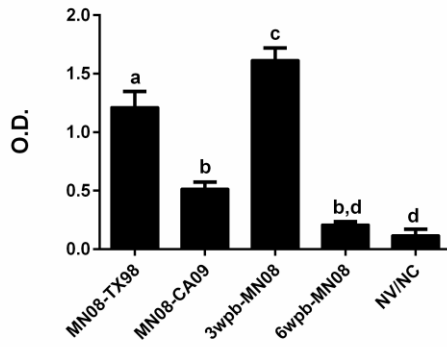
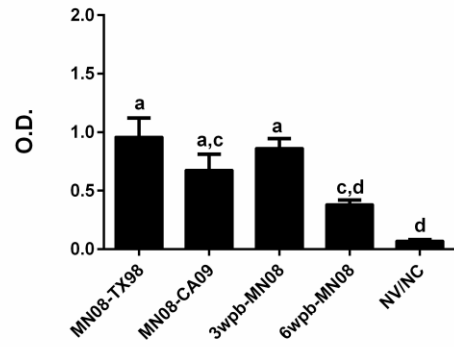
**A. Anti-MN08 IgG (0 dpi)****B. Anti-MN08 IgG (5 dpi)****C. Anti-CA09 IgG (0 dpi)****D. Anti-CA09 IgG (5 dpi)****E. Anti-MN08 IgG (0 dpi)****F. Anti-MN08 IgG (5 dpi)****G. Anti-CA09 IgG (0 dpi)****H. Anti-CA09 IgG (5 dpi)**

FIG 4. Systemic IgG response following bivalent and monovalent WIV and LAIV vaccination. Study 1: Serum anti-MN08 IgG levels prior to challenge (A) and post-challenge (B). Cross-reactive serum anti-CA09 IgG levels prior to challenge (C) and post-challenge (D). Study 2: Serum anti-MN08 IgG levels prior to challenge (E) and post challenge (F). Cross reactive serum anti-CA09 IgG levels prior to challenge (G) and post challenge (H). Statistically significant differences between treatment groups and controls are identified by different lowercase letters ( $P \leq 0.05$ ).

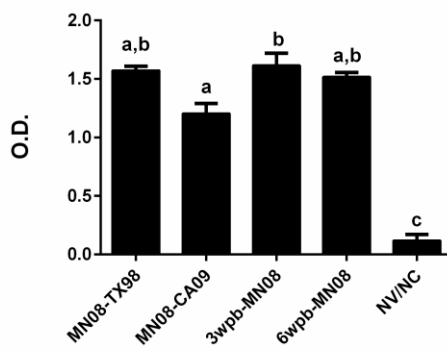
A. Anti-MN08 IgA



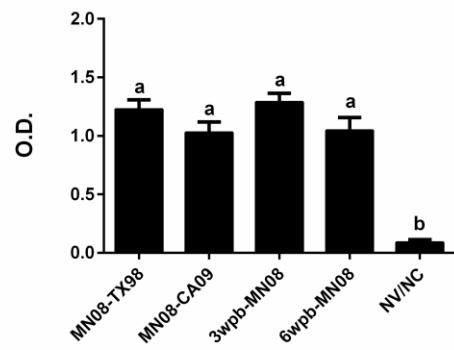
B. Anti-CA09 IgA



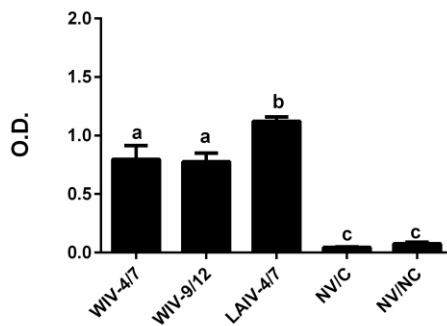
C. Anti-MN08 IgG



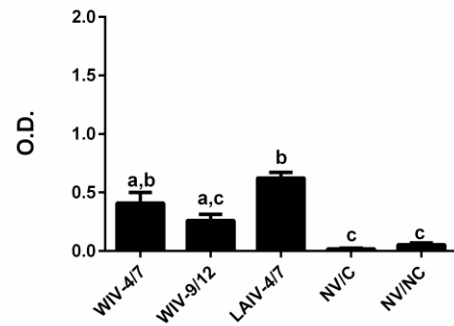
D. Anti-CA09 IgG



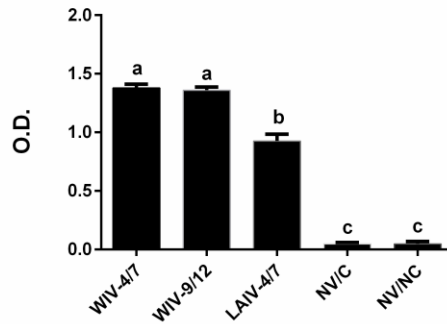
E. Anti-MN08 IgA



F. Anti-CA09 IgA



G. Anti-MN08 IgG



H. Anti-CA09 IgG

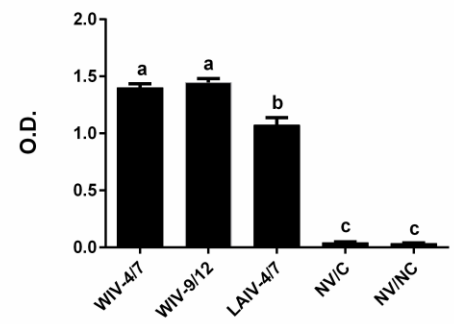




FIG 5. Mucosal IAV-specific IgA and IgG in pigs vaccinated with bivalent, monovalent WIV and LAIV. Pigs were vaccinated and challenged as described in the materials and methods, and BALF was collected at dpi 5 to evaluate IgA and IgG specific to indicated virus (MN08 vaccine virus or CA09 challenge virus) Study 1: Levels of anti-MN08 IgA (A), anti-CA09 IgA (B), anti-MN08 IgG (C) and anti-CA09 IgG (D). Study 2: Levels of anti-MN08 IgA (E) and anti-CA09 IgA antibody (F), anti-MN08 IgG (G) and anti-CA09 IgG (H). Statistically significant differences between treatment groups and controls are identified by different lowercase letters ( $P \leq 0.05$ ).

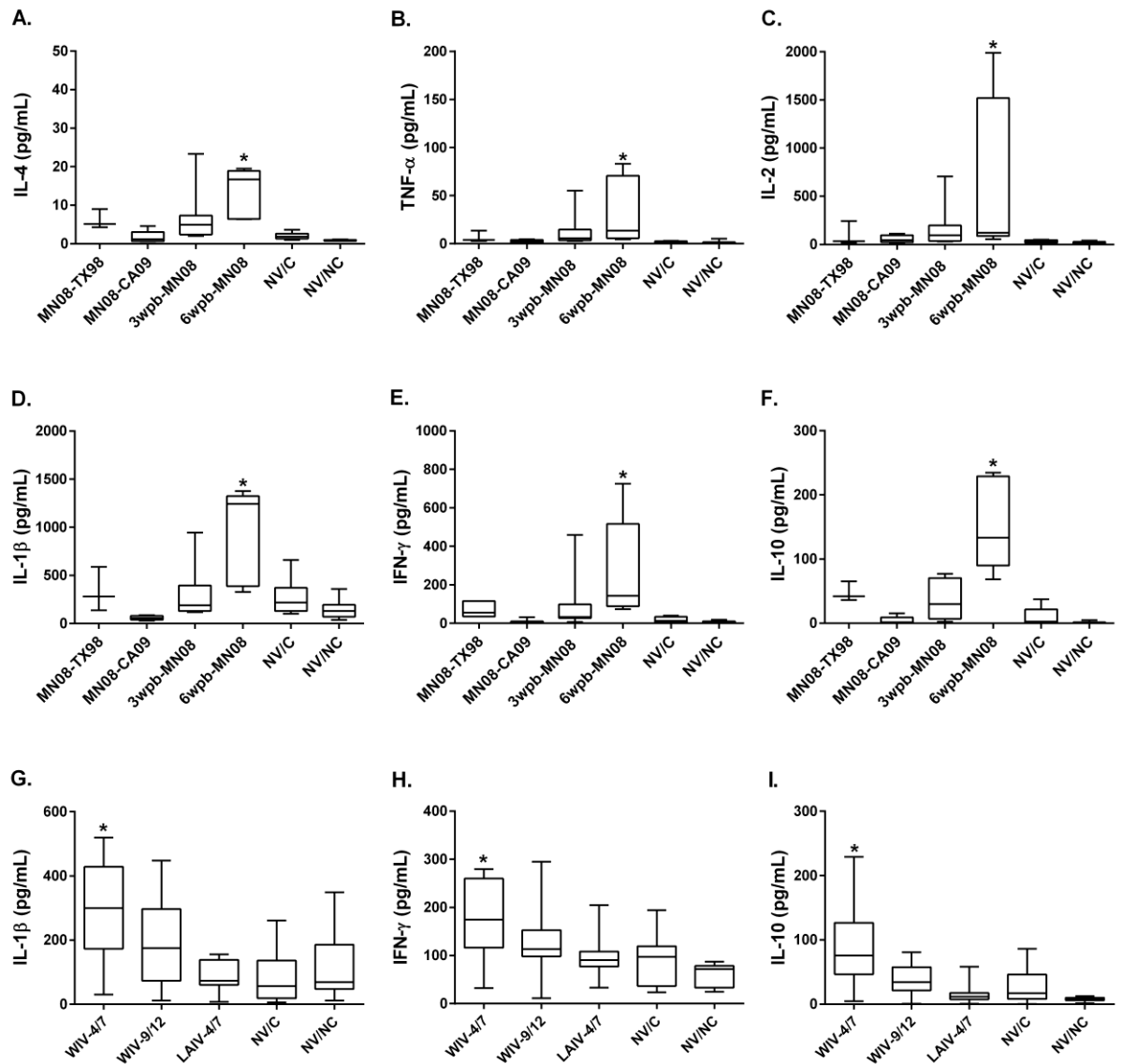


FIG 6. Study 1: Cytokine protein concentrations (pg/mL) in BALF (5 dpi) of pigs vaccinated with bivalent (MN-TX09 and MN08-CA09) and monovalent 3 or 6wpb-MN08, challenged with pH1N1. IL-4 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-2 (C), IL-1 $\beta$  (D) IFN- $\gamma$  (E) and IL-10 (F). Study 2: IL-1 $\beta$  (G), IFN- $\gamma$  (H) and IL-10 (I) protein concentrations (pg/mL) in cell-free BALF (5 dpi) of vaccinated and pH1N1-challenged groups and control groups (NV/C; NV/NC). Data presented as box plots demonstrating the median

cytokine concentration (pg/ml) per group with the 5th and 95th percentile and standard deviation. Statistical differences ( $p < 0.05$ ) of vaccinated groups compared to controls are shown with asterisks.

#### **4. Manuscrito 2**

**The impact of adjuvant in whole inactivated Virus (WIV) vaccine on influenza A infection in vaccine-associated enhanced respiratory disease (VAERD) affected pigs**

---

O artigo será submetido à revista Vaccine.

**The impact of adjuvant in whole inactivated Virus (WIV) vaccine on influenza A infection in vaccine-associated enhanced respiratory disease (VAERD) affected pigs**

Carine K. Souza<sup>1,2</sup>, Daniela S. Rajão<sup>1</sup>, Crystal L. Loving<sup>1</sup>, Phillip C. Gauger<sup>3</sup>, Cláudio W. Canal<sup>2</sup>, Amy L. Vincent<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Virus and Prion Research Unit, USDA-ARS, 1920 Dayton Avenue, P.O. Box 70, Ames, IA 50010, USA; <sup>2</sup>Laboratório de Virologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP: 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. <sup>3</sup>Iowa State University -ISU, Ames, IA 50010.

Corresponding author: Amy L. Vincent, Virus and Prion Research Unit, USDA-ARS, 1920 Dayton Avenue, P.O. Box 70, Ames, IA 50010, USA, [amy.vincent@ars.usda.gov](mailto:amy.vincent@ars.usda.gov)

Running Title: The type of adjuvant in whole inactivated influenza A vaccine changes the outcome of vaccine-associated enhanced respiratory disease (VAERD) in pigs.

Keywords: vaccine, influenza, swine, adjuvant, respiratory disease

## Abstract

Whole inactivated virus (WIV) vaccines reduce clinical disease against homologous influenza A virus (IAV) infection; however, WIV formulated with oil-in-water (OW) emulsion adjuvants are correlated with vaccine-associated enhanced respiratory disease (VAERD) in swine when challenged with mismatched heterologous IAV of the same hemagglutinin subtype. The aim of this study was to investigate if different adjuvants in IAV WIV vaccine formulation interfere with VAERD. Pigs were vaccinated with WIV containing swine 1 $\delta$ -cluster H1N2 that were formulated with five different commercially available adjuvants: Oil in water OW1, OW2 emulsions, nano-emulsion squalene based (NE), gel polymer (GP), and aqueous immunostimulating particulate (IMP). Pigs were vaccinated with 2 doses, 3 weeks apart, by the intramuscular route with WIV (in OW1, OW2, NE, and GP) or intranasally (WIV-IMP). Five days post challenge with H1N1pdm09 virus, WIV-OW1 and WIV-OW2 groups had significantly higher percentages of macroscopic lung lesions consistent with VAERD (22.1% and 21.7%) when compared to the non-vaccinated and challenged (NV/C) controls (6.1%), WIV-NE (11.3%), WIV-GP (9.3%), and WIV-IMP (8.1%). Prior to challenge, WIV-OW1 and WIV-OW2 groups had also significantly higher geometric mean titers (GMT) against the vaccine strain in hemagglutination inhibition (HI) assays (640 $\pm$ 13 and 1371 $\pm$ 12). WIV-NE and WIV-GP groups had GMT of 149 $\pm$ 13 and 184 $\pm$ 13. The WIV-IMP group had non-detectable GMT and was not evaluated in the VAERD model. None of the groups had cross-reactive antibodies against the challenge strain. In general, WIV-OW, NE and GP groups had IgG levels significantly higher against homologous and heterologous virus in serum and BALF; so presence of total virus IgG alone did not explain the different challenge outcomes. Adjuvant played a significant role in WIV immunogenicity and altered the VAERD outcome; however the mechanisms involved require further investigation.

## Introduction

Vaccination is broadly used to control Influenza A virus (IAV) in the swine industry of United States and Europe. The currently used vaccines against IAV available in the market are mainly whole inactivated virus (WIV), which are formulated with adjuvants based on oil in water (OW) emulsions (REETH; MA, 2013). Adjuvants are components widely used in vaccine formulation to modulate antigen-specific immune response by magnifying and/or shaping Th1 or Th2 immune response (EGLI et al., 2014). A robust T helper 2 (Th2) response provides protection through hemagglutinin (HA) specific antibodies that neutralize the IAV (NAUTA; BEYER; OSTERHAUS, 2009). The cellular mediated immune response may play a role by providing partial protection against antigenically distinct IAV (HEINEN; BOER-LUIJTZE; BIANCHI, 2001). The currently WIV-OW vaccines for IAV used in pigs can elicit protective immune response against homologous and antigenically related IAV strains (VINCENT et al., 2010b). However, due to the introduction of the pandemic H1N1 in 2009 (H1N1pdm09) and the recurrent introduction of human seasonal viruses to pigs resulted in the co-circulation of antigenically drifted IAV in U.S. swine population (MA et al., 2009; NELSON et al., 2014a; VINCENT et al., 2008b). The IAV cross-protection by the use of the currently available WIV vaccines in pigs can be limited (LOVING et al., 2013b; VINCENT et al., 2010b).

Recently studies reproduced an enhancement of respiratory disease when pigs were vaccinated with a monovalent WIV containing  $\delta 1$ -cluster H1N2 followed by a heterologous challenge containing the same hemmagglutinin subtype, as H1N1pdm09 (GAUGER et al., 2011, 2012, 2013). The pathology observed in vaccine associated

enhanced respiratory disease (VAERD) affected pigs was characterized by severe bronchointerstitial pneumonia with necrotizing bronchiolitis, and peribronchiolar lymphocytic cuffing (GAUGER et al., 2012, 2013). Although the mechanism responsible for the development of VAERD is not completely understood, some features have been recognized like the presence of non-neutralizing IgG antibodies that cross-react with the heterologous virus (GAUGER et al., 2012, 2013). Moreover, an HA epitope mapping of these non-neutralizing antibodies showed that they were targeted to the conserved HA2 stalk domain of the heterologous virus and in vitro assays showed an enhancement of virus infectivity by promoting virus membrane fusion activity (KHURANA et al., 2013). Pro-inflammatory cytokine dysregulation was also implicated in VAERD (GAUGER et al., 2013).

There is a need to improve IAV vaccines for pigs that protect against heterologous infection without resulting in VAERD. Although these outcomes were demonstrated in the reported VAERD model in the context of WIV-OW vaccination, it is not known if different adjuvants combined with the same virus antigen in WIV formulations would have an impact on the development of VAERD. So, the aim of the present study was to assess if the use of different adjuvants in IAV WIV vaccine formulation would alter the VAERD outcome.

## **Material and Methods**

### ***Viruses and vaccines***

The IAV strain A/sw/MN/02011/08 H1N2 ( $\delta$ 1-H1N2) was grown in Madin-Darby canine kidney cells with OptiMEM. Infected cultures were clarified and inactivated by UV irradiation using the “sterilize” setting in a UV cross-linking chamber (GS Gene Linker; Bio-Rad, Hercules, CA). Each dose of WIV contained approximately



128 hemagglutination units (HAU) of the virus as previously described (VINCENT et al., 2010b). Five commercial adjuvants were used in the vaccine formulations with the adjuvant proportion following the recommendations of the manufacturer (Table 1) and stored at 4°C.

Pigs were obtained from a herd free of IAV and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) at approximately three weeks of age. Upon arrival, pigs were treated prophylactically with ceftiofur (Pfizer Animal Health, New York, NY) according to label directions to reduce potential respiratory bacterial pathogens. Pigs were housed in biosafety level 2 (BSL2) containment during the vaccination and challenge phases of the study. Pigs were cared for in compliance with the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the National Animal Disease Center (NADC).

Prior to vaccination, pigs were screened for antibody against IAV nucleoprotein (NP) by ELISA (MultiS ELISA, IDEXX, Westbrook, Maine) to ensure absence of preexisting antibodies due to prior exposure or passively acquired maternal antibodies. Fifty pigs were randomly split into five vaccinated groups of 10 pigs each, and were vaccinated with 2 mL of WIV with adjuvant: OW1, OW2, nano-emulsion (NE), gel polymer (GP) or aqueous immunostimulating particulate (IMP) at 4 weeks of age and boosted at 7 weeks of age. Fifteen additional pigs were included as non-vaccinated, challenged (NV/C) and non-vaccinated, non-challenged (NV/NC) control groups. At 10 weeks of age, pigs were challenged with 2 mL of  $10^5$  tissue cell infectious dose (TCID<sub>50</sub>) of pandemic A/CA/04/2009 H1N1. Five days post infection pigs were humanely euthanized with a lethal dose of pentobarbital (Fatal Plus, Vortech, Dearborn, MI).

Bronchoalveolar fluid (BALF) samples were collected at necropsy. In order to assess if the pigs presented concurrent bacterial pneumonia, BALF samples were cultured for aerobic bacteria on blood agar and Casmin (NAD enriched) plates. In addition, polymerase chain reaction (PCR) assays for porcine circovirus type 2 (PCV2) (OPRIESSNIG et al., 2003), *Mycoplasma hyopneumoniae* (STRAIT et al., 2008) and RT-PCR for PRRSV were conducted on BALF nucleic acid extracts. Commercial PCR assay for PRRSV was conducted with the NA and EUPRRSV-specific PCR assay (Life Technologies, Carlsbad, CA), according to manufacturer's recommendations for serum.

#### ***Evaluation of macroscopic and microscopic pneumonia***

Lungs were removed at necropsy on 5 dpi and evaluated for the percentage of the lung affected with purple-red consolidation typical of IAV in swine. The percentage of the surface area affected with pneumonia was visually estimated for each lung lobe, and total percentage for the entire lung was calculated based on weighted proportions of each lobe to the total lung volume, as previously reported (GAUGER et al., 2012). Tissue samples from the trachea and the right middle or affected lung lobe were fixed in 10% buffered formalin for histopathologic examination. Tissues were processed by routine histopathologic procedures and slides were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or immunohistochemistry (IHC). Slides were evaluated by a veterinary pathologist blinded to treatment group and microscopic lesion severity was scored as previously described (GAUGER et al., 2012).

#### ***Hemagglutination Inhibition and ELISA assays***

Serum samples from all groups were collected prior to the first vaccination, at the boost, at pre-challenge and at 5 dpi. Sera were heat inactivated at 56°C for 30 min and hemagglutination inhibition (HI) assays were conducted with both  $\delta$ 1-H1N2 or

H1N1pdm09 viruses as antigens and turkey red blood cells (RBCs) following a standard HI protocol (KITIKOON P, GAUGER PC, 2014). HI titers were divided by 10 and  $\log_2$  transformed, analyzed, and reported as the geometric mean titer (GMT).

In order to detect IAV specific  $\delta$ 1-H1N2 and H1N1pdm09 antibodies isotypes (IgA or IgG), independent ELISAs were conducted using whole virus preparations. Immulon-2HB 96-well plates (Dynex, Chantilly, VA) were coated with 100 HA units/50  $\mu$ L of  $\delta$ 1-H1N2 or H1N1pdm09 virus diluted in a coating solution (Kirkegaard & Perry Laboratories - KPL, Gaithersburg, MD) following manufacture recommendation's. Both viruses were previously grown in MDCK cells with serum-free OptiMEM. The whole virus coated plates were incubated at room temperature overnight. Plates were blocked for 1 h at room temperature with 150  $\mu$ l of starting block (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) and washed 3 times with 200  $\mu$ l of 0.05% Tween 20 in phosphate-buffered saline (PBS-T). Sera was diluted in PBS at 1:2000 as previously described (GAUGER et al., 2012). BALF samples were incubated at 37°C for 1 h with an equal volume of 10 mM dithiothreitol (DTT) to disrupt mucus and diluted 1:4 in PBS. Plates were incubated at room temperature for 1 h and washed 3 times with PBS-T. Fifty microliters of peroxidase-labeled goat anti-swine IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories - KPL, Gaithersburg, MD) or anti-swine IgA (Bethyl, Montgomery, TX) diluted 1:1500 in Starting Block was added to each well for 1 h at room temperature. Plates were washed 3 times with PBS-T prior to adding 50  $\mu$ l of 2,2'-azino-di 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS)-peroxide as the substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories - KPL, Gaithersburg, MD) for 8–10 minutes and the subsequent addition of 50  $\mu$ l KPL Stop Solution (Kirkegaard & Perry Laboratories - KPL, Gaithersburg, MD). The optical density (OD) was measured at 405 nm

wavelength with an automated ELISA reader. Antibody levels were reported as the mean OD for each duplicate sample and the mean of each group was compared.

### ***Interferon- $\gamma$ ELISpot assay***

Blood samples were collected using sodium citrate CPT tubes (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ), at the 1 week post-boost and at pre-challenge time points. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated according to the manufacturer's recommendations (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ). The PBMC were stimulated with  $\delta$ 1-H1N2 and H1N1pdm09 viruses, positive control (Pokeweed mitogen) or sham to evaluate the number of interferon-gamma secreting cells (IFN- $\gamma$  SCs) in the ELISpot assay (porcine IFN- $\gamma$  ELISpot assay, R&D systems, Minneapolis, MN) as previously described (LOVING et al., 2012a). Plates were scanned and spots enumerated using CTL-ImmunoSpot® S5 UV Analyzer and ImmunoSpot 5 software. The reported values were calculated from the average number of spots counted for duplicated wells receiving virus subtracted by the number of the mock stimulated wells.

### ***Virus titration in lung and nasal samples***

In order to evaluate virus shedding and replication in the lungs, nasal swabs at 0, 1, 3 and 5 dpi and BALF samples were submitted to virus titration assay on MDCK cells, as previously described (VINCENT et al., 2008b). MDCK-inoculated monolayers were evaluated for cytopathic effect (CPE) between 48 and 72 h post-infection and subsequently fixed with 4% phosphate-buffered formalin and stained using immunocytochemistry (ICC) with anti-influenza A nucleoprotein monoclonal antibody (VINCENT et al., 1997). The TCID<sub>50</sub> was calculated for each sample (REED; MUENCH, 1938).

### ***Statistical analysis***

Lung lesions scores,  $\log_{10}$  transformed virus titers,  $\log_2$  HI titers, mean OD ELISA IgA and IgG antibody levels and cytokine concentrations were analyzed using analysis of variance (ANOVA) with a p value  $\leq 0.05$  considered significant (GraphPad Prism Version 5.00, San Diego, CA). Response variables shown to have a significant effect in each treatment group were subjected to pair-wise comparison using the Tukey-Kramer test.

## **Results**

### ***Macroscopic and microscopic lung lesions***

All pigs were free from influenza A NP specific antibodies prior to vaccination. At 5 dpi, bacterial pathogens were not detected in the lungs and the pigs were negative for PRRSV, PCV2, and *M. hyopneumoniae* nucleic acids in BALF. At necropsy, lungs of the WIV-vaccinated pigs with OW1 (avg: 22.1%) and OW2 (avg: 21.7%) with a subsequent heterologous challenge (H1N1pdm09) had significantly higher percentages of macroscopic lung lesions when compared to NV/C controls (6.1%). In contrast, NE (avg: 11.3%), GP (avg: 9.3%), and IMP (avg: 8.1%) groups displayed macroscopic lung lesions equivalent to the NV/C controls (avg: 6.1%) (Figure 1A). In the microscopic lesions, OW1 (avg: 14.4%) and OW2 (avg: 14.6%) with a subsequent heterologous challenge (H1N1pdm09) had significantly higher percentages of macroscopic lung lesions when compared to NV/C controls (5.1%) Despite NE (avg: 10.7%) had percentage of microscopic lesions similar to OW group, NE was not significantly different from GP (avg: 7.8%), IMP (avg: 8.3%) groups and NV/C control (avg: 6.1%) (Figure 1B).

### ***Whole virus anti- $\delta$ 1-H1N2 and cross-reactive anti-H1N1pdm09 IgG responses in serum***

Anti- $\delta$ 1-H1N2 and cross-reactive anti-H1N1pdm09 IgG levels were evaluated in serum pre- and post-challenge. WIV-OW1, OW2, NE and GP groups had significantly higher anti- $\delta$ 1-H1N2 IgG levels compared to controls, but OW1 and OW2 had significantly higher anti- $\delta$ 1-H1N2 IgG levels when compared to other groups at 0 and 5 dpi (Figure 2A and 2B). In contrast, cross-reactive anti-H1N1pdm09 IgG levels at pre and post-challenge were also observed in these four vaccinated groups (OW1, OW2, NE and GP) when compared to controls (Figure 2C and D).

### ***HI antibody response***

Prior to challenge, WIV-OW1, OW2, NE and GP groups showed significantly higher HI titers against the vaccine strain ( $\delta$ 1-H1N2) when compared to controls. HI titers of these groups remained significantly higher at 5 dpi when compared to controls, with elevated titers in OW1 and GP groups (Figure 2E). The intranasal WIV-IMP group did not show detectable HI titers against the vaccination pre and post-challenge phase of the study. None of the vaccinated groups had detectable cross-reactive HI antibodies against the heterologous challenge virus (H1N1pdm09). NV/C and NV/NC groups HI mean titers remained below the cut-off against both antigens tested.

### ***Local IgA and IgG anti- $\delta$ 1-H1N2 and cross-reactive anti-H1N1pdm09 antibody responses***

BALF samples were collected at 5 dpi to assess local humoral responses post challenge. Anti- $\delta$ 1-H1N2 IgA levels was significantly higher in the WIV-OW1, OW2, NE and GP groups when compared to controls and IMP group (Figure 3A). In contrast, cross-reactive anti-H1N1pdm09 IgA response was not detected in BALF (Figure 3B). In

addition, these groups (WIV-OW1, OW2, NE and GP) showed IgG anti- $\delta$ 1-H1N2 and cross-reactive anti-H1N1pdm09 response significantly higher compared to controls, with significant increased levels in WIV-OW1 and OW2 groups (Figure 3C and D). NW samples were also collected to investigate mucosal antibody response, mainly the intranasal group, WIV-IMP. Levels of IgA anti  $\delta$ 1-H1N2 were significantly higher at 1 wpb in NW in WIV-OW1, WIV-OW2, WIV-NE and WIV-GP groups when compared to controls (Figure 3E). However, IgA levels anti-  $\delta$ 1-H1N2 was not detected in the WIV-vaccinated groups at pre-challenge (Figure 3F), as well as none of the groups demonstrated detectable levels of cross-reactive IgA anti-H1N1pdm09 at 1wpb or 0 dpi.

#### ***IFN- $\gamma$ recall responses to $\delta$ 1-H1N2 and H1N1pdm09 following vaccination***

An ELISpot assay was performed in order to evaluate IFN- $\gamma$  recall responses IAV-specific following WIV vaccination with different adjuvants. Pigs vaccinated with WIV-OW1, OW2, NE and GP showed significantly higher number of  $\delta$ 1-H1N2-specific IFN- $\gamma$  SC at -21 dpi or 1 wpb (mean: 61, 132, 80 and 26, respectively) and at dpi 0 (mean: 33, 80, 36 and 35, respectively) compared to controls (NV/C and NV/NC) (Figure 4A). In addition, these groups had significant detectable number of H1N1pdm09-specific IFN- $\gamma$  SC at 1 wpb (mean: 51, 146, 39 and 29, respectively) and at pre-challenge (mean: 36, 88, 39 and 29, respectively) when compared to controls (NV/C and NV/NC), (Figure 4B). In addition, WIV-OW2 group showed the greatest number of  $\delta$ 1-H1N2 and H1N1pdm09 IFN- $\gamma$  secreting cells in both -21 and 0 dpi.

#### ***Nasal shedding and virus in the lungs***

All vaccinated groups were negative for IAV in nasal swabs at 0 dpi. Pigs vaccinated with WIV-NE, GP and IMP begin to shed low virus titers at 1 dpi (Figure 5A). By the 3 and 5 dpi, all WIV groups displayed high H1N1pdm09 virus titers,

similar to NV/C control pigs (Figure 5B and C). In addition, all vaccinated groups presented high virus titers in the lungs (Figure 5D). These results demonstrated that none of the WIV preparations elicited protection against infection with the heterologous challenge strain.

## **Discussion**

Here, the type of adjuvant in the WIV formulation followed by a mismatched IAV challenge showed to change the VAERD outcome. There are several reasons to include an adjuvant into a vaccine formulation such as to improve the quality of the immune response (PELLEGRINI et al., 2009), to facilitate the use of smaller doses of antigen, to reduce the number of administrations required to achieve protection (BOYLE et al., 2007) and to increase the magnitude of the immune response (PODDA, 2001). OW emulsions are fluid, well tolerated, induce a strong short-term immune responses and allow a slightly delay of the antigen release (AIKAWA et al., 1998). The oil phase ratio is very low, between 15 and 25%, which has been suggested to explain their safety (AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001). The mechanisms of action of OW emulsions with immune system are not well understood, but they protect antigen from rapid degradation by enzymes, thereby improving the immunogenicity (AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001). MF59 is a squalene-based OW adjuvant broadly used in WIV IAV vaccines for humans has been shown to elicit an increased antibody repertoire (KHURANA et al., 2010, 2011; OTT et al., 1995; VESIKARI et al., 2009).

Several new commercial adjuvants have been developed in order to improve vaccine efficacy for veterinary use. Sodium polyacrylic gel polymer as Montanide Gel 01 is water based adjuvant, designed to improve safety and efficacy of aqueous type



vaccines inducing a balanced (Th1/Th2) immune response. It is a dispersion of a high molecular weight polyacrylic polymer in water. Other type of adjuvant (IMS1313) is a dispersion of liquid particles in an aqueous phase containing an immunostimulating compound listed as GRAS (Generally Recognized As Safe) substances that are fluid, well tolerated and stimulates a humoral and in some cases cellular responses. A study showed that a immunostimulating (Montanide™ IMS 1313) and gel polymer (Montanide™ Gel 01) adjuvants enhanced protection to challenge reducing clinical signs and shortened illness duration. However, the gel based adjuvant was able to improve a subunit vaccine efficacy when compared to immunostimulating adjuvant (CAUCHARD et al., 2014).

The VAERD model was already reported in pigs in multiple models of WIV vaccination and subsequent challenge with mismatched IAV strains of the same HA subtype, but antigenically drifted IAVs (BRAUCHER et al., 2012; GAUGER et al., 2011; SANDBULTE et al., 2014; VINCENT et al., 2012b). The full mechanism of VAERD induced lung pathology is unresolved, however non-neutralizing antibodies that cross-react with heterologous virus along with cytokine dysregulation have been associated as factors that contribute to the development of VAERD (GAUGER et al., 2012, 2013). So, we investigated if the use of different types of adjuvants in the IAV WIV vaccine formulation would impact the VAERD outcome seen previously with WIV-OW vaccines.

Both WIV-OW vaccinated groups from our study demonstrated high percentage of lung lesions consistent with VAERD, as observed in our previous studies when WIV was formulated with OW adjuvant (GAUGER et al., 2011, 2012). In contrast, OW squalene-based adjuvant (NE group) and polyacrilic-based (GP group) showed lung

pathology with significantly less pneumonia or more similar to NV/C controls when compared to VAERD affected pigs. WIV-IMP group did not elicit any vaccine immune response, so this group could not be evaluated in the VAERD context. Neutralizing antibodies response to the homologous vaccine strain was previously shown in studies using the same experimental monovalent  $\delta$ 1-H1N2 WIV vaccines with a subsequent H1N1pdm09 challenge, however cross-neutralizing HI titers of H1N1pdm09 were not detected, similar to our findings irrespective the type of adjuvant (GAUGER et al., 2011, 2013). Nevertheless, both OW groups showed a trend of higher levels of cross-reactive IgG anti-H1N1pdm09 in serum and BALF in correlation with lung pathology. This cross-reactive IgG response may have contributed to the severity of lung lesions observed in VAERD through still unclear mechanisms, as antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) (VELLA et al., 1980) and/or the activation of complement cascade (KOPF et al., 2002). In addition, these VAERD associated antibodies elicited by WIV formulated with OW adjuvant were targeted to conserved epitopes on the HA2 domain, that were correlated with increased infectivity and virus fusion (GAUGER et al., 2014b; KHURANA et al., 2013). Therewith, an epitope mapping of these cross-reactive antibodies elicited by other types of adjuvants would elucidate if there is a preference binding to HA1 or HA2 domain, as demonstrated in a study that compared WIV and live-attenuated influenza vaccine (LAIV) platforms (GAUGER et al., 2014b).

Induction of IgA response has been correlated to cross-protection against heterologous challenge demonstrated by the intranasal Live Attenuated Influenza Vaccines (LAIV) (LOVING et al., 2013a; VINCENT et al., 2007, 2012b). In contrast, previous studies showed that WIV vaccinated pigs induced IgA response against the

homologous vaccine strain but no cross-reactive IgA response to the heterologous challenge (GAUGER et al., 2012, 2013, 2014b), as we demonstrated in the present study. Previous findings showed that vaccination with WIV-OW failed to elicit a significant number of specific-IAV IFN- $\gamma$  secreting cells prior to challenge when compared to non-vaccinated animals (LOVING et al., 2012b), but when challenge with a homologous virus, pigs vaccinated with WIV-OW demonstrated specific-IAV IFN- $\gamma$  response. In contrast, regardless the type of adjuvant our results showed higher number of peripheral  $\delta$ 1-H1N2 and cross-reactive H1N1pdm09-specific IFN- $\gamma$  SC at 1wpb and prior to challenge. However, WIV vaccines was shown to prime virus specific T cells and cross-reactive IgG response in BALF, they were not cross-protective, as confirmed by the presence of high virus titers in the lungs and nasal swabs. Such IFN- $\gamma$  immune response found in our study might be correlated with immunogenicity of the vaccine formulation but may not have played a role in the induction of protective heterosubtypic cellular-mediated response to a faster virus clearance. This result is consistent with the high virus titers found in nasal swabs and lung. The WIV vaccines formulated with OW1 and 2, NE and GP adjuvants provided a significant immunogenicity, demonstrated by the humoral and cellular immune response.

In conclusion, our study demonstrated that the type of adjuvant in the WIV formulation altered the VAERD outcome. Different adjuvants (OW, NE and GP) in WIV formulation induced immune responses against the vaccine strain, except IMP adjuvant. However none of the vaccinated groups were protected from the heterologous challenge virus. Despite the presence of cross-reactive IgG alone did not explain the different outcomes observed, there was a trend of increased cross-reactive IgG levels in OW-based adjuvants that can be correlated with the severity of the lung pathology

observed. Although this study focused on the impact of adjuvants in the context of VAERD, basic vaccine studies using homologous and slightly drifted strains as challenge viruses should be done to evaluate the efficacy of WIV with various adjuvants to fully understand the extent and limitations of these vaccine components.

### **Acknowledgements**

The authors thank Michelle Harland and Gwen Nordholm for technical laboratory assistance. Tyler Standley, Jason Huegel, and Jason Crabtree for assistance in the animal studies. Assistance with microbiologic screening from Dr. Susan Brockmeier is appreciated. Mention of trade names or commercial products in this article is solely for the purpose of providing specific information and does not imply recommendation or endorsement by the U.S. Department of Agriculture. C.K.S was a Capes-Brazil fellowship recipient of a PhD sandwich scholarship. Funding was provided by USDA-ARS. USDA is an equal opportunity provider and employer.

### **References**

- [1] Reeth K Van, Ma W. Swine influenza virus vaccines: To change or not to change-that's the question. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2013;370:173–200. doi:10.1007/82-2012-266.
- [2] Egli A, Santer D, Barakat K, Zand M, Levin A, Vollmer M, et al. Vaccine adjuvants--understanding molecular mechanisms to improve vaccines. *Swiss Medical Weekly* 2014;144:w13940. doi:10.4414/smw.2014.13940.
- [3] Nauta JJP, Beyer WEP, Osterhaus ADME. On the relationship between mean antibody level, seroprotection and clinical protection from influenza. *Biologicals* 2009;37:216–21. doi:10.1016/j.biologicals.2009.02.002.
- [4] Heinen PP, Boer-luijtz EA De, Bianchi ATJ. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. *Journal of General Virology* 2001;82:2697–707.

- [5] Vincent AL, Ciacci-Zanella JR, Lorusso A, Gauger PC, Zanella EL, Kehrli ME, et al. Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs. *Vaccine* 2010;28:2782–7. doi:10.1016/j.vaccine.2010.01.049.
- [6] Vincent AL, Lager KM, Janke BH, Gramer MR, Richt JA. Failure of protection and enhanced pneumonia with a US H1N2 swine influenza virus in pigs vaccinated with an inactivated classical swine H1N1 vaccine. *Veterinary Microbiology* 2008;126:310–23. doi:10.1016/j.vetmic.2007.07.011.
- [7] Ma W, Lager KM, Vincent a L, Janke BH, Gramer MR, Richt J a. The role of swine in the generation of novel influenza viruses. *Zoonoses and Public Health* 2009;56:326–37. doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01217.x.
- [8] Nelson MI, Wentworth DE, Culhane MR, Vincent AL, Viboud C, LaPointe MP, et al. Introductions and evolution of human-origin seasonal influenza A viruses in multinational swine populations. *Journal of Virology* 2014. doi:10.1128/JVI.01080-14.
- [9] Loving CL, Lager KM, Vincent AL, Brockmeier SL, Gauger PC, Anderson TK, et al. Efficacy in Pigs of Inactivated and Live Attenuated Influenza Virus Vaccines against Infection and Transmission of an Emerging H3N2 Similar to the 2011-2012 H3N2v. *Journal of Virology* 2013;87 :9895–903. doi:10.1128/JVI.01038-13.
- [10] Gauger PC, Vincent AL, Loving CL, Lager KM, Janke BH, Kehrli ME, 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* 2011;29:2712–9. doi:10.1016/j.vaccine.2011.01.082.
- [11] Gauger PC, Vincent a L, Loving CL, Henningson JN, Lager KM, Janke BH, et al. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. *Veterinary Pathology* 2012;49:900–12. doi:10.1177/0300985812439724.
- [12] Gauger PC, Loving CL, Lager KM, Janke BH, Kehrli ME, Roth J a, et al. Vaccine-associated enhanced respiratory disease does not interfere with the adaptive immune response following challenge with pandemic A/H1N1 2009. *Viral Immunology* 2013;26:314–21. doi:10.1089/vim.2013.0018.
- [13] Khurana S, Loving CL, Manischewitz J, King LR, Gauger PC, Henningson J, et al. Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease. *Science Translational Medicine* 2013;5:200ra114. doi:10.1126/scitranslmed.3006366.
- [14] Opriessnig T, Yu S, Gallup JM, Evans RB, Fenaux M, Pallares F, et al. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. vol. 40. 2003. doi:10.1354/vp.40-5-521.
- [15] Strait EL, Madsen ML, Minion FC, Christopher-Hennings J, Dammen M, Jones KR, et al. Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46:2491–8. doi:10.1128/JCM.02366-07.

- [16] Kitikoon P, Gauger PC VA. Hemagglutinin Inhibition assay with swine sera. *Methods in Molecular Biology* 2014;1161:295–301.
- [17] Loving CL, Vincent AL, Pena L, Perez DR. Heightened adaptive immune responses following vaccination with a temperature-sensitive, live-attenuated influenza virus compared to adjuvanted, whole-inactivated virus in pigs. *Vaccine* 2012;30:5830–8. doi:10.1016/j.vaccine.2012.07.033.
- [18] Vincent LL, Janke BH, Paul PS, Halbur PG. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1997;195:191–5.
- [19] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* 1938;27:493–7. doi:10.1016/j.jvs.2011.05.096.
- [20] Pellegrini M, Nicolay U, Lindert K, Groth N, Della Cioppa G. MF59-adjuvanted versus non-adjuvanted influenza vaccines: Integrated analysis from a large safety database. *Vaccine* 2009;27:6959–65. doi:10.1016/j.vaccine.2009.08.101.
- [21] Boyle J, Eastman D, Millar C, Camuglia S, Cox J, Pearse M, et al. The utility of ISCOMATRIX??? adjuvant for dose reduction of antigen for vaccines requiring antibody responses. *Vaccine* 2007;25:2541–4. doi:10.1016/j.vaccine.2006.12.018.
- [22] Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: Experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine*, vol. 19, 2001, p. 2673–80. doi:10.1016/S0264-410X(00)00499-0.
- [23] Aikawa K, Matsumoto K, Uda H, Tanaka S, Shimamura H, Aramaki Y, et al. Prolonged release of drug from O/w emulsion and residence in rat nasal cavity. *Pharmaceutical Development and Technology* 1998;3:461–9. doi:10.3109/10837459809028627.
- [24] Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 2001;19:2666–72. doi:10.1016/S0264-410X(00)00498-9.
- [25] Vesikari T, Pellegrini M, Karvonen A, Groth N, Borkowski A, O’Hagan DT, et al. Enhanced immunogenicity of seasonal influenza vaccines in young children using MF59 adjuvant. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2009;28:563–71. doi:10.1097/INF.0b013e31819d6394.
- [26] Khurana S, Chearwae W, Castellino F, Manischewitz J, King LR, Honorkiewicz A, et al. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. *Science Translational Medicine* 2010;2:15ra5. doi:10.1126/scitranslmed.3000624.
- [27] Khurana S, Verma N, Yewdell JW, Hilbert AK, Castellino F, Lattanzi M, et al. MF59 adjuvant enhances diversity and affinity of antibody-mediated immune response to pandemic influenza vaccines. *Science Translational Medicine* 2011;3:85ra48. doi:10.1126/scitranslmed.3002336.
- [28] Ott G, Barchfeld GL, Chernoff D, Radhakrishnan R, van Hoogevest P, Van Nest G. MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharmaceutical Biotechnology* 1995;6:277–96.

- [29] Cauchard S, Bertrand F, Barrier-Battut I, Jacquet S, Laurentie M, Barbey C, et al. Assessment of the safety and immunogenicity of *Rhodococcus equi*-secreted proteins combined with either a liquid nanoparticle (IMS 3012) or a polymeric (PET GEL A) water-based adjuvant in adult horses and foals--identification of promising new candidate an. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2014;157:164–74. doi:10.1016/j.vetimm.2013.12.003.
- [30] Braucher DR, Henningson JN, Loving CL, Vincent AL, Kim E, Steitz J, et al. Intranasal vaccination with replication-defective adenovirus type 5 encoding influenza virus hemagglutinin elicits protective immunity to homologous challenge and partial protection to heterologous challenge in pigs. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI* 2012;19:1722–9. doi:10.1128/CVI.00315-12.
- [31] Sandbulte MR, Platt R, Roth J a, Henningson JN, Gibson K a, Rajão DS, et al. Divergent immune responses and disease outcomes in piglets immunized with inactivated and attenuated H3N2 swine influenza vaccines in the presence of maternally-derived antibodies. *Virology* 2014;464-465:45–54. doi:10.1016/j.virol.2014.06.027.
- [32] Vincent AL, Ma W, Lager KM, Richt J a, Janke BH, Sandbulte MR, et al. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease. *Journal of Virology* 2012;86:10597–605. doi:10.1128/JVI.01439-12.
- [33] Vella S, Rocchi G, Resta S, Marcelli M, De Felici A. Antibody reactive in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity following influenza virus vaccination. *Journal of Medical Virology* 1980;6:203–11. doi:10.1002/jmv.1890060303.
- [34] Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M, Bachmann MF. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nature Medicine* 2002;8:373–8. doi:10.1038/nm0402-373.
- [35] Gauger PC, Loving CL, Khurana S, Lorusso A, Perez DR, Kehrli ME, et al. Live attenuated influenza A virus vaccine protects against A(H1N1)pdm09 heterologous challenge without vaccine associated enhanced respiratory disease. *Virology* 2014;471-473C:93–104. doi:10.1016/j.virol.2014.10.003.
- [36] Vincent AL, Ma W, Lager KM, Janke BH, Webby RJ, García-Sastre A, et al. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. *Vaccine* 2007;25:7999–8009. doi:10.1016/j.vaccine.2007.09.019.
- [37] Loving CL, Lager KM, Vincent AL, Brockmeier SL, Gauger PC, Anderson TK, et al. Efficacy in Pigs of Inactivated and Live Attenuated Influenza Virus Vaccines against Infection and Transmission of an Emerging H3N2 Similar to the 2011-2012 H3N2v. *Journal of Virology* 2013;87 :9895–903. doi:10.1128/JVI.01038-13.
- [38] Gauger PC, Loving CL, Khurana S, Lorusso A, Perez DR, Kehrli ME, et al. Live attenuated in fl uenza A virus vaccine protects against A ( H1N1 ) pdm09 heterologous challenge without vaccine associated enhanced respiratory disease. *Virology* 2014;471-473:93–104. doi:10.1016/j.virol.2014.10.003.

- [39] Loving CL, Vincent AL, Pena L, Perez DR. Heightened adaptive immune responses following vaccination with a temperature-sensitive, live-attenuated influenza virus compared to adjuvanted, whole-inactivated virus in pigs. *Vaccine* 2012;30:5830–8. doi:10.1016/j.vaccine.2012.07.033.



## Tables and Figures

Table 1. Characteristics of the five different adjuvants used in the WIV formulation of the experimental vaccines. The proportion of adjuvant and the route of administration were performed following the manufacture recommendations.

| WIV vaccine group | Adjuvant                     | Major immunostimulatory component   | (v/v) | Route | Type of immune response                                      |
|-------------------|------------------------------|---|-------|-------|--|
| OW1               | Emulsigen-D™ MVP             | Oil in water (OW) emulsion  | 20%   | IM    | Humoral response (Strong short term immunity)                |
| OW2               | Seppic MONTANIDE™ ISA 15A VG | Mineral OW based emulsion   | 15%   | IM    | Humoral response (Strong short term immunity)                |
| NE                | Invivogen AddaVax™           | Squalene-based OW nano-emulsion (similar to MF59)                             | 50%   | IM    | Humoral and/or cellular responses. Cytokines and chemokines. |
| GP                | Seppic MONTANIDE™ Gel 01     | Sodium polyacrylate polymer in water  | 10%   | IM    | Humoral and/or cellular responses                            |
| IMP               | Seppic MONTANIDE™ IMS 1313   | Dispersion of liquid particles GRAS substances (Generally Recognized As Safe) | 50%   | IN    | Humoral and in some cases cellular response                  |

**IM, intramuscular; IN, intranasal;**

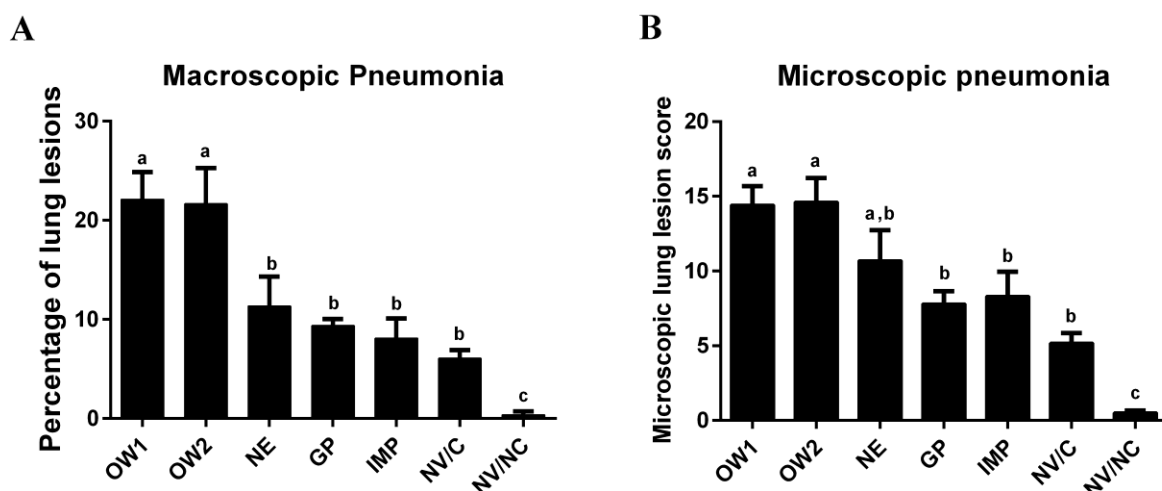


FIG 1. Percentage of total lung surface area in lesions of WIV-1 $\delta$ -H1N2 vaccinated groups followed by a heterologous challenge (H1N1pdm09). (A) OW1 and OW2 vaccinated pigs presented significantly higher percentage of lung lesions consistent with VAERD when compared with other adjuvants and controls. (B) OW1 and OW2 demonstrated significantly higher percentage of microscopic lesions compared to controls. NE presented microscopic scores similar to OW, GP and IMP. Microscopic lung lesions were scored as described in Material and Methods. Statistically significant differences between vaccinated groups and controls are marked with asterisks.

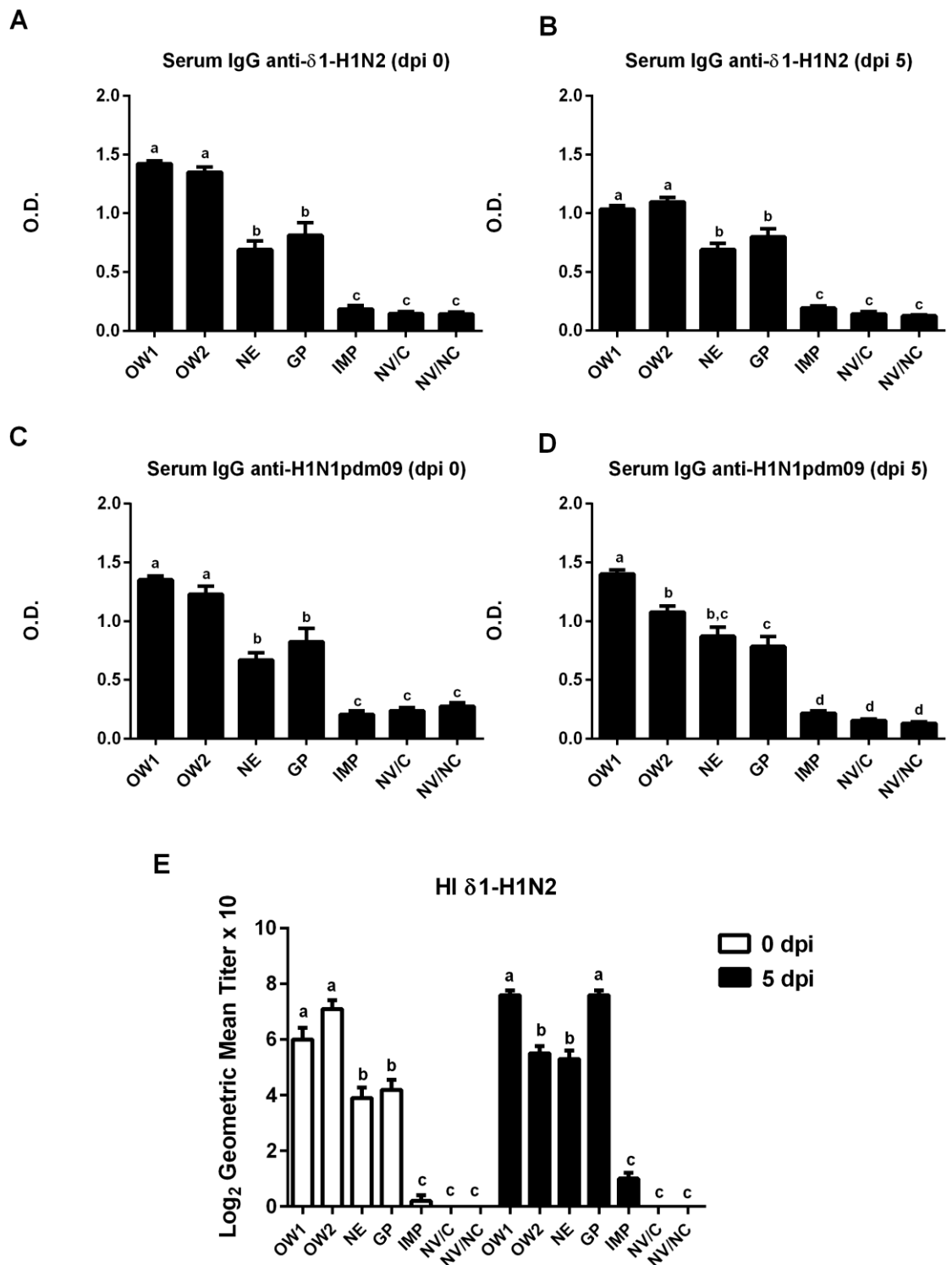


FIG 2. ELISA optical density (O.D.) of IgG anti- $\delta$ 1-H1N2, IgG anti-H1N1pdm09 and Hemagglutination Inhibition (HI) geometric mean titer (Log<sub>2</sub>), pre and post challenge.

WIV-OW1, WIV-OW2, WIV-NE and WIV-GP presented significantly higher levels of IgG anti- $\delta$ 1-H1N2 (A,B) and cross-reactive anti-H1N1pdm09 (C, D), pre and post-challenge compared with controls. WIV-OW1, OW2, NE and GP presented significantly higher HI titers against the vaccine strain ( $\delta$ 1-H1N2) compared to control pre and post-challenge (E). Statistically significant differences between treatment groups in each sampling day are identified by different lower case letters ( $P \leq 0.05$ ).

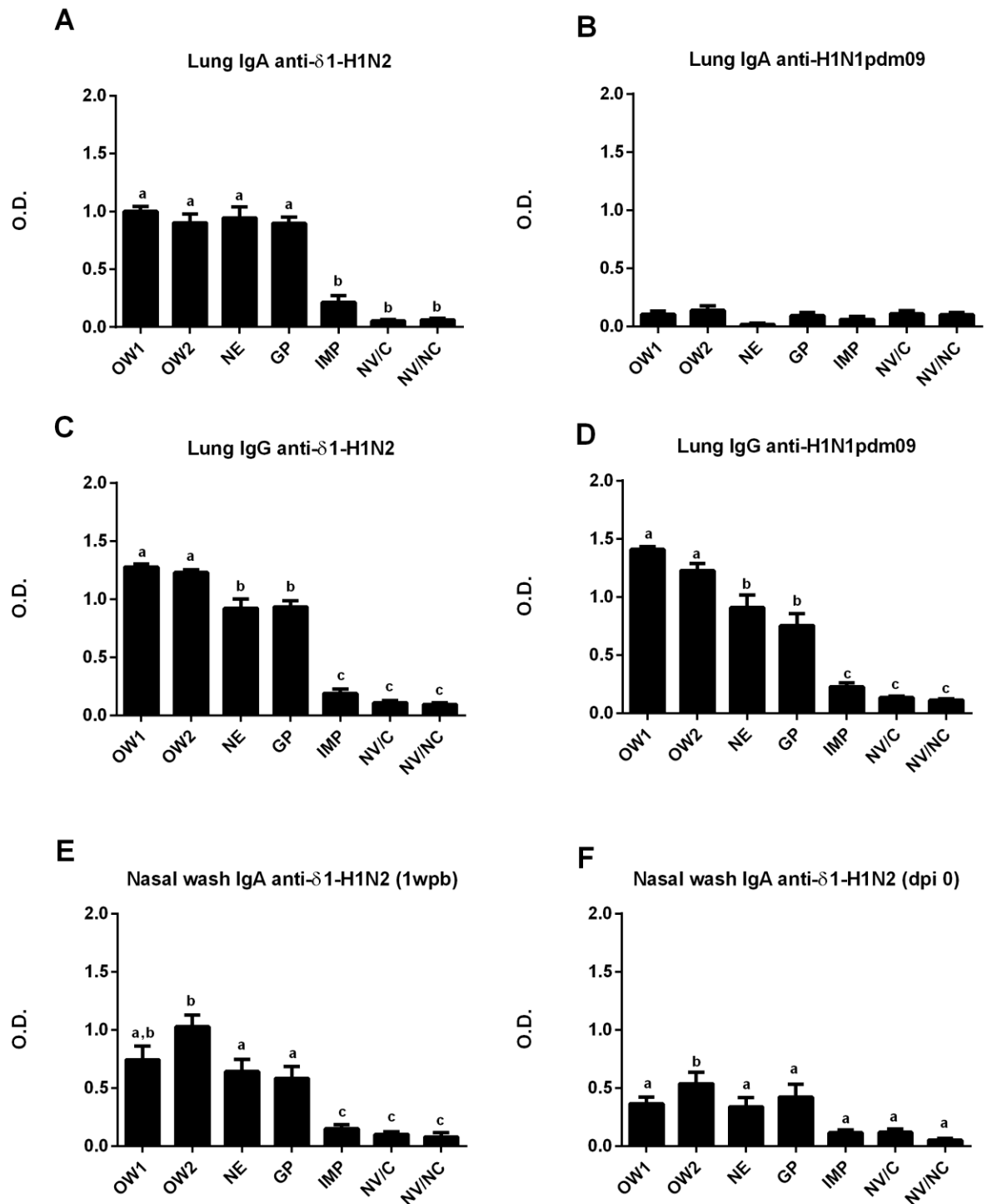


FIG 3. ELISA OD of IgA and IgG anti- $\delta$ 1-H1N2 and anti-H1N1pdm09 response in lung (BALF) and NW. WIV-OW1, OW2, NE and GP presented significantly higher levels of IgA anti- $\delta$ 1-H1N2 (A) and no cross-reactive IgA anti-H1N1pdm09 levels (B). WIV-

OW1, OW2, NE and GP showed significantly higher IgG anti- $\delta$ 1-H1N2 (C) and cross-reactive anti-H1N1pdm09 (D) compared to controls. NW samples showed significantly higher IgA anti- $\delta$ 1-H1N2 antibody levels in the WIV-OW1, OW2, NE and GP groups at 1wpb (E). Only OW2 group presented very low but significant levels of IgA response prior to challenge (dpi 0) (F). Statistically significant differences between treatment groups are identified by different lowercase letters ( $P \leq 0.05$ ).

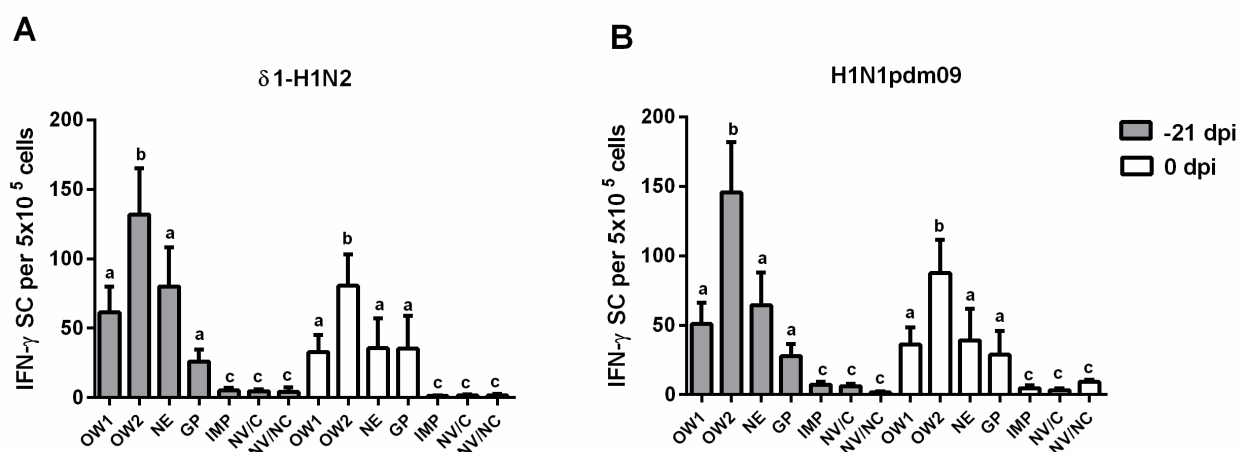


FIG 4. Peripheral IFN- $\gamma$  recall responses to homologous  $\delta$ 1-H1N2 and heterologous H1N1pdm09 virus in WIV vaccinated pigs. The number of IFN- $\gamma$  secreting cells (SC) antigen-specific in WIV-OW1, OW2, NE and GP groups were significantly higher at -21 dpi and pre-challenge (0 dpi) when stimulated with  $\delta$ 1-H1N2 (A) and H1N1pdm09 strain (B). Statistically significant differences between treatment groups within the same sampling day (-21 or 0 dpi) are identified by different lowercase letters ( $P \leq 0.05$ ).

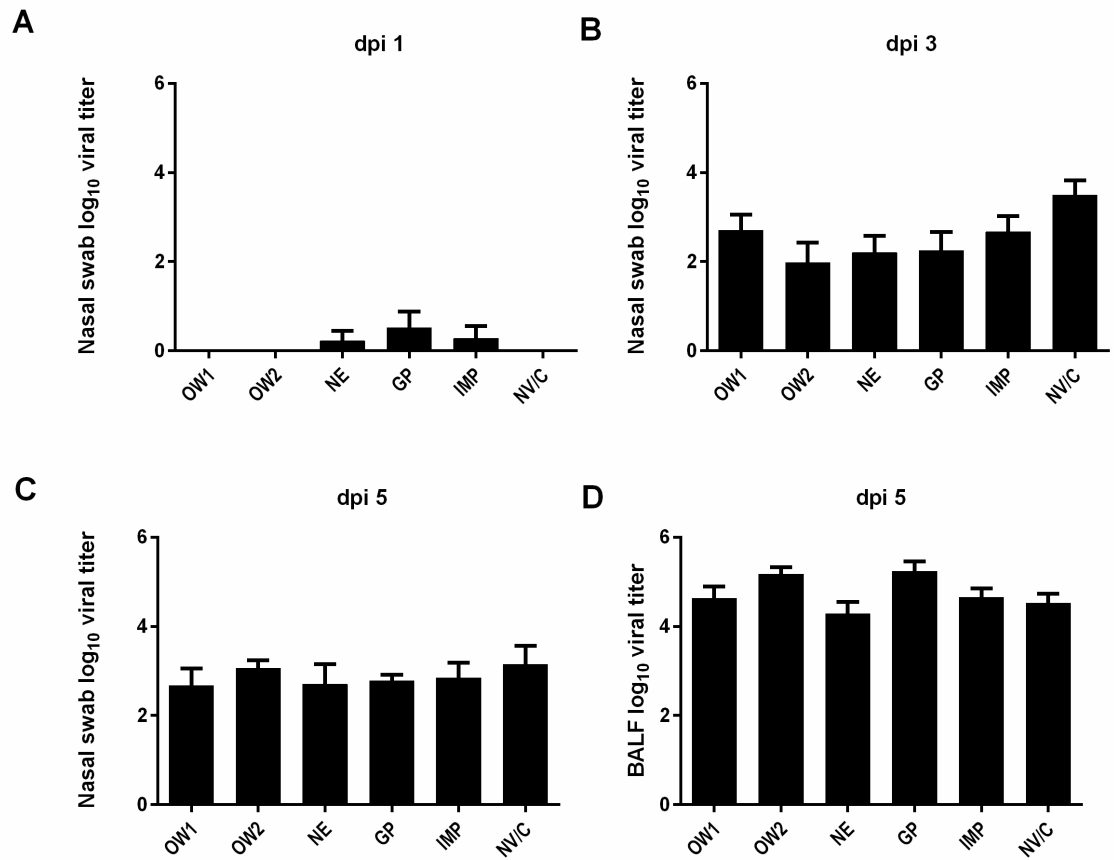


FIG 5. Virus titers (Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>) of vaccinated/challenge pigs compared with controls (NV/C and NV/NC) in nasal swabs at 3 and 5 dpi and virus in the lungs (BALF). The groups WIV-NE, WIV-GP and WIV-IMP presented very low virus titers in nasal swab at 3 dpi (A). All vaccinated groups shed virus by the day 3 and 5 (B, C). High virus titers in BALF (D) were found in all vaccinated and NV/C groups.

## 5. CONCLUSÕES FINAIS

- A inclusão da cepa heteróloga H3N2 (TX98) na formulação da WIV bivalente contendo MN08 não impediu o desenvolvimento de VAERD.
- O desafio de 3 ou 6 semanas após o desafio não alterou a indução de VAERD.
- A idade da primeira dose da vacina WIV, 4 ou 9 semanas de idade, não alterou o desenvolvimento de VAERD, mas teve um impacto na imunogenicidade da vacina WIV.
- LAIV ofereceu proteção até 8 semanas após reforço.
- Vacinas WIV-OW induziram lesões consistentes com VAERD.
- Com exceção do grupo WIV-IMP, todos os adjuvantes induziram anticorpos não-neutralizantes de reatividade cruzada no soro e pulmão.
- Os diferentes adjuvantes utilizados na formulação da WIV não ofereceram proteção contra a infecção viral, mas tiveram impacto na imunogenicidade da vacina e no desenvolvimento de VAERD.



## 6. REFERÊNCIAS

- AIKAWA, K. et al. Prolonged release of drug from O/w emulsion and residence in rat nasal cavity. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 3, p. 461–469, 1998.
- AIR, G. M. Influenza neuraminidase. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 6, p. 245–256, 2012.
- ALEXANDER, D. J.; BROWN, I. H. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, p. 197–225, 2000.
- ALLISON, A. C. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. [s.l: s.n.]. v. 28
- ALVAREZ, A. C. et al. A broad spectrum, one-step reverse-transcription PCR amplification of the neuraminidase gene from multiple subtypes of influenza A virus. **Virology Journal**, v. 5, p. 77, 2008.
- ANDERSON, T. K. et al. Characterization of co-circulating swine influenza A viruses in North America and the identification of a novel H1 genetic clade with antigenic significance. **Virus Research**, v. 201, p. 24–31, 2015.
- AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2666–2672, mar. 2001.
- BAILEY, C. C. et al. Ifitm3 Limits the Severity of Acute Influenza in Mice. **PLoS Pathogens**, v. 8, 2012.
- BANCROFT, C. T.; PARSLOW, T. G. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome. **Journal of Virology**, v. 76, p. 7133–7139, 2002.
- BARBÉ, F.; ATANASOVA, K.; VAN REETH, K. Cytokines and acute phase proteins associated with acute swine influenza infection in pigs. **Veterinary Journal (London, England : 1997)**, v. 187, p. 48–53, 2011.
- BASLER, C. F. et al. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 2746–2751, 2001.
- BEARE, A. S.; WEBSTER, R. G. Replication of avian influenza viruses in humans. **Archives of Virology**, v. 119, p. 37–42, 1991.
- BERGMANN, M. et al. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. **Journal of Virology**, v. 74, p. 6203–6206, 2000.

BIKOUR, M. H.; CORNAGLIA, E.; ELAZHARY, Y. Evaluation of a protective immunity induced by an inactivated influenza H3N2 vaccine after an intratracheal challenge of pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 312–314, 1996.

BOKHARI, S. H.; JANIES, D. Reassortment networks for investigating the evolution of segmented viruses. **IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics**, v. 7, p. 288–298, 2010.

BOWIE, A. G.; FITZGERALD, K. A. RIG-I: tri-ing to discriminate between self and non-self RNA. **Trends in Immunology**, v. 28, p. 147-50, 2007.

BOYLE, J. et al. The utility of ISCOMATRIX adjuvant for dose reduction of antigen for vaccines requiring antibody responses. **Vaccine**, v. 25, p. 2541–2544, 2007.

BRASS, A. L. et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. **Cell**, v. 139, p. 1243–1254, 2009.

BRAUCHER, D. R. et al. Intranasal vaccination with replication-defective adenovirus type 5 encoding influenza virus hemagglutinin elicits protective immunity to homologous challenge and partial protection to heterologous challenge in pigs. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 19, n. 11, p. 1722–9, nov. 2012.

BRENTANO, L.; ZANELLA, J.R.C.; MORES, N.; PIFFER, I. A. **Levantamento soroepidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus de influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil**. Comunicado Técnico Embrapa Suínos e Aves. **Anais...2002**

BROWN, D. M. et al. Multifunctional CD4 cells expressing gamma interferon and perforin mediate protection against lethal influenza virus infection. **Journal of Virology**, v. 86, p. 6792-803, 2012.

BROWN, I. H. et al. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2947–2955, 1998.

BROWN, I. H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 29–46, 2000.

BUI, H.-H. et al. Ab and T cell epitopes of influenza A virus, knowledge and opportunities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 246–251, 2007.

BUSH, R. M. et al. Predicting the evolution of human influenza A. **Science**, v. 286, p. 1921–1925, 1999.

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

- CAUCHARD, S. et al. Assessment of the safety and immunogenicity of Rhodococcus equi-secreted proteins combined with either a liquid nanoparticle (IMS 3012) or a polymeric (PET GEL A) water-based adjuvant in adult horses and foals--identification of promising new candidate an. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 157, n. 3-4, p. 164–74, 15 fev. 2014.
- CDC. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices--United States, 2013-2014. **MMWR**, v. 62, p. 1,5,28, 2013.
- CHANDER, Y. et al. Full length sequencing of all nine subtypes of the neuraminidase gene of influenza A viruses using subtype specific primer sets. **Journal of Virological Methods**, v. 165, p. 116–120, 2010.
- CHEN, G. L.; SUBBARAO, K. Live attenuated vaccines for pandemic influenza. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 333, p.109-32, 2009.
- CHEN, Y. et al. Phylogenetic analysis of human/swine/avian gene reassortant H1N2 influenza A virus isolated from a pig in China. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 48, p. 466–472, 2008.
- CHOI, Y. K. et al. Phylogenetic analysis of H1N2 isolates of influenza A virus from pigs in the United States. **Virus Research**, v. 87, p. 173–179, 2002.
- CIACCI-ZANELLA, J. R. et al. Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 22, p. 3–9, 2010.
- CLEMENTS, M. L. et al. Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, p. 157–160, 1986.
- COHEN, S. N.; HALSTEAD, S. B. Shock associated with dengue infection. **Tropical Pediatrics**, v. 68, p. 448–456, 1966.
- COLMAN, P. M.; VARGHESE, J. N.; LAVER, W. G. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase, **Nature**, v. 303, p. 41-4, 1983.
- COX, N. et al. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, 2nd edition. **WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev 1**, p. 94 pages, 2005.
- CRISCI, E. et al. Influenza virus in pigs. **Molecular Immunology**, v. 55, p. 200-11, 2013.

CROS, J. F.; PALESE, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: Influenza, Thogoto and Borna disease viruses **Virus Research**, v. 95, p. 3-12, 2003.

CROUSE, J. et al. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 1, p. 49–58, 2015.

CUNHA RG, VINHA VR, P. W. Isolation of a strain of Myxovirus influenzae-A suis from swine slaughtered in Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, n. 1, p. 13–7, 1978.

DE JONG, J. C. et al. Antigenic drift in swine influenza H3 haemagglutinins with implications for vaccination policy. **Vaccine**, v. 17, p. 1321–1328, 1999.

DE JONG, M. D. et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. **Nature Medicine**, v. 12, p. 1203–1207, 2006.

DE WIT, E. et al. Evidence for specific packaging of the influenza A virus genome from conditionally defective virus particles lacking a polymerase gene. **Vaccine**, v. 24, p. 6647–6650, 2006.

DEA, S. et al. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 4, p. 380–392, 1992.

DETMER, S. E. et al. Detection of Influenza a Virus in Porcine Oral Fluid Samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 241–247, 2011.

DIAMOND, M. S.; FARZAN, M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 46–57, 2013.

DOLFI, D. V et al. Dendritic cells and CD28 costimulation are required to sustain virus-specific CD8+ T cell responses during the effector phase in vivo. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, p. 4599–4608, 2011.

EGLI, A. et al. Vaccine adjuvants--understanding molecular mechanisms to improve vaccines. **Swiss Medical Weekly**, v. 144, p. w13940, 2014.

ELLIS, J. et al. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 159-63, 2004.

EVERITT, A. et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, n. 7395, p. 519-23, 2012.

FANG, R. et al. Complete structure of A/duck/Ukraine/63 influenza hemagglutinin gene: animal virus as progenitor of human H3 Hong Kong 1968 influenza hemagglutinin. **Cell**, v. 25, n. August, p. 315–323, 1981.

FANNING, T. G.; REID, A. H.; TAUBENBERGER, J. K. Influenza A virus neuraminidase: regions of the protein potentially involved in virus-host interactions. **Virology**, v. 276, p. 417–423, 2000.

GARCÍA, M. A. et al. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 70, p. 1032–1060, 2006.

GARTEN, R. J. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 197–201, 10 jul. 2009.

GASPARINI, R. et al. Live attenuated influenza vaccine--a review. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 52, p. 95–101, 2011.

GAUGER, P. C. 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, n. 15, p. 2712–9, 24 mar. 2011.

GAUGER, P. C. et al. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 6, p. 900–12, nov. 2012.

GAUGER, P. C. et al. Vaccine-associated enhanced respiratory disease does not interfere with the adaptive immune response following challenge with pandemic A/H1N1 2009. **Viral Immunology**, v. 26, n. 5, p. 314–21, out. 2013.

GAUGER, P. C. et al. Live attenuated influenza A virus vaccine protects against A (H1N1) pdm09 heterologous challenge without vaccine associated enhanced respiratory disease. **Virology**, v. 471-473, p. 93–104, 2014a.

GEISS, G. et al. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 10736-41, 2002.

GREBE, K. M.; YEWDELL, J. W.; BENNINK, J. R. Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand? **Microbes and Infection**, v. 10, p. 1024-9, 2008.

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

GUARNER, J. et al. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of influenza A virus infection in human lungs. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 114, p. 227–233, 2000.

HAESEBROUCK, F.; PENSAERT, M. B. Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunised with an inactivated influenza H1N1 vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 11, p. 239–249, 1986.

HALBUR, P. G. et al. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. **Veterinary Pathology**, v. 32, p. 648–660, 1995.

HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 18, p. 425–433, 2007.

HAMADA, H. et al. Multiple redundant effector mechanisms of CD8+ T cells protect against influenza infection. **Journal of Immunology**, v. 190, p. 296–306, 2013.

HANCOCK, K. et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, p. 1945–1952, 2009.

HATCHETTE, T. F. et al. Influenza A viruses in feral Canadian ducks: Extensive reassortment in nature. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2327–2337, 2004.

HATTA, M. et al. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. **Science**, v. 293, p. 1840–1842, 2001.

HAUSE, B. M. et al. Antigenic categorization of contemporary H3N2 Swine influenza virus isolates using a high-throughput serum neutralization assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 22, p. 352–359, 2010.

HEINEN, P. P. et al. Systemic and mucosal isotype-specific antibody responses in pigs to experimental influenza virus infection. **Viral Immunology**, v. 13, p. 237–247, 2000.

HEINEN, P. P. et al. Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2-nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 1851–1859, 2002.

HEINEN, P. P.; BOER-LUIJTZE, E. A. DE; BIANCHI, A. T. J. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2697–2707, 2001.

HOFSHAGEN, M. et al. Pandemic influenza A(H1N1)v: human to pig transmission in Norway? **Euro surveillance : Bulletin Européen sur les Maladies Transmissibles European Communicable Disease Bulletin**, v. 14, 2009.

HOWDEN, K. J. et al. An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50, p. 1153–1161, 2009.

HUBER, V. C. et al. Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 7381–7388, 2001.

HUGHES, H. R. et al. Oral fluids as a live-animal sample for evaluating cross-reactivity and cross-protection following intranasal influenza A virus vaccination in pigs. **Clinical and Vaccine Immunology**, CVI00358-15, 2015.

HUTCHINSON, E. C. et al. Genome packaging in influenza A virus. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 313-28, 2010.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2011 Release (current)**. Disponível em:  
<<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>.

IMAI, M. et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. **Nature**, v. 486, p. 420-8, 2012.

INTELLI-, E. et al. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. **New England Journal**, v. 360, n. 25, p. 2605–2615, 2009.

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

JACKSON, S. et al. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses in ferrets: a public health risk assessment. **Journal of Virology**, v. 83, p. 8131–8140, 2009.

JEGASKANDA, S. et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with control of pandemic H1N1 influenza virus infection of macaques. **Journal of Virology**, v. 87, p. 5512–22, 2013.

JIA, D. et al. Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling. **PLoS ONE**, v. 5, 2010.

JINDAL, N. et al. Amplification of four genes of influenza A viruses using a degenerate primer set in a one step RT-PCR method. **Journal of Virological Methods**, v. 160, p. 163–166, 2009.

JOHNSON, N. P. A. S.; MUELLER, J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 “Spanish” influenza pandemic. **Bulletin of the history of medicine**, v. 76, p. 105–115, 2002.

JULKUNEN, I. et al. Inflammatory responses in influenza A virus infection. **Vaccine**, v. 19 Suppl 1, p. S32–S37, 2000.

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

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

KARASIN, A. I.; CARMAN, S.; OLSEN, C. W. Identification of human H1N2 and human-swine reassortant H1N2 and H1N1 influenza A viruses among pigs in Ontario, Canada (2003 to 2005). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1123–1126, 2006.

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

KAWAOKA, Y.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. **Journal of Virology**, v. 63, n. 11, p. 4603–4608, 1989.

KENDAL, A. P. et al. Antigenic similarity of influenza A (H1N1) viruses from epidemics in 1977--1978 to "Scandinavian" strains isolated in epidemics of 1950-1951. **Virology**, v. 89, p. 632–636, 1978.

KHATRI, M. et al. Swine Influenza H1N1 Virus Induces Acute Inflammatory Immune Responses in Pig Lungs: a Potential Animal Model for Human H1N1 Influenza Virus. **Journal of Virology**, v. 84, p. 11210-8, 2010.

KHURANA, S. et al. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. **Science Translational Medicine**, v. 2, p. 15ra5, 2010.

KHURANA, S. et al. MF59 adjuvant enhances diversity and affinity of antibody-mediated immune response to pandemic influenza vaccines. **Science Translational Medicine**, v. 3, p. 85-48, 2011.

KHURANA, S. et al. Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 200, p. 200-114, 2013.

KILBOURNE, E. D. Influenza pandemics of the 20th century. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 9-14, 2006.

KIM, H. M. et al. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. **Journal of Virology**, v. 82, n. 9, p. 4265–4274, 2008.



- KIM, H. W. et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. **American Journal of Epidemiology**, v. 89, p. 422–434, 1969.
- KITIKOON, P., GAUGER, P.C., VINCENT, A. L. Hemagglutinin Inhibition assay with swine sera. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 295–301, 2014.
- KITIKOON, P. et al. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 117–128, 2006.
- KITIKOON, P. et al. Swine influenza matrix 2 (M2) protein contributes to protection against infection with different H1 swine influenza virus (SIV) isolates. **Vaccine**, v. 28, n. 2, p. 523–31, 11 dez. 2009.
- KITIKOON, P.; STRAIT, E. L.; THACKER, E. L. The antibody responses to swine influenza virus (SIV) recombinant matrix 1 (rM1), matrix 2 (M2), and hemagglutinin (HA) proteins in pigs with different SIV exposure. **Veterinary Microbiology**, v. 126, p. 51–62, 2008.
- KOBASA, D. et al. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. **Nature**, v. 431, p. 703–707, 2004.
- KOPF, M. et al. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. **Nature medicine**, v. 8, p. 373–378, 2002.
- KYRIAKIS, C. S. et al. Efficacy of commercial swine influenza vaccines against challenge with a recent European H1N1 field isolate. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1-2, p. 67–74, 29 jul. 2010.
- KYRIAKIS, C. S. et al. Virological Surveillance and Preliminary Antigenic Characterization of Influenza Viruses in Pigs in Five European Countries from 2006 to 2008. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, p. 93–101, 2011.
- KYRIAKIS, C. S. et al. Influenza A virus infection dynamics in swine farms in Belgium, France, Italy and Spain, 2006-2008. **Veterinary Microbiology**, v. 162, p. 543–550, 2013.
- LAMB, R.; KRUG, R.; KNIPE, D. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: **Fields Virology**. [s.l: s.n.]. p. 1487–1531.
- LAMERE, M. W. et al. Contributions of Anti-nucleoprotein IgG to Heterosubtypic Immunity against Influenza Virus. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 7, p. 4331–4339, 2012.

LANGE, E. et al. Pathogenesis and transmission of the novel swine origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 2119-23, 2009.

LANZ, C. et al. Swine IFITM proteins potently inhibit influenza A virus replication. **Journal of Virology**, v. 89, p. 863-9, 2014.

LAROCHELLE, R.; SAUVAGEAU, R.; MAGAR, R. Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Quebec. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 513–515, 1994.

LARSEN, D. L. et al. Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 117-31, 2000

LEE, Y.-T. Y. Y.-J. et al. New vaccines against influenza virus. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 3, p. 12–28, 2014.

LEKCHAROENSUK, P. et al. Novel swine influenza virus subtype H3N1, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 787–794, 2006.

LEKCHAROENSUK, P. et al. First whole genome characterization of swine influenza virus subtype H3N2 in Thailand. **Veterinary Microbiology**, v. 145, p. 230–244, 2010.

LI, K. et al. IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion. **PLoS Pathogens**, v. 9, e100312, 2013.

LIN, Y. P. et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 9654–9658, 2000.

LORUSSO, A. et al. Genetic and antigenic characterization of H1 influenza viruses from United States swine from 2008. **The Journal of General Virology**, v. 92, n. Pt 4, p. 919–30, abr. 2011.

LOVING, C. L. et al. Heightened adaptive immune responses following vaccination with a temperature-sensitive, live-attenuated influenza virus compared to adjuvanted, whole-inactivated virus in pigs. **Vaccine**, v. 30, p. 5830–5838, 2012a.

LOVING, C. L. et al. Efficacy in Pigs of Inactivated and Live Attenuated Influenza Virus Vaccines against Infection and Transmission of an Emerging H3N2 Similar to the 2011-2012 H3N2v. **Journal of Virology**, v. 87, n. 17, p. 9895–9903, 2013a.

LOVING, C. L. et al. Efficacy in Pigs of Inactivated and Live Attenuated Influenza Virus Vaccines against Infection and Transmission of an Emerging H3N2 Similar to the 2011-2012 H3N2v. **Journal of Virology**, v. 87, n. 17, p. 9895–9903, set. 2013b.

LUDWIG, S. et al. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? **Virology**, v. 212, p. 555–561, 1995.

LUIZ F. CARON, MARA E. G. JOINEAU, ELIZABETH SANTIN, ROSARIA R. T. DE B. RICHARTZ, MARIA APARECIDA DE CARVALHO PATRICIO, V. T. S. Seroprevalence of H3N2 Influenza A virus in pigs from Paraná (South Brazil): Interference of the animal management and climatic conditions. **Virus Reviews and Research**, v. 15, n. 1, p. 1–27, 2010.

MA, W. et al. Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the midwestern United States. **Journal of Virology**, v. 80, p. 5092–5096, 2006.

MA, W. et al. The role of swine in the generation of novel influenza viruses. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n. 6-7, p. 326–37, ago. 2009.

MA, W. et al. Identification and characterization of a highly virulent triple reassortant H1N1 swine influenza virus in the United States. **Virus Genes**, v. 40, p. 28–36, 2010.

MALIK PEIRIS, J. S. Avian influenza viruses in humans. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 28, p. 161–173, 2009.

MANCINI, D. A. P.; CUNHA, E. M. S.; CASTRO, A. F. DE. Evidence of swine respiratory infection by influenza viruses in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 11, p. 39–43, 2006.

MANDELBOIM, O. et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. **Nature**, v. 409, p. 1055–1060, 2001.

MARTIN, K.; HELENIUS, A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. **Journal of Virology**, v. 65, p. 232–244, 1991.

MASIC, A. et al. Elastase-dependent live attenuated swine influenza A viruses are immunogenic and confer protection against swine influenza A virus infection in pigs. **Journal of Virology**, v. 83, p. 10198–10210, 2009.

MASIC, A.; BABIUK, L. A.; ZHOU, Y. Reverse genetics-generated elastase-dependent Swine influenza viruses are attenuated in pigs. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 375–385, 2009.

MCGILL, J.; VAN ROOIJEN, N.; LEGGE, K. L. Protective influenza-specific CD8 T cell responses require interactions with dendritic cells in the lungs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 1635–1646, 2008.

MCGILL, J.; VAN ROOIJEN, N.; LEGGE, K. L. IL-15 trans-presentation by pulmonary dendritic cells promotes effector CD8 T cell survival during influenza virus infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, p. 521–534, 2010.

MILLER, L. C. et al. Evolutionary characterization of pig interferon-inducible transmembrane gene family and member expression dynamics in tracheobronchial lymph nodes of pigs infected with swine respiratory disease viruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 159, p. 180–191, 2014.

MONSALVO, A. C. et al. Severe pandemic 2009 H1N1 influenza disease due to pathogenic immune complexes. **Nature Medicine**, v. 17, p. 195–199, 2011.

NABEL, G. J.; FAUCI, A. S. Induction of unnatural immunity: prospects for a broadly protective universal influenza vaccine. **Nature Medicine**, v. 16, p. 1389–1391, 2010.

NAUTA, J. J. P.; BEYER, W. E. P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. On the relationship between mean antibody level, seroprotection and clinical protection from influenza. **Biologicals**, v. 37, p. 216–221, 2009.

NELSON, M. I. et al. Global transmission of influenza viruses from humans to swine. **The Journal of General Virology**, v. 93, n. Pt 10, p. 2195–203, out. 2012.

NELSON, M. I. et al. Introductions and evolution of human-origin seasonal influenza A viruses in multinational swine populations. **Journal of Virology**, 2014a.

NELSON, M. I. et al. Continual Re-Introduction of Human Pandemic H1N1 Influenza A Viruses into US Swine, 2009-2014. **Journal of Virology**, n. April, p. JVI.00459–15, 2015.

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

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

NEUMANN, G.; NODA, T.; KAWAOKA, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. **Nature**, v. 459, p. 931–939, 2009.

NGUYEN-VAN-TAM, J. S. et al. Outbreak of low pathogenicity H7N3 avian influenza in UK, including associated case of human conjunctivitis. **Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles, European communicable disease bulletin.**, v. 11, 2006.

NODA, T. et al. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. **Nature**, v. 439, p. 490–492, 2006.

O'BRIEN, K. B. et al. A protective role for complement C3 protein during pandemic 2009 H1N1 and H5N1 influenza a virus infection. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

- O'NEILL, R. E. et al. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 22701–22704, 1995.
- OLSEN, B. et al. Global patterns of influenza A virus in wild birds. **Science**, v. 312, p. 384–388, 2006.
- OLSEN, C. W. et al. Antigenic and genetic analysis of a recently isolated H1N1 swine influenza virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 1630–1636, 1993.
- OLSEN, C. W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. **Virus Research**, v. 85, n. 2, p. 199–210, 2002.
- OPRIESSNIG, T. et al. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 521–9, 2003
- OTT, G. et al. MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. **Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, p. 277–296, 1995.
- PANYASING, Y. et al. Kinetics of influenza A virus nucleoprotein antibody (IgM, IgA, and IgG) in serum and oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions. **Vaccine**, v. 31, p. 6210–6215, 2013.
- PANYASING, Y. et al. Detection of Influenza A Virus Nucleoprotein antibodies in oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions using a blocking ELISA. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, p. 177–184, 2014.
- PASCUA, P. N. Q. et al. Virulence and transmissibility of H1N2 influenza virus in ferrets imply the continuing threat of triple-reassortant swine viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 15900–5, 2012.
- PATTON, L. M. et al. Interleukin-1 beta-induced neutrophil recruitment and acute lung injury in hamsters. **Inflammation**, v. 19, p. 23–29, 1995.
- PEDERSEN, J. C. Hemagglutination-inhibition test for avian influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to the avian influenza virus. **Methods in Molecular Biology**, v. 436, p. 53–66, 2008a.
- PEDERSEN, J. C. Neuraminidase-inhibition assay for the identification of influenza A virus neuraminidase subtype or neuraminidase antibody specificity. **Methods in Molecular Biology**, v. 436, p. 67–75, 2008b.
- PEIRIS, J. S. et al. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary “human” H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? **Journal of Virology**, v. 75, p. 9679–9686, 2001.

PELLEGRINI, M. et al. MF59-adjuvanted versus non-adjuvanted influenza vaccines: Integrated analysis from a large safety database. **Vaccine**, v. 27, p. 6959–6965, 2009.

PENA, L. et al. Modifications in the polymerase genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 viruses. **Journal of Virology**, v. 85, n. 1, p. 456–69, jan. 2011.

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

PLATT, R. et al. Comparison of humoral and cellular immune responses to inactivated swine influenza virus vaccine in weaned pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, p. 252–257, 2011a.

PODDA, A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: Experience with the MF59-adjuvanted vaccine. **Vaccine**, v. 19, p. 2673-80, 2001.

PRICKETT, J. R.; ZIMMERMAN, J. J. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. **Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 11, n. 2, p. 207–216, 2010.

QUAN, F.-S. et al. Induction of heterosubtypic immunity to influenza virus by intranasal immunization. **Journal of Virology**, v. 82, p. 1350–1359, 2008.

QUIÑONES-PARRA, S. et al. Universal immunity to influenza must outwit immune evasion. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 285, 2014.

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

RAJÃO, D. S. et al. Genetic characterization of influenza virus circulating in Brazilian pigs during 2009 and 2010 reveals a high prevalence of the pandemic H1N1 subtype. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 7, p. 783–790, 2013b.

RAJÃO, D. S. et al. Influenza A virus hemagglutinin protein subunit vaccine elicits vaccine-associated enhanced respiratory disease in pigs. **Vaccine**, v. 32, n. 40, p. 5170–6, 8 set. 2014.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, p. 493–497, 1938.

REETH, K. VAN; MA, W. Swine influenza virus vaccines: To change or not to change—that's the question. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 370, p. 173–200, 2013.

RENEGAR, K. B.; SMALL, P. A. Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 1972–1978, 1991.

RESA-INFANTE, P. et al. The influenza virus RNA synthesis machine: Advances in its structure and functionRNA. **Biology**, v. 8, p. 207-15, 2011.

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

RICHT, J. A. et al. Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine. **Journal of Virology**, v. 80, p. 11009–11018, 2006.

RICHT, J. A.; GARCÍA-SASTRE, A. Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 333, p. 177-95, 2009.

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, p. 361–373, 1983.

ROSSMAN, J. S.; LAMB, R. A. Influenza virus assembly and budding. **Virology**, v. 411, p. 229-36, 2011.

ROSSOW, K. D. et al. Diagnostic investigation of unexpected serology results for swine influenza virus (SIV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). **Journal of Swine Health and Production**, v. 11, p. 33–35, 2003.

SAFO, M. K. et al. Crystal Structures of Influenza A Virus Matrix Protein M1 : Variations on a Theme. **PLOS One**, v. 9, n. 10, p. e109510, 2014.

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

SCHAEFER, R. et al. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 761–767, 2011.

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

SCHAEFER, R.; TREVISOL, I. M.; PALUDO, E. 2008. Avaliação da Presença do Vírus Influenza em Suínos no Sul do Brasil. **Comunicado Técnico Embrapa Suínos e Aves**. ISSN 1678-8842.

SCHOLTISSEK, C. et al. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. **Virology**, v. 87, p. 13–20, 1978.

SCHOLTISSEK, C. et al. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. **Virology**, v. 147, p. 287–294, 1985.

SCHRAUWEN, E. J. A et al. Insertion of a multibasic cleavage site in the haemagglutinin of human influenza H3N2 virus does not increase pathogenicity in ferrets. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 1410–1415, 2011.

SCHRAUWEN, E. J.; FOUCHIER, R. A. Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. **Emerging Microbes & Infections**, v. 3, p. e9, 2014.

SCHULTZ, U. et al. Evolution of pig influenza viruses. **Virology**, v. 183, p. 61–73, 1991.

SEO, S. H.; WEBBY, R.; WEBSTER, R. G. No apoptotic deaths and different levels of inductions of inflammatory cytokines in alveolar macrophages infected with influenza viruses. **Virology**, v. 329, p. 270–279, 2004.

SHINYA, K. et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. **Nature**, v. 440, p. 435–436, 2006.

SHOPE, B. SWINE ( **From the Department of Animal Pathology of The Rockefeller Institute for Medical**). p. 373–385, 1931.

SHORTRIDGE, K. F. et al. Persistence of Hong Kong influenza virus variants in pigs. **Science**, v. 196, p. 1454–1455, 1977.

SHORTRIDGE, K. F.; WEBSTER, R. G. Geographical distribution of swine (Hsw1N1) and Hong Kong (H3N2) influenza virus variants in pigs in Southeast Asia. **Intervirology**, v. 11, p. 9–15, 1979.

SHTYRYA, Y. A; MOCHALOVA, L. V; BOVIN, N. V. Influenza virus neuraminidase: structure and function. **Acta Naturae**, v. 1, p. 26–32, 2009.

SIECZKARSKI, S. B.; WHITTAKER, G. R. Viral entry. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 285, p. 1–23, 2005.

SMITH, G. J. D. et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 11709–11712, 2009a.

SMITH, G. J. D. et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. **Nature**, v. 459, n. 7250, p. 1122–5, 25 jun. 2009b.



SMITH, S. et al. IFITM proteins-cellular inhibitors of viral entry. **Current opinion in Virology**, v. 4, p. 71–7, 2014.

SNACKEN, R. et al. The next influenza pandemic: Lessons from Hong Kong, 1997. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 195-203, 1999.

SOLÓRZANO, A. et al. Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. **Journal of Virology**, v. 79, p. 7535–7543, 2005.

SONG, D. S. et al. Isolation of H3N2 swine influenza virus in South Korea. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 15, p. 30–34, 2003.

SONG, D. S. et al. Isolation and phylogenetic analysis of H1N1 swine influenza virus isolated in Korea. **Virus Research**, v. 125, p. 98–103, 2007.

SONG, M. S. et al. Evidence of human-to-swine transmission of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in South Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 3204–3211, 2010.

SPACKMAN, E.; SUAREZ, D. L. Type A influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. **Methods in Molecular Biology**, v. 436, p. 19–26, 2008.

STEINHAEUER, D. A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. **Virology**, v. 258, p. 1–20, 1999.

STRAIT, E. L. et al. Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2491–2498, 2008.

SUGIMURA, T. et al. Isolation of a recombinant influenza virus (Hsw 1 N2) from swine in Japan. **Archives of Virology**, v. 66, p. 271–274, 1980.

SUGUITAN, A. L. et al. The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A / Vietnam / 1203 / 2004 ( H5N1 ) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals. **Journal of Virology**, v. 2004, p. 2706–2714, 2012.

SUN, J. et al. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. **Nature Medicine**, v. 15, p. 277–284, 2009.

SUN, J. et al. CD4+ T cell help and innate-derived IL-27 induce Blimp-1-dependent IL-10 production by antiviral CTLs. **Nature Immunology**, v. 12, p. 327–334, 2011.

SUN, X.; WHITTAKER, G. R. Entry of influenza virus. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 790, p. 72–82, 2013.

- TAKADA, A.; KAWAOKA, Y. Antibody-dependent enhancement of viral infection: Molecular mechanisms and in vivo implications. **Reviews in Medical Virology**, v. 13, p. 387-98, 2003.
- TAMM, A.; SCHMIDT, R. E. IgG binding sites on human Fc gamma receptors. **International Reviews of Immunology**, v. 16, p. 57–85, 1997.
- TAMURA, S. et al. Functional role of respiratory tract haemagglutinin-specific IgA antibodies in protection against influenza. **Vaccine**, v. 8, p. 479–485, 1990.
- TAUBENBERGER, J. K. et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. **Nature**, v. 437, p. 889–893, 2005.
- TAUBENBERGER, J. K.; MORENS, D. M. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 15–22, jan. 2006.
- THACKER, E. L.; THACKER, B. J.; JANKE, B. H. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2525–2530, 2001.
- TONG, S. et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. **PLoS Pathogens**, v. 9, 2013.
- TUMPEY, T. M. et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. **Science**, v. 310, p. 77–80, 2005.
- TUMPEY, T. M. et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. **Science**, v. 315, p. 655–659, 2007.
- UBOL, S.; HALSTEAD, S. B. How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, p. 1829-35, 2010.
- VAN REETH, K. et al. Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza a virus subtypes endemic in European pigs. **Virus Research**, v. 103, p. 115-24, 2004.
- VAN REETH, K. Avian and swine influenza viruses: Our current understanding of the zoonotic risk. **Veterinary Research**, v. 38, p. 243–260, 2007.
- VAN REETH, K.; LABARQUE, G.; PENSAERT, M. Serological profiles after consecutive experimental infections of pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 swine influenza viruses. **Viral Immunology**, v. 19, p. 373–382, 2006.
- VAN REETH, K.; NAUWYNCK, H. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. **Veterinary Research**, v. 31, p. 187–213, 2000.

VAN REETH, K.; NAUWYNCK, H.; PENSAERT, M. Bronchoalveolar interferon-alpha, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and inflammation during acute influenza in pigs: a possible model for humans? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 1076–1079, 1998.

VAN REETH, K.; VAN GUCHT, S.; PENSAERT, M. Correlations between lung proinflammatory cytokine levels, virus replication, and disease after swine influenza virus challenge of vaccination-immune pigs. **Viral Immunology**, v. 15, n. 4, p. 583–94, jan. 2002.

VAN REETH, K.; VAN GUCHT, S.; PENSAERT, M. Investigations of the efficacy of European H1N1- and H3N2-based swine influenza vaccines against the novel H1N2 subtype. **The Veterinary Record**, v. 153, p. 9-13, 2003.

VELLA, S. et al. Antibody reactive in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity following influenza virus vaccination. **Journal of Medical Virology**, v. 6, p. 203–211, 1980.

VESIKARI, T. et al. Enhanced immunogenicity of seasonal influenza vaccines in young children using MF59 adjuvant. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, p. 563–571, 2009.

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

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

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

VINCENT, A. L. et al. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. **Vaccine**, v. 25, p. 7999–8009, 2007.

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

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

VINCENT, A. L. et al. Characterization of an influenza A virus isolated from pigs during an outbreak of respiratory disease in swine and people during a county fair in the United States. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 51–59, 2009a.

VINCENT, A. L. et al. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. **Virus Genes**, v. 39, n. 2, p. 176–85, out. 2009b.

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

VINCENT, A. L. et al. Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs. **Vaccine**, v. 28, p. 2782–2787, 2010b.

VINCENT, A. L. et al. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease. **Journal of Virology**, v. 86, p. 10597–605, 2012a.

VINCENT, L. L. et al. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 195, n. 9, p. 191–195, 1997.

WAGGONER, S. N. et al. Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. **Nature**, p. 481, p. 394–8, 2011.

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

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

WEBSTER, R. G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiological Reviews**, v. 56, p. 152–179, 1992.

WESLEY, R. D.; TANG, M.; LAGER, K. M. Protection of weaned pigs by vaccination with human adenovirus 5 recombinant viruses expressing the hemagglutinin and the nucleoprotein of H3N2 swine influenza virus. **Vaccine**, v. 22, p. 3427–3434, 2004.

WHARTON, S. A. et al. Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: Specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 945–948, 1994.

WILSON, I. A.; SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. **Nature**, v. 289, p. 366–373, 1981.

WORCH, R. Structural biology of the influenza virus fusion peptide. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, n. 3, p. 421–426, 2014.

YOON, K.-J. et al. Comparison of a Commercial H1N1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Hemagglutination Inhibition Test in Detecting Serum Antibody against Swine Influenza Viruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 197–201, 2004.

YORK, A.; FODOR, E. Biogenesis, assembly, and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell. **RNA biology**, v. 10, p. 1274–82, 2013.

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

ZELL, R. et al. Novel reassortant of swine influenza H1N2 virus in Germany. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 271–276, 2008.

ZHANG, R.-H. et al. Development of latex agglutination test with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to swine influenza virus. **International immunopharmacology**, v. 19, n. 2, p. 201–5, 2014.

ZHANG, Y. et al. H5N1 hybrid viruses bearing 2009/H1N1 virus genes transmit in guinea pigs by respiratory droplet. **Science**, v. 340, p. 1459–63, 2013.

ZHOU, N. N. et al. Genetic reassortment of avian , swine , and human influenza A viruses in american pigs. **Journal of Virology**, v. 73, n. 10, p. 8851–8856, 1999a.