

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE
Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal



Dissertação

**INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA A EM SUÍNOS EM FASE DE
CRESCIMENTO E TERMINAÇÃO**

Francisco Elias Vendruscolo

Concórdia, 2021

Francisco Elias Vendruscolo

**INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA A EM SUÍNOS EM FASE DE
CRESCIMENTO E TERMINAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

Orientadora: Janice Reis Ciacci Zanella

Coorientadoras: Letícia Lopes e Caroline Pissetti

Concórdia, 2021

Ficha de identificação de obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e adaptado pelo CTI – Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

V453i

Vendruscolo, Francisco Elias

Investigação da circulação do Vírus da Influenza A em suínos em fase de crescimento e terminação / Francisco Elias Vendruscolo; orientadora Janice Zanella; coorientadora Letícia Lopes; coorientadora Caroline Pissetti. -- Concórdia, 2021.

40 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal Catarinense, campus Concórdia, Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal, Concórdia, 2021.

Inclui referências.

1. Doença respiratória. 2. Pandêmico. 3. Suabe nasal. 4. Lenço nasal. I. Zanella, Janice, II. Lopes, Letícia. III. Pissetti, Caroline . IV. Instituto Federal Catarinense. Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal. V. Título.

Francisco Elias Vendruscolo

**INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA A EM SUÍNOS EM FASE DE
CRESCIMENTO E TERMINAÇÃO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

Data da Defesa: 16/07/2021

Banca examinadora:

Prof. Dra. Janice Reis Ciacci Zanella (Orientadora).

PhD em Virologia Molecular pela Universidade de Nebraska, EUA.
Embrapa Suínos e Aves - Concórdia/SC

Prof. Dr. Diogenes Dezen.

Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Instituto Federal Catarinense – Concórdia/SC

Dra. Francini Klaumann.

Doutorado pela Universitat Autònoma de Barcelona - Espanha.
BRF/AS – Gerência de Saúde Animal



Emitido em 16/07/2021

DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS Nº 004/2021 - PGPSA/ARAQ (11.01.02.22)
(Nº do Documento: 27273)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 23/02/2023 17:18)

JANICE REIS CIACCI ZANELLA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.306-##

Visualize o documento original em <https://sig.ifc.edu.br/documentos/> informando seu número: **27273**, ano: **2021**,
tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS**, data de emissão: **18/05/2022** e o código de verificação:
db8de3318c

**À minha família e minha esposa Helena por me incentivarem e me apoiarem
incondicionalmente na realização dessa conquista.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a meus pais por me apoiarem e incentivarem na busca de conhecimento, não somente puderam me garantir condições financeiras, como também sendo exemplo a serem seguidos de caráter, ética, responsabilidade e amor.

Aos meus irmãos por serem exemplos de vida e muitas vezes servindo como fonte inspiradora para as minhas realizações.

A empresa BRF S.A., especificamente unidade de Concórdia/SC, desde os gestores que foram compreensivos com o tempo investido para a conclusão desse projeto, os colegas de equipe que auxiliaram na realização do experimento.

A minha orientadora Janice que foi sempre muito atenciosa aos meus anseios e possibilitou a realização do experimento, sendo exemplo de profissional atuante no setor da pesquisa e referência técnica para todo o setor.

Aos colaboradores do laboratório de sanidade da Embrapa Suínos e Aves e do CEDISA por auxiliarem no processamento dos materiais coletados no projeto.

A minha esposa e companheira Helena por me incentivar sempre, nos momentos de dificuldade acreditar em mim e apoiar incondicionalmente.

O sucesso não é final. O fracasso não é fatal. É a coragem de continuar que conta.

Winston Churchill

Resumo

VENDRUSCOLO, Francisco. **Investigação da circulação do Vírus da Influenza A em suínos em fase de crescimento e terminação**. 2021. 40p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2021.

Atualmente, o modelo intensivo adotado na cadeia de produção de suínos em grande escala predispõe o desenvolvimento de doenças de caráter enzoótico, envolvendo muitas vezes um complexo de agentes etiológicos e causando síndromes que cursam com diminuição dos índices de produtividade e frequentemente aumento da taxa de mortalidade dos plantéis. O vírus da Influenza A (IAV) é um agente etiológico que faz parte do chamado complexo de doenças respiratórias dos suínos (CDRS), podendo cursar com sinais clínicos inespecíficos tais como febre, apatia, tosse, prostração, inapetência, perda de peso e frequentemente associado a lesões de pneumonia responsáveis por condenação de carcaças no abatedouro. A possibilidade de rearranjos virais com variantes da influenza aviária, humana e de suínos, aumenta a importância do vírus no que diz respeito a um evento pandêmico, reiterando a importância do monitoramento da prevalência do agente. A adoção de boas práticas de produção (BPP) e sistemas de biossegurança adequados está descrita como uma forma de evitar a propagação do vírus, reduzindo sua possibilidade de disseminação. Diferentes modelos de produção (em tamanho e níveis de biossegurança) podem estar ligados a prevalência do IAV e devem ser monitorados para que se desenvolvam estratégias de controle efetivas para reduzir o prejuízo nos rebanhos comerciais. O trabalho foi desenvolvido em uma agroindústria no meio oeste catarinense através de um checklist aplicado em 385 granjas em sistema vertical de suínos em terminação, caracterizando-as quanto ao nível de biossegurança e BPP adotados. Uma amostragem de 35 granjas foi submetida a coleta de swabs nasais para detecção do IAV através de técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RTq-PCR), totalizando 529 amostras. Também foi utilizada uma técnica de coleta de material para diagnóstico através da utilização de lenços nasais para avaliação do método, totalizando 80 amostras. Após a realização do checklist nas granjas, foram caracterizados quatro grupos de acordo com os níveis de biossegurança e BPP adotadas no sistema: G1 – granjas com menos de 700 animais e com baixo padrão de biossegurança (145 granjas); G2 – granjas com menos de 700 animais e alto padrão de biossegurança (56 granjas); G3 – granjas com mais de 700 animais e baixo padrão de biossegurança (74 granjas) e G4 – granjas com mais de 700 animais e alto padrão de biossegurança (110 granjas). Foram realizadas 30 amostras de swabs nasais e lenços nasais em uma granja para um teste piloto, resultando em 86,6% de animais positivos para IAV através da coleta tradicional de swabs nasais e 83,3% de positividade utilizando a técnica dos lenços nasais. Como resultado das coletas do experimento foram obtidas 15 amostras positivas para IAV, sendo 12 através da coleta a partir de swabe tradicional e 3 através do método do lenço nasal. Foi realizado a análise de variância para comparação dos métodos, evidenciando diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre eles.

Palavras-chave: doença respiratória; pandêmico; swabe nasal; lenço nasal.

Abstract

VENDRUSCOLO, Francisco. **Investigation of Influenza A Virus circulation in finishing pigs.** 2021. 40p. Dissertation (Master degree in Science) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2021.

Currently, the intensive model adopted in the large scale swine production chain predisposes the development of enzootic nature diseases, often involving a complex of etiological agents and causing syndromes that lead to a decrease in productivity rates and frequently an increase in herds mortality rate. The Influenza A virus (IAV) is an etiological agent that is part of the so-called swine respiratory disease complex (SRDC), it can be associated with nonspecific clinical signs such as fever, apathy, cough, prostration, inappetence, weight loss and frequently associated with pneumonia injuries responsible for carcasses condemnation in the slaughterhouse. The possibility of viral rearrangements associated with variants of avian, human and swine influenza increases the importance on a pandemic event, reiterating the importance of monitoring the virus prevalence. The adoption of good production practices (GPP) and adequate biosecurity is described as a way to prevent the virus spreading. Different production models (in size and levels of biosecurity) may be linked to the prevalence of IAV and must be monitored in order to develop effective strategies to reduce the damage in commercial herds. The work was developed in an industry situated in the middle-west of Santa Catarina through a checklist applied to 385 farms in a vertical system of finishing pigs, characterizing them in terms of the biosecurity level and GPP. An amount of 35 farms were submitted to the collection of nasal swabs for the detection of IAV through the real time polymerase chain reaction technique (RTq-PCR), a total of 529 samples will be submitted to the technique. A technique for collecting material for diagnosis through the use of nasal wipes was also used to evaluate the method, totaling 80 samples. After carrying out the checklist on the farms, four groups were characterized according to the levels of biosecurity and GPP adopted: G1 - farms with less than 700 animals and with a low standard of biosecurity (145 farms); G2 - farms with less than 700 animals and a high standard of biosecurity (56 farms); G3 - farms with more than 700 animals and low biosecurity standard (74 farms) and G4 - farms with more than 700 animals and high biosafety standard (110 farms). 30 samples of nasal swabs and nasal wipes have been carried out on a farm for a pilot test, resulting in 86.6% of animals positive for IAV through the traditional collection of nasal swabs and 83.3% of positivity using the technique of nasal wipes. As a result of the collections of the experiment, 15 positive samples for IAV were obtained, being 12 through the collection from traditional nasal swab and 3 through the nasal wipes method. Analysis of variance was performed to compare the methods, showing a statistical difference ($p \leq 0.05$) between them.

Keywords: respiratory disease, pandemic, nasal swab, nasal wipe.

Lista de Figuras

Figura 1	Método de contenção para realização da coleta com suabe tradicional e utilizando a gaze.....	24
Figura 2	Análise de variância evidenciando diferença estatística nos valores de cT encontrados na detecção do IAV utilizando método do lenço e suabe nasal.....	28

Lista de Tabelas

Tabela 1	Grupos de granjas de acordo com o tamanho e padrão de biosseguridade adotado.....	22
Tabela 2	Amostragem de granjas para realização das coletas de material para análise laboratorial.....	23
Tabela 3	Valores de cT obtidos através de análise de RT-PCR para IAV coletados por método tradicional e método com lenço nasal.....	27
Tabela 4	Percentual de granjas positivas para IAV através de RT-PCR.....	29
Tabela 5	Total de amostras positivas em cada método (suabe tradicional e lenço nasal).....	29
Tabela 6	Análise de comparação das médias de GPD, mortalidade e CA entre os grupos definidos segundo os padrões de BPP e biosseguridade.....	30

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE.....	11
2	OBJETIVOS.....	16
	2.1 Geral.....	16
	2.2 Específicos.....	16
3	Investigação da circulação do vírus da influenza A em suínos em fase de crescimento e terminação.....	17
	3.1 Introdução.....	18
	3.2 Material e Métodos.....	21
	3.3 Resultados.....	26
	3.4 Discussão.....	31
	3.5 Conclusão.....	34
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
5	REFERÊNCIAS.....	36
6	ANEXOS.....	39

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

Os números referentes a produção nacional de suínos têm evoluído a cada ano, é o que mostra um mapeamento realizado pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) onde o Brasil se destaca com um plantel reprodutivo de aproximadamente 2 milhões de matrizes alojadas para produção em sistemas tecnificados. Em comparação com o mercado externo, o Brasil ocupa a quarta posição na produção de carne suína, com um volume produzido de 4,43 milhões toneladas no ano de 2020. Em relação as exportações, ocupa a mesma posição totalizando aproximadamente 1 milhão de toneladas de carne suína, correspondente a 23% da produção nacional. Santa Catarina é maior produtor de suínos do país, sendo responsável por 30% do abate total e participação de 50% na exportação brasileira em 2020 (ABPA, 2021).

Considerando a importância econômica e a relevância da atividade de suinocultura no país, diversos tópicos devem ser levados em conta no que diz respeito a segurança alimentar. Garantir as boas práticas de produção (BPP) na cadeia produtiva é um tema que dificilmente estará fora dos debates acerca da sustentabilidade da atividade. A adoção de medidas de biossegurança também deixam de ser optativas frente as ameaças de doenças como a Peste Suína Clássica (PSC), com surtos reportados no Norte e Nordeste do país em 2018 e a Peste Suína Africana (PSA) responsável por grandes perdas econômicas na Ásia, Europa e África. Essas são doenças na lista da OIE, sendo fatores determinantes para o comércio internacional de produtos suínos. Segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), caso a PSC seja reintroduzida em zonas consideradas livres dentro do território nacional, os prejuízos poderiam alcançar a casa dos R\$ 4,5 bilhões.

Práticas de biossegurança são frequentemente adotadas como chave para a prevenção na introdução e transmissão de diversos agentes patogênicos de importância na produção de suínos. De maneira geral a adoção de tais práticas tem

gerado um melhor resultado econômico, maior eficácia nos programas vacinais e medicamentosos (reduzindo a utilização dos mesmos) e gerando benefícios para o bem-estar dos animais (Brennan & Christley, 2012). Surtos da diarreia epidêmica dos suínos que ocorreram no ano de 2013 na América do Norte são exemplos de falhas de implementação de programas de biossegurança que geraram grandes consequências para a atividade (Scott et al., 2016).

Os programas vacinais vêm se tornando ferramentas comuns, e de certa maneira eficazes, na diminuição da transmissão viral e aparecimento de sinais clínicos de doenças endêmicas nos suínos, porém para algumas enfermidades os protocolos de vacinação ainda não estão bem padronizados ou ainda assim oferecem uma cobertura aquém do esperado (Van Reeth & MA, 2013). Ainda assim práticas de biossegurança combinadas a programas vacinais específicos seguem sendo a melhor opção para controlar surtos e infecções persistentes nos rebanhos de suínos (White et al., 2016).

O modelo de produção de suínos em grande escala predispõe o surgimento de doenças de caráter enzoótico envolvendo mais de um agente etiológico, o chamado complexo de doenças respiratórias dos suínos (CDRS). *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, vírus da Influenza A (IAV) e o *Circovírus suíno* tipo 2 (PCV2) são exemplos de agentes comumente envolvidos no aparecimento de lesões de pneumonia e pleurite no abate. (Fablet et al., 2012). O CDRS acomete suínos desde a fase de creche até o crescimento e a terminação, sendo o quadro clínico bastante variado de acordo com os agentes envolvidos e geralmente acarretando perdas nos índices produtivos de ganho de peso e eficiência alimentar. Na maioria das vezes o IAV atua como agente primário nessas infecções, causando destruição do epitélio respiratório dos brônquios e bronquíolos, facilitando a ação de outros agentes como *Pasteurella multocida*, *Glässerella parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e exacerbando os sinais clínicos e perdas em decorrência. O IAV é considerado um fator de risco para o agravamento das lesões pulmonares associadas ao *Mycoplasma hyopneumoniae* (Thacker et al., 2001). A interação entre os dois

agentes foi estudada em condições de campo e parecem ter efeito sinérgico no que diz respeito a sintomatologia e persistência da infecção nos rebanhos (Schmidt et al., 2015). Em um estudo conduzido por Rech et al. (2017) avaliando casos de CDRS entre os anos de 2009 e 2015 no Brasil foi observado que o IAV estava presente na maioria dos casos seguido por infecção pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*. Nesse mesmo estudo foi detectado que o subtipo com maior prevalência foi o IAV pandêmico de 2009 ou A(H1N1)pdm09, ressaltando a importância do agente como agente primário nos casos de CDRS.

A influenza é uma doença respiratória viral aguda que afeta diversas espécies animais incluindo humanos. Os vírus *Influenza* pertencem a família *Orthomyxoviridae* que possui cinco gêneros distintos: *Influenza A*, *Influenza B*, *Influenza C*, *Thogotovirus* e *Isavirus*. (King et al., 2011). Os vírus do gênero *Influenza A* podem infectar várias espécies de aves e mamíferos (incluindo o ser humano, suínos e equinos), possui envelope e seu genoma é composto por oito segmentos de RNA com polaridade negativa interligados que codificam entre 10 e 12 proteínas virais. O RNA é protegido por duas proteínas chamadas de nucleoproteína (NP) e proteína da matriz (M), sendo essas utilizadas em testes de triagem para identificação do vírus da *Influenza A*. Em sua superfície estão presentes duas glicoproteínas: a hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) que determinam a tipagem viral. Essas glicoproteínas são os maiores alvos da resposta imune do hospedeiro, levando a um processo de substituição de aminoácidos chamado “*antigenic drift*”, em alguns casos mudanças maiores causando substituição de um segmento inteiro do genoma resultam num fenômeno denominado “*antigenic shift*” ou rearranjo. Isso geralmente ocorre quando uma célula hospedeira é infectada por dois ou mais IAV diferentes, gerando uma progênie de vírus com uma nova combinação de genes (Vincent et al., 2009).

Os sinais clínicos da influenza em suínos são semelhantes aos sinais clínicos em humanos, sendo comum o aparecimento de febre, apatia, redução no consumo de alimento, dificuldade para respirar, tosse, espirro, conjuntivite e descarga nasal. Em

nível de rebanho, a doença cursa com alta morbidade e geralmente baixa mortalidade em caso de infecções isoladas (Vincent et. al, 2008). Os suínos possuem uma particularidade em seu trato respiratório, nele existe a presença de receptores com afinidade tanto ao vírus humano quanto ao vírus aviário, tornando a espécie um hospedeiro importante no que diz respeito a recombinação genética (Brown, 2000).

A influenza A em suínos é considerada endêmica no mundo todo, sendo a espécie considerada portadora dos subtipos virais A/H1N1, A/H3N2 e A/H1N2 (Vincent et al., 2009).

Em 2009 uma nova linhagem do IAV surgiu no México e Estados Unidos, em poucas semanas o vírus se alastrou para 30 países, fazendo com que a Organização Mundial da Saúde emitisse um alerta de potencial pandêmico. Foi estabelecido que esta linhagem do vírus era resultante de um rearranjo triplo com genes de origem aviária, humana e de suínos - Influenza pandêmico (A(H1N1)pdm09) (Smith, 2009). Esse evento tem reforçado a necessidade de monitoramento dos possíveis rearranjos e linhagens circulantes do vírus tanto em humanos como em suínos, prevendo possíveis ameaças a produção e saúde pública de modo geral.

Na América do Norte até o final da década de 90 o principal subtipo encontrado nos rebanhos era o H1N1 clássico (cH1N1), após esse período foram detectadas amostras contendo o subtipo H3N2 recombinante triplo, contendo segmentos gênicos do cH1N1, segmentos de vírus aviário e humano, o chamado TRIG - "*triple reassortant internal gene cassette*" (Zhou, 1999). Desde 2005 os subtipos virais H1N1 e H1N2 com características do vírus sazonal humano tem emergido na população de suínos do continente. A evolução do vírus também é representada por meio de clusters de acordo com a linhagem gênica da glicoproteína H1 (clusters α , β , γ , δ). Hoje em dia circulam no continente os vírus H1N1, H1N2, H1N1pdm09 e H3N2 (Vincent, et al., 2009).

Na Ásia e continente Europeu houve a circulação do vírus cH1N1 e outros subtipos de IAV. Ao longo do tempo esses vírus foram substituídos por outros sendo

eles: H3N2 humano, H1N1 aviário, esse posteriormente sofreu um rearranjo com o H3N2 humano. Na década de 90 houve o surgimento do subtipo H1N2 contendo recombinações genéticas (Vincent et al., 2009).

Na América do Sul a Argentina relatou nos anos 2000 casos de suínos com sinais clínicos compatíveis com a doença onde foi possível isolar o subtipo H3N2, onde mais tarde a infecção foi reproduzida de maneira experimental, sugerindo a adaptação do subtipo a espécie. Também no mesmo país em 2009 e 2010 foram relatados casos com a presença do vírus H1N1pdm09 (Pereda et al., 2011). No Brasil poucos estudos importantes ocorreram antes do evento pandêmico de 2009. Desde a década de 30 se suspeita da presença do IAV nos rebanhos brasileiros, porém o primeiro relato do isolamento do agente foi descrito apenas em 1978 (Cunha et al., 1978). Alguns estudos mais recentes indicam uma prevalência de 60% de soros positivos para IAV e relatam a presença de um subtipo H1N2 contendo genes H1 e N2 de origem IAV sazonal humano e genes internos provenientes do vírus H1N1pdm09 (Ciacci-Zanella et al., 2011). No estado do Paraná um estudo detectou a positividade em animais de 46% em 74 granjas testadas através de análise sorológica para o subtipo H3N2 (Caron et al., 2010).

Os aspectos que envolvem a ecologia do IAV em suínos e a participação dessa espécie como hospedeiro de diversas linhagens virais, aliado ao evento pandêmico que ocorreu em 2009 destacam a importância da elaboração e desenvolvimento de protocolos de pesquisa e monitoria dos subtipos que mais ocorrem nos plantéis nacionais. Assim é possível a tomada de decisão para a inclusão de práticas de controle que reduzam a possibilidade da transmissão e o risco do surgimento de novas variantes que elevem os prejuízos econômicos na atividade.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Detectar e caracterizar o vírus da Influenza A em granjas de suínos em fase de crescimento e terminação observando aspectos como períodos de maior transmissibilidade e fatores que influenciam a maior excreção e conseqüentemente circulação do vírus nos rebanhos nessa fase.

2.2 Específicos

- Avaliar do ponto de vista de desempenho zootécnico (ganho de peso médio diário, percentual de mortalidade e conversão alimentar na fase) o efeito da adoção de BPP e medidas de biossegurança;
- Avaliar o método de colheita de amostras utilizando lenços nasais (“nasal wipes”) para realização de teste molecular de RT-PCR na detecção do IAV;
- Comparar o método de eleição para colheita de material para diagnóstico de IAV em suínos através de RT-PCR utilizando suabes nasais com a técnica utilizando lenços nasais;
- Realizar tipificação dos IAV existentes nos plantéis de terminação da integração de suínos em uma agroindústria do meio oeste catarinense;
- Verificar o comportamento sazonal no que diz respeito a circulação e excreção do IAV nos rebanhos de suínos em fase de crescimento e terminação.

3 INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA A EM SUÍNOS EM FASE DE CRESCIMENTO E TERMINAÇÃO

Autores

Francisco Elias Vendruscolo^a, Letícia Lopes^b, Caroline Pissetti^c, Janice Reis Ciacci
Zanella^b

^aBRF S.A; ^bEmbrapa Suínos e Aves; ^cCentro de Diagnóstico de Sanidade Animal - CEDISA

3.1 Introdução

Atualmente, o modelo de produção de suínos em grande escala predispõe o surgimento de doenças de caráter enzoótico envolvendo mais de um agente etiológico, o chamado complexo de doenças respiratórias dos suínos. *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, Influenza A (IAV) e o *Circovírus suíno* tipo 2 (PCV2) são exemplos de agentes comumente envolvidos no aparecimento de lesões de pneumonia e pleurite no abate (Fablet, et. al 2012).

A influenza é uma doença respiratória viral aguda que afeta diversas espécies animais incluindo humanos. Os vírus *Influenza* pertencem a família *Orthomyxoviridae* que possui cinco gêneros distintos: *Influenza A*, *Influenza B*, *Influenza C*, *Thogotovirus* e *Isavirus* (King et. al 2011). Os vírus do gênero *Influenza A* (IAV) podem infectar várias espécies de aves e mamíferos (incluindo o ser humano, suínos e equinos).

A infecção pelo IAV está presente em diversos países produtores de suínos ao redor do mundo, e em diversos países o vírus possui material genético de múltiplas origens, incluindo o vírus aviário e humano. Suínos possuem os receptores específicos tanto para o vírus da *Influenza* humana quanto aviária em seu trato respiratório, fator esse que pode contribuir para o surgimento de novas variantes com potencial pandêmico para a população humana (Brown, 2000).

A transmissão do vírus pode ocorrer de diversas formas, além do contato direto com suínos infectados, aerossóis e fômites que podem servir de fontes de infecção, bem como outras espécies, inclusive humanos, que podem transmitir o vírus para os suínos. A dinâmica de transmissão do IAV entre o ser humano e o suíno ressalta a tendência de surgimento de novas variantes que podem surgir desse evento. Nelson et. al (2019) relatam o aparecimento de uma nova variante resultante da recombinação de um vírus H3N2 com genoma derivado de dois diferentes vírus introduzidos do ser humano para o suíno. Bowman et. al (2017) descreve um caso

onde há a transmissão do IAV entre suínos e humanos em feiras agropecuárias nos EUA, resultando na detecção de uma nova variante do vírus H3N2.

O diagnóstico laboratorial do IAV pode ser realizado através de diversos métodos, como o isolamento viral em cultivo celular ou ovos embrionados para detectar a presença do agente; testes moleculares para detectar o material genético viral; sorologia por Elisa ou teste da inibição da hemaglutinação (HI) para detecção de anticorpos; análise histopatológica aliada a imunohistoquímica para detectar lesões microscópicas e presença de antígeno nos tecidos do aparelho respiratório (Van Reeth et al. 2012).

Medidas de biossegurança são comumente utilizadas como forma de evitar a transmissão de várias doenças, porém mais estudos são necessários para elucidar melhor a efetividade dessas práticas no controle da Influenza A (Allerson, et al 2013). Tais medidas envolvem diversas práticas de manejo, operacionalização e ações que reduzam os riscos da introdução e disseminação de agentes endêmicos que podem vir a causar prejuízos econômicos e sanitários nos sítios de produção. Tais práticas podem melhorar as respostas dos animais aos protocolos de vacinação e tratamentos medicamentosos, além de reduzir o uso de antibióticos na cadeia produtiva (Lannen, et. al 2013).

A vacinação é um método de prevenção bastante utilizado em diversos países, sendo a vacina composta por subtipos virais diferentes adequados a cada desafio específico. Nos Estados Unidos as vacinas contêm isolados de IAV cH1N1 e H3N2 (Kitikoon, et al. 2006). Na Europa são compostas pelos subtipos H1N1 (A/New Jersey/8/76 ou Sw/Netherlands/25/80) e vírus H3N2 (A/Port Chalmers/1/73) (Van Reeth et al. 2003). As vacinas vivas atenuadas são descritas como capazes de aumentar a imunidade local e promover a proteção cruzada para outros subtipos virais. Apesar da inovação na área da imunoprofilaxia, o estabelecimento de novos subtipos e novas variantes genéticas em suínos dificulta a confecção de vacinas eficazes empregadas no controle da influenza nos rebanhos (Van Reeth & MA, 2013). Os programas vacinais

vêm se tornando ferramentas comuns, e de certa maneira eficazes, na diminuição da transmissão viral e aparecimento de sinais clínicos em países como Canadá e Estados Unidos. Já no Brasil os protocolos de vacinação ainda não estão bem padronizados, ressaltando as práticas de biossegurança como importantes formas de prevenção e controle da infecção nos plantéis (Van Reet & MA, 2013). Para isto, o monitoramento e caracterização do vírus IAV nos rebanhos são importantes para avaliar a situação das granjas e ser base para medidas de controle. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi detectar e caracterizar o vírus da Influenza A em granjas de suínos em fase de crescimento e terminação observando aspectos como períodos de maior transmissibilidade e fatores que influenciam a maior excreção e conseqüentemente circulação do vírus nos rebanhos nessa fase.

3.2 Material e Métodos

Delineamento experimental

O experimento foi realizado em uma integração de suínos no meio oeste de Santa Catarina em um sistema de produção em três sítios. Os animais alvo do estudo eram da fase de crescimento e terminação, compreendendo indivíduos entre 65 e 180 dias de vida. A genética utilizada nas granjas é própria da empresa e os lotes alojados compreendem animais machos e fêmeas (lotes mistos).

Foi aplicado um checklist padrão (Anexo 1) utilizado nas rotinas dos responsáveis técnicos pelas granjas, avaliando as características das granjas no que diz respeito aos procedimentos de biossegurança adotados e boas práticas de produção empregados na rotina de trabalho da granja. Os itens compreendidos no checklist destacam aspectos descritos como fatores de risco na circulação de eventuais agentes patogênicos importantes na produção de suínos, avaliando através de 45 itens:

- Presença de outras criações de animais e/ou acesso de outros animais no perímetro da granja;
- Presença de barreira sanitária com cercado ao redor do perímetro da granja;
- Avaliação das estruturas e equipamentos gerais das instalações como cortinados, forros, telas e telhados;
- Sistema de fornecimento de ração e água para os animais;
- Aspectos de limpeza e organização dos materiais da granja;
- Destinação dos animais mortos;
- Existência de um programa de controle de roedores;

O checklist foi aplicado em um total de 385 granjas do sistema vertical de suínos em terminação (SVT) com capacidade de alojamento entre 220 e 3100 animais. A partir do resultado do checklist, uma pontuação foi associada a cada granja, resultando

em quatro grupos de acordo com o tamanho da granja e padrão de biossegurança como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Grupos de granjas de acordo com o tamanho e padrão de biossegurança adotado.

Grupo	Tamanho da Granja	Padrão de Biossegurança	Número de Granjas
Grupo 1	<700 animais	Baixo	145
Grupo 2	<700 animais	Alto	56
Grupo 3	>700 animais	Baixo	74
Grupo 4	>700 animais	Alto	110

Coleta

A partir dos grupos obtidos após a aplicação do checklist, foi selecionada uma amostragem de granjas para a realização de coleta de amostras para posterior detecção do vírus através de análise laboratorial (Tabela 2). As coletas de material foram realizadas utilizando duas metodologias: a) suabe nasal tradicional e b) lenços nasais. Para o suabe tradicional foram utilizados suabes de polipropileno, polietileno e rayon estéreis que são introduzidos na cavidade nasal do animal na direção dorso-medial realizando-se movimentos circulares para coleta de secreção e então acondicionado em meio de transporte MEM (Meio Essencial Mínimo), suplementado com antibiótico, anfotericina B e BSA (albumina sérica bovina) até a chegada ao laboratório. O suabe nasal através de lenços nasais é uma técnica que utiliza gazes hidrófilas de algodão previamente esterilizadas em autoclave que são friccionadas na superfície do focinho do animal e posteriormente acondicionado em meio de transporte da mesma forma. As coletas foram realizadas num total de 35 granjas,

sendo que em 6 delas foram realizadas as coletas pareadas com o método do lenço, totalizando 609 amostras, sendo 529 com suabe nasal e 80 utilizando as gizes.

Tabela 2: Amostragem de granjas para realização das coletas de material para análise laboratorial.

Grupo	N° de granjas para suabe nasal	N° de granjas para lenço nasal	N° de amostras coletadas
Grupo 1	14	3	255
Grupo 2	5	1	95
Grupo 3	6	0	95
Grupo 4	10	2	164
Total	35	6	609

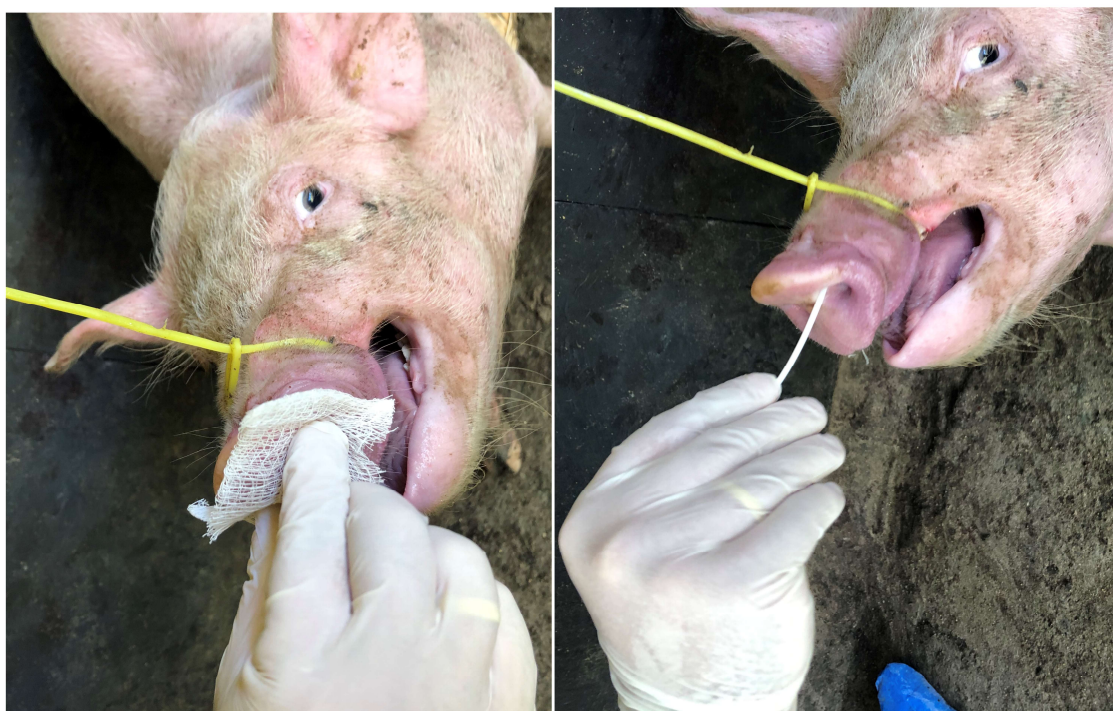
Os lotes escolhidos para a realização das coletas de suabe e lenço nasal também foram analisados quanto ao seu desempenho zootécnico obtido na fase de crescimento/terminação. Os animais foram pesados na saída de creche e novamente pesados antes do abate na indústria. Foram avaliados índices de ganho de peso diário (GPD), mortalidade e conversão alimentar (CA).

Fase de coletas do projeto piloto

Como forma de avaliar e treinar a metodologia de coleta de material utilizando os lenços nasais, foi realizado um piloto em uma granja na qual foram realizadas 60 coletas, sendo 30 utilizando suabes tradicionais de rayon e 30 utilizando os lenços de gaze de algodão. Para a realização da coleta, o animal era contido com o auxílio de um cachimbo. Dessa forma o animal permanecia imóvel, facilitando a introdução do suabe, bem como a fricção com a gaze no focinho do animal (Figura 1). Após a coleta os suabes e lenços eram transportados em MEM e acondicionados em caixa de isopor

com gelo até a chegada ao laboratório. As coletas do piloto foram realizadas durante o mês de agosto de 2020.

Figura 1: Método de contenção para realização da coleta com suabe tradicional e utilizando a gaze.



Processamento das amostras no laboratório

Após as coletas o material foi acondicionado em caixa de isopor com gelo e encaminhadas ao laboratório CEDISA (Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal) em Concórdia/SC para processamento. No laboratório as amostras contidas nos microtubos de 3mL (suabes) e tubos tipo Falcon de 15mL (lenços) foram homogeneizadas por dez segundos e então separadas em alíquotas. Para extração de RNA, foi utilizado 200 μ L de cada amostra. A extração foi realizada pelo kit IndiMag Pathogen Kit (Indical Bioscience GmbH, Leipzig, Alemanha), no extrator automático IndiMag 48 (Indical Bioscience GmbH, Leipzig, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

Para amplificação do gene M do IAV foi utilizado o protocolo de Spackman e Suarez (2008) com modificações, com os primers M+25 (5'-AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3'), M-124 (5'-TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG-3'), M-124-2 (5'-TGC AAA GAC ACT TTC CAG TCT CTG-3') e a sonda Taqman M+64 (5'-FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA-3'). Para a reação foi utilizando o kit AgPath-ID (Applied Biosystems, Austin, EUA) e o seguinte programa: 60°C por 30 minutos, 45°C por 10 minutos, 95°C por 10 minutos, e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A reação foi realizada no termociclador QuantStudio 6 (ThermoFisher, Waltham, EUA). Em todas as etapas foram utilizadas amostras conhecidas positivas e negativas para controle da técnica de extração e reação. As amostras positivas foram submetidas a subtipagem através da técnica de RT-PCR, conforme Haach et al. (2020).

Análise Estatística

Foi realizado um teste exato de Fisher (TEF) para avaliar diferença estatística entre os métodos de suabe nasal e lenço nasal. Também foi utilizada a análise de variância com o intuito de comparar os resultados obtidos através de cada método aplicado.

Para avaliação dos índices de ganho de peso diário (GPD), mortalidade e conversão alimentar (CA), foi feito uma comparação entre as médias através do teste “*Least Significant Difference*” (LSD), protegido pelo teste F global ($p \leq 0,05$).

3.3 Resultados

Resultados das coletas do projeto piloto

Realizado no mês de agosto de 2020, o projeto piloto teve por objetivo realizar a operacionalidade da metodologia de coleta utilizando os lenços nasais e contou com um total de 60 amostras coletadas em uma granja de suínos em fase de terminação. Do total 30 amostras foram coletadas através do método convencional através do uso de suabes do tipo rayon e 30 utilizando lenços nasais. Das 60 amostras totais, 51 (85%) testaram positivas para o IAV através do RT-qPCR. Isoladamente as amostras obtidas através do suabe convencional apresentaram 26 amostras positivas (86,6%), já através do lenço nasal foram obtidas 25 amostras positivas para o IAV (83,3%). Nessas amostras o valor do Ct variou entre 19,68 e 35,97 (Tabela 3). Em um ensaio de PCR em tempo real (qPCR), uma reação positiva é detectada pelo acúmulo de um sinal fluorescente, visualizado pelo Ct (Cycle threshold). O Ct é definido como o número de ciclos necessários para que a fluorescência gerada dentro de uma reação de qPCR ultrapasse o limiar de fluorescência e seja detectada. Os níveis de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucleico alvo na amostra, ou seja, quanto menor o nível de Ct, maior a quantidade de ácido nucleico alvo na amostra.

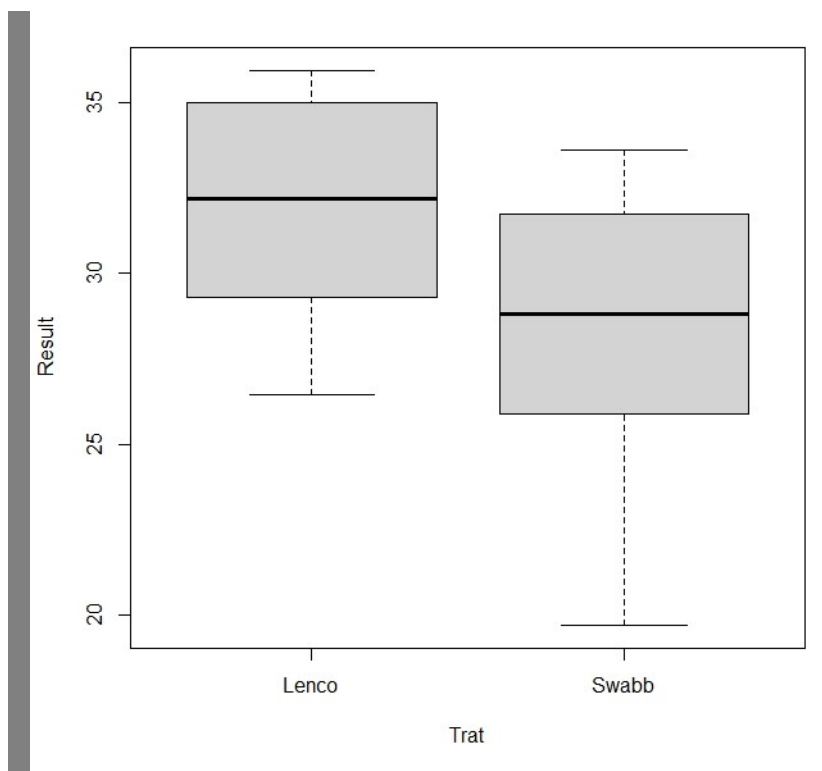
Tabela 3: Valores de Ct obtidos através de análise de RT-PCR para IAV coletados por método tradicional e método com lenço nasal.

Animal	Suabe	Lenço
1	Negativo	35,62
2	33,28	35,63
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	33,95
5	31,75	33,16
6	33,64	35,6
7	32,4	35,97
8	28,46	34,13
9	29,94	31,89
10	30,41	29,29
11	Negativo	29,46
12	27,41	Negativo
13	30,28	33,39
14	32,41	32,5
15	33,6	Negativo
16	26,28	35
17	31,81	35,47
18	22,13	27,19
19	32,17	Negativo
20	19,68	27,71
21	29,32	32,66
22	33,6	Negativo
23	21,87	30,46
24	29,14	35,22
25	25,9	26,46
26	28,16	29,65
27	25,86	28,64
28	28,25	31,81
29	24,55	28,22
30	26,03	30,26

No intuito de comparar as duas técnicas de coleta, foi realizado um teste exato de Fisher (TEF), onde o resultado demonstrou não haver diferença significativa entre os dois métodos ao nível de significância de 5% ($p=0,5384$).

Foi realizada a análise de variância com o intuito de comparar os resultados obtidos através de cada método aplicado. Em relação aos valores de Ct obtidos através de análise de RT-qPCR houve diferença significativa ($p\leq 0,05$), sendo que o procedimento utilizando a técnica do lenço apresentou maior valor ($31,83\pm 0,65$) em comparação com a técnica tradicional utilizando o suabe nasal ($28,25\pm 0,82$), sugerindo que a técnica do suabe tradicional possui maior sensibilidade em relação a técnica utilizando os lenços.

Figura 2: Análise de variância evidenciando diferença estatística nos valores de cT encontrados na detecção do IAV utilizando método do lenço e suabe nasal.



Resultados das coletas do experimento

Após o teste piloto foram realizadas as coletas nas granjas conforme descrito no delineamento experimental, agrupadas de acordo com o padrão de biosseguridade adotado e escala de produção.

Do total de 35 propriedades onde foram realizadas as coletas através da técnica tradicional, com suabe nasal, em 3 granjas foram obtidos resultados positivos (8,57%) no RT-qPCR para IAV. Das 6 granjas onde foram realizadas a coleta através da metodologia do lenço nasal, 2 delas apresentaram animais positivos (33,3%) (Tabela 4).

Tabela 4: Percentual de granjas positivas para IAV através de RT-PCR.

Método de Coleta	Granjas Positivas	Granjas Negativas	Total
Suabe nasal	3	32	35
Lenço Nasal	2	4	6
%	12,2	87,8	100

Do total de coletas realizadas, 529 amostras de suabe nasal mais 80 amostras com o lenço nasal, foram obtidas 15 amostras positivas, 12 através do suabe nasal e 3 através do lenço nasal (2,27% e 3,75% respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5: Total de amostras positivas em cada método (suabe nasal e lenço nasal).

Método de Coleta	Amostras Positivas	Amostras Negativas	Total
Suabe nasal	12	517	529
Lenço nasal	3	77	80
%	2,46	97,54	100

Com o intuito de analisar quais subtipos virais estão circulando na integração na fase de crescimento e terminação, as amostras positivas foram submetidas a subtipagem. Somente em cinco amostras a quantidade de vírus presente permitiu que fosse realizada a subtipagem viral, as amostras eram originárias de duas granjas e o mesmo subtipo H3N2 foi encontrado em todas as amostras.

Análise de desempenho zootécnico dos lotes em função do grupo

Em relação ao desempenho zootécnico obtido na fase de crescimento/terminação. Os animais permaneceram nas propriedades em torno de 120 dias, foram pesados na saída de creche e novamente pesados antes do abate na indústria. Foram avaliados índices de ganho de peso diário (GPD), mortalidade e conversão alimentar (CA) na fase com objetivo de verificar o impacto dos protocolos de biosseguridade e de doenças respiratórias em possíveis perdas. Os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos baseados nos protocolos de biosseguridade e BPP no que diz respeito aos índices de GPD e CA, não houve diferença significativa na mortalidade entre os grupos (Tabela 6). A comparação entre as médias foi feita pelo teste “*Least Significant Difference*” (LSD), protegido pelo teste F global ($p \leq 0,05$).

Tabela 6: Análise de comparação das médias de GPD, mortalidade e CA entre os grupos definidos segundo os padrões de BPP e biosseguridade.

Variável	Grupo				Pr > F
	1	2	3	4	
GPD	0,881±0,017 ^b	0,918±0,016 ^{ab}	0,898±0,017 ^{ab}	0,946±0,015 ^a	0,0395
Mortalidade	4,301±0,828 ^a	2,548±0,307 ^a	4,298±1,040 ^a	2,624±0,108 ^a	0,1056
C.A.	2,439±0,023 ^a	2,287±0,029 ^b	2,417±0,042 ^a	2,266±0,029 ^b	0,0001

3.4 Discussão

O presente trabalho alcançou as expectativas propostas tratando-se da comparação entre os dois métodos de coleta sugeridos para detecção do IAV em rebanhos de suínos. Do ponto de vista de coleta percebe-se uma maior facilidade na condução do procedimento quando utilizando o método do lenço nasal. Apesar de nesse experimento ter sido optado pela contenção do animal para realização da coleta, observa-se que em uma situação de coletas aleatórias, como por exemplo no caso da realização de monitoria sanitária, é possível realizar a fricção do lenço no focinho do animal sem a necessidade de contenção do mesmo. A não necessidade de contenção do animal reduz o estresse causado tanto no animal alvo da coleta quanto nos demais animais do lote pois não gera o comportamento de vocalização comum nas situações onde o animal é contido. Além disso a coleta de amostras através do uso do lenço exige menor número de pessoal habilitado, em contrapartida o método do suabe nasal tradicional necessita de treinamento específico e experiência para a correta realização. Tendo em vista a facilidade na realização do procedimento com o lenço é possível fazer um maior número de coletas em menor espaço de tempo. Nolting et al. (2015) relatam tais vantagens do método quando comparado ao suabe nasal considerado padrão ouro para coletas destinadas a pesquisa da presença do IAV.

O material de confecção da gaze parece não influenciar na detecção de partículas virais através da técnica de RT-qPCR como pode ser visto nos resultados comparativos entre os dois métodos. O TEF demonstrou que não há diferença estatística no que diz respeito a detecção do IAV na comparação entre os dois testes a um nível de significância de 5%, o mesmo foi demonstrado por Edwards et al. (2014). Uma particularidade na utilização dos lenços é a necessidade de um maior volume de material acessório para transporte das amostras, pois os tubos para acondicionamento dos lenços são maiores do que os tubos para acondicionamento dos suabes.

Os valores de Ct obtidos através do RT-qPCR revelaram através de análise estatística de variância que existe diferença significativa entre os dois métodos, sendo que o método de suabe nasal apresentou valores menores em comparação com o método do lenço nasal. Isso se deve ao provável fato de que na coleta utilizando-se o lenço nasal é comum haver algum tipo de material orgânico presente no focinho do animal que seja incluído na amostra. Segundo Nolting et al. (2015) tais contaminantes ambientais podem inibir a amplificação por PCR ou causar toxicidade celular em procedimentos de isolamento viral.

Nelson et al. (2018) observou em seu experimento que não houve diferença significativa comparando o padrão ouro de coleta de amostras para IAV e dois diferentes materiais no método do lenço (gaze de algodão e outro material sintético comercial).

Na coleta realizada com o intuito de avaliar a prevalência do IAV em função dos padrões de biossegurança e BPP adotadas em cada granja, o percentual de amostras positivas foi muito baixo, impossibilitando uma avaliação precisa sobre as diferenças entre cada grupo de granjas monitoradas. O baixo número de amostras positivas (2,46%) evidencia o fato de que na fase em questão, aproximadamente 130 dias de vida dos animais, há uma baixa taxa de excreção do IAV. Esse fato também pode estar ligado a escolha aleatória dos animais no momento da coleta das amostras, sem direcionar em suínos que por ventura apresentassem algum tipo de sintomatologia clínica. A baixa detecção do IAV não ocorre na fase de creche onde a prevalência apresentou resultados superiores a 60% de positividade em amostras de suabe nasal avaliadas através de técnica de RT-qPCR nessa mesma integração (Ferreira et al., 2019). Os resultados de baixa prevalência do IAV nessa fase da produção são semelhantes aos resultados observados por Corzo et al. (2014) que, através da análise de secreção nasal, detectou 4,6% de animais positivos em suínos em fase de crescimento.

A subtipagem viral demonstrou a presença de somente um subtipo viral na integração (H3N2), porém a baixa carga viral nas amostras positivas dificultou que a subtipagem fosse realizada em todas as amostras. O resultado obtido por Ferreira (2019) em experimento realizado na mesma integração, também detectou a presença desse subtipo nas fases anteriores além de outros subtipos como o H1N1pdm09 e H1N2.

No intuito de avaliar o desenvolvimento dos suínos submetidos a diferentes padrões de BPP e biosseguridade, foram avaliados índices zootécnicos obtidos após o abate de cada lote avaliado no projeto. As médias dos resultados de GPD, mortalidade e C.A. foram obtidas em cada grupo. Observa-se que a C.A. é significativamente melhor nos grupos 2 e 4, onde as pontuações referentes aos padrões de BPP e biosseguridade são maiores. A respeito do GPD houve diferença significativa, onde os valores foram maiores no grupo 4, o que também evidencia que padrões melhores de biosseguridade levaram a um melhor desenvolvimento dos suínos em relação ao grupo 1. Em relação a mortalidade, não houve diferença significativa entre os lotes avaliados.

Em relação ao baixo número de amostras positivas na coleta do experimento, é possível que o fator sazonalidade tenha influenciado, visto que as coletas realizadas no mês de agosto para o piloto apresentaram mais amostras positivas em comparação com as amostras realizadas nos meses de dezembro.

3.5 Conclusão

A biosseguridade em granjas de suínos é de suma importância para a manutenção do status sanitário de um rebanho, e levando-se em consideração o IAV, trata-se de uma das formas de reduzir o impacto causado pelo mesmo na atividade. Neste trabalho a hipótese inicial seria que granjas com aspectos de biosseguridade mais bem estabelecidos estariam relacionadas com uma menor prevalência do IAV nas fases de crescimento e terminação, porém devido a uma baixa prevalência do vírus nessa fase o resultado final não foi atingido. Todavia o resultado mostra que para a fase em questão, aspectos como a imunidade dos animais podem estar ligado a uma baixa taxa de circulação do vírus entre os animais e apesar da baixa prevalência foi possível realizar a subtipagem do vírus H3N2 nos rebanhos da integração.

O método de coleta de descarga nasal para detecção do IAV utilizando lenços nasais surge como uma ferramenta de fácil realização e baixo custo, parecendo ser ideal para programas de monitoria sanitária periódicos para a detecção dos vírus circulantes nos plantéis. Apesar de apresentar sensibilidade reduzida comparado a técnica de suabe tradicional, pode ser explorada em casos de necessidade de grandes volumes de coleta e que requeiram agilidade no processo.

A garantia da adoção de medidas de BPP e protocolos mais elaborados de biosseguridade também demonstram um melhor desenvolvimento dos animais, resultando em melhores índices zootécnicos e consequentemente reduzindo os custos de produção.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do experimento não ter alcançado seu objetivo principal na correlação dos aspectos de biossegurança com a prevalência do IAV nos plantéis de suínos em fase de crescimento e terminação, a adoção de tais medidas segue sendo uma das principais ferramentas no controle dos desafios sanitários presentes na cadeia produtiva. Como sugestão para desenvolvimento de novos trabalhos relacionados ao tema, sugere-se uma coleta direcionada em animais apresentando sintomatologia clínica e também em fases onde a incidência da doença é maior. O uso de lenços nasais para a coleta de material para pesquisa de IAV pode ser uma alternativa bastante útil para programas de monitoria sanitária periódicos, melhorando assim o conhecimento dos principais subtipos circulantes nos plantéis e servindo como informação para a tomada de decisão quanto a adoção de protocolos de vacinação.

5 REFERÊNCIAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2021**. São Paulo, SP, 2021. 75p.

BOWMAN, A. S., WALIA, R. R., NOLTING, J. M., VINCENT, A. L., KILLIAN, M. L., ZENTKOVICH, M. M., ... & FORSHEY, T.. Influenza A (H3N2) virus in swine at agricultural fairs and transmission to humans, Michigan and Ohio, USA, 2016. **Emerging infectious diseases**, 23(9), 1551. 2017.

BRENNAN, M.L., CHRISTLEY, R.M. Biosecurity on cattle farms: a study in north-west England. **PLoS One** 7, 2012.

BROWN, I. H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **Vet. Microbiol.**, v. 74, p. 29-46, 2000.

CARON, L.F.; JOINEAU, M.E.G.; SANTIN, E.; RICHARTZ, R.R.T.B.; PATRICIO, M.A.C.; SOCCOL, V.T. Seroprevalence of H3N2 influenza A vírus in pigs from Paraná (South Brazil): Interference of the animal management and climatic conditions. **Vírus Reviews and Research**. 15, 63-73. 2010.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; SCHAEFER, R.; SCHIOCHET, M.F.; SILVEIRA, S.; CARON, L.; PIOVEZAN, U. 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. 2011.

CORZO, C. A.; MORRISON, R. B.; FITZPATRICK, A. M.; CULHANE, M. R.. Risk factors for detecting Influenza A in growing pigs. **Journal of Swine Health and Production**. v22. P176-184. 2014.

CUNHA, R.G.; VINHA, V.R.; PASSOS, W.D. Isolation of a strain of Myxovirus influenzae-A suis from swine slaughtered in Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Biologia** 38, p13-17. 1978.

EDWARDS, J. L.; NELSON, S. W.; WORKMAN, J. D.; SLEMONS, R. D.; SZABLEWSKI, C. M.; NOLTING, J. M.; BOWMAN, A. S.. Utility of snout wipe samples for Influenza A vírus surveillance in exhibition swine populations. **Influenza and Other Respiratory Virus**, v8, p574-579.

FERREIRA, M. V.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; SCHAEFER, R.; PIEROZAN, R. L.. Detecção e caracterização do vírus da Influenza A em suínos na fase de creche no meio oeste de Santa Catarina. 2019.

FABLET, C.; MAROIS-CRÉHAN, C.; SIMON, G.; GRASLAND, B.; JESTIN, A.; KOBISCH, M.; MADEC, F.; ROSE, N. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: a cross-sectional study. **Veterinary Microbiology**, v. 157, p. 152-163, 2012.

HAACH, V.; GAVA, D.; CANTÃO, M.E.; SCHAEFER, R. Evaluation of two multiplex RT-PCR assays for detection and subtype differentiation of Brazilian swine influenza viruses. **Brazilian Journal of Microbiology**, 51(3), p. 1447-1451, 2020.

KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. **San Diego: Elsevier Academic Press**, 2011. 1327p.

NELSON, M. I.; SOUZA, C. K.; TROVÃO, N. S.; DIAZ, A., MENA, I.; ROVIRA, A., ... & CULHANE, M. R.. Human-origin influenza A (H3N2) reassortant viruses in swine, Southeast Mexico. **Emerging infectious diseases**, 25(4), 691. 2019.

NELSON, S. W.; HAMMONS, C. T.; BLISS, N. T.; LAUTERBACH, S. E.; ZENTKOVICH, M. M.; LORBACH, J. N.; NOLTING, J. M.; BOWMAN, A. S.. Evaluation of nonwoven fabrics for nasal wipe sampling for influenza A virus in swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. Vol. 30. p920-923. 2018.

NOLTING, J.M., SZABLEWSKI, C.M., EDWARDS, J.L., NELSON, S.W., BOWMAN, A.S. Nasal Wipes for Influenza A Virus Detection and Isolation from Swine. **Journal of Visualized Experiments**. Vol.106. 2015.

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

RECH, R. R.; GAVA, D.; SILVA, M. C.; FERNANDES, L. T.; HAACH, V.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; SCHAEFER. Porcine respiratory disease complex after the introduction of H1N1/2009 influenza virus in Brazil. **Zoonoses and Public Health**. p.e155-e161. 2017.

SCHMIDT, C.; CIBULSKI, S.P.; ANDRADE, C.P.; TEIXEIRA, T.F.; VARELA, AP.M.; SCHEFFER, C.M.; FRANCO, A.C.; ALMEIDA, L.L.; ROEHE, P.M. Swine Influenza Virus and Association with the Porcine Respiratory Disease Complex in Pig Farms in Southern Brazil. **Zoonoses and Public Health**. v.63, p.234-240. 2015.

SCOTT, A.; MCCLUSKEY, B.; BROWN-REID, M.; GREAR, D.; PITCHER, P.; RAMOS, G.; SPENCER, D.; SINGREY, A. Porcine epidemic diarrhea virus introduction into the United States: Root cause investigation. **Prev. Vet. Med.** 2016.

SMITH, G. J. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. **Nature**. 459 (7250), p. 1122-1125, 2009.

THACKER, E.L.; THACKER, B.J.; JANKE, B.H. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and Swine Influenza Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2525-2530, 2001.

VAN REETH, K. & MA, W. Swine Influenza Virus Vaccines: To Change or Not to Change — That's the Question. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 370, p. 173–200, 2013.

VINCENT, A.L.; MA, W.; LAGER, K.M.; JANKE, B.H.; RICHT, J.A. Swine influenza viruses a North American perspective. **Advances in Virus Research**. 72, 127-154. 2008.

VINCENT, A.L.; MA, W.; LAGER, K.M.; GRAMER, M.R.; RICHT, J.A. & JANKE, B.H. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. **Virus Genes**. v. 39, p. 176-185. 2009.

ZHOU, N.N. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in american pigs. **J Virol**, v. 73, p. 8851–8856, 1999.

6 ANEXOS

a) Questionário de biosseguridade aplicado nas granjas observadas no projeto;

1)Existe criação de bovinos/aves na propriedade?
2)A propriedade tem criação de aves soltas?
3)A granja possui cerca de isolamento e elas estão íntegras?
4)A granja possui cercado em torno dos silos?
5)Existe pia com sabão, papel toalha e álcool gel para higiene das mãos na barreira sanitária?
6)A rede de distribuição está íntegra, caixas d'água fechadas e com tampas íntegras?
7)Os pedilúvios estão disponíveis e limpos?
8)A granja possui sistema de cloração?
9)Os telhados estão íntegros?
10)Os forros estão em bom estado de limpeza e conservação?
11)Os galpões possuem tela antipássaro?
12)Cortinas estão em bom estado de conservação?
13)As telas estão em bom estado de conservação?
14)Observa-se a ausência de ninhos de passarinho nas instalações externas (beirais) das pocilgas?
15)Observa-se ausência de árvores frutíferas, hortas, milho ou outras plantações e varal de roupas dentro da área de biosseguridade ou cerca?
16)A área de biosseguridade está limpa e organizada?
17)Os silos são mantidos fechados e limpos, sem resíduos de ração por cima e por baixo?
18)Os animais recebem alimento diretamente no piso?
19)Existe desperdício de ração que permite ingestão de ração com fezes?
20)Existe a prática de superlotação na criação dos suínos, considerando as diferentes categorias animais?
21)Existe maravalha em uso para manejar os animais além da composteira?
22)A limpeza das baias permite que os animais fiquem em contato com dejetos uma grande parte do dia?
23)A granja possui banheiro e escritório?
24)Observa-se a ausência de animais domésticos na propriedade?
25)Animais domésticos tem acesso às instalações?
26)Existe acesso de pessoas não autorizadas nas pocilgas?
27)As pessoas responsáveis pela suinocultura atendem outra atividade com animais ou os mesmos tem acesso às instalações?
28)A água dos animais é proveniente de fonte protegida?
29)As caixas d'água internas da granja estão limpas e protegidas?
30)Produtor realiza limpeza da caixa d'água e tubulações com dicloro?
31)Os níveis de cloro estão com um mínimo de 2,0 ppm no final da linha do bebedouro?
32)O controle de insetos (baratas, moscas e larvas) está sendo realizado?

33)O controle de roedores está sendo realizado de maneira efetiva?
34)Há porta iscas nas laterais das pocilgas, a cada 25 m, para controle de roedores?
35)Os arredores das instalações estão roçados e sem entulhos?
36)Os procedimentos de limpeza, desinfecção e vazios sanitários são realizados conforme padrão?
37)Existem baias de enfermagem adequadas (fonte de calor, comedouros e bebedouros extras)?
38)Os animais com sinais de doença estão marcados e em processo de tratamento tendo o mesmo sido registrado?
39)Seringas e agulhas em uso para medicação estão em condições físicas e de higiene adequadas?
40)Os animais mortos são preparados no local da composteira?
41)Tem porco de subsistência na propriedade?