

Avanços em Sanidade, Produção e Reprodução de Suínos VII



SINSUI 2023

15° Simpósio Internacional de Suinocultura
Produção, Reprodução e Sanidade Suína

09 a 11 de maio de 2023 | Centro de Eventos da PUCRS

Editores

Fernando P. Bortolozzo - Ivo Wentz - Ana Paula G. Mellagi - Rafael da Rosa Ulguim - Gabriela P. Zanin - Dalila Mabel Schmidt Tomm - David E. S. N. Barcellos.

Vacinas para influenza em suínos e seleção de candidatos vacinais: quais são os desafios?

Schaefer R*¹, Haach V² & Tochetto C¹

¹Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil. ²Laboratório de Virologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

*Autor de correspondência: rejane.schaefer@embrapa.br

Palavras-chave: Vírus Influenza A, diversidade genética e antigênica, vacina, suínos

A influenza suína é uma doença respiratória viral aguda causada pelo vírus influenza A (IAV) pertencente à família *Orthomyxoviridae*. Os sinais clínicos observados em suínos infectados são caracterizados por febre, letargia, anorexia, e tosse, com alta morbidade e baixa mortalidade. A doença causa prejuízos significativos na produção de suínos pela perda de peso e aumento da conversão alimentar nos animais afetados, e pode causar um aumento no número de casos de aborto em matrizes devido à hipertermia (35). Quadros clínicos severos da doença são ocasionados por infecção concomitante com outros patógenos respiratórios do complexo de doenças respiratórias de suínos, resultando em pneumonias complicadas e aumento da mortalidade (35). Os IAVs são vírus RNA de fita simples, segmentados e de polaridade negativa que infectam uma ampla gama de espécies aviárias e mamíferos, sendo as aves aquáticas os reservatórios dos IAVs na natureza onde já foram detectados diferentes subtipos virais. Os subtipos virais são determinados pela antigenicidade das glicoproteínas de superfície do envelope viral: hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) e, embora dezesseis tipos de HA (H1-H16) e nove tipos de NA (N1-N9) já tenham sido detectados em aves aquáticas, o número de subtipos virais encontrados em mamíferos é restrito (35, 39). Em humanos e suínos circulam apenas os subtipos H1 e H3 (20). A rápida evolução viral é resultado de dois tipos de mutações: as mutações pontuais (ou *antigenic drift*) e o rearranjo gênico (ou *antigenic shift*). O *antigenic drift* ocorre pelo acúmulo gradual de mutações nas proteínas de superfície HA e NA que resultam em mudanças antigênicas no vírus. O *antigenic shift* ocorre quando dois vírus distintos infectam a mesma célula do hospedeiro e trocam segmentos gênicos entre si, resultando em um vírus com características novas. Os suínos têm sido implicados como agentes de mixagem para IAVs de origem aviária, humana e suína pela presença nas células epiteliais do trato respiratório de receptores de ácido siálico ligado à galactose por ligações do tipo $\alpha 2,6$ (para ligação de IAVs de mamíferos) e $\alpha 2,3$ (preferenciais para ligação de IAV aviária) (19). Um exemplo do potencial de surgimento de vírus pandêmicos em suínos foi a emergência em humanos do vírus H1N1 em 2009 (H1N1pdm09), que surgiu como resultado de eventos de rearranjo gênico entre IAVs de suínos das linhagens Norte-Americana e Eurasiana (11). A extensa diversidade antigênica observada nos vírus H1 e H3 de suínos é principalmente consequência da frequente introdução de IAVs de origem humana em suínos (2). Embora a transmissão viral entre humanos e suínos seja bidirecional (humano-suíno e suíno-humano), a transmissão de vírus de humanos para suínos é mais frequente em termos de transmissão viral que resulta em uma infecção sustentada na espécie secundária, no caso a espécie suína (21). Diferenças na imunidade entre humanos e suínos poderiam explicar, em parte, a maior frequência de transmissão viral de humanos para suínos, além disso, a alta densidade de animais nas criações intensivas de suínos ampliam as oportunidades para a adaptação de vírus de origem humana em suínos.

Atualmente, três subtipos (H1N1, H1N2 e H3N2) de IAV circulam em suínos globalmente, todavia, uma enorme diversidade genética e antigênica é descrita para esses três subtipos virais (2). Uma revisão completa sobre a caracterização genética dos IAVs isolados de suínos em diferentes países pode ser encontrada na referência 38.

Na América do Sul, os dados sobre a diversidade genética e evolução dos IAVs em suínos são escassos devido à falta de um sistema de vigilância da influenza em suínos. No Brasil, os dados existentes são resultado de pesquisas realizadas principalmente por universidades e pela Embrapa Suínos e Aves, os quais têm revelado um aumento significativo da diversidade genética

dos IAVs de suínos, especialmente após 2009 (3, 6, 13, 14, 16, 17, 22, 24, 27, 28, 29, 30 e 34). Atualmente, circulam em rebanhos suínos no Brasil três clados genéticos de vírus H1 (H1N1 e H1N2), classificados como sendo da linhagem 1B (vírus de origem humana transmitido para suínos na metade da década de 1980 e no início dos anos 2000), e uma linhagem de vírus H3 (H3N2; transmitido de humanos para suínos no final da década de 1990), que se diversificou em três clados genéticos (34). Além disso, resultados da análise filogenética realizada até agora mostraram que os vírus suínos brasileiros da linhagem 1B (H1N1, H1N2) e H3N2 são distintos dos vírus que circulam em suínos em outros países (22, 34). Em relação ao vírus H1N1pdm09, logo após a sua detecção em suínos no Brasil (24, 28) houve um aumento rápido da diversidade genética e da transmissão viral entre suínos. Os dados gerados pela análise filogenética de vírus isolados entre 2009 e 2020 revelaram dez clados genéticos (gene HA) com transmissão sustentada em suínos (16). Além disso, após a introdução em suínos, o vírus H1N1pdm09 sofreu rearranjo gênico com os IAVs endêmicos nesta espécie aumentando ainda mais a diversidade genética viral (2, 21, 22, 18, 34).

A vacinação de suínos é a melhor estratégia para o controle da influenza, e os anticorpos produzidos contra a glicoproteína de superfície HA são os mais importantes para proteção contra a infecção (sendo a proteína HA o principal componente das vacinas) (35). Entretanto, para que a vacina seja eficaz, esta deve incluir cepas virais similares aos vírus que circulam a campo. Atualmente, o maior desafio para a seleção de cepas vacinais é a co-circulação de múltiplas linhagens de vírus na mesma região geográfica (2, 16, 17, 34). Em geral, as vacinas para influenza não são esterilizantes e as possíveis vantagens e desvantagens de cada tipo de vacina devem ser avaliadas. A vacinação para influenza tem por objetivo prevenir a doença clínica, reduzir a replicação e excreção viral de forma que os eventos de transmissão entre suínos sejam muito reduzidos, controlando a doença nos rebanhos ao longo do tempo (37). Diferentes vacinas e estratégias vacinais foram desenvolvidas nos últimos anos, como as vacinas produzidas com vírus inteiro inativado (Whole inactivated *influenza virus*; WIV), com vírus vivo atenuado (Live attenuated *influenza virus*; LAIV), com vetores virais que expressam uma proteína imunogênica do vírus, vacinas produzidas com partículas semelhantes a vírus (VLP, virus-like particle), vacinas de DNA ou vacinas baseadas em RNA mensageiro (mRNA). As vacinas WIV são utilizadas em diferentes países, e induzem altos níveis de anticorpos séricos contra a HA, todavia a resposta imune celular é muito limitada. São consideradas eficazes na proteção de suínos contra infecção por vírus homólogo ou geneticamente similar. Entretanto, suínos vacinados com vacina WIV, contendo adjuvante óleo-em-água, e desafiados com vírus heterólogo ou homossubtípico, mas antígenicamente distinto, podem desenvolver doença respiratória exacerbada associada à vacinação (VAERD) (8), caracterizada por pneumonia broncointersticial severa com bronquiolite necrótica e hiperplasia (8, 9). Foi descrito também uma menor eficácia das vacinas WIV em leitões com anticorpos maternos (37). As vacinas LAIV são produzidas com vírus atenuados por meio de mutação induzida em um determinado gene. Alguns exemplos de modificações que geram atenuação viral são: mutações introduzidas nos genes das polimerases virais tornando o vírus sensível à temperaturas mais altas (18) ou mutação no gene que codifica a proteína NS1, reduzindo a capacidade do vírus de impedir a síntese de interferon (IFN) do tipo I (32). Em geral, as vacinas LAIV se mostraram seguras após administração pela via intranasal, e proteção cruzada significativa foi observada em suínos vacinados após desafio com vírus antígenicamente distinto, mas do mesmo subtipo (18, 37). Também foi demonstrada habilidade da vacina LAIV em superar a interferência dos anticorpos maternos, e em condições experimentais não foi observada a ocorrência de VAERD em suínos vacinados e posteriormente desafiados com um vírus heterólogo (10). Uma desvantagem deste tipo de vacina é a possibilidade de ocorrência de rearranjo gênico entre o vírus vacinal e os vírus endêmicos (wild-type) em suínos, levando a emergência de novos vírus contendo uma combinação de genes do vírus vacinal e genes de vírus suíno wild-type (31). Recentemente, um estudo que comparou suínos não vacinados e suínos vacinados com uma vacina LAIV bivalente (H1N1 e H3N2) contendo uma proteína indutora de IgA (IGIP) e desafiados com vírus antígenicamente distintos, mostrou que os animais vacinados tiveram redução da replicação viral nos pulmões, da excreção viral e lesões pulmonares, além do bloqueio da transmissão do

vírus de desafio (independente de qual subtipo viral foi utilizado no desafio dos animais) (26). As vacinas vetoriais utilizam como vetor algum vírus bem caracterizado (ex.: adenovírus, alfavírus, poxvírus), mas com replicação limitada no hospedeiro, e que apresenta ao sistema imune do hospedeiro uma proteína de um vírus-alvo contra a qual se quer uma resposta imunológica (25). Esse tipo de vacina permite uma rápida atualização do antígeno de interesse e induz resposta imune humoral e celular específica (12), porém a presença de imunidade prévia ao vetor viral pode reduzir as respostas imunológicas induzidas pela vacina (7). Estudos em suínos demonstraram proteção contra desafio por vírus homólogo (4), proteção parcial contra vírus heterólogo (1), e indução de anticorpos IgA em suínos vacinados pela via intranasal (5). Outro tipo de vacina testada em suínos são as vacinas contendo VLPs, que são partículas semelhantes a vírus, mas sem a capacidade de replicação porque não contém material genético viral. Os VLPs carregam um gene de interesse que quando expressado na célula do hospedeiro induz resposta imune humoral e celular. Estudos mostraram que suínos vacinados com VLPs contendo o gene que codifica a proteína HA desenvolveram títulos robustos de anticorpos e tiveram redução das lesões pulmonares e excreção viral após o desafio (15). As vacinas de DNA consistem em um plasmídeo de expressão contendo genes que codificam um ou mais antígenos imunogênicos de interesse. O DNA plasmídeo é inserido em bactérias, e posteriormente purificado e administrado ao hospedeiro. A produção do antígeno de interesse nas células do hospedeiro resulta em uma resposta imune humoral e celular contra este antígeno (33). Para aumentar a eficiência e imunogenicidade das vacinas de DNA é necessário utilizar adjuvantes, e diferentes vias de administração e métodos, como por exemplo associação com diferentes vacinas (vacina DNA + reforço com uma segunda vacina). Um dos problemas apresentados por vacinas de DNA é que os anticorpos produzidos contra o vetor plasmídeo podem tornar a vacina ineficaz ou pode haver o desenvolvimento de tolerância imunológica contra os antígenos presentes na vacina (33). Por último, as vacinas baseadas em mRNA carregam uma informação genética que será codificada pela célula do hospedeiro e resultará na expressão de uma proteína de interesse. As vacinas de mRNA podem estimular o sistema imune inato, induzindo IFN do tipo I e citocinas inflamatórias, além de resposta robusta de células T CD4+ e CD8+, e anticorpos neutralizantes. Em suínos foi demonstrada proteção clínica, e redução da excreção viral após o desafio com vírus homólogo (23).

Independentemente do tipo de vacina utilizada, é preciso ressaltar a importância de que sejam incluídos na vacina contra influenza antígenos virais contemporâneos, para aumentar a cobertura antigênica da diversidade viral circulante (37). Por isso, a análise periódica de novos vírus isolados de suínos deve ser realizada para possibilitar a atualização das vacinas para suínos. A grande diversidade viral observada nos últimos 14 anos (16, 17, 22, 34), particularmente pela circulação nos rebanhos de vírus contendo proteínas HA e NA antigenicamente distintas (17), representa um enorme desafio para a produção de vacinas eficazes. A análise antigênica, por cartografia antigênica, de IAVs isolados de suínos no Brasil até 2018 mostrou que pelo menos sete componentes ou antígenos virais deveriam ser incluídos em uma vacina de forma a abranger toda a diversidade viral existente no rebanho brasileiro (17). Fundamentalmente, o primeiro passo é a implementação de uma estratégia de vigilância para caracterização regular dos IAVs de suínos para otimizar o design da vacina, onde cepas ou candidatos vacinais seriam selecionados de acordo com o cluster antigênico mais prevalente ou atual em circulação, em vez de abranger toda a diversidade detectada em um período de tempo mais longo (17).

Como conclusão, é extremamente importante que seja realizada a vigilância do vírus influenza A em suínos com o objetivo de avaliar a frequência (e evolução) dos clados que circulam nos sistemas de produção. Os dados gerados pelo monitoramento de suínos irão auxiliar na seleção de cepas (ou candidatos) vacinais, levando em conta a diversidade genética e antigênica dos vírus circulantes em suínos no Brasil. A disponibilização de novas vacinas, em conjunto com a implementação de medidas de biossegurança em granjas, são essenciais para o controle da influenza em rebanhos suínos e para reduzir os riscos de surgimento de vírus com potencial pandêmico nesta espécie.

Referências

- (1) **Abente E J., Rajão D.S., Gauger P. et al.** Alphavirus-vectored hemagglutinin subunit vaccine provides partial protection against heterologous challenge in pigs. *Vaccine*, v. 37, n. 11, p. 1533–1539, 2019. (2) **Anderson T.K., Chang J., Arendsee Z.W. et al.** Swine Influenza A Viruses and the Tangled Relationship with Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 11, a038737, 2021. (3) **Biondo, N., Schaefer R., Gava D. et al.** Genomic Analysis of Influenza A Virus from Captive Wild Boars in Brazil Reveals a Human-like H1N2 Influenza Virus. *Veterinary Microbiology*, 168, p.34–40, 2014. (4) **Bosworth, B., Erdman M.M., Stine D.L. et al.** Replicon particle vaccine protects swine against influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 33, n. 6, p. e99–e103, 2010. (5) **Braucher D.R., Henningson J.N., Loving C.L. 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*, v. 19, n. 11, p. 1722–1729, 2012. (6) **Ciacchi-Zanella J.R., Schaefer R., Gava D. et al.** Influenza A Virus Infection in Brazilian Swine Herds Following the Introduction of Pandemic 2009 H1N1. *Veterinary Microbiology*, 180, p.118–122, 2015. (7) **Ertl H.C.** Viral vectors as vaccine carriers. *Current Opinion in Virology*, v. 21, p. 1–8, 2016. (8) **Gauger P.C., Vincent A.L., Loving C. L. et al.** Enhanced pneumonia and disease in pigs vaccinated with an inactivated human-like (δ -cluster) H1N2 vaccine and challenged with pandemic 2009 H1N1 influenza virus. *Vaccine*, v. 29, n. 15, p. 2712–2719, 2011. (9) **Gauger P.C., Vincent A.L., Loving C. L. et al.** Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. *Veterinary Pathology*, v. 49, n. 6, p. 900–912, 2012. (10) **Gauger P.C., Loving C.L., Khurana S. 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, 2014. (11) **Garten R.J., Davis, T.C., Russel C.A. et al.** Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science*, 325, p.197–201, 2009. (12) **Joshi L. R., Knudsen D., Piñeyro P. et al.** Protective efficacy of an orf virus-vector encoding the hemagglutinin and the nucleoprotein of influenza A virus in swine. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 747574, 2021. (13) **Haach V., Gava D., Cantão, M.E. et al.** One-Step Multiplex RT-QPCR for the Detection and Subtyping of Influenza A Virus in Swine in Brazil. *Journal of Virological Methods*, 269, p.43–48, 2019. (14) **Haach V., Gava D., Cantão M.E. et al.** Evaluation of Two Multiplex RT-PCR Assays for Detection and Subtype Differentiation of Brazilian Swine Influenza Viruses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, p.1447–1451, 2020. (15) **Hernandez L.A., Miller C. L., Vaughn E.M.** Particle and subunit-based hemagglutinin vaccines provide protective efficacy against H1N1 influenza in pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 191, p. 35–43, 2016. (16) **Junqueira D.M., Tochetto C., Anderson T. et al.** Human-to-Swine Spillover and Onward Transmission of H1N1pdm09 in Brazil; Embrapa Suínos e Aves: Concórdia, SC, Brazil, 2023; manuscript in preparation. (17) **Lopes S., Anderson T.K., Schaefer R. et al.** Antigenic and Genetic Diversity of H1 and H3 Influenza A Viruses in Swine in Brazil; University of London: Hertfordshire, UK, 2023; manuscript in preparation. (18) **Loving C.L., Vincent A.L., Pena 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, n. 40, p. 5830–5838, 2012. (19) **Ma W., Kahn R.E. and Richt J.A.** The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 3(1), 158–66. 2009. (20) **Ma W.** Swine Influenza Virus: Current Status and Challenge. *Virus Research*, 288: 198118, 2020. (21) **Nelson M.I., Vincent A.L.** Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human–animal interface. *Trends in Microbiology* 3:142–53, 2015. (22) **Nelson M.I., Schaefer R., Gava D. et al.** Influenza A viruses of human origin in swine, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 8:1339–47, 2015. (23) **Petsch B., Schnee M., Vogel A.B. et al.** Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nature Biotechnology*, v. 30, n. 12, p. 1210–1216, 2012. (24) **Rajão D.S., Costa A.T.R., Brasil B.S.A.F. 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*, 7(5), 783–790, 2013. (25) **Rajão D. S., Pérez D. R.** Universal vaccines and vaccine platforms to protect against influenza viruses in humans and agriculture. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. 123, p. 1–21, 2018. (26) **Rajão D.S., Zanella G.C., Wymore Brand M. et al.** Live attenuated influenza A virus vaccine expressing an IgA-inducing protein protects pigs against replication and transmission. *Frontiers in Virology*, 3:1042724. 2023. (27) **Rech R.R., Gava D., Silva M.C. et al.** Porcine Respiratory Disease Complex after the Introduction of H1N1/2009 Influenza Virus in Brazil. *Zoonoses & Public Health*, 65, e155–e161, 2018. (28) **Schaefer R., Zanella J.R.C., Brentano L. et al.** Isolation and Characterization of a Pandemic H1N1 Influenza Virus in Pigs in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31, p.761–767, 2011. (29) **Schaefer R., Rech R.R., Gava D. et al.** A Human-like H1N2 Influenza Virus Detected during an Outbreak of Acute Respiratory Disease in Swine in Brazil. *Archives of Virology*, 160, p.29–38, 2015. (30) **Schmidt C., Cibulski S.P., Muterle Varela A.P. et al.** Full-Genome Sequence of a Reassortant H1N2 Influenza A Virus Isolated from Pigs in Brazil. *Genome Announcement*, 2, e01319-14, 2014. (31) **Sharma A., Zeller M.A., Li G. et al.** Detection of live attenuated influenza vaccine virus and evidence of reassortment in the U.S. swine population. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 32, n. 2, p. 301–311, 2020. (32) **Solórzano A., Webby R.J., Lager K.M. 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, n. 12, p. 7535–7543, 2005. (33) **Soema P.C., Kompier R., Amorij J.P. et al.** Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 94, p. 251–263, 2015. (34) **Tochetto C., Junqueira D.M., Anderson T.K. et al.** Introductions of Human-Origin Seasonal H3N2, H1N2 and Pre-2009 H1N1 Influenza Viruses to Swine in Brazil. *Viruses*, 15, p. 576, 2023. (35) **Van Reeth K., Vincent A. L.** Influenza viruses. In: Zimmerman J.J. et al. (Eds.). *Diseases of Swine*. 11th. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2019. p. 576–593 (36) **Vincent A.L., Ma W., Lager K.M. et al.** Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. *Vaccine*, v. 25, n. 47, p. 7999–8009, 2007. (37) **Vincent A.L., Perez D.R., Rajão, D. et al.** Influenza A virus vaccines for swine. *Veterinary Microbiology*, v. 206, p. 35–44, 2017. (38) **Vincent, A.L., Anderson T.K., Lager, K.M.** A brief introduction to influenza A virus in swine. In *Animal Influenza Virus. Methods in Molecular Biology*; Spackman, E., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2020; Volume 2123, pp. 249–262. (39) **Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T. et al.** Evolution and Ecology of Influenza A Viruses, *Microbiological Reviews*, 56 (1), p.152-179, 1992.