

Molecular evaluation of influenza A virus in swine at slaughterhouses in Colombia

Evaluación molecular de la presencia del virus de influenza A en cerdos en plantas de beneficio en Colombia

Juan Flórez R¹ MVZ; Víctor Vera A¹ Ph.D; Ángela Lora M¹ M.Sc; Gloria Ramírez-Nieto^{1*} Ph.D.

¹Universidad Nacional de Colombia (Bogotá), Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Carrera 30# 45-03 Edificio 561B Bogotá, Colombia.

*Correspondencia: ggramirez@unal.edu.co

Received: Octubre 2017; Accepted: July 2018.

ABSTRACT

Objective. To assess the presence of influenza A virus and to evaluate the impact of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus on the endemic strains circulating in the Colombian swine population after its emergence and spread. **Materials and methods.** 369 lung tissue samples were collected from clinically normal slaughterhouse pigs from 11 geographic regions of Colombia, which were analyzed using qRT-PCR test for the detection of influenza A virus. After molecular detection, positive samples were processed to perform isolation trials in specific pathogen free chicken embryo eggs, and the presence of the virus was accomplished by hemagglutination test and RT-PCR assays. **Results.** Molecular detection techniques showed circulation of swine influenza viruses in five out of 11 geographic regions monitored. Likewise, sample testing by viral isolation analysis enabled successful recovery and confirmation of five viral strains from two geographic regions. **Conclusions.** It was possible to demonstrate that slaughterhouses represent a feasible alternative for research and characterization of influenza virus, allowing researchers to collect pig samples from different origins. They also provide a useful tool for achieving viral isolation and early detection of molecular changes that would help to anticipate the appearance of strains with pandemic and/or epidemic potential throughout the national territory.

Keywords: H1N1 viruses; isolation; slaughterhouse; influenza; qRT-PCR; reverse transcriptase polymerase chain reaction (*Source: DeCS*).

RESUMEN

Objetivo. Determinar la presencia del virus de influenza A y evaluar el efecto que tuvo el surgimiento y diseminación del virus H1N1 pandémico de 2009 sobre las cepas endémicas que circulan en la población de cerdos de Colombia. **Materiales y métodos.** Se recolectaron 369 muestras de tejido pulmonar de cerdos clínicamente sanos en plantas de beneficio de 11 regiones geográficas de Colombia, que fueron analizadas mediante qRT-PCR para la detección de virus de influenza A. Se seleccionaron muestras positivas para el aislamiento en huevos de embrión de pollo SPF, y la presencia del virus fue confirmada con ensayos de hemaglutinación y RT-PCR. **Resultados.** Se demostró la circulación del virus de influenza A en cinco de las 11 regiones geográficas analizadas y se logró el aislamiento de cinco cepas de campo a partir de muestras provenientes de dos de estas regiones. **Conclusiones.** Fue posible comprobar que el análisis de muestras obtenidas en plantas de beneficio constituye una alternativa valiosa para el estudio y caracterización de los virus de influenza en cerdos, al permitir cobertura de un mayor número de individuos, haciendo posible la detección molecular y el aislamiento de cepas de campo, aspectos fundamentales para establecer el surgimiento de cepas con potencial pandémico y/o epidémico en el territorio nacional.

Palabras clave: Aislamiento; influenza; planta de beneficio; RT-PCR en tiempo real; reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa; virus H1N1 (*Fuente: DeCS*).

INTRODUCTION

The occurrence of respiratory diseases is considered one of the main challenges for the pig industry worldwide, leading to substantial losses associated to pig mortality in different production stages (1). Regarding swine influenza, it plays a key role as one of the causes of the porcine respiratory complex (PRC). Swine influenza is characterized by a high morbidity, which allows a rapid propagation among pigs, that is enhanced by the transmission routes, including airborne particles, contaminated fomites and direct contact with secretions from infected individuals (2). Sick animals initially show fever, lethargy, anorexia and it is usual to note nasal and ocular discharges (3). Other characteristic signs include respiratory distress and cough, the latter is caused by extensive bronchiolitis and bronchitis. Pig recovery is fast, usually taking between six and seven days after infection (4). Although all age groups may be compromised, it has been demonstrated an increased level of incidence for young pigs, especially those at weaned and nursery stages (5).

Influenza virus infection of pigs is closely related to the pandemic Spanish flu from 1918. The etiologic agent is an *Influenzavirus type A*, which is included in the *Orthomyxoviridae* family. These viruses are enveloped, with a diameter of 80-120 nm, and possess a negative, single stranded and segmented RNA genome that codify for at least 12 proteins (6), including the surface glycoproteins, Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA), which projects through the viral envelope and interact with sialic acid receptors of host cells (7). The M gene codify for two proteins, M1 (matrix protein) and M2 (ion channel protein) (8). RNA polymerase viral complex is composed by PB1 (polymerase basic 1), PB2 (polymerase basic 2) and PA (polymerase acid) proteins. New accessory proteins, such as PB1-F2, PB1-N40 and PA-X have been characterized recently and they are found only in some influenza viruses (9).

A high genetic variability is considered an important feature of influenza viruses and is related to two main mechanisms. One of them, known as drift, involves gradual mutations occurring in one or more viral segments leading to minor changes in proteins that can accumulate over time, this is promoted by the RNA polymerase's high error rate during the replication process (10). The other mechanism is denominated shift or reassortment and it involves the exchange of viral segments when simultaneous infection with two different virus subtypes occurs into the same cell (11). Those changes can work in a cooperative mode to generate new molecular characteristics and favouring adaptation processes

INTRODUCCIÓN

La presentación de enfermedades respiratorias es uno de los principales desafíos para la industria porcina a nivel mundial, ocasionando pérdidas considerables asociadas con la mortalidad de cerdos en diferentes etapas productivas (1). El virus de la influenza porcina en particular juega un papel primario dentro del complejo respiratorio porcino (CRP), debido a que ocasiona una alta morbilidad, lo que permite su rápida propagación entre los cerdos, la cual a su vez es favorecida por la forma de transmisión, que ocurre principalmente a través de aerosoles, fómites contaminados y el contacto directo con secreciones provenientes de individuos infectados (2). Los animales enfermos presentan inicialmente fiebre de 40.5°C, letargia, anorexia y se pueden observar descargas nasales y oculares (3). Otros signos característicos son una dificultad para respirar y tos, esta última causada por una bronquitis y bronquiolitis extensa. La recuperación de los cerdos es rápida y generalmente toma entre seis y siete días después de la infección (4). Aunque todos los grupos etarios pueden verse comprometidos, se ha demostrado una mayor incidencia en cerdos jóvenes, especialmente aquellos en etapa de pre-cebo (5).

El origen de la infección por virus de influenza en cerdos está estrechamente relacionado con la pandemia de la gripe española de 1918, causada por un virus del género *influenzavirus* tipo A, que a su vez pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, el cual se caracteriza por ser un virus envuelto de 80-120 nm de diámetro y poseer un genoma ARN segmentado de cadena sencilla de polaridad negativa. El genoma está compuesto por ocho segmentos virales que codifican para al menos 12 proteínas (6) entre las cuales se encuentran las glicoproteínas de superficie, Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) que se proyectan a través de la envoltura viral y se encargan de interactuar con los receptores de ácido siálico de las células huésped (7). El gen de la proteína de matriz codifica para dos proteínas, M1 (proteína de matriz) y M2 (proteína de poro de iones) (8). Las proteínas PB1 (polimerasa básica 1), PB2 (polimerasa básica 2) y PA (polimerasa ácida) conforman el complejo de la ARN polimerasa. Con respecto a éstas, recientemente se han caracterizado nuevas proteínas accesorias como PB1-F2, PB1-N40 y PA-X, las cuales son codificadas sólo por algunos virus de influenza (9).

Una característica importante de los virus de influenza es su alta tasa de variabilidad genética, la cual está determinada principalmente por dos mecanismos; el primero, denominado *drift* se relaciona con la actividad de la ARN polimerasa, la cual no posee un sistema de corrección de lectura eficiente durante el ciclo de replicación lo que conlleva a la aparición de mutaciones graduales en uno o más segmentos genómicos (10). El segundo, conocido como *shift* (o re-arreglo),

that might allow to cross hosts' barriers and under particular circumstances acquire pandemic potential (12), resulting in a greater complexity to understand this agent at the biological and epidemiological level, and as a consequence hindering the implementation of control and/or prevention measures at the human and animal population levels (13).

This complexity is also associated to the existence of several subtypes of influenza A viruses, since they are classified into 18 HA and 11 NA subtypes based on the molecular and antigenic characteristics on the major surface glycoproteins, and they have been recognized in different species of birds and mammalian hosts (14,15). Most prevalent and common subtypes of influenza A virus in pigs include H1N1, H1N2, H3N2 (16). However, they can be susceptible to infections by influenza viruses from human and bird origins, and often are considered as "mixing vessels" for the emergence of new viruses because they are able to express receptors with sialic acid in an α -2,6 and α -2,3 linkage conformation on their epithelial cells (17). The first mainly recognized by human influenza viruses (18), while the latter mediates the entry of avian influenza viruses preferably (19). Despite the above, it is important to clarify that not only pigs but humans are recently considered as an important source to generate new viral variants for swine (20), and in this context the emergence and transmission of 2009 pandemic H1N1 (H1N1pdm09) virus from humans to pigs has contributed to the increase of genetic diversity of swine influenza virus lineages nowadays (21).

In Colombia there is evidence of serologic reactivity of influenza virus in pigs since the late 70's, and our research team has accomplished molecular detection and isolation of field strains from commercial pig farms since 2008. These results have proved influenza virus circulation in the Colombian pig population, as well as the identification of classical swine H1N1, swine H3N2 and H1N1pdm09 strains, suggesting for the latter a predominance on the main pig producing areas of our country after its introduction in 2009 (22). Based on this and considering the lack of information regarding the consequences of the emergence and introduction of the H1N1pdm virus into the swine population in our country, there is a need to carry out new studies in order not only to detect and characterize by molecular methods influenza virus but for obtaining field strains that will allow to understand the biologic, antigenic and pathogenic features of the influenza virus strains that are circulating into the pig population in Colombia.

involucra el intercambio de uno o más segmentos virales cuando ocurre una infección simultánea con dos cepas diferentes del virus de influenza en una misma célula (11). Tales cambios trabajan de forma cooperativa para la generación de virus con nuevas características moleculares y adaptaciones que pueden permitirles cruzar la barrera entre especies y en ciertas ocasiones adquirir un potencial pandémico (12), resultando en una mayor complejidad para el entendimiento biológico y epidemiológico de este agente, dificultando así el establecimiento de medidas de control y/o prevención eficientes en las poblaciones tanto de animales como humanas (13).

Esta complejidad se asocia igualmente a la existencia de múltiples subtipos del virus de influenza A, ya que de acuerdo a las características moleculares y antigénicas de las glicoproteínas de superficie, HA y NA, estos virus se han clasificado en 18 subtipos de HA y 11 subtipos de NA que se reconocen actualmente en aves y diversos huéspedes mamíferos (14,15), siendo los más comunes y prevalentes dentro de la especie porcina los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 (16); sin embargo, los cerdos también son susceptibles a infecciones por virus de influenza de origen humano y aviar, y a menudo son denominados "vasos mezcladores" para la generación de nuevos virus, debido a la capacidad de expresar en la superficie de sus células epiteliales los receptores con moléculas de ácido siálico en conformación α -2,6 y α -2,3 (17); el primero de los cuales está relacionado con la afinidad por los virus de origen humano (18), mientras que el segundo media preferiblemente la entrada de los virus de influenza de origen aviar (19). A pesar de lo anterior, es importante mencionar que recientemente se ha considerado que la vía de transmisión del humano al cerdo es una fuente potencial en la generación de nuevas variantes del virus (20) y es en este contexto que la aparición del virus H1N1 pandémico de 2009 (H1N1pdm09) y su transmisión a los cerdos han llevado a un incremento en la diversidad genética de los linajes de virus de influenza porcina (21).

Con respecto a la situación de la infección por virus de influenza en cerdos en Colombia, existe evidencia de reactividad serológica desde finales de los 70's y de otra parte en nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo la detección molecular así como el aislamiento de cepas de campo en explotaciones porcinas a partir de 2008, lo cual demuestra la circulación del virus de influenza en la población de cerdos de Colombia, identificándose la presencia de cepas del tipo H1N1 clásico y H3N2 porcino, al igual que del virus H1N1pdm09, sugiriéndose una predominancia de este último en las principales regiones productoras de cerdos del país actualmente (22). Basados en estos antecedentes y teniendo en cuenta que se desconocen los efectos ocurridos como consecuencia de la aparición del virus H1N1pdm, se hace necesario llevar a cabo estudios que

In order to contribute to this knowledge, we proposed this research with the aim to establish a strategy that allowed the analysis of a large number of samples with a distribution of national coverage, which it ultimately will help to carry out efficient epidemiological studies by decreasing biosecurity risks associated to staff entry into the facilities, and unnecessary stress in the animals a result of manipulation. Otherwise, we propose molecular analysis and detection methodologies to be used for the recovery and evaluation of field virus strains. This will provide a perspective of the circulation of influenza A virus in swine in Colombia, besides offering an alternative to create a repository of field virus strains with great relevance to the understanding of influenza virus evolution in our environment. This information has great impact, not only at the national but the international level, under the "One Health" concept of influenza virus infection.

MATERIALS AND METHODS

Collection and process of samples. Samples from the respiratory tract, specifically lung tissue, were collected from clinically healthy slaughterhouse pigs under post-mortem conditions. Samples were randomly chosen from the slaughter line at 22 slaughterhouses located in 11 geographic regions in Colombia between September and December 2015. To establish the sample size, an exploratory design was used for the study, according to the formula:

$$\frac{NZ^2pq}{d^2(N-1)+Z^2pq} n = \frac{3.928.585 (1.96)^2 (0.15)(0.85)}{(0.02)^2 (3.928.585-1) + 1.96^2 (0.15)(0.85)} n = 306$$

Based on the following parameters: the Colombian porcine census performed by DANE (National Administrative Department of Statistics) during 2014, using a pig population of 3.928.585 (N) in the 11 geographic regions of interest (Table 1), with an expected prevalence of 15% (p),

Table 1. Proportion of samples according to colombian porcine census during 2014.

Regions	Number of pigs	Samples collected
Cundinamarca (y Bogotá)	458.958	80
Eje Cafetero	403.012	20
Antioquia	1.536.647	125
Valle del Cauca	533.862	54
Meta	418.161	10
Tolima	108.054	10
Chocó	44.677	10
Huila	79.258	10
Santander	93.430	10
Atlántico	89.007	20
Nariño	163.519	20
Total	3.928.585	369

permitan, además de realizar, la detección y caracterización molecular de los virus que circulan actualmente, obtener cepas de campo que amplíen las posibilidades de conocer características biológicas, antigénicas y de patogenicidad de los virus de influenza presentes en Colombia.

Con el fin de contribuir a éste conocimiento se planteó el presente estudio, el cual busca establecer una estrategia de toma de muestras y análisis de las mismas que permita acceder a un número significativo de muestras con alcance a nivel nacional, lo cual permitirá implementar estudios epidemiológicos más eficientes, al disminuir los riesgos en la bioseguridad por el ingreso de personal a las granjas y la manipulación innecesaria de los animales durante la etapa de producción. Se propone igualmente la implementación de metodologías para la detección y análisis molecular así como su evaluación en la obtención de cepas de campo a partir de estas muestras, lo cual permitirá determinar no solo la presencia y circulación del virus de influenza A en cerdos en el país, sino que además ofrecerá una alternativa para generar un banco de cepas de campo de fundamental relevancia para el entendimiento de la evolución de los virus de influenza en nuestro medio, lo cual guarda relevancia bajo el concepto de "una salud", con impacto no solo a nivel nacional sino internacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y preparación de muestras.

Se obtuvieron muestras del tracto respiratorio, particularmente de tejido pulmonar, de cerdos clínicamente sanos al sacrificio bajo condiciones post-mortem. Las muestras fueron tomadas aleatoriamente, entre septiembre y diciembre de 2015, en 22 plantas de beneficio localizadas en 11 regiones geográficas de Colombia seleccionando entre dos a cinco cerdos por granja en la línea de sacrificio. Para este estudio se utilizó un diseño de tipo exploratorio y el tamaño de la muestra fue de 306 animales de acuerdo con el censo porcino del DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística) realizado en Colombia durante 2014, utilizando una población de cerdos de 3.928.585 (N) en las 11 regiones geográficas de interés (Tabla 1), con una prevalencia esperada del 15% (p) de acuerdo a estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, una significancia del 95% (Z), una precisión del 2%, y el valor de q = 85% (1-15%); de acuerdo con lo anterior, se calculó el tamaño de la muestra aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{NZ^2pq}{d^2(N-1)+Z^2pq} n = \frac{3.928.585 (1.96)^2 (0.15)(0.85)}{(0.02)^2 (3.928.585-1) + 1.96^2 (0.15)(0.85)} n = 306$$

El total de muestras se incrementó considerando un margen de error del 14% por pérdidas asociadas a la recolección, transporte y/o procesamiento, para

according to previous studies in our research team, a significance of 95% (Z), a precision of 2% and a q value of 85% (1-15%). According to these data a total number of 306 samples was obtained.

Based on this number and by increasing 14%, considering losses during collection, transportation and the preparation processes, a total of 369 samples were collected. The distribution of number of samples was done according to pig's availability at the slaughterhouses in every region, selecting between two to five pigs from the same farm in order to have the major number of farms and/or locations possible.

Each sample was collected under aseptic conditions, selecting a lung fragment from the cranial lobe with an approximate size of 3 cm length and 3 cm width, that was placed in individual Nasco® bags and transported (encased in ice) to the virology laboratory at the National University (Bogotá). Once they arrived at the lab, a portion of each sample was selected to prepare 2 mL of 10% tissue suspension in PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH: 7.1±0.1) solution supplemented with 3% of antibiotics and antimycotic (Gibco®, penicillin, streptomycin y amphotericin B; Reference 15240096). The resulting suspension was aliquoted in two fractions and stored at -70°C for virus isolation. On the other hand, another suspension of tissue homogenate was prepared for RNA extraction by adding 90 mg of each sample to 600 µL of PBS and disrupting the tissue by using 50 khz ultrasonic frequency (Cole-Parmer® 4710 Series). The tissue homogenates were stored in three volumes of 200 µL each at -70°C for subsequent RNA extraction, using the RNAeasy Mini Kit (Qiagen®, CA, USA) and following the manufacturers' instructions.

Real time RT-PCR analysis (qRT-PCR). From RNA obtained as indicated formerly, qRT-PCR was conducted using TaqMan® hydrolysis probes and primers for detecting influenza A virus (Inf A) matrix (M) gene, swine influenza (SW Inf A) virus NP gene and H1N1 swine (SW H1) influenza HA gene, following the CDC protocol with modifications (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA). Further subtyping was performed for the detection of the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes of the swine H3N2 virus subtype, following a multiplex qRT-PCR analysis using TaqMan® hydrolysis probes with modification of the Standard Operating Protocol provided by The University of Minnesota. qRT-PCR reactions were performed on a LightCycler 480 real time thermocycler (Roche Life Science®) using the SuperScript™ III Platinum® One-step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen®, California, USA).

un total de 369, distribuidas en cada una de las regiones de acuerdo con la disponibilidad de cerdos en las respectivas plantas de beneficio.

Las muestras fueron obtenidas de manera aséptica, seleccionado un fragmento con un tamaño aproximado de 3 cm de largo por 3 cm de ancho a partir del lóbulo craneal de los pulmones, el cual fue depositado en bolsas Nasco® individuales y transportado bajo condiciones de refrigeración hasta el laboratorio de virología de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). En el laboratorio, se tomó una porción de cada tejido para preparar una suspensión al 10% en PBS (búfer fosfato salino, pH: 7.1±0.1) suplementado al 3% con solución de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomycin y anfotericina B, Gibco®), en un volumen final de 2 mL, los cuales fueron fraccionados en dos alícuotas y almacenados a -70°C hasta el momento de ser utilizadas en los intentos de aislamiento viral. Por otro lado, para la extracción del ARN se preparó una suspensión adicionando 90 mg de cada muestra a 600 µL de PBS y realizando la lisis del tejido por ultrasonido, empleando un equipo sonicador (Cole-Parmer®, Ultrasonic Homogenizer 4710 Series). Posterior a esto, se fraccionó el homogenizado en tres volúmenes de 200 µL que se almacenaron a -70°C hasta el momento de llevar a cabo la extracción del ARN, empleando para ello el RNAeasy Mini Kit (Qiagen®, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis mediante RT-PCR tiempo real (qRT-PCR). A partir del ARN obtenido como se indicó previamente, se llevó a cabo un qRT-PCR inicial empleando sondas de hidrólisis TaqMan® y primers para la detección del gen de la matriz (M) de los virus de influenza A (Inf A), del gen NP de virus de influenza porcina (SW Inf A) y del gen HA del virus de influenza del subtipo H1 (SW H1), mediante la adaptación de un protocolo estandarizado por el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA*) en Atlanta. De acuerdo con los resultados obtenidos, se realizó una subtipificación por medio de un ensayo de qRT-PCR *multiplex* usando sondas de hidrólisis TaqMan® y primers para la detección de los genes HA y NA del virus H3N2 porcino; este ensayo fue adaptado a partir de un procedimiento operativo estándar suministrado por la Universidad de Minnesota. Se realizaron reacciones en un solo paso utilizando el sistema de RT-PCR *SuperScript™ III Platinum® One-step* (Invitrogen®, California, USA). Las reacciones de RT-PCR en tiempo real se realizaron empleando el termociclador LightCycler 480 (Roche Life Science®) y la recuperación y análisis de datos se llevó a cabo usando el programa Roche LightCycler® versión 1.5. Las muestras fueron consideradas negativas cuando mostraban un valor de C_p (*crossing point* o punto límite de detección) mayor a 39 y positivas si se obtenían valores por debajo de este límite.

Data analysis and recovery was carried out in the Roche LightCycler® software version 1.5. Negative results were considered when samples exhibited Cp (crossing point) values >39 and positive if results were below this value.

The reaction mixture for influenza A virus detection, used a final volume of 25 µL with a concentration of 1.25X of 2X Reaction Mix Invitrogen®, containing 1 µM of each forward and reverse primers, 0.25 µM of the specific probe, 0.5 µL of Superscript III RT/Platinum® Taq Mix and 5 µL of RNA extracted from each sample. Reverse transcription was done in a cycle of 50°C for 30 minutes, then a cycle for Taq inhibitor activation at 95°C for 2 minutes followed by 45 cycles for PCR amplification at 95°C for 15 seconds and 55°C for 30 seconds. Positive samples for influenza A virus but negative for SW Inf A and SW H1 were included for H3N2 virus subtyping, using a final volume of 25 µL with a concentration of 1.25X of 2X Reaction Mix Invitrogen®, 0.5 µM of H3 forward primer, 0.75 µM of H3 Reverse primer, 0.75 µM of N2 forward primer, 1 µM of N2 Reverse primer, 0.3 µM of each probe, 0.5 µL of Superscript III RT/Platinum® Taq Mix and 5 µL of RNA extracted from each sample. Reverse transcription was done in a cycle of 50°C for 30 minutes, then a cycle for Taq inhibitor activation in 95°C for 15 minutes and afterwards 30 cycles of denaturation (94°C for 30 seconds), annealing (58°C for 1 minute),

Table 2. Primers and probes for the detection of influenza A virus through qRT-PCR

Primers and probes	Sequence (5'>3')
InfA Forward	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C
InfA Reverse	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA
InfA Probe ¹	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG
SW InfA Forward	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG
SW InfA Reverse	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC
SW InfA Probe ²	CYA CTG CAA GCC CA "T" ACA CAC AAG CAG GCA
SW H1 Forward	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA
SW H1 Reverse	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGG
SW H1 Probe ²	CA GAA TAT ACA "T" CC RGT CAC AAT TGG ARA A
H3 Forward	CGC AAT MGC AGG TTT CAT AGA
H3 Reverse	GAT GCC TGA AAC CGT ACC A
H3 Probe ³	ATG GTT GGG AGG GAA T
N2 Forward	TGG TCA AAG CCG CAA TG
N2 Reverse	CAG CGG AAA GCC KAA TCG
N2 Probe ⁴	ATT ACA GGA TTT GCA CTT TTT

¹Probe labeled at the 5' end with reporter molecule FAM and with the quencher, Backhole Quencher 1 (BHQ1) at the 3'-end

²Probes labeled at the 5' end with the reporter molecule FAM and quenched internally at a modified "T" residue with BHQ1, with a modified 3'-end to prevent probe extension by Taq polymerase

³Probe labeled at the 5' end with reporter molecule 6FAM and with the quencher, Minor groove binder (MGB) at the 3'-end

⁴Probe labeled at the 5' end with reporter molecule VIC and with the quencher, Minor groove binder (MGB) at the 3'-end

En el primer análisis se usó un volumen final de reacción de 25 µL, teniendo en cuenta los siguientes volúmenes y concentraciones de trabajo: 1.25X para el búfer 2X Reaction Mix Invitrogen® (Invitrogen, Corp., CA, USA), 1 µM para cada primer, 0.25 µM de cada sonda, 0.5 µL de la enzima Taq SuperScript III RT/Platinum® (Invitrogen, Corp., CA, USA) y 5 µL del ácido nucleico extraído de cada muestra. Los perfiles térmicos iniciaron con la transcripción reversa en un ciclo a 50°C por 30 minutos, luego un ciclo de activación de la enzima Taq a 95°C por 2 minutos, seguido por 45 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos y 55°C por 30 segundos, en el cual se captaban las señales de fluorescencia. Las muestras positivas en el análisis de Inf A y negativas para los ensayos de SW InfA y SW H1, fueron incluidas en la prueba de subtipificación para virus del subtipo H3N2 porcino, empleando un volumen final de reacción de 25 µL y las siguientes concentraciones y volúmenes de trabajo: 1.25X para el búfer 2X Reaction Mix Invitrogen® (Invitrogen, Corp., CA, USA), 0.5 µM del primer forward H3, 0.75 µM del primer reverse H3, 0.75 µM del primer forward N2, 1 µM del primer reverse N2, 0.3 µM de cada sonda, 0.5 µL de la enzima Taq SuperScript III RT/Platinum® (Invitrogen, Corp., CA, USA) y 5 µL del ácido nucleico extraído de cada muestra. El ciclo térmico del qRT-PCR fue: transcripción reversa a 50°C por 30 minutos, seguida por un ciclo de activación de la Taq polimerasa a 95°C por 15 minutos y luego 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 30 segundos), hibridación (58°C por 1 minuto), elongación (72°C por 1 minuto) y finalmente otro ciclo de elongación a 72°C por 7 minutos. Las secuencias de primers y sondas utilizadas se encuentran consignadas en la tabla 2.

Aislamiento viral. Para realizar el aislamiento viral se seleccionaron las muestras positivas que en la prueba qRT-PCR presentaron mayor concentración de antígeno viral, a partir de las cuales se llevó a cabo la inoculación de 0.2 mL del homogenizado de tejido pulmonar en la cavidad alantoidea de huevos de embrión de pollo SPF (libres de patógenos específicos) de 9 a 10 días de incubación, los cuales se incubaron por 72 horas a una temperatura de 37°C bajo condiciones de humedad, observándolos al ovoscopio cada 24 horas para verificar la viabilidad de los embriones. Al final del proceso de incubación se colectó el líquido alantoideo y se evaluó la presencia de un agente hemaglutinante por medio de la prueba de hemaglutinación (HA), utilizando una solución de glóbulos rojos de pollo SPF al 0.5%. Los resultados positivos a la prueba de HA fueron evaluados a través de un análisis de RT-PCR convencional utilizando primers dirigidos a la amplificación del gen M (Tabla 3) del virus de influenza A. Antes de considerar una muestra como negativa al aislamiento viral, se realizaron tres pasajes ciegos en huevos de embrión de pollo SPF.

elongation (72°C for 1 minute), and finally another cycle for elongation 72°C for 7 minutes. Sequences for primers and probes used are found in table 2.

Virus isolation. Positive samples with greater viral antigen concentration through qRT-PCR were selected to perform virus isolation. In order to do this, 0.2 mL of each lung tissue homogenate was inoculated into the allantoic cavity of 9 to 10-day old specific pathogen free (SPF) embryo chicken eggs by triplicate. After 72 hours incubation at 37°C, allantoic fluids were evaluated by hemagglutination test (HA) using 0.5% chicken red blood cells (RBC). Positive results for this assay were confirmed through conventional RT-PCR using primers targeting the influenza A matrix gene (Table 3). Three blind passages in SPF embryo chicken eggs were attempted before considering a sample as negative for virus isolation.

Ethical considerations. Samples were collected under post-mortem conditions, without causing any kind of distress on analyzed pigs. Procedures and conditions used to obtain samples were approved by the bioethics committee of the school of Veterinary Medicine and Animal Science of the National University of Colombia, according to the CB-058-2016.

RESULTS

As a result of this research it was possible to demonstrate the presence of influenza A virus in lung samples from pigs from five out of 11 regions (Cundinamarca, Eje Cafetero, Antioquia, Valle del Cauca y Meta) by using molecular tests. There were 44 positive samples for influenza A virus out of a total of 369 analyzed samples, which represents a percentage of detection of 11.9% (Table 4). The greater distribution of positive samples was found in Cundinamarca and Antioquia regions, with a molecular detection percentage of 17.5% and 18.4%, respectively. Additional subtyping tests through qRT-PCR enabled characterization of the H1N1pdm09 strain in two samples collected in Antioquia and one sample from Cundinamarca. On the other hand, it was not possible to detect the presence of the H3N2 swine influenza virus subtype on the analyzed samples by molecular tests.

Table 4. Detection of influenza A virus by qRT-PCR tests.

Region	Positive/total samples	Percentage	H1N1pdm09
Cundinamarca	14/80	17.5%	1
Eje Cafetero	3/20	15%	0
Antioquia	23/125	18.4%	2
Valle del Cauca	3/54	5.5%	0
Total	44/369	11.9%	3

Table 3. Primers used for the amplification of M gene product size of 153 bp

Primers	Sequence (5'>3')
M Forward	ACG GAT GGG AGT GCA GAT AC
M Reverse	GAA GGC CCT CTT TTC AAA CC

Aspectos éticos. Las muestras fueron recolectadas en condiciones post-mortem, sin ocasionar ningún tipo de dolor en los cerdos analizados. Los procedimientos y condiciones empleadas fueron aprobados por el comité de bioética de la facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, mediante comunicación CB-058-2016.

RESULTADOS

Como resultado de este estudio se demostró, utilizando pruebas de análisis molecular, la presencia del virus de influenza A en muestras de cerdos colectadas en plantas de beneficio procedentes de cinco de las 11 regiones analizadas (Cundinamarca, Eje Cafetero, Antioquia, Valle del Cauca y Meta). Se identificaron 44 muestras positivas al virus de influenza A dentro del total de 369 evaluadas, lo que representa una proporción del 11.9% de los análisis realizados (Tabla 4). La mayor distribución de muestras positivas correspondió a las regiones de Cundinamarca y Antioquia, donde se pudo describir un porcentaje de detección molecular de 17.5% y 18.4%, respectivamente. Las pruebas de sub-tipificación adicionales por medio de qRT-PCR caracterizaron a la cepa H1N1pdm09 en dos muestras recolectadas en Antioquia y una muestra procedente de Cundinamarca. Por otro lado, no se pudo demostrar la presencia de virus del subtipo H3N2 porcino a través de análisis moleculares de las muestras analizadas.

Aislamiento viral. Fue posible la obtención de cinco aislamientos virales como resultado de la inoculación en huevos de embrión de pollo, confirmando que correspondían a virus de influenza A de acuerdo con los resultados de la prueba de hemaglutinación y el análisis de RT-PCR convencional para la detección del gen de la matriz (Figura 1). Uno de los aislamientos identificado como A/swine/Colombia/1-019/2015 se obtuvo a partir de muestras de cerdos de Cundinamarca, mientras que los cuatro restantes (A/swine/Colombia/3-015/2015 A/swine/Colombia/3-020/2015, A/swine/Colombia/3-021/2015, A/swine/Colombia/3-027/2015) fueron aislados a partir de muestras tomadas de cerdos procedentes de tres granjas diferentes en Antioquia. El análisis de sub-tipificación por qRT-PCR reveló que estas cepas poseían características moleculares asociadas a la cepa H1N1pdm09.

Virus isolation. Five different field virus isolates were obtained after the inoculation into chicken embryo eggs, and they were confirmed as influenza A virus by hemagglutination and conventional RT-PCR assays (Figure 1). One isolate was recovered from pigs from Cundinamarca (A/swine/Colombia/1-019/2015), while the other four isolates (A/swine/Colombia/3-015/2015, A/swine/Colombia/3-020/2015, A/swine/Colombia/3-021/2015, A/swine/Colombia/3-027/2015) corresponded to pig samples from three different farms in Antioquia. Subtyping analysis by qRT-PCR established that all viruses had molecular traits related to the H1N1pdm09 influenza virus.

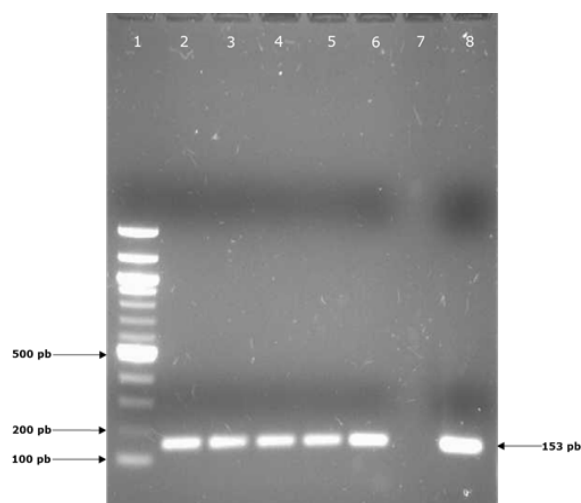


Figure 1. RT-PCR products of M gene, amplification of 153 bp. Lane 1: 100 bp DNA ladder. Lanes 2-6: positive influenza virus isolates. Lane 7: negative control. Lane 8: positive control.

DISCUSSION

Results from this study demonstrated the presence of swine influenza A virus in pigs from five out of the 11 Colombian geographic regions that were analyzed. This also corroborated the circulation of this virus in the three regions where the farms representing the largest number of pig production are concentrated in our country (Cundinamarca, Antioquia y Valle), considering published data by ICA (Colombian Institute of Agriculture) during 2016. It is worth to mention that results of previous investigations in our research team allowed detection and isolation of classical swine H1N1 and H1N1pdm of 2009 (22). Therefore, those results and the ones found here indicate a permanent presence for this viral agent at commercial farms. These also suggest a continuous transmission flow among pigs, as it has been shown in studies from other countries (23,24), which might favor the establishment of an endemic infection throughout the Colombian pig population.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la presencia del virus de influenza A en cerdos en cinco de las 11 regiones geográficas de Colombia que fueron analizadas y corroboran su circulación en tres de las regiones donde se concentra la mayor proporción de las granjas de producción de cerdos en el país (Cundinamarca, Antioquia y Valle), teniendo en cuenta los datos publicados por el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) durante 2016. Vale la pena mencionar que de acuerdo a investigaciones realizadas previamente por nuestro grupo de investigación en estas mismas regiones se evidenció la presencia y se lograron aislamientos de virus de influenza porcina del tipo H1N1 clásico y H1N1pdm del 2009 (22). Teniendo en cuenta lo anterior, se demuestra que los virus de influenza se han establecido de manera permanente en las explotaciones porcinas sugiriendo la existencia de flujos de transmisión permanentes entre los cerdos como lo han demostrado algunos estudios en otros países (23,24), favoreciendo en este caso el establecimiento de una infección con carácter endémico en la población de cerdos de Colombia.

En cuanto a la metodología utilizada, es evidente que las plantas de beneficio se constituyen en una fuente importante para obtener información para el monitoreo del virus de influenza y probablemente otros agentes no solo de tipo viral sino bacteriano, como se ha comprobado en otros estudios alrededor del mundo (25,26). Este hecho se resalta considerando que se logró la posibilidad de una mayor cobertura tanto en el número de individuos como de regiones de diferentes partes del territorio nacional, comprobando su utilidad para establecer no solo la presencia del virus de influenza, sino además para obtener aislamientos de cepas virales. Este último hallazgo representa un potencial mayor pues brinda una alternativa para llevar a cabo estudios de epidemiología molecular, eco-biología, así como de patogénesis ya que ofrece la posibilidad de obtener material biológico de utilidad para la evaluación tanto *in vivo* como *in vitro* de los aislamientos obtenidos.

Por otra parte, es importante recalcar que los ensayos moleculares permitieron la detección de virus de influenza en animales clínicamente sanos, lo cual puede ser un indicativo del mantenimiento de un estado subclínico de la infección que se prolonga hasta la etapa final de sacrificio, o de un proceso de reinfección de los animales al final del ciclo productivo, haciendo necesario de cualquier manera determinar qué factores de tipo ecológico y/o epidemiológico favorecen la permanencia de la infección en granjas tecnificadas con buenas prácticas de manejo, donde es de esperar que los

Regarding to the sampling strategy used in this study, it is clear that slaughterhouses can be a valuable source to record new information for surveillance of influenza virus and probably from other microbiological agents (including bacteria), as it has been demonstrated in other investigations around the world (25,26). This fact is highlighted when considering that it enabled to reach a large number of individuals and/or regions from all over the national territory. It also proved to be useful not only for the molecular detection of influenza viruses but it also allowed the isolation of field viral strains. This latter finding shows proof as an important alternative to implement molecular, epidemiological, eco-biological, and pathogenesis related investigations to evaluate influenza isolates under *in vivo* and *in vitro* conditions.

On the other hand, it is important to mention that the molecular tests used in the study allowed the detection of influenza virus presence from clinically healthy animals at the slaughterhouse. These findings could be an indication of a late infection of the animals, or of a subclinical state of the infection that perpetuates the presence of the virus until the slaughterhouse stage. Either one of the possibilities it is necessary to determine the ecologic and/or epidemiologic mechanisms and/or factors that contribute to the infection's permanency at technically developed farms which follow good management practices. In addition, one could expect that the animals at this stage have developed an immune response originated from natural exposure to the virus, this is also an important factor that needs to be considered for the implementation of control strategies. These findings are in agreement with other published results (27,28) and they prove the importance to accomplish new studies that focused in the clarification of the mechanisms that are involved in the maintenance of the virus into the farms. Whether or not it is causing an infection that might be exacerbated as a result of stress conditions or by co-infection with other microorganisms.

It is essential to highlight that sequencing and phylogenetic analysis are required to explore about the probable origin of the isolated strains. In order to understand new virus introductions towards the swine population it is also needed to describe the infection chains to establish the origin of these agents and the species involved in transmission flows. Genetic characteristics related to the high molecular variability associated to adaptation that might result in an increased level of virulence, should also be considered (29,30) with the remaining six genes from North American triple-reassortant SIVs. To characterize the role of the pH1N1 NA and M genes in pathogenesis and transmission, their impact was evaluated in the background of an H1N1 triple-reassortant (tr1930, it is essential to extend the surveillance methods to other potential hosts that cooperate to the complex interactions and generation of strains with different features.

animales hayan desarrollado una respuesta inmune como resultado de la exposición natural al virus, lo cual representa un factor importante a tener en cuenta en los programas de control instaurados. Esto concuerda con lo encontrado en otras investigaciones (27,28) y demuestra la importancia de realizar estudios tendientes a esclarecer los mecanismos involucrados en la presencia de este estado de infección subclínica que podría ser exacerbada bajo condiciones de estrés o debido a la presencia de otros microorganismos, o para determinar la fuente de reinfección para los animales, lo cual hace que cobre mayor relevancia el conocer los mecanismos y/o factores de riesgo que favorecen el mantenimiento del virus en las poblaciones porcinas.

Es esencial mencionar, que los análisis de secuenciación y filogenia son necesarios para indagar el probable origen de las cepas aisladas, es decir describir las cadenas de infección que demuestran la procedencia de estos agentes y la(s) especie(s) que pueden estar implicadas en los flujos de transmisión, pudiéndose evidenciar nuevas introducciones de los virus de influenza hacia la población de cerdos. Considerando las características genéticas de alta variabilidad molecular asociadas a la aparición de nuevas adaptaciones que podrían representar un incremento en la virulencia, como se ha podido evidenciar en otras investigaciones (29,30), es indispensable ampliar los métodos de vigilancia hacia otros huéspedes potenciales que aportan a la compleja interacción y la generación de cepas con características diferentes.

En conclusión, el virus de influenza A está presente y circula en explotaciones de cerdos de diferentes procedencias en el territorio nacional. La detección molecular de este agente en las muestras de tejido pulmonar recolectadas *post-mortem*, a partir de animales clínicamente sanos, resalta la utilidad de este método en el diagnóstico de agentes virales y en la identificación de infecciones de tipo subclínico, lo cual tiene una gran significancia en el entendimiento de la epidemiología de la infección por el virus de la influenza tanto en animales como en el hombre.

La estrategia de muestreo utilizada a nivel de plantas de beneficio provee diversas ventajas en comparación con la toma de muestras a nivel individual en las granjas, incluyendo aquellos aspectos que se asocian con las restricciones para el ingreso a las granjas y el seguimiento de rutinas que cumplan con los requisitos de bioseguridad para prevenir la entrada de patógenos a las explotaciones animales. En este sentido, también brinda una mayor practicidad y facilidad durante la recolección, que determina la obtención de un mayor número de muestras y disminuye el tiempo invertido durante el proceso.

In conclusion the influenza A virus is present and it circulates among commercial pig farms from different locations of the national territory. Molecular detection of this virus in lung tissue samples collected from clinically healthy animals under post-mortem conditions, increases the usefulness for this method to detect several viral agents and for the identification of subclinical infections, which has a great importance for the understanding of influenza virus epidemiology in animals as well as in human hosts.

The sampling strategy used at slaughterhouses provides several advantages when compared to collecting specimens at pig farms, including those aspects related to farm restriction access and following the tasks to fulfill biosecurity requirements to prevent the entry of new pathogens. In this sense, it can provide greater effectiveness facilitating the collection of samples thus, obtaining a larger number of samples and reducing the amount of time invested in the process.

Despite the fact that a serologic reactivity for the swine H3N2 influenza virus subtype in Colombia has been confirmed, it was not possible to detect this by the molecular assays used. This issue leads to propose the requirement of monitoring in new locations, in order to expand the range for the molecular detection scope making it possible to prove the circulation of other influenza virus strains and subtypes at swine exploitation systems. This kind of searching will also allow to describe the transmission flows, the identification of risk factors in the facilities and prevalence values that might be conditioned for every age group in the farm. Likewise, it is important to explore other species of interest included in influenza virus ecology to detail aspects related to inter-species transmission factors and changes for host adaptation dynamics.

It is clear that influenza virus plays a key role for the development of pandemic events in the human population and it has an impact on how serious the consequences that arise from the emergence of new viruses with unpredictable pathogenicity and transmissibility characteristics could be. These points must be evaluated periodically to detect molecular changes that might represent the acquisition of new adaptations, and differences in the pathogenicity and/or virulence of viral strains circulating in the environment.

Acknowledgments

The authors want to thank: Porkcolombia's support for accomplishing this study. To Colciencias, that provided funding to carry out this project under contract 572-2014 and code 110165843183. To the National University of Colombia and all members of the Microbiology and Epidemiology research group who contributed with their work and resources to execute this work.

Tomando en cuenta que no fue posible detectar el virus de influenza porcina del subtipo H3N2 en las muestras analizadas, a pesar de que su presencia ha sido confirmada en estudios serológicos desarrollados previamente en Colombia, se plantea el requerimiento de extender las estrategias de monitoreo hacia nuevos escenarios para expandir el alcance de la evaluación molecular y demostrar la circulación o no de cepas de otros linajes o subtipos en las explotaciones porcinas. La búsqueda a nivel de esta locación también permitirá la descripción de los flujos de transmisión, la determinación de los factores de riesgo presentes en estas instalaciones y los valores de prevalencia que pueden estar condicionados a cada uno de los grupos etarios presentes en la granja. De igual forma, es importante la exploración de otras especies de interés dentro de la ecología del virus de influenza para detallar los aspectos relacionados con los factores de transmisión inter-especie y cambios en la dinámica de adaptación hacia diferentes huéspedes.

Finalmente, es claro el papel clave que desempeñan los virus de influenza en el desarrollo de eventos de tipo pandémico en la población humana y las graves repercusiones que puede significar la aparición de un virus con una patogenicidad y transmisibilidad impredecibles. Estos puntos deben ser evaluados periódicamente con el objetivo de detectar cambios moleculares que podrían representar la adquisición de nuevas adaptaciones, o diferencias en patogenicidad y/o virulencia de las cepas del virus circulando en nuestro medio.

Agradecimientos

A Porkcolombia por su apoyo para la realización de este estudio. A Colciencias por el financiamiento otorgado para el desarrollo del proyecto a través del contrato 572-2014, código 110165843183. A la Universidad Nacional de Colombia y a los integrantes del grupo de investigación en Microbiología y Epidemiología por los recursos y el trabajo aportado en la ejecución de este estudio

REFERENCES

1. Alvarez J, Sarradell J, Kerkaert B, Bandyopadhyay D, Torremorell M, Morrison R, et al. Association of the presence of influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sow farms with post-weaning mortality. *Prev Vet Med. Elsevier B.V.*; 2015;121(3-4):240-5.
2. Neira V, Rabinowitz P, Rendahl A, Paccha B, Gibbs SG, Torremorell M. Characterization of viral load, viability and persistence of influenza A virus in air and on surfaces of swine production facilities. *PLoS One.* 2016;11(1):1-11.
3. Pomorska-Mól M, Kwit K, Markowska-Daniel I, Kowalski C, Pejsak Z. Local and systemic immune response in pigs during subclinical and clinical swine influenza infection. *Res Vet Sci. Elsevier Ltd*; 2014;97(2):412-21.
4. Janke BH. Clinicopathological Features of Swine Influenza. In: Richt JA, Webby RJ, editors. *Swine Influenza: Current topics in microbiology and immunology.* Verlag: Springer; 2013. p. 69-83.
5. Detmer S, Gramer M, Goyal S, Torremorell M, Torrison J. Diagnostics and Surveillance for Swine Influenza. In: Richt JA, Webby RJ, editors. *Swine Influenza: Current topics in microbiology and immunology.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2012. p. 85-112.
6. Tsai KN, Chen GW. Influenza genome diversity and evolution. *Microbes Infect. Elsevier Masson SAS*; 2011;13(5):479-88.
7. Mair CM, Ludwig K, Herrmann A, Sieben C. Receptor binding and pH stability — How influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochim Biophys Acta - Biomembr. Elsevier B.V.*; 2014;1838(4):1153-68.
8. Ito T, Gorman OT, Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RG. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol.* 1991;65(10):5491-8.
9. Rodriguez-Frandsen A, Alfonso R, Nieto A. Influenza virus polymerase: Functions on host range, inhibition of cellular response to infection and pathogenicity. *Virus Res. Elsevier B.V.*; 2015;209:1-16.
10. Air GM. Influenza virus antigenicity and broadly neutralizing epitopes. *Curr Opin Virol. Elsevier B.V.*; 2015;11:113-21.
11. Greenbaum BD, Li O, Poon L, Levine A, Rabadan R. Viral reassortment as an information exchange between viral segments. 2015;109(9):3341-6.
12. Mehle A, Dugan VG, Taubenberger JK, Doudna JA. Reassortment and Mutation of the Avian Influenza Virus Polymerase PA Subunit Overcome Species Barriers. *J Virol.* 2012;86(3):1750-7.
13. Sandbulte M, Spickler A, Zaabel P, Roth J. Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine. *Vaccines.* 2015;3(1):22-73.
14. Dangi T, Jain A. Influenza Virus: A Brief Overview. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci.* 2012;82(1):111-21.
15. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol. Elsevier Ltd*; 2014;22(4):183-91.
16. Crisci E, Mussá T, Fraile L, Montoya M. Review: Influenza virus in pigs. *Mol Immunol. Elsevier Ltd*; 2013;55(3-4):200-11.
17. Scholtissek C. Source for Influenza Pandemics. *Eur J Epidemiol.* 1994;10(4):456-8.
18. Neumann G, Kawaoka Y. Transmission of influenza A viruses. *Virology.* 2015;479-480C:234-46.
19. Wang J-Y, Chen Z-L, Li C-S, Cao X, Wang R, Tang C, et al. The distribution of sialic acid receptors of avian influenza virus in the reproductive tract of laying hens. *Mol Cell Probes. Elsevier Ltd*; 2015;29(2):129-34.
20. Nelson MI, Gramer MR, Vincent AL, Holmes EC. Global transmission of influenza viruses from humans to swine. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt_10):2195-203.
21. Kong W, Wang F, Dong B, Ou C, Meng D, Liu J, et al. Novel reassortant influenza viruses between pandemic (H1N1) 2009 and other influenza viruses pose a risk to public health. *Microb Pathog. Elsevier Ltd*; 2015;89:62-72.

22. Ramirez-Nieto GC. First isolation and identification of H1N1 swine influenza viruses in Colombian pig farms. *Health (Irvine Calif)*. 2012;4(10):983–90.
23. Pereda A, Rimondi A, Cappuccio J, Sanguinetti R, Angel M, Ye J, et al. Evidence of reassortment of pandemic H1N1 influenza virus in swine in Argentina: Are we facing the expansion of potential epicenters of influenza emergence? *Influenza Other Respi Viruses*. 2011;5(6):409–12.
24. Chiapponi C, Baioni L, Luppi A, Moreno A, Castellan A, Foni E. Temporal insight into the natural generation of a new reassortant porcine influenza virus in a swine holding. *Vet Microbiol. Elsevier B.V.*; 2014;174(1–2):9–15.
25. Qi X, Pan Y, Qin Y, Zu R, Tang F, Zhou M, et al. Molecular characterization of avian-like H1N1 swine influenza viruses isolated in Eastern China, 2011. *Viol Sin*. 2012;27(5):292–8.
26. Fan X, Zhu H, Zhou B, Smith DK, Chen X, Lam TT-Y, et al. Emergence and dissemination of a swine H3N2 reassortant influenza virus with 2009 pandemic H1N1 genes in pigs in China. *J Virol*. 2012;86(4):2375–8.
27. Bowman AS, Nolting JM, Nelson SW, Slemons RD. Subclinical influenza virus A infections in pigs exhibited at agricultural fairs, Ohio, USA, 2009–2011. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(12):1945–50.
28. Dagan B, Services FV, Health A, Dagan B, Consultant VP, Health A, et al. Seroepidemiology Survey and Isolation of Swine Influenza Viruses from Subclinical Infections in Israel During the Years 2009–2011. *Israel J Vet Med*. 2014;69(2):62–7.
29. Ma W, Liu Q, Bawa B, Qiao C, Qi W, Shen H, et al. The neuraminidase and matrix genes of the 2009 pandemic influenza H1N1 virus cooperate functionally to facilitate efficient replication and transmissibility in pigs. *J Gen Virol*. 2012;93(6):1261–8.
30. Brookes SM, Núñez A, Choudhury B, Matrosovich M, Essen SC, Clifford D, et al. Replication, pathogenesis and transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus in non-immune pigs. *PLoS One*. 2010;5(2).