

## **INFLUENZA EM SUÍNOS: SITUAÇÃO BRASILEIRA E MUNDIAL**

**Janice Reis Ciacci Zanella**

*Embrapa Suínos e Aves*

### **Introdução**

Dentre as doenças zoonóticas, a influenza ou gripe é uma das mais importantes e estudadas, pois afeta a economia e a saúde de ambos humanos e animais mundialmente. A infecção causada pelo vírus influenza (VI) causa surtos de enfermidade respiratória aguda em suínos, denominada Influenza Suína (IS). O suíno pode se infectar com vários subtipos do VI tanto de mamíferos quanto de aves, sendo um importante hospedeiro, desempenhando um papel importante na epidemiologia da influenza.

Essa palestra vai revisar a evolução dos VI em suínos no Brasil e no mundo. Além disso, vai descrever os principais resultados dos trabalhos de pesquisa e investigação com esse vírus no Brasil pela Embrapa Suínos e Aves.

### **Etiologia da IS**

A IS é causada por vírus de influenza A pertencentes à família *Orthomyxoviridae*. Os vírus influenza A (VIA) são envelopados e tem o genoma viral composto de oito segmentos de RNA interligados e protegidos por uma proteína viral chamada nucleoproteína (NP). Os VIA são tipados de acordo com suas proteínas de superfície (envelope): a hemaglutinina (HA) ou a neuroaminidase (NA), que são os maiores alvos da resposta imune do hospedeiro. A pressão imunitária é a maior causa na seleção de mutantes com substituições em aminoácidos, um processo chamado “*antigenic drift*”, que são mudanças menores na HA ou NA. Todavia mudanças maiores podem ocorrer no vírus, chamadas “*antigenic shift*”, causada por uma substituição de um segmento inteiro do genoma. Essa natureza segmentada no genoma do VI propicia o *antigenic shift* ou mesmo o

*reassortment* ou rearranjo. Quando uma célula do hospedeiro é infectada com dois (ou mais) VI diferentes uma troca de segmentos gênicos entre eles pode ocorrer, permitindo a geração de uma progênie de vírus com uma nova combinação de genes.

Em mamíferos, os VI replicam principalmente no trato respiratório, geralmente acompanhado de sinais clínicos. Já em espécies aviárias o sítio principal de replicação é o trato intestinal, sem ocorrência de sinais clínicos. Em aves aquáticas os VI são geralmente muito adaptados ao hospedeiro e demonstram baixa taxa de evolução, sendo que nos mamíferos a taxa de evolução é muito maior.

O VI faz parte do complexo respiratório dos suínos, juntamente com outros agentes como o *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV) e o circovírus suíno tipo 2 (PCV2). Portanto, a infecção pelo VI não pode ser tratada como um caso isolado, mas sim como parte de um complexo de agentes infecciosos capazes de agravar o quadro clínico e dificultar o controle.

## **Epidemiologia da IS**

A IS é uma doença endêmica, acomete rebanhos em todas as fases de produção e geralmente não é sazonal. A introdução em rebanhos ocorre por movimento de animais de reposição de origens diferentes e o VIS é transmitido principalmente de suíno para suíno por secreções do sistema respiratório. A infecção característica tem um quadro de morbidade alta, afetando quase toda totalidade do rebanho, mas com mortalidade baixa.

O suíno é chave na epidemiologia da influenza, pois se infecta com subtipos de VI de diferentes espécies e esse rearranjo entre diferentes VI infectando as células do sistema respiratório podem causar o surgimento de novas progênies, novos vírus, os quais os animais (e mesmo o homem) não tem imunidade, ou mesmo as vacinas disponíveis podem controlar. Os suínos se infectam com os subtipos A/H1N1 (dentre eles o clássico), A/H3N2 e A/H1N2. Além destes VI, o vírus H1N1 que emergiu em 2009 (H1N1pdm09) também está presente na população suína em diversos países do mun-

do. Contudo, os VI circulantes em suínos contêm diferenças genéticas devido a introduções independentes, como apresentado a seguir.

Na América do Norte, principalmente nos Estados Unidos, importante produtor e exportador de suínos o VI H1N1 clássico (cH1N1) era a principal causa de IS até o final da década de 90. Vacinas comerciais foram preparadas para esse subtipo e colocadas em uso desde 1994. Mas, essa situação mudou no final da década de 90 com o surgimento de vírus influenza H3N2 recombinante triplo contendo uma combinação única de genes internos conhecida como “gene interno de rearranjo triplo” ou TRIG (*triple reassortant internal gene cassette*). A partir de então, houve um aumento na taxa de mudanças genéticas em isolados de VI da América do Norte, e *clusters* genéticos e antigênicos diferentes começaram a evoluir. Os VI contendo o TRIG são caracterizados por possuírem os segmentos gênicos NP, M, NS do cH1N1, os segmentos PB2 e PA de vírus aviários e PB1, HA e NA de vírus humanos. Assim, nos EUA e Canadá, os recombinantes H1 e os vírus H3N2 são endêmicos e a maioria contém o TRIG, independente do subtipo. O TRIG está também presente na Coreia do Sul, Vietnã e China. Assim, vírus com o HA de linhagem cH1N1 evoluíram formando os *clusters alfa, beta, gama e delta*, sendo que os quatro *clusters* do gene HA podem ser encontrados contendo genes da neuraminidase dos subtipos N1 ou N2. O surgimento do *cluster delta* de H1N1 e H1N2 com o gene HA derivado de VI humano (e diferente do cH1N1) foi outro evento importante (2005 nos EUA e 2003 no Canadá). Esses vírus emergiram e se espalharam em rebanhos americanos e atualmente são classificados como *subclusters delta 1* e *delta 2* (H1N2 e H1N1, respectivamente). Os HAs do *cluster delta* são pareados com N1 ou N2 da linhagem humana. Desta forma, atualmente, circulam na população suína dos EUA os vírus H1N1pdm09 (e demais *gama cluster*), H1N1 (*clusters alfa, beta, e delta 2*), H1N2 (*delta 1*) e *cluster IV H3N2*.

Na Ásia e Continente Europeu circulam vários subtipos de VI, apesar do vírus cH1N1 ter circulado naquelas regiões, eles foram substituídos por outros subtipos virais. Na mesma época do surgimento do vírus cH1N1 em suínos, em 1976, emergiu também o vírus H3N2 humano (*human-like*). Em 1979, surgiu o vírus influenza H1N1 aviário (*avian-like*), o qual rapidamente substituiu o vírus cH1N1, tornando-se a linhagem dominante e, posteriormente, sofreu

um rearranjo com o vírus H3N2 humano, dando origem a vírus contendo os genes HA e NA de origem humana e os sendo esses diferentes dos genes internos de origem aviária. A partir da década de 90 emergiram os vírus H1N2 contendo diferentes combinações de genes. A maioria dos vírus de influenza suína que circulam na Europa também é encontrada na Ásia, porém existem várias linhagens virais que são encontradas somente na Ásia. A China é ponto chave na epidemiologia dos VI na Ásia, devido à elevada densidade e produção animal como também devido às práticas de manejo. Isolados de VI em suínos na China incluem cH1N1, H1N1pdm09, H3N2 da Eurásia, H3N2 de origem humana ou H3N2 Norte Americano, H1N1 da Eurásia e H1N2 contendo TRIG, dentre outros. Assim, VI isolados na China incluem VI da América do Norte e da Europa, rearranjos entre VI da América do Norte e Europa e VI únicos de origem aviária. A maior parte destes dados é originária da região de Hong Kong, sendo que no restante do país a informação é escassa. Outros países da Ásia realizam monitorias de VI e a situação também é diversa. Na Coreia do Sul, o cH1N1, H1N2 TRIG e H3N2 circulam, sendo que o H3N2 de origem humana também foi introduzido. Da mesma forma, o H3N2 de origem humana contendo o TRIG também circula no Vietnã. Na Tailândia circulam VI semelhantes aos da Eurásia, como o cH1N1, H1N1, H1N1pdm09 e H3N2 (humano).

Na América do Sul, a Argentina desponta como a região com mais estudos de vigilância na população suína para VI, sendo que no final de 2008 um H3N2 de origem humana foi isolado de suínos com sinais típicos de influenza. A reprodução experimental da doença mostrou que o vírus foi transmitido de forma eficiente entre os suínos, e que os animais inoculados tinham lesões características do VI, sugerindo que este vírus é completamente adaptado para suínos e tem potencial para ser mantido na população suína. Também em 2009, foi relatada a infecção de suínos com o vírus H1N1pdm09 e, em 2010 e 2011, também foi relatado o isolamento de vírus recombinantes naturais com os genes internos do H1N1pdm09 e os genes de superfície (HA e NA) de origem humana H1. Portanto, há alguma evidência indireta de circulação de VI humano, como H1, na Argentina. Em 2011, outro vírus recombinante foi isolado contendo os genes de superfície do vírus H3N2 totalmente humano, isolado pela primeira vez em 2008, e todos os genes internos originários do vírus H1N1pdm09. Os sinais clínicos observados em todos estes casos correspondem aos sinais típicos de

gripe (febre, dispnéia, tosse, espirros, etc), e a ausência de vacinas e as características de produção de suínos da Argentina podem contribuir para o surgimento de novos rearranjos.

## **IS no Brasil**

A pesquisa da influenza em suínos no Brasil vem evoluído em dados e em qualidade depois do surgimento do H1N1pdm09 na população humana e inúmeros surtos em suínos. Dentre os poucos estudos existentes antes de 2009 destaca-se a sorologia de rebanhos suínos de 10 estados brasileiros entre 1996 a 1999, sendo que os testes de HI (inibição da hemaglutinação) indicaram a presença de anticorpos contra os subtipos virais H1N1/Texas/1/77 (2.2%) e H3N2/New Jersey/76 (16.7%).

Desde 2009, um projeto co-financiado pelo CNPq/MAPA e Embrapa capacitaram o laboratório da Embrapa Suínos e Aves para diagnóstico e análise genômica de VI. A coleta de amostras de suas nasais e tecido pulmonar de suínos possibilitaram o isolamento de diferentes VI. Deste trabalho surgiu a primeira notificação às autoridades sanitárias do H1N1pdm09 em rebanhos suínos brasileiros. Isso foi baseado em diagnóstico clínico, histopatológico e viral e confirmado pela análise das sequências dos genes VI isolados de suínos mostraram elevada identidade (98-100%) com o H1N1pdm09 que circula em humanos desde 2009.

Ainda neste estudo foi realizada a análise de soros de suínos coletados de granjas comerciais no período de julho de 2009 a dezembro de 2011, o que mostrou uma prevalência de 60% de soros positivos para influenza A através de um teste de ELISA comercial. Além disso, a análise retrospectiva por HI de soros coletados de suínos no Brasil, antes e depois de 2009, revelou que antes de 2009 a presença de anticorpos contra o H1N1pdm09 não era detectada em suínos no Brasil.

## **Sinais clínicos**

Os sinais clínicos típicos de influenza são aqueles de doença respiratória aguda, caracterizada por febre, apatia, redução de consumo de ração, dificuldade respiratória, tosse, espirro, conjuntivite e descarga nasal. O curso dura entre 2 a 7 dias e observa-se um acometimento de muitos suínos do rebanho. Os suínos se recuperam em 4 a 6 dias, sendo que na maioria das vezes as pneumonias bacterianas podem ocorrer.

## **Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial do surto pode ser realizado por identificação viral através do isolamento do vírus de secreções nasais ou lavados pulmonares em cultivos celulares ou em ovos de galinha embrionados. O material suspeito deve ser remetido ao laboratório, em suabes de material sintético em meio de transporte (salina e glicerol) e conservado em refrigeração. Amostras de tecido de traquéia e pulmão também podem ser enviadas para isolamento viral e histopatologia com confirmação por imunohistoquímica.

Testes moleculares como o RT-PCR (reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa) podem ser aplicados para identificação do gene da proteína M (matriz), confirmando assim o VI ou também para o subtipo específico (se H1 ou H3, se N1 ou N2) com rapidez e segurança. Testes rápidos e específicos como a PCR quantitativa (PCR em tempo real) estão disponíveis para estudos de dinâmica de infecção ou mesmo para diferenciação de VI do H1N1pdm09.

Testes sorológicos (inibição da hemaglutinação - HI) devem ser realizados em amostras coletadas após o surto (agudas) e convalescentes (3 a 4 semanas após). O teste de ELISA é comercialmente disponível, mas o HI ainda é o teste mais utilizado.

## Controle

O controle pode ser realizado por aplicação de vacinas e cuidados com biossegurança. Uma cartilha publicada pela Embrapa Suínos e Aves, *Gripe A – Recomendações para a Prevenção na Suinocultura* explica quais são esses cuidados e pode ser obtida no site gratuitamente: <http://www.cnpsa.embrapa.br/?ids=Sn6l70p1l&macro=3&tipo=18>.

Vacinas comerciais contra os tipos H1N1, H1N2 e H3N2, e mais atualmente o H1N1pdm09 estão disponíveis no mundo todo, todavia estão em período de registro no Brasil. Nos Estados Unidos as vacinas para VIA foram introduzidas para o vírus clássico H1N1 em 1994. No ano 2000 aproximadamente 40% dos rebanhos dos EUA vacinavam as matrizes. Esse número subiu para 70% dos rebanhos em 2006 e atualmente estima-se que 90% dos rebanhos vacinam as matrizes naquele país. O grande desafio das vacinas para influenza suína é que os VI em circulação estão sob constante evolução ou emergência desde 1998 com o surgimento dos TRIG. Atualmente, estima-se que sete clusteres antigênicos e subtipos co-circulam na população suína dos Estados Unidos como o H3N2,  $\alpha$ H1,  $\beta$ H1,  $\gamma$ H1,  $\delta$ -1H1,  $\delta$ -2H1 e H1N1pdm09. Assim, seria necessário atualizar as vacinas utilizadas em cada granja, tendo presente na vacina os subtipos circulantes no rebanho.

Assim como nos demais países onde a IS é considerada endêmica, aqui no Brasil o seu controle não faz parte de programas sanitários dos governos, como é o caso de outras enfermidades como a peste suína clássica, por exemplo. Assim, não existe um fundo federal permanente para essas necessidades.

A indústria suína precisa de respostas rápidas e muito trabalho de pesquisa e vigilância precisa ser feito. A vigilância pode gerar um banco de dados atualizado das sequências genômicas, e apoiar a formar uma coleção de vírus ou antígenos ou mesmo um banco de dados que forneça uma caracterização clínica dos surtos; isso tudo associado a um retrato do rebanho. Isso ainda não está disponível no Brasil. É necessária uma identificação rápida e notificação de vírus em casos clínicos, desenvolvimento de reagentes sorológicos e diagnósticos nacionais e informação da seleção de estirpes vacinais.

A OIE (Organização Mundial de Saúde Animal), FAO e Organização Mundial de Saúde (WHO) formou uma rede de especialistas em influenza animal denominado OFFLU. O trabalho deste grupo, que inclui a participação do Brasil, tem como objetivo principal o delineamento e atualização das ações para coordenar vigilância global de influenza em suínos e desenvolver meios padronizados para essa vigilância. Além disso, os especialistas trabalham para desenvolver um melhor entendimento das implicações globais da infecção de influenza em suínos para saúde animal e interface humana-animal.

## **Agradecimentos**

O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (CNPq/MAPA edital 64 - Processo no. 578102/2008-0). A autora agradece a equipe do projeto da Embrapa Suínos e Aves: Rejane Schaefer, Luizinho Caron, Danielle Gava, Marcos Morés, Marisete Schiochet, Neide Simon, Giseli Ritterbusch, Camila Sá Rocha e Simone Silveira (Universidade do Contestado – Concórdia-SC) e aos pesquisadores do National Animal Disease Center do USDA em Ames, Iowa, Dr. Amy Vincent e Dr. Kelly Lager.

## **Literatura consultada**

Brentano, L., Zanella, J.R.C., Mores, N., Piffer, I.A. 2002. Levantamento soroepidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus de influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. In Comunicado técnico (Concórdia, Embrapa Suínos e Aves), pp. 1-6.

Cappuccio, J.A., Pena, L., Dibarbora, M., Rimondi, A., Pineyro, P., Insarralde, L., Quiroga, M.A., Machuca, M., Craig, M.I., Olivera, V., Chockalingam, A., Perfumo, C.J., Perez, D.R., Pereda, A., 2011, Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a non-contemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. *J Gen Virol* 92, 2871-2878.

Ciacchi-Zanella, J.R., Schaefer, R., Schiochet, M.F., Silveira, S., Caron, L., Piovezan, U. 2011. Current and retrospective serology study of influenza A viruses antibodies in Brazilian pig populations (Concordia, SC, Brazil, Embrapa Swine and Poultry Research Center), p. 1.

Ciacchi Zanella, J. R., Vincent, A., Prickett, J.R., Zimmerman S.M., Zimmerman J. J. Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope blocking ELISA developed for avian species. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, v.22, p.3 - 9, 2010.

Garten, R.J., Davis, C.T., Russell, C.A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W.M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C.B., Emery, S.L., Hillman, M.J., Rivaller, P., Smagala, J., de Graaf, M., Burke, D.F., Fouchier, R.A., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C.M., Lopez-Gatell, H., Olivera, H., Lopez, I., Myers, C.A., Faix, D., Blair, P.J., Yu, C., Keene, K.M., Dotson, P.D., Jr., Boxrud, D., Sambol, A.R., Abid, S.H., St George, K., Bannerman, T., Moore, A.L., Stringer, D.J., Blevins, P., Demmler-Harrison, G.J., Ginsberg, M., Kriner, P., Waterman, S., Smole, S., Guevara, H.F., Belongia, E.A., Clark, P.A., Beatrice, S.T., Donis, R., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C.B., Shaw, M., Jernigan, D.B., Uyeki, T.M., Smith, D.J., Klimov, A.I., Cox, N.J., 2009, Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325, 197-201.

Kyriakis, C.S., Brown, I.H., Foni, E., Kuntz-Simon, G., Maldonado, J., Madec, F., Essen, S.C., Chiapponi, C., Van Reeth, K., 2009, Virological Surveillance and Preliminary Antigenic Characterization of Influenza Viruses in Pigs in Five European Countries from 2006 to 2008. *Zoonoses Public Health*.

Lee, C.S., Kang, B.K., Kim, H.K., Park, S.J., Park, B.K., Jung, K., Song, D.S., 2008, Phylogenetic analysis of swine influenza viruses recently isolated in Korea. *Virus Genes* 37, 168-176.

Lorusso, A., Vincent, A.L., Gramer, M.R., Lager, K.M., Ciacchi-Zanella, J.R., 2012, Contemporary Epidemiology of North American Lineage Triple Reassortant Influenza A Viruses in Pigs. *Curr Top Microbiol Immunol*.

Ngo, L.T., Hiromoto, Y., Pham, V.P., Le, H.T., Nguyen, H.T., Le, V.T., Takemae, N., Saito, T., 2012, Isolation of novel triple-reassortant swine H3N2 influenza viruses possessing the hemagglutinin and neuraminidase genes of a seasonal influenza virus in Vietnam in 2010. *Influenza Other Respi Viruses* 6, 6-10.

OIE 2011. World Animal Health Information Database (WAHID) In WAHID interface Weekly disease information.

Pereda, A., Cappuccio, J., Quiroga, M.A., Baumeister, E., Insarralde, L., Ibar, M., Sanguinetti, R., Cannilla, M.L., Franzese, D., Escobar Cabrera, O.E., Craig, M.I., Rimondi, A., Machuca, M., Debenedetti, R.T., Zenobi, C., Barral, L., Balzano, R., Capalbo, S., Risso, A., Perfumo, C.J., 2010, Pandemic (H1N1) 2009 outbreak on pig farm, Argentina. *Emerg Infect Dis* 16, 304-307.

Pereda, A., Rimondi, A., Cappuccio, J., Sanguinetti, R., Angel, M., Ye, J., Sutton, T., Dibarbora, M., Olivera, V., Craig, M.I., Quiroga, M., Machuca, M., Ferrero, A., Perfumo, C., Perez, D.R., 2011, Evidence of reassortment of pandemic H1N1 influenza virus in swine in Argentina: are we facing the expansion of potential epicenters of influenza emergence? *Influenza Other Respi Viruses* 5, 409-412.

Schaefer, R., Ciacci-Zanella, J. R., Brentano, L., Vincent, A.L., Ritterbusch, G. A., Silveira, S., Caron, L. and Mores, N., 2011, Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31, 761-767.

Van Reeth, K., Brown, I.H., Durrwald, R., Foni, E., Labarque, G., Lenihan, P., Maldonado, J., Markowska-Daniel, I., Pensaert, M., Pospisil, Z., Koch, G., 2008, Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. *Influenza Other Respi Viruses* 2, 99-105.

Vincent, A.L., Ciacci-Zanella, J.R., Lorusso, A., Gauger, P.C., Zanella, E.L., Kehrl, M.E., Jr., Janke, B.H., Lager, K.M., 2010, Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs. *Vaccine* 28, 2782-2787.

Vincent, A.L., Lager, K.M., Harland, M., Lorusso, A., Zanella, E., Ciacci-Zanella, J.R., Kehrl, M.E., Klimov, A., 2009a, Absence of 2009 pandemic H1N1 influenza A virus in fresh pork. *PLoS One* 4, e8367.

Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Janke, B.H., Richt, J.A., 2008, Swine influenza viruses a North American perspective. *Adv Virus Res* 72, 127-154.  
Zhu, H., Webby, R., Lam, T.T., Smith, D.K., Peiris, J.S., Guan, Y., 2011, History of Swine Influenza Viruses in Asia. *Curr Top Microbiol Immunol*.