

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO DO CURSO DE
MEDICINA VETERINÁRIA, REALIZADO JUNTO À EMBRAPA SUÍNOS E AVES
EM CONCÓRDIA – SC.**

Assunto de Interesse: Influenza Suína: estratégias para controle envolvendo
biosseguridade, vacinação e manejo.

Discente: Isabela de Andrade

JABOTICABAL – SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO DO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA, REALIZADO JUNTO À
EMBRAPA SUÍNOS E AVES EM CONCÓRDIA – SC.**

Assunto de Interesse: Influenza Suína: estratégias para controle
envolvendo biossegurança, vacinação e manejo.

Discente: Isabela de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira

Relatório do Estágio Curricular em Prática Veterinária
apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP, para
graduação em Medicina Veterinária.

JABOTICABAL – SP

2º SEMESTRE DE 2024

D282r de Andrade, Isabela

Relatório final do estágio curricular obrigatório do curso de Medicina Veterinária, realizado junto à EMBRAPA Suínos e Aves em Concórdia – SC. : Assunto de Interesse: Influenza Suína: estratégias para controle envolvendo biossegurança, vacinação e manejo. / Isabela de Andrade. -- Jaboticabal, 2024

79 p. : fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira

1. Suínos. 2. Influenza Suína. 3. Sanidade animal. 4. Diagnóstico veterinário. 5. Pesquisa veterinária. I. Título.

ISABELA DE ANDRADE

**RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO DO CURSO DE
MEDICINA VETERINÁRIA, REALIZADO JUNTO À EMBRAPA SUÍNOS E AVES
EM CONCÓRDIA – SC.**

Assunto de Interesse: Influenza Suína: estratégias para controle envolvendo biossegurança, vacinação e manejo.

Relatório de Estágio Curricular em Prática Veterinária apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira


Área de Concentração: Saúde Animal

Data da defesa: 09/12/2024


(X) Aprovado

() Reprovado


Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA**
Data: 11/12/2024 10:01:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **KARINA SONALIO**
Data: 10/12/2024 18:04:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

M.V. Dra. Karina Sonálio
Ghent University – Universidade de Gante – Bélgica

Documento assinado digitalmente
 **ANA CLAUDIA CALCHI**
Data: 09/12/2024 16:07:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

M.V. Me. Ana Cláudia Calchi
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **PAOLA CASTRO MORAES**
Data: 11/12/2024 10:47:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a. Dr.^a Paola Castro Moraes
CEGRA

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, de alguma forma, contribuíram ao longo desses anos para a minha formação, em especial à minha família e amigos que sempre acreditaram em mim.

SUMÁRIO

I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. EMBRAPA SUÍNOS E AVES	8
2.1. HISTÓRICO E DESCRIÇÃO	8
2.2 INFRAESTRUTURA E INSTALAÇÕES	9
2.2.1 LABORATÓRIO DE SANIDADE E GENÉTICA ANIMAL, SETOR DE ISOLAMENTO E NECROPSIA.....	9
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	12
3.1 ISOLAMENTO DO VÍRUS DA INFLUENZA SUÍNA	13
3.2 ATIVIDADES DO LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA.....	15
3.2.1 EXPERIMENTO COM <i>Salmonella</i> spp. EM CAMA DE FRANGO.....	16
3.3 CONFECÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS.....	20
3.4 COLORAÇÃO DE LÂMINAS PARA ENSAIO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	24
3.5 HISTOMORFOMETRIA DO INTESTINO DE AVES	26
3.6 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	27
3.6.1 RECEPÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E PESAGEM DOS ANIMAIS.....	27
3.6.2 INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL.....	28
3.6.4 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	29
3.6.5 AFERIÇÃO DE PARÂMETROS E TRATAMENTO DE ANIMAIS.....	30
3.6.6 LIMPEZA DAS INSTALAÇÕES E MANEJO DOS ANIMAIS	31
3.6.7 EUTANÁSIA E DESTINO DOS ANIMAIS.....	31
3.7 NECRÓPSIA	31
3.7.1 NECRÓPSIA DE SUÍNOS	32
3.7.2 NECRÓPSIA DOS SUÍNOS INOCULADOS COM <i>A. suis</i>	35
3.7.3 NECRÓPSIA DE AVES.....	37
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	38
5. REFERÊNCIAS	39
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	40
1. RESUMO	40
2. INTRODUÇÃO.....	41
3. TRANSMISSÃO, PREVALÊNCIA E IMPACTO ECONÔMICO.....	42
4. COMPLEXO DAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DE SUÍNOS.....	45
5. PATOGENIA.....	47
5. DIAGNÓSTICO.....	49

5.1 AMOSTRAGEM E SELEÇÃO DE ANIMAIS	50
5.2 HISTOPATOLOGIA.....	50
5.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	53
5.4 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	53
5.5 ISOLAMENTO VIRAL	55
6. TRATAMENTO	55
7. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE	56
7.1 BIOSSEGURIDADE.....	56
7.1.1 BOAS PRÁTICAS DE PRODUÇÃO E VAZIO SANITÁRIO ENTRE LOTES.....	57
7.1.2 INTRODUÇÃO DE ANIMAIS NO REBANHO.....	58
7.1.3 MISTURA DE LOTES DE DIFERENTES ORIGENS	59
7.1.4 TRANSPORTE DE SUÍNOS.....	59
7.1.5 CONTATO DE SUÍNOS COM OUTROS ANIMAIS.....	60
7.1.6 CONTATO DE PESSOAS GRIPADAS COM SUÍNOS.....	61
7.1.7 LIMPEZA E DESINFECÇÃO DE FÔMITES	61
7.1.8 TRÂNSITO DE PESSOAS E VEÍCULOS NA PROPRIEDADE	62
7.2 O PAPEL DOS ANTICORPOS MATERNO NA PROTEÇÃO.....	62
8. VACINAÇÃO	65
9. CONCLUSÃO	67
10. REFERÊNCIAS	67

I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

1. INTRODUÇÃO

O presente relatório contém as atividades desenvolvidas pela acadêmica Isabela de Andrade durante a realização do estágio curricular junto à EMBRAPA Suínos e Aves, como parte dos requisitos para a conclusão do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP - Campus de Jaboticabal.

O estágio foi realizado de 05 de agosto a 29 de novembro, acompanhando o segundo semestre letivo de 2024, totalizando 600 horas. O trabalho foi realizado sob a orientação do professor Dr. Luis Guilherme de Oliveira e as atividades foram desenvolvidas na unidade da EMBRAPA Suínos e Aves em Concórdia, estado de Santa Catarina, sob a supervisão do médico veterinário Me. Marcos Zanella Mores.

O objetivo do estágio foi aprimorar os conhecimentos teóricos e práticos sobre suinocultura, acompanhando a rotina da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em relação a pesquisas, experimentos e atividades laboratoriais. O estágio possibilitou o contato com profissionais que atuam na área da suinocultura, através do auxílio nas atividades de pesquisa relacionadas à sanidade de suínos, ampliando os conhecimentos obtidos durante a graduação.

2. EMBRAPA SUÍNOS E AVES

2. 1. HISTÓRICO E DESCRIÇÃO

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) é uma empresa pública, vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que foi criada em 1973 para desenvolver a base tecnológica de um modelo de agricultura e pecuária genuinamente tropical. A EMBRAPA é responsável por realizar pesquisas e atuar em busca de inovações científicas, qualidade e eficiência produtiva, além de promover a sustentabilidade na agroindústria brasileira, em um permanente diálogo entre o setor público e privado, incluindo produtores rurais, instituições de ensino e pesquisa, líderes do Estado e da sociedade civil.

A unidade da EMBRAPA localizada em Concórdia, no meio-oeste catarinense, surgiu em 1974 como Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e três anos depois se tornou Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, devido à grande expansão da suinocultura e avicultura nas décadas de 1960 e 1970. Posteriormente, se tornou EMBRAPA - Suínos e Aves. É uma das 43 unidades da EMBRAPA no Brasil e a única no estado de Santa Catarina. A Unidade está localizada em uma importante região para as duas atividades no Brasil, na cidade de Concórdia em Santa Catarina. Essa localização é próxima a produtores, granjas, agroindústrias e todo o setor produtivo. O que acontece neste centro de pesquisa é replicado em todo o Brasil e serve de referência no mundo. As soluções são desenvolvidas para atender pequenos, médios e grandes produtores. Sua missão é viabilizar soluções de pesquisa, desenvolvimento e inovação para a sustentabilidade da suinocultura e avicultura brasileira em benefício da sociedade. É um centro de pesquisa de referência, reconhecido nacional e mundialmente e tendo mais de 5 mil trabalhos publicados.

2.2 INFRAESTRUTURA E INSTALAÇÕES

A EMBRAPA Suínos e Aves possui uma área de 210 hectares, com infraestrutura que conta com um prédio administrativo, unidades de produção e pesquisa, campos experimentais, dois complexos de laboratórios (análises físico-químicas e sanidade e genética animal), isolamento, necrópsia, biotério, incubatórios, fábrica de ração, biblioteca, unidade de produção de aves e ovos SPF (*specific pathogen free*) e unidade de produção de suínos SPF, central de coleta de sêmen suíno, laboratório TEC-DAM (Tecnologias para Destinação de Animais Mortos), estação meteorológica, almoxarifado, refeitório, abatedouro e estruturas de apoio.

Durante a realização do estágio curricular, a grande maioria das atividades foram realizadas junto ao Laboratório de Sanidade e Genética Animal, setor de Isolamento, setor de necrópsia e campo experimental de suínos.

2.2.1 LABORATÓRIO DE SANIDADE E GENÉTICA ANIMAL, SETOR DE ISOLAMENTO E NECROPSIA

O Laboratório de Sanidade e Genética Animal (LSGA) é responsável por realizar atividades de pesquisa com suínos e aves, tendo uma área construída de

1.775m² e sendo considerado um laboratório que atende às normas de biossegurança de nível 2 (NB2), possuindo internamente um laboratório de biossegurança de nível 3 (NB3) construído posteriormente. As instalações do LSGA se iniciam pela recepção, que apresenta a área de controle da entrada e saída de material contaminado e material limpo no interior do laboratório e o livro de registro de visitantes. Na área externa ao laboratório, está presente o refeitório e centro de convivência dos funcionários e colaboradores e o prédio com escritórios dos pesquisadores, analistas e salas de reuniões. Na parte interna, com entrada restrita, estão localizados os vestiários, uma vez que é necessária a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) para realização de atividades dentro das instalações. Entre os EPIs necessários estão: jaleco, calças brancas e sapatos próprios para atividades laboratoriais. De acordo com as atividades desenvolvidas em cada setor, EPIs adicionais são necessários, como luvas, óculos, toucas e máscaras.



Figura 1. Entrada do laboratório LSGA. Fonte: arquivo pessoal.

Após o vestiário, há o acesso para os laboratórios de pesquisas. Estão divididos de forma setorizada e abrangem as áreas de virologia, bacteriologia, histopatologia, reprodução, genética molecular, imunologia e carne cultivada. Além das atividades de pesquisa, os laboratórios fornecem suporte para as granjas internas da EMBRAPA Suínos e Aves, com serviços de diagnóstico e monitoria do rebanho.

No laboratório de patologia, são realizadas atividades referentes à histopatologia, desde o processo de recepção de amostras em formol até a confecção de lâminas histológicas e ensaios de imuno-histoquímica. O laboratório é equipado com microscópios ópticos, capelas de fluxo de ar controlado, refrigeradores e

geladeiras, bancadas de trabalho, micrótomo e outros equipamentos utilizados na confecção de lâminas.



Figura 2. Laboratório de Patologia da EMBRAPA – Suínos e Aves. Fonte: arquivo pessoal.

No laboratório de virologia, há estufas de cultivo celular, fluxos de ar controlado, incubadoras de ovos, bancadas de trabalho, refrigeradores e geladeiras e também local para realização da ovoscopia. No laboratório de bacteriologia, há uma sala própria para o preparo de meios de cultura, estufas para crescimento de microrganismos, bancadas de trabalho, geladeiras e refrigeradores próprios.

Há também salas específicas para as atividades de biologia molecular, como uma sala específica para extração de DNA, uma sala própria para preparo do mix utilizado nos ensaios de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), uma sala própria para os termocicladores e outra sala para eletroforese em gel de agarose.

Em um prédio separado e próximo ao LGSA encontra-se o setor de necrópsia, o setor de isolamento e o laboratório TEC DAM. O laboratório TEC DAM, anexo ao prédio de necrópsia, é o local onde é realizado o tratamento dos animais mortos. Na necrópsia, há um vestiário próprio para paramentação com EPIs necessários para realização dos procedimentos, uma sala para recepção dos animais, um local para realização da insensibilização seguida de sangria dos animais, uma câmara fria e a sala de necrópsia propriamente dita.



Figura 3. Sala de Necrópsia da Embrapa Suínos e Aves. Fonte: arquivo pessoal.

No setor de isolamento, há também um vestiário próprio e recepção. Há salas equipadas com instalações para os animais que serão utilizados nos projetos de pesquisa que envolvam experimentação animal com uso de agentes infectocontagiosos. As instalações para suínos contam com baias de concreto e pisos vazados, com comedouros e bebedouros adequados para animais na fase de creche, que podem ser adaptados para animais maiores na fase de terminação segundo a necessidade de cada experimento.



Figura 4. Imagem de uma baia de suínos no setor de Isolamento da EMBRAPA. Fonte: arquivo pessoal.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o estágio, foram desenvolvidas atividades de experimentação animal e acompanhamento de projetos de pesquisa em desenvolvimento pela EMBRAPA

Suínos e Aves. Como os dados obtidos nos estudos são sigilosos e de propriedade da EMBRAPA, neste relatório serão apenas mencionadas e descritas as atividades de rotina durante os experimentos, sem divulgação de resultados experimentais ou de informações sigilosas.

3.1 ISOLAMENTO DO VÍRUS DA INFLUENZA SUÍNA

Realizado pelo laboratório de virologia, parte do LSGA, o isolamento viral é realizado com o objetivo de monitoramento do Vírus da Influenza Suína nos plantéis do Brasil, para que seja feita a identificação do vírus circulante como ferramenta de diagnóstico e pesquisa, assim como analisar suas características moleculares e genéticas. O isolamento viral é um método muito sensível para a detecção do vírus influenza. Além disso, disponibiliza o isolado viral para outras análises, como o sequenciamento de DNA, ou para a produção de vacinas autógenas. O isolamento é feito com a utilização de amostras de material biológico de suíno, podendo ser utilizado desde secreção nasal até amostras de tecido pulmonar (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 2012). As amostras devem ser de animais com sintomatologia clínica da doença, preferencialmente com elevada temperatura retal, indicando a fase aguda da infecção viral (SCHAEFER et al., 2013). Na EMBRAPA, as amostras utilizadas para o isolamento viral são provenientes de laboratórios de diagnóstico veterinário que fornecem amostras que tiveram resultado positivo para PCR para influenza. A secreção nasal, fluido oral ou pulmão coletadas dos animais são inoculadas em ovos embrionados de galinhas SPF, obtidos da granja produtora de aves SPF da própria EMBRAPA, dos 9 até 11 dias de incubação. A inoculação é feita com a abertura de um pequeno orifício na casca do ovo, logo abaixo da câmara de ar e no lado oposto ao local de implantação do embrião, introduzindo uma agulha para inocular a amostra no interior do ovo embrionado. A partir da inoculação, os ovos são mantidos em estufas pra incubação e avaliados diariamente através da ovoscopia para verificar a viabilidade embrionária após inoculação. Os embriões que acabam se tornando inviáveis no primeiro dia são descartados e os que se tornam inviáveis do segundo e terceiro dia são armazenados para avaliação posterior. Após 4 dias de incubação, o líquido cório-alantóide (LCA) é aspirado com o uso de uma agulha. Após a aspiração do LCA, as amostras obtidas podem passar por novas passagens para replicação em ovos embrionados, sendo recomendado até quatro passagens. Após

as passagens virais, os LCAs coletados são submetidos à reação de hemaglutinação (HA) utilizando-se hemácias de perus. O teste do HA tem como objetivo verificar a presença de antígenos virais, de modo que a presença da suspensão viral acaba aglutinando as hemácias.



Figura 5. Realização de ovoscopia nos ovos embrionados de galinhas SPF para verificar a viabilidade embrionária pós-inoculação da amostra para isolamento viral. Fonte: arquivo pessoal.

Como alternativa ao isolamento viral em ovos embrionados, podem ser utilizadas células da linhagem MDCK (células de rim de cão ou *Madin-Darby Canine kidney cells*), consideradas permissíveis ao vírus da Influenza (SCHAEFER et al., 2011). As amostras são inoculadas em cultura de células suscetíveis (ex., MDCK) e monitoradas quanto ao desenvolvimento de efeito citopático (CPE), que são mudanças nas características morfológicas da célula induzida pela presença do vírus (SCHAEFER et al., 2013). Durante o estágio, foram acompanhadas técnicas de isolamento viral tanto em ovos embrionados quanto em cultivo de células.

As amostras consideradas positivas para o teste de HA são submetidas à extração de DNA, utilizando-se kits comerciais, e posteriores reações de PCR. Os produtos da PCR, após passarem por um processo de purificação, podem ser utilizados para a realização do sequenciamento genético do Vírus da Influenza.

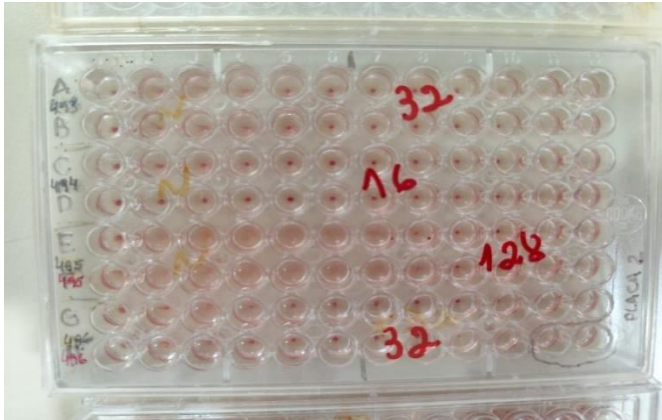


Figura 6. Placa de HA utilizada para verificar a presença de antígenos virais. Na imagem, é possível observar o resultado de titulação de 1/32, 1/16, 1/128 e 1/32 para a presença de antígeno do vírus da influenza. Fonte: arquivo pessoal.

3.2 ATIVIDADES DO LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA

Como parte das atividades do LSGA, foi acompanhada a rotina do laboratório de bacteriologia. O laboratório é dividido entre os patógenos de aves e de suínos. Nas atividades referentes aos patógenos respiratórios de suínos, quando uma amostra era enviada para a bacteriologia e sendo proveniente de lesões pulmonares, era feito o cultivo e tentativa de identificação e isolamento da bactéria envolvida na lesão. A amostra que é encaminhada para a bacteriologia precisa ser enviada e recebida pelo laboratório o mais rápido possível e ser mantida em temperatura de refrigeração (4°C). Após a recepção, a amostra deve ser trabalhada em uma bancada e próxima a chama do bico de Bunsen, sendo feita a avaliação do material enviado quanto a presença de lesões, especialmente nódulos e material fibrinoso. O material passa por um corte no local da lesão e, em seguida, é feito o plaqueamento em ágar sangue pela técnica de *imprint* do tecido (procedimento em que se coloca a área lesionada do tecido em contato com a superfície do ágar) e também por esfregaço de suabe. Caso a suspeita do agente envolvido seja uma bactéria microaerófila (como o *Actinobacillus pleuropneumoniae*) é utilizada uma câmara de microaerófilia para incubação. O crescimento bacteriano é acompanhado e as colônias são classificadas quanto às suas características morfológicas e bioquímicas, sendo muitas vezes necessário fazer a repicagem e o plaqueamento da mesma amostra sucessivas vezes para conseguir um bom crescimento para realizar a identificação.

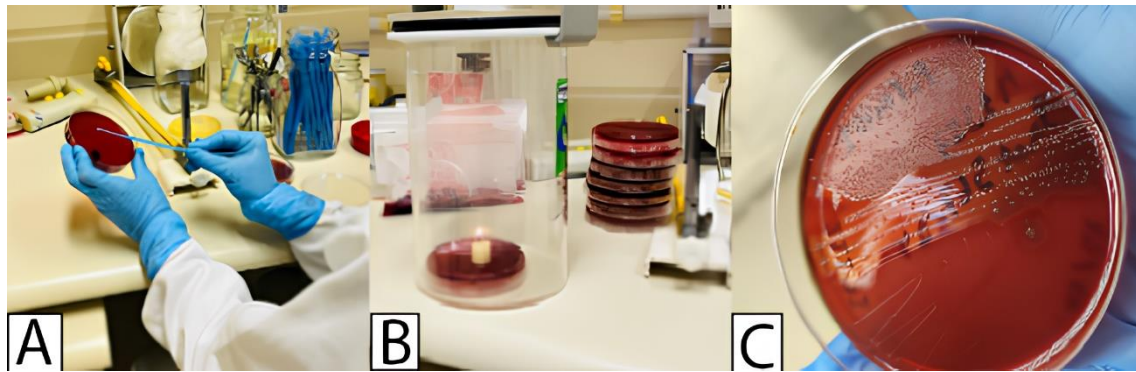


Figura 7. **A.** Após realização da técnica de imprint em ágar, é feito o plaqueamento para obtenção de culturas bacterianas. **B.** Câmaras de microaerófilia com uso de velas para crescimento de microrganismos microaerófilos. **C.** Crescimento bacteriano em ágar sangue após período de incubação em estufa. Fonte: arquivo pessoal.

3.2.1 EXPERIMENTO COM *Salmonella* spp. EM CAMA DE FRANGO

Como parte das atividades do estágio, foi possível acompanhar a realização de um experimento sobre a presença de bacteriófagos e *Salmonella* spp. em camas de aviário. Os bacteriófagos (fagos) são vírus que infectam células bacterianas e estão sendo utilizados como método de controle biológico para *Salmonella* spp. em frangos. Os bacteriófagos são administrados por via oral nas aves e acabam sendo excretados nas fezes, estando presentes na cama e podendo interferir na presença de outros agentes, como a *Salmonella*. O objetivo do experimento foi contabilizar a viabilidade dos fagos e da *Salmonella* spp. na cama aviária com o passar dos dias do vazio sanitário, pois com a prática comum de reutilização das camas em lotes posteriores, havia chance de contaminação do próximo lote com a *Salmonella* sp. e com o fago. O objetivo do experimento era quantificar e avaliar se persistência do fago na cama de frango pode reduzir a quantidade de *Salmonella* sp. presente e que entrará em contato com o próximo lote através da cama.

As camas utilizadas no experimento foram recebidas de um aviário comercial e eram camas de segunda passagem. A duração do experimento planejava avaliar e quantificar o fago e a *Salmonella* sp. nas camas por 12 dias, que é a duração do intervalo entre lotes em um aviário comercial. A cama utilizada foi previamente testada quanto a presença prévia de *Salmonella* sp. e fago antes do início do experimento e teve resultado negativo para a presença dos agentes. Depois, foram pesadas

amostras de 30 gramas da cama de aviário e separadas em sacos plásticos, formando três grupos experimentais. O grupo S contemplava as 40 amostras de cama que foram inoculadas com 1 mL *Salmonella* sp. (S) e homogeneizadas. O grupo SF contava com 40 amostras que foram inoculadas com 1 mL de *Salmonella* sp. e adicionados 1 mL de fagos e homogeneizadas. O grupo F contava com 40 amostras que foram inoculadas somente com 1 mL de fagos (F). O grupo S teve as amostras numeradas de S1 até S10. O grupo F teve as amostras numeradas de F1 a F10 e o grupo SF foi numerado de SF1 a SF10. Essas amostras foram então separadas em copos descartáveis de isopor com tampas para armazenamento e avaliadas nos dias 0, 4, 8 e 12, sendo 10 amostras de cada grupo avaliadas de forma qualitativa e quantitativa para a presença de bacterifagos e *Salmonella* spp. nos respectivos dias.

Para a avaliação quantitativa de cada amostra, foram pesadas 10g da cama e separadas em recipientes de vidro, sendo adicionado PBS (solução salina tamponada com fosfato, ou *Phosphate-Buffered Saline*) em seguida. Os vidros foram colocados em um agitador por 10 minutos para homogeneização. Dessa homogeneização, foram coletadas uma quantidade de cada amostra e diluídas em micro tubos com PBS até a diluição 10^{-3} , e então foi feito o plaqueamento dessas diluições (do -1 ao -3) em ágar Verde Brilhante (VB). Para o plaqueamento, foi utilizado um suabe umedecido com PBS para espalhar o conteúdo por toda a placa, sendo colocado na estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi feita a contagem de unidades formadoras de colônia na placa para a avaliação quantitativa de *Salmonella*.

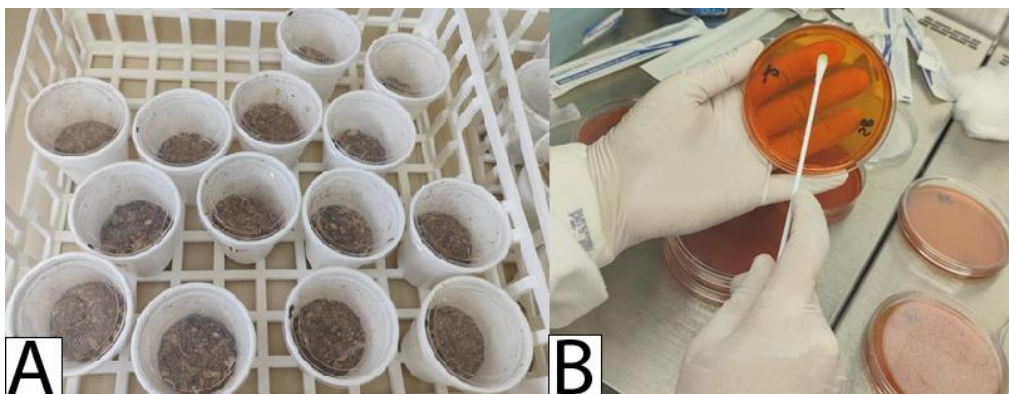


Figura 8. **A.** Amostras de cama de aviário separadas em copos descartáveis e incubadas durante a duração do experimento em temperatura ambiente. **B.** Plaqueamento das diluições das amostras em ágar Verde Brilhante (VB) para avaliação quantitativa de *Salmonella*. Fonte: arquivo pessoal.

Para a amostragem quantitativa de fagos, foram coletadas amostras da cama homogeneizadas com PBS dos grupos S, SF e F e colocadas em microtubos com clorofórmio e agitados, então sendo coletados 0,1 mL do sobrenadante e colocado em meio SM, que é um meio de solução salina tamponada com magnésio que é frequentemente utilizado para armazenar bacteriófagos. Para a análise quantitativa dos fagos foi feita a diluição até 10^{-2} , utilizado um meio ágar com presença de *Salmonella*, para que sejam observadas as formações dos halos dos fagos na placa.

Para a avaliação qualitativa (avaliando somente presença e ausência) foi utilizada aproximadamente 3 gramas de cada amostra em um tubo de ensaio, sendo utilizados dois tubos por amostra. Em um dos tubos era adicionado, junto da cama, 30 mL de caldo peptonado (CPT) e no segundo tubo, junto com a cama, 27,5 mL de caldo nutriente (CN) e 1 mL de cultivo de *Salmonella*. Ambos os tubos eram homogeneizados e armazenados em estufa a 37°C por 24 horas.

Após as 24 horas, foi retirado 1 mL do tubo com CPT e adicionado em meio líquido de tetracionato (TT) e 0,1 mL foi adicionado ao meio líquido Rapport (RT), sendo os dois meios líquidos armazenados na estufa para incubação por 24 horas. Após esse período, foram utilizadas duas placas de ágar divididas ao meio, sendo a primeira placa ágar VB (verde brilhante) e a segunda ágar XL (xilose lisina). Em metade de cada placa, foram feitas as estriações da amostra do meio líquido TT em uma metade da placa e na outra metade do meio líquido RP. Após 24 horas se incubação, foi feita a análise qualitativa de cada amostra para *Salmonella*.

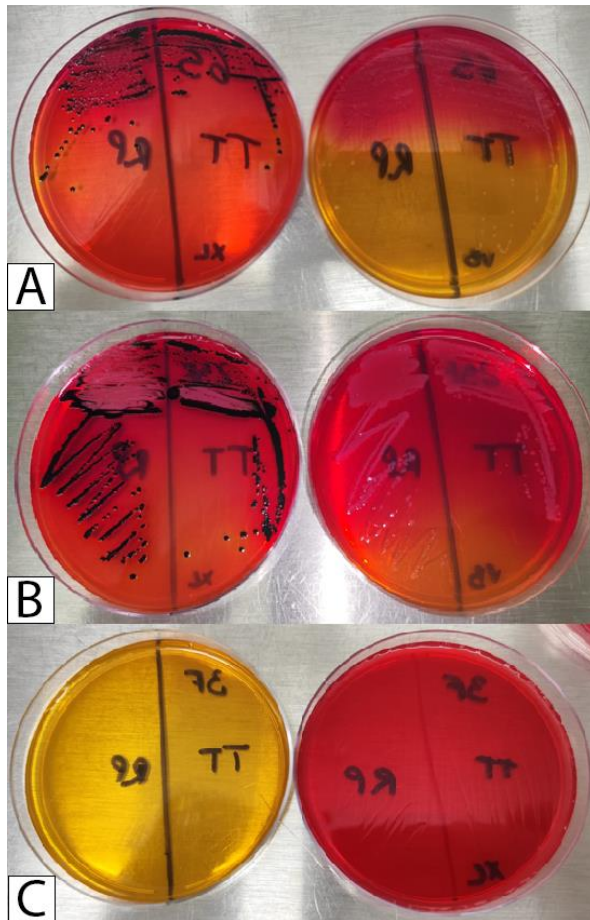


Figura 9. **A.** Grupo S, com duas placas de ágar (VB e XL) divididas ao meio, sendo feitas as estriações da avaliação qualitativa do meio TT em uma metade da placa e RP na outra metade. Nesse grupo, foi observado o crescimento de colônias, confirmando a presença de *Salmonella* sp. e tornando a avaliação qualitativa positiva. **B.** Grupo SF, com duas placas de ágar (VB e XL) divididas ao meio, sendo feitas as estriações da avaliação qualitativa do meio TT em uma metade da placa e RP na outra metade. Nesse grupo, foi observado o crescimento de colônias, confirmando a presença de *Salmonella* sp. e tornando a avaliação qualitativa positiva. **C.** Grupo F, com duas placas de ágar (VB e XL) divididas ao meio, sendo feitas as estriações da avaliação qualitativa do meio TT em uma metade da placa e RP na outra metade. Nesse grupo, não foi observado o crescimento de colônias, tornando a avaliação qualitativa negativa para a presença de *Salmonella* sp. nas amostras. Fonte: arquivo pessoal.

O teste qualitativo do fago foi feito em ágar com adição de uma camada de cultura líquida de *Salmonella* sp. A amostra da cama utilizada havia sido previamente misturada com clorofórmio para causar o rompimento da célula bacteriana e de outros

contaminantes presentes na cama aviária, restando somente os fagos. Uma gota de cada amostra foi colocada na placa, que estava dividida pela quantidade de amostras. Após incubação, a formação de halos indicava a presença dos fagos.

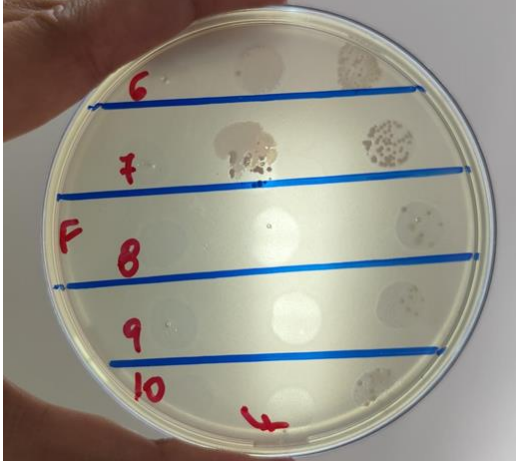


Figura 10. Avaliação qualitativa da presença de bacteriófagos nas amostras do experimento, mostrando a presença de halos na placa de ágar indicando a presença do agente. Fonte: arquivo pessoal.

3.3 CONFECCÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS

A confecção de lâminas histológicas é um procedimento de rotina realizado pelo laboratório de Patologia da EMBRAPA Suínos e Aves. É uma técnica que permite a visualização de lesões e alterações microscópicas e tem um grande valor para a realização de diagnósticos e avaliação de resultados de pesquisa. Antes das lâminas serem confeccionadas, o material deve ser coletado através de técnicas de necrópsia e deve ser previamente mantido em solução de formol tamponado a 10% por, no mínimo, 24 horas para que ocorra a fixação do tecido. O volume de formol utilizado deve ser de pelo menos 10 vezes o volume do material coletado (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

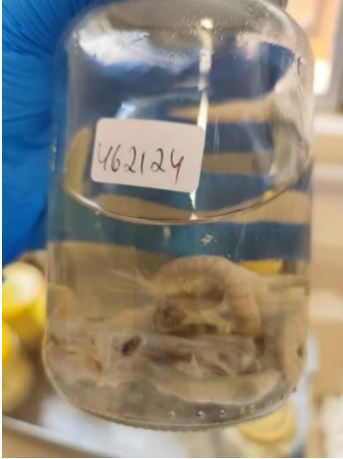


Figura 11. Recepção das amostras acondicionadas em formol tamponado a 10%, com número de identificação do animal. Fonte: arquivo pessoal.

É importante que a amostra seja devidamente identificada com as informações sobre sua origem, identificação do animal, suspeita clínica, lesões macroscópicas observadas na necrópsia e também quais tecidos foram coletados de cada animal. É importante que cada animal tenha suas amostras colocadas em recipiente individuais de formol 10% devidamente separadas e identificadas (RECH et al., 2014).

Após a passagem do tempo correto para a fixação do material, este deve ser encaminhado para a realização da clivagem do material. A clivagem é o corte do material que deve ser feito observando-se as características de cada tecido e quais estruturas devem ser observadas na microscopia, respeitando a espessura de corte de acordo com o processo de inclusão em parafina.



Figura 12. Clivagem (corte) dos tecidos após a o período de fixação de 24 horas em formol tamponado a 10%, para preparo para a inclusão em parafina. Fonte: arquivo pessoal.

A seguir, as amostras passam pelo processo de inclusão em parafina. Este procedimento consiste na impregnação do tecido com uma substância que permita, posteriormente, seccioná-lo em camadas. A parafina é a mais utilizada neste procedimento. Como ela não é miscível em água, a primeira etapa da inclusão compreende a desidratação, quando ocorre a retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool. A diafanização é a etapa seguinte, com a substituição do álcool, agora presente nos tecidos, por xilol. Finalmente, na impregnação, última etapa, o xilol é substituído por parafina fundida a 60°C em pequenos blocos. Neste momento a catalogação do bloco é importante para a posterior identificação da peça (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017, TIMM, 2005). Na EMBRAPA, as etapas descritas acima, desde a desidratação até substituição por parafina fundida a 60°C, são feitas de forma automatizada com o uso de uma máquina processadora de tecidos (Tissue-Tek® VIP®).

Em seguida, o bloco de parafina deve ser mantido em um refrigerador até o momento de ser cortado no micrótomo. O micrótomo é um aparelho que permite o corte dos blocos de parafina em espessuras pré-determinadas, permitindo a formação dos cortes histológicos utilizados na microscopia. O micrótomo é formado por uma lâmina (fixa ou descartável) de aço, afiada, e um braço ao qual se prende o bloco e que se desloca verticalmente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017; TIMM, 2005).

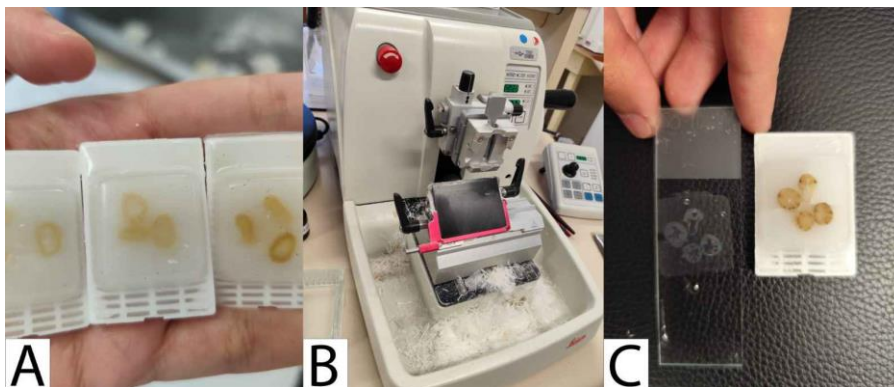


Figura 13. **A.** Blocos de parafina prontos para serem cortados no micrótomo para a confecção de lâminas para histopatologia. **B.** Micrótomo, aparelho utilizado para realizar o corte dos tecidos nos blocos de parafina. **C.** Resultado do corte no micrótomo, com o comparativo do corte obtido na lâmina e o bloco de parafina de origem. Fonte: arquivo pessoal.

Após o corte e confecção das lâminas, estas devem passar por um processo de coloração. Na histologia, há vários corantes que podem ser utilizados e a escolha deve ser feita de acordo com as estruturas que serão avaliadas na microscopia e o tipo de tecido. Normalmente são utilizados corantes hidrossolúveis, sendo necessário a remoção da parafina da peça que foi preparada nas etapas descritas anteriormente e que permanece na lâmina de vidro (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

Os corantes mais utilizados nos procedimentos histológicos são a Hematoxilina e a Eosina (HE). A Hematoxilina é uma base que cora os componentes ácidos das células em um tom azulado escuro, sendo os mais abundantes o DNA e o RNA, de modo que o núcleo e certas partes do citoplasma se tornam azulados. A Eosina é um ácido que cora as estruturas básicas da célula de rosa, como o citoplasma (GARTNER & HIATT, 1999).

Para corar peças incluídas em parafina é necessária a retirada da parafina e a hidratação da peça. Este procedimento é realizado a partir de uma sequência de banhos em xilol, álcool e água, inversamente ao procedimento executado na etapa de inclusão. Durante o estágio, as lâminas foram colocadas em dois banhos de xilol com duração de 10 minutos cada, seguido de banhos com duração de 10 minutos no álcool 100% e 96% e 5 minutos no álcool 80% e 70%, antes de prosseguir com a coloração por Hematoxilina e Eosina. Após o término do processo de coloração, as lâminas são colocadas para secagem e colocação das lamínulas, estando então prontas para avaliação no microscópio óptico.



Figura 14. Preparo para coloração de lâminas, com a sequência de submersão em xilol, álcool 100%, álcool 96%, álcool 80%, álcool 70%, água destilada, hematoxilina, bicarbonato, eosina e banhos de álcool 70%, 80%, 90% e 100%. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 15. Lâminas no final do processo de coloração por Hematoxilina-Eosina, na etapa de secagem antes da colocação das lamínulas. Fonte: arquivo pessoal.

A avaliação das lâminas de histologia no microscópio óptico faz parte da rotina do laboratório da patologia da EMBRAPA, sendo realizada em todas as amostras recebidas. É importante realizar a leitura de lâminas de acordo com a suspeita clínica e histórico do animal, observando a compatibilidade das lesões microscópicas com os achados de necrópsia.

3.4 COLORAÇÃO DE LÂMINAS PARA ENSAIO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

O termo Imuno-histoquímica (IHQ) é associado a metodologias que usam imuno-ensaios para co-localizar um epítipo de interesse em cortes de tecido. Após o tecido ter passado pela inclusão em parafina e seccionado em lâminas, é possível co-localizar os antígenos nos componentes histológicos e celulares, mantendo a arquitetura original do tecido circundante. Os anticorpos são utilizados como reagentes específicos capazes de identificar e estabelecer ligação com constituintes teciduais, de modo que seja possível identificar a presença de variadas substâncias, como patógenos, nas células e tecidos por intermédio da cor que é associada aos complexos antígeno-anticorpo formados (FERRO, 2014).

Uma condição importante para os ensaios de imuno-histoquímica é a marcação específica pelo anticorpo primário, isto é, o anticorpo deverá apenas ligar-se ao antígeno pretendido (marcação específica) e não a outros elementos estranhos (marcação inespecífica). O que se pretende obter é uma marcação específica do antígeno com ausência de marcação inespecífica de fundo (FERRO, 2014).

Durante o período de estágio, foram realizados ensaios de imuno-histoquímica para diversos agentes infecciosos na rotina do laboratório de patologia. Entre os

agentes avaliados , destaca-se a *Salmonella* spp., vírus da Influenza, *Circovirus* e *Brachyspira* spp. A seguir, será descrito um exemplo da técnica de IHQ para *Salmonella* spp. realizada pelo laboratório. Trabalhando na câmara de exaustão, as lâminas separadas para o ensaio de IHQ devem ser identificadas e colocadas em suportes plásticos. Junto com as lâminas a serem investigadas, deve-se preparar também uma lâmina com controle positivo e negativo para a validação da IHQ. As lâminas devem ser mergulhadas em xilol por 10 minutos, seguido de mergulhos em álcool absoluto, álcool 96%, álcool 80% e álcool 70% por 5 minutos cada, sendo submergidos em água destilada em seguida. Depois, acontece a submersão das lâminas em PBS com Tween 20 por 5 minutos, seguindo para submersão em tampão citrato em uma cuba plástica e levados ao micro-ondas por 5 minutos, na potência de 700W, juntamente com outra cuba de água para manter a umidade. Depois de retirar a cuba e completar o tampão citrato evaporado, as lâminas retornam ao micro-ondas por mais 5 minutos e, após o término, devem repousar com o tampão citrato por 20 minutos.

A seguir, as lâminas são submergidas em PBS de Tween 20 por 5 minutos, depois são secas com lenço de papel ao redor do tecido e é utilizada uma caneta bloqueadora de líquidos para delimitar o contorno do tecido. Então, é feito um processo de submersão em PBS de Tween 20 por 5 minutos, em peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos, em água destilada por 1 minuto e em PBS de Tween 20 por 5 minutos. A seguir, o tecido é coberto pelo anticorpo policlonal, produzido em coelho, anti *Salmonella* sp. (em diluição 1:1000) e é incubado em câmara úmida na estufa a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Após isso, as lâminas são lavadas com auxílio de uma pisseta com PBS para retirar o excesso de anticorpo e os tecidos são cobertos pelo Polímero EnVision+ Dual Link Systems – HRP e incubado em câmara úmida na estufa a 37°C por 30 minutos. Depois, é feita a lavagem do tecido para retirar o excesso do polímero com PBS de Tween 20.

O último processo é a revelação, que existem duas opções: pela solução reveladora AEC (amino-etilcarbazol) e DAB (diaminobenzidina tetrahidrocloro). A coloração do antígeno se torna marrom caso a solução reveladora utilizada seja a DAB e se torna vermelha se a solução reveladora utilizada por a AEC. A escolha da solução reveladora depende da preferência do patologista para realização da leitura dos resultados. A seguir, as lâminas estão prontas para leitura no microscópio óptico,

sendo necessário iniciar a leitura pelas lâminas do controle negativo e positivo e observar as marcações indicando a presença do antígeno no controle positivo, com as características morfológicas e histológicas esperadas para cada agente investigado e sem a presença de marcações no controle negativo ou de marcações inespecíficas.

3.5 HISTOMORFOMETRIA DO INTESTINO DE AVES

Como parte de um experimento envolvendo experimentação animal, foram avaliados os efeitos de diferentes dietas e uso de probióticos em frangos de corte. Os animais foram necropsiados ao final do experimento e, de cada animal, foi confeccionada uma lâmina de histologia com cortes de três segmentos do intestino delgado corados com hematoxilina-eosina. Cada lâmina passou então por análises morfométricas realizadas em analisador de imagem AxioVision® no setor de patologia da EMBRAPA Suínos e Aves. Foram selecionados e medidos os comprimentos em linha reta, de acordo com a unidade adotada (μm), de 10 vilosidades e 10 criptas, por animal. As medidas da altura de vilosidades foram tomadas a partir da base da cripta até o ápice da vilosidade e as criptas foram medidas da base inferior até a base superior da cripta. Os dados obtidos foram separados em planilhas para futura avaliação estatística.

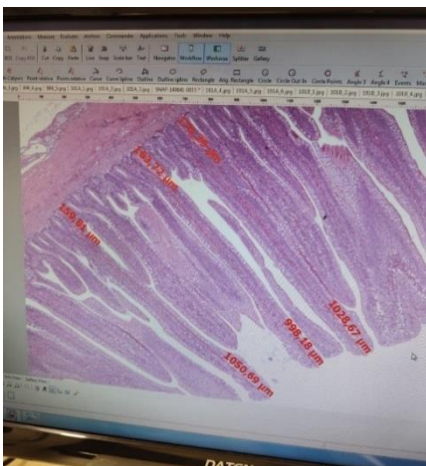


Figura 16. Processo de avaliação histomorfométrica do intestino de frangos de corte pelo software AxioVision®. Fonte: arquivo pessoal.

3.6 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Durante o estágio, foram realizadas atividades relacionadas ao manejo e utilização de suínos e aves em pesquisa. Devido à confidencialidade dos experimentos, neste relatório serão descritas somente as atividades de rotina durante a experimentação, sem detalhes sobre os estudos realizados ou divulgação de resultados. Todos os experimentos realizados na EMBRAPA necessitam de aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) para sua realização.

Durante o estágio, foram acompanhados três experimentos com o uso de animais. O primeiro experimento, que foi realizado em frangos de corte, tinha como objetivo avaliar as diferenças no uso de dietas e probióticos distintos relacionado com a infecção dos animais com *Clostridium* sp. O segundo experimento, com suínos na fase de creche, tinha como objetivo avaliar diferentes tratamentos para diarreia causada por *Escherichia coli*. O terceiro experimento, por fim, tinha como objetivo avaliar a capacidade da bactéria *Actinobacillus suis* de causar lesões pulmonares.

3.6.1 RECEPÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E PESAGEM DOS ANIMAIS

Os suínos utilizados para o experimento foram alojados nas instalações do setor de Isolamento, prédio anexo ao LSGA. As salas para recepção dos animais foram previamente limpas e desinfetadas e tiveram suas baias ajustadas para os animais, com regulagem dos comedouros e bebedouros de acordo com a idade dos leitões. Também foi verificada a vazão de água de cada baia, a temperatura e ventilação da sala. Os suínos foram transportados da granja interna da EMBRAPA para o setor de isolamento e foram recebidos no dia do desmame, aos 28 dias. Na chegada ao setor de Isolamento, os animais foram identificados pela moosa (marcação australiana), pesados em uma balança convencional e alocados em suas respectivas baias. No total, o experimento realizado utilizou 88 suínos, alojados em 11 baias com 8 animais em cada.

As baias do setor de isolamento também podem receber animais na fase de terminação, como aconteceu posteriormente. Em outro experimento realizado, os suínos recebidos eram animais SPF oriundos da granja interna de suínos SPF da EMBRAPA e foram devidamente identificados e pesados antes de serem alocados

nas baias para a realização do experimento. Os animais pesavam aproximadamente 100 kg e foram divididos em grupos de 3 animais por baia e um animal selecionado para ser o controle foi alojado em uma sala separada, totalizando 7 animais.

Além da experimentação com suínos, também aconteceu o acompanhamento de um experimento com frangos de corte. Os animais estavam alojados no aviário experimental da EMBRAPA e o experimento avaliou o uso de probióticos em diferentes concentrações, no qual os animais foram alojados em grupos, desafiados por via oral por um patógeno (*Clostridium* sp.) e monitorados quanto ao peso e condição clínica.

3.6.2 INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL

Como parte do experimento, após serem identificados e separados em grupos, os 88 suínos foram desafiados com uma cepa de *E. coli*, em uma solução por via oral. A inoculação foi feita individualmente, utilizando um aplicador. Os grupos identificados como controle foram inoculados com o mesmo volume por via oral, porém de solução salina.

No outro estudo realizado, com os suínos SPF, foi feita a inoculação de duas cepas (A e B) de *Actinobacillus suis*, que foram isoladas a partir de amostras coletadas de lesões pulmonares em frigoríficos. O estudo foi realizado para investigar a capacidade do *A. suis* de causar lesões respiratórias, pois o agente está sendo frequentemente isolado de amostras de frigoríficos e pouco se sabe sobre sua patogenicidade, por ser uma bactéria pouco relatada. A inoculação foi feita por via nasal, com uso de um gotejador, sendo utilizado o volume de 2 mL do inóculo. Como eram suínos na fase de terminação e de difícil contenção, os animais passaram por uma sedação por via intramuscular para a realização do procedimento. O animal pertencente ao grupo controle recebeu o mesmo volume de solução de salina, por via nasal.



Figura 17. Suíno sendo desafiado com *A. suis* por via nasal, com uso de um gotejador.
Fonte: arquivo pessoal.

No estudo realizado com frangos de corte, os animais receberam uma inoculação por via oral de *Clostridium* sp. através de uma pipeta de plástico e um aplicador. A inoculação do microrganismo foi feita aos 13, 14 e 15 dias de idade dos animais, acompanhada da pesagem dos mesmos em grupos.

3.6.4 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Como parte do acompanhamento do experimento, os 88 animais inoculados com *E. coli* por via oral tiveram as amostras de sangue e fezes coletadas uma semana antes da inoculação, no dia da inoculação e nos dias 7, 14, 21 e 35 após a inoculação. Cada animal foi contido individualmente, identificado pela mocha e pesado. Foi utilizado um cavalete de madeira para a contenção dos animais durante a coleta de. O sangue foi coletado com o suíno na posição horizontal e com a cabeça posicionada para baixo, através de punção na veia jugular, e a seringa foi deixada em temperatura ambiente, sendo rapidamente levada ao laboratório para centrifugação após o término da coleta. As fezes foram coletadas da ampola retal, utilizando uma haste de algodão para estimular a liberação das fezes, e a amostra foi armazenada em sacos? Ou outro recipiente? em um botijão de nitrogênio líquido logo após a coleta.



Figura 18. Suíno contido em um cavalete de madeira para a coleta de sangue. A punção foi feita na veia jugular e foram coletados aproximadamente 3 mL de sangue de cada animal, mantidos em temperatura ambiente para posterior centrifugação e obtenção do soro. Fonte: arquivo pessoal.

3.6.5 AFERIÇÃO DE PARÂMETROS E TRATAMENTO DE ANIMAIS

Devido às características do experimento, os animais inoculados com *E. coli* foram avaliados diariamente quanto ao surgimento de sinais clínicos nos dias que sucederam a inoculação. Foi avaliada a presença de diarreia nas baias em que os animais estavam alojados, a condição corporal dos animais, ingestão de água e ração de cada baia e sinais de apatia dos animais. A consistência das fezes foi avaliada nos dias em que foram feitas as coletas de amostras de fezes. Os animais também foram monitorados, por 5 dias após a inoculação, quanto à temperatura retal, que foi aferida individualmente de cada leitão.

Alguns animais apresentaram complicações do quadro clínico, com emagrecimento progressivo e apatia. Estes animais foram medicados seguindo o tratamento indicado pela literatura, com aplicação parenteral de antibiótico e anti-inflamatório. Caso algum animal estivesse em situação de sofrimento, seria feito o protocolo de ponto final humanitário (eutanásia) e o animal seria necropsiado, com coleta de amostras para avaliações laboratoriais.

No experimento realizado com a inoculação de *A. suis*, os animais foram monitorados por sete dias após a inoculação (7 dpi), para acompanhamento da

sintomatologia clínica respiratória e aferição da temperatura retal foi feita durante 4 dpi. Para avaliação da sintomatologia respiratória, os animais eram avaliados quanto ao padrão da respiração, presença de tosse e/ou espirros, dispneia e presença de secreção nasal. Durante o experimento, um dos animais inoculados com a cepa B de *A. suis* apresentou um quadro respiratório com sinais de severa dispneia, apatia e tosse. Devido à intensificação dos sinais clínicos, um animal do experimento foi eutanasiado e necropsiado com aproximadamente 24 horas pós-infecção para coleta de amostras. Com relação à temperatura retal, os animais inoculados com a cepa A e B apresentaram elevação da temperatura retal nos 2 dpi, atingindo a temperatura máxima de 40,7 °C. Nos dias 3 e 4 pós-inoculação, a temperatura retal apresentou diminuição e retornou aos parâmetros normais (39°C).

3.6.6 LIMPEZA DAS INSTALAÇÕES E MANEJO DOS ANIMAIS

Durante a realização dos experimentos, os animais receberam ração e água em quantidades monitoradas, mas de acordo com suas necessidades. Os animais foram avaliados diariamente quanto a condição clínica, ingestão de alimento e água. As baias foram limpas diariamente com o uso de um raspador e as oscilações de temperatura na sala foram monitoradas.

3.6.7 EUTANÁSIA E DESTINO DOS ANIMAIS

Com o final do experimento, todos os animais foram eutanasiados. O processo de eutanásia utilizado foi a insensibilização por eletrocussão seguida da sangria dos animais. Após a sangria, os animais foram levados para a mesa de necrópsia e as amostras coletadas para posterior avaliação foram armazenadas em formol tamponado a 10% para posterior processamento, além de todas as alterações macroscópicas encontradas durante a necropsia terem sido registradas.

3.7 NECRÓPSIA

Durante o estágio na EMBRAPA, foi realizado o acompanhamento de vários procedimentos de necrópsia durante a rotina do setor de patologia. As necrópsias

faziam parte da avaliação dos animais utilizados nos experimentos e também como parte do monitoramento dos animais da granja interna da EMBRAPA.

Antes do início da necrópsia, é importante que todo o material necessário para a coleta de amostras esteja devidamente separado. As avaliações macroscópicas realizadas durante a necrópsia dificilmente são suficientes para chegar a um diagnóstico, sendo necessárias futuras análises laboratoriais das amostras coletadas no momento da necrópsia. O procedimento de necrópsia deve ser feito em um local adequado e o médico veterinário deve utilizar equipamentos de proteção durante a realização do procedimento. Entre os equipamentos estão botas de borracha, luvas de procedimento descartáveis, máscara descartável cobrindo boca e nariz e roupa de proteção.

Durante o procedimento de necrópsia, é importante anotar todas as alterações encontradas e fotografar o que for mais relevante, para que essa informação possa ser adicionada à ficha do animal. Os materiais para a coleta de amostras devem ser separados e identificados de acordo com o animal necropsiado, podendo ser utilizados frascos de formol tamponado a 10%, sacos plásticos com fechamento Ziploc, seringas e agulhas estéreis, swabs de algodão e tubos Falcon.

O local da necrópsia deve ser um local de fácil limpeza e desinfecção, longe do acesso de animais e da circulação de pessoas. Na EMBRAPA, existe uma instalação própria para a realização das necrópsias, que possui o piso de fácil limpeza, mesas de alumínio de fácil higienização e câmara fria para armazenamento de carcaças. Após todos os procedimentos de necrópsia, a sala passa por um processo de limpeza e higienização com o uso de água e desinfetantes.

3.7.1 NECRÓPSIA DE SUÍNOS

O primeiro passo para a realização de uma necrópsia é estabelecer uma ordem de avaliação dos sistemas, de modo que nenhum órgão fique sem ser avaliado. A ordem deve ser memorizada pelo médico veterinário e deve ser seguida de maneira sistemática toda vez que um animal for necropsiado. É importante obter informações sobre o quadro clínico e histórico do animal, idade e suspeita do que pode ter acontecido de acordo com o histórico da granja.

Primeiro deve ser feita uma avaliação externa da carcaça antes de realizar sua abertura. Deve ser observada a presença de fraturas, sangue, mordidas, picadas, marcas de brigas ou alterações na pele. Também deve ser observada a condição corporal do animal, sinais de desidratação ou lesões. É importante avaliar as mucosas e orifícios externos quanto à coloração, presença de secreções e hemorragia.

Na abertura da carcaça, é feito o rebatimento dos membros torácicos e pélvicos. No membro pélvico, é importante seccionar a cápsula e o ligamento da articulação coxofemoral. No momento da secção, deve-se avaliar o aspecto do líquido sinovial. Em seguida, a pele deve ser abatida com uma secção longitudinal da linha média do tórax até o abdômen ventral. Os linfonodos inguinais devem ser avaliados quando a pele for rebatida.

A seguir, a cavidade abdominal deve ser aberta e as vísceras expostas. Deve-se tomar cuidado para não perfurar os intestinos e avaliar quanto à presença de líquido ou aderências na cavidade. Quanto ao tórax, deve-se fazer uma incisão no diafragma e avaliar a presença de pressão negativa, depois deve ser feita remoção das costelas e verificação se há aderências, líquido ou fibrina na pleura e no saco pericárdico.

A avaliação dos órgãos deve ser feita em blocos. Ainda sem retirar da carcaça, cada órgão deve ser avaliado quanto à sua posição anatômica, tamanho e coloração. Os órgãos da cavidade torácica (pulmão, coração, traqueia e esôfago) costumam ser removidos em conjunto, enquanto que o fígado, o baço e os rins são removidos separadamente. O estômago é removido em conjunto com os intestinos delgado e grosso e o pâncreas. Para as fêmeas, é importante fazer a avaliação do útero e ovários em conjunto com a bexiga.

É importante tomar cuidado com a contaminação de amostras durante a coleta. Se as amostras forem destinadas ao diagnóstico microbiológico, devem ser coletadas de maneira estéril, colocadas em sacos plásticos com lacre Ziploc e mantidas em refrigeração até o momento do processamento. Caso as amostras sejam destinadas ao diagnóstico histopatológico, devem ser mantidas em formol tamponado a 10% por pelo menos 24 horas para fixação. A identificação e envase das amostras é crucial para um bom diagnóstico e deve ser sempre acompanhado da ficha de necropsia com as lesões macroscópicas, histórico e suspeita clínica.

Outra técnica de necrópsia comumente utilizada pelos veterinários durante o período de estágio foi uma técnica que realiza o rebatimento dos membros pélvicos e torácicos seguida de abertura da cavidade torácica simultaneamente com a cavidade abdominal, após a realização de um corte nos músculos e região da cartilagem do manúbrio e segmentação das costelas, seguindo para o abatimento da musculatura e pele do abdômen e realizando a abertura total da carcaça antes de realizar a avaliação dos órgãos.

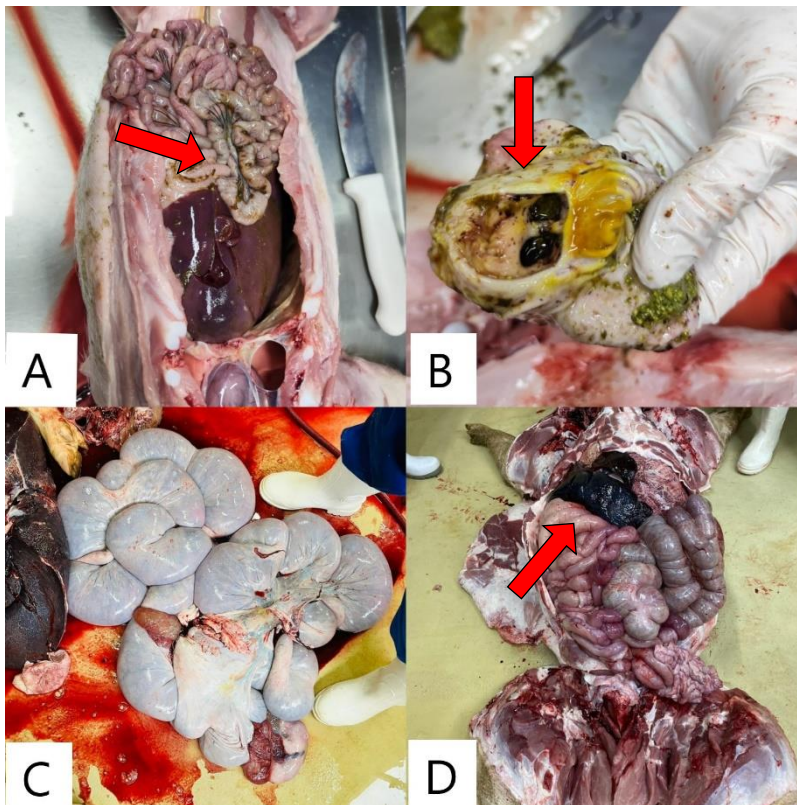


Figura 19. Imagens de necrópsias realizadas durante o período de estágio. **A.** Abertura da cavidade abdominal de um leitão na fase de creche, com presença de extravasamento de conteúdo gastrointestinal. **B.** Úlcera gástrica encontrada em leitão, na fase de creche, com perfuração do estômago e extravasamento de conteúdo. **C.** Necrópsia de uma matriz, com exposição do útero para retirada dos fetos e avaliação. **D.** Necrópsia de uma matriz, com grande distensão abdominal. Foi encontrado grande aumento de volume na região de estômago e baço e, após avaliação, foi constatada a causa da morte por torção gastro-esplênica. Fonte: arquivo pessoal.

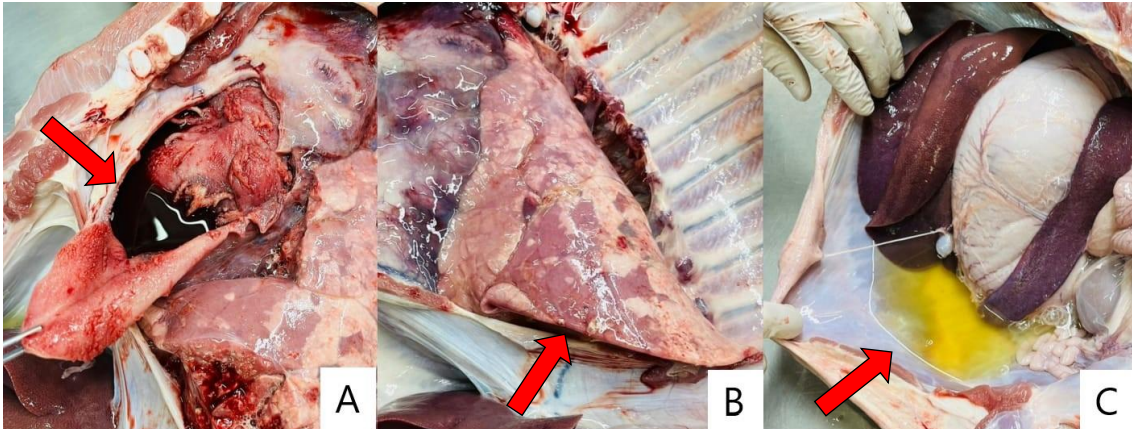


Figura 20. Achados macroscópico de uma necrópsia realizada em um suíno na fase de terminação. **A.** Hemopericárdio (acúmulo de sangue dentro do pericárdio) e pericardite. **B.** Áreas vermelhas e firmes de consolidação pulmonar, com aspecto de “tabuleiro de xadrez” e presença de fragmentos de fibrina. **C.** Acúmulo de líquido livre na cavidade abdominal (ascite). Fonte: arquivo pessoal. A suspeita foi uma infecção pelo vírus da Influenza, seguida de uma infecção bacteriana secundária que evoluiu para uma pericardite, porém apenas pelos achados de necrópsia não é possível concluir o diagnóstico, sendo necessário uma investigação laboratorial completa.

3.7.2 NECRÓPSIA DOS SUÍNOS INOCULADOS COM *A. suis*

Após o término dos 7 dias de acompanhamento dos animais inoculados experimentalmente com *A. suis*, foi realizada a eutanásia dos mesmos utilizando eletrocussão seguida da sangria. Depois, as carcaças foram avaliadas quanto às lesões respiratórias e acometimento dos demais órgãos.

De maneira geral, a infecção ficou restrita ao trato respiratório, com lesões restritas ao pulmão e a pleura e, majoritariamente, acometendo o lado direito do pulmão. Não foram encontradas alterações nos demais órgãos e as lesões assemelharam-se com as lesões causadas por *A. pleuropneumoniae*, com característica nodulares e aspecto necrótico-hemorrágico. A seguir, estão apresentadas fotos exemplificando os achados de necrópsia.

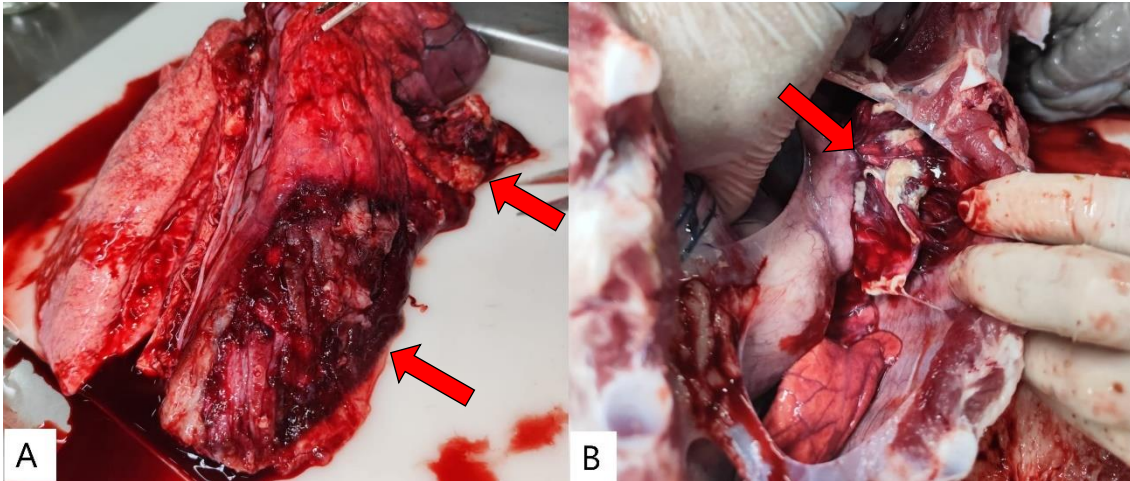


Figura 21. Achados de necrópsia de suíno inoculado com cepa A de *A. suis*. **A.** Com a inspeção do pulmão, foram encontrados nódulos com conteúdo purulento nos lobos cardíaco e apical direito, com extensa área de lesão necrótico-hemorrágica no lobo diafragmático. **B.** Apresentou, também, aderências e conteúdo amarelo/esbranquiçado (fibrina) na cavidade torácica. Fonte: arquivo pessoal.

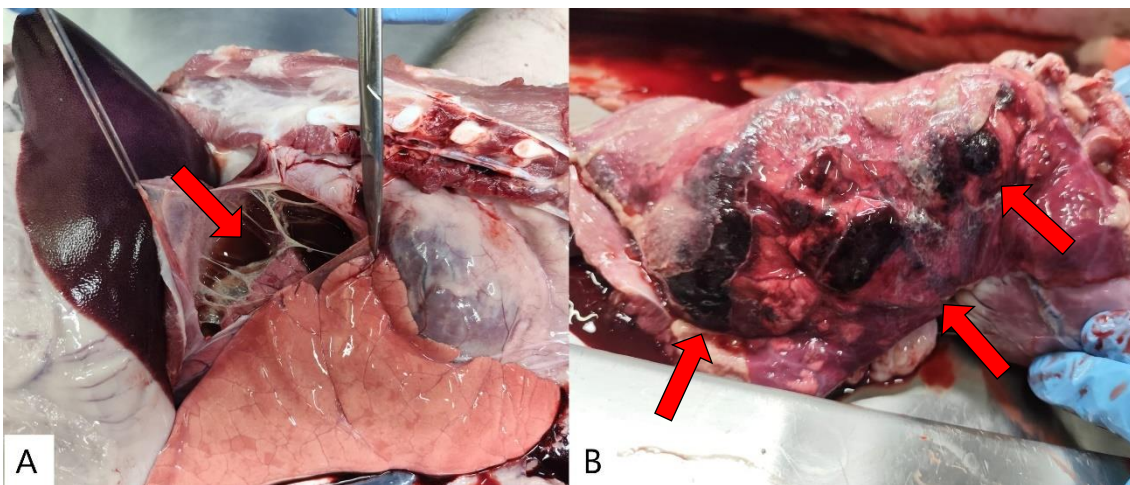


Figura 22. Achados de necrópsia de suíno inoculado com cepa B de *A. suis*, que apresentou sinais clínicos de dispnéia severa e tosse 24 horas pós inoculação. **A.** Havia a presença de líquido no pericárdio e na pleura, com presença de fragmentos de fibrina. **B.** A lesão pulmonar encontrada foi uma lesão nodular multifocal, com aspecto necrótico, hemorrágico e firme, localizada nos lobos diafragmático, cardíaco e apical do lado direito. Fonte: arquivo pessoal.

3.7.3 NECRÓPSIA DE AVES

Para o procedimento de necrópsia de aves, os animais eram frangos de corte de 28 dias oriundos do experimento que utilizou probióticos na ração. Com a recepção dos animais, foi feita a pesagem e avaliação individual quanto a alterações externas, seguido do processo de eutanásia por desarticulação cervical. Em seguida, a carcaça foi colocada em submersão na água e feita a avaliação externa, que busca avaliar a presença de lesões e alterações. Inicia-se pela cabeça e avalia as crista e barbelas, olhos, bico e cavidade oral, penas e articulações das asas, jarrete e pés.

Em seguida, inicia-se a abertura da carcaça. Deve-se realizar uma incisão na pele entre as penas e o abdômen, retirando-a em sentido cranial e expondo a musculatura do peito. Com uma tesoura, deve ser feito um corte no pescoço da ave até a mandíbula inferior e prosseguir para a desarticulação da articulação coxofemoral. Os músculos abdominais e costelas devem ser cortados na região da articulação e todo o peitoral deve ser aberto, rebatendo a musculatura para expor os órgãos internos.

Os órgãos internos devem ser avaliados separadamente, iniciando-se pelos sacos aéreos, articulações, esterno, coração e fígado. O trato gastrointestinal é removido da carcaça a partir da moela em conjunto com o proventrículo e intestinos. É importante avaliar o baço, alças duodenais, pâncreas e divertículo de Meckel durante a retirada dos intestinos. A Bursa de Fabricius está mais próxima da cloaca e também deve ser avaliada, por ser um órgão linfoide importante. O experimento realizado tinha o objetivo de coletar amostras do intestino, próximas ao divertículo de Meckel, para a realização da histomorfometria. Os demais órgãos foram somente avaliados rapidamente e alterações encontradas foram anotadas nas fichas de cada animal. O intestino foi totalmente mensurado quanto ao comprimento e peso. Os fragmentos de intestino coletados foram colocados em formol tamponado a 10%.



Figura 23. Achado durante a necropsia dos frangos de corte, dilatação de proventrículo. Fonte: arquivo pessoal.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O período de estágio curricular foi de grande importância para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Tive oportunidade de conhecer diversos profissionais que atuam na área da suinocultura, desde pesquisadores até extensionistas, tendo a oportunidade de aprender sobre os diferentes papéis que um médico veterinário pode desempenhar no setor da suinocultura, como parte fundamental e um elo importante entre a produção e a sanidade animal.

Foi muito importante participar ativamente dos experimentos realizados pela EMBRAPA, conhecer os procedimentos adotados e vivenciar as situações adversas que aparecem quando trabalhamos com experimentação animal. Também tive oportunidade de aprimorar minhas habilidades laboratoriais, conversando com técnicos e pesquisadores que possuem anos de experiência. O ambiente criado durante o estágio na EMBRAPA – Suínos e Aves é bastante acolhedor, permitindo-me sanar dúvidas e discutir casos e situações cotidianas na criação de suínos, além de contar com o apoio e os conselhos dos funcionários, outros estagiários e colaboradores.

Por fim, diante da vivência obtida no estágio curricular, consigo ter uma visão mais ampla do papel do médico veterinário na suinocultura, tanto diretamente atuando nas granjas em contato com produtores e desafios a campo, quanto na equipe

laboratorial. A pesquisa desenvolvida pela EMBRAPA é fundamental para guiar o futuro, trazendo inovações e modernidade à cadeia produtiva, ao mesmo tempo em que avança em direção a um desenvolvimento sustentável e promissor para a suinocultura brasileira. A experiência adquirida durante o estágio complementa minhas vivências anteriores, incluindo outros estágios extracurriculares e aprendizados teóricos durante a graduação, aprimorando meus conhecimentos científicos e auxiliando no desenvolvimento das minhas habilidades profissionais e pessoais como futura médica veterinária.

5. REFERÊNCIAS

CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; ERICKSON, G. A.; HESSE, R. A.; NELSON, E. A.; OLIVEIRA, S. Diagnostic Tests, Test Performance, and Considerations for Interpretation. In: Diseases of Swine. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 75–97, 2012.

EMBRAPA Suínos e Aves - Portal EMBRAPA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves>>. Acesso em: 22 out. 2024.

FERRO, A. B. Imunohistoquímica. [S.l], [s.n], 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/4569/1/Imunohistoquímica.pdf>>. Acesso em: 05 de out. de 2024.

GARTNER, LESLIE P.; HIATT, JAMES L. Tratado de histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. Paulo. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 13. ed, 2018.

RECH, R. R.; DA SILVA, M. C.; SILVA, V. S. Manual de Necropsia de Suídeos. Brasília, Embrapa Suínos e aves, 2014.

SCHAEFER, R.; ZANELLA, J. R. C.; BRENTANO, L.; VINCENT, A. L.; RITTERBUSCH, G. A.; SILVEIRA, S.; CARON, L.; MORES, N. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. Embrapa Swine and Poultry Research Center,. Concórdia; Brazil: v. 31, p. 761–767, 2011.

SCHAEFER, R.; RECH, R. R.; SILVAM M. C.; GAVA, D.; CIACCI-ZANELLA, J. R. [Guidelines for diagnosis of swine influenza.] Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.33, n.1, p.61-73, 2013.

TIMM, L. L. TÉCNICAS ROTINEIRAS DE PREPARAÇÃO E ANÁLISE DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS. Caderno La Salle XI, Canoas, v.2, n° 1, p. 231-239, 2005.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Assunto de Interesse: Influenza Suína: estratégias para controle envolvendo biossegurança, vacinação e manejo.

1. RESUMO

A influenza suína é uma enfermidade causada pelo vírus da Influenza tipo A, descrito pela primeira vez como agente causador de doença respiratória em suínos em 1918. A influenza suína é uma enfermidade endêmica nas granjas comerciais do Brasil e do mundo, sendo considerada um agente primário no Complexo das Doenças Respiratórias de Suínos e que, associada a agentes secundários, agrava o quadro clínico e causa prejuízos econômicos com o aumento da mortalidade e da incidência de lesões ao abate.

O vírus causa uma doença respiratória aguda em suínos, caracterizado por espirros, tosse e anorexia, que resulta em uma alta morbidade e baixa mortalidade de animais, afetando diretamente os custos de produção. Além disso, o vírus da Influenza é uma zoonose e gera preocupação pela sua alta mutabilidade e disseminação, acometendo tanto suínos quanto humanos, sendo o vírus responsável pela pandemia de 2009.

Atualmente, o controle da influenza é um desafio nas granjas ao redor do mundo. Seu correto diagnóstico e monitoramento deve ser realizado visando o controle nas criações comerciais, a fim de reduzir os prejuízos econômicos que acompanham sua presença nas granjas. O controle da influenza atualmente é realizado através da vacinação, práticas de biossegurança e manejo.

O presente estudo busca apresentar uma revisão de literatura a respeito do vírus da influenza em suínos, sua epidemiologia, impacto econômico, importância para a suinocultura mundial e estratégias de controle.

2. INTRODUÇÃO

O agente etiológico da influenza suína é um vírus de RNA fita simples polimórfico envelopado com 80-120nm de diâmetro pertencente à família Orthomyxoviridae (SHAW & PALESE, 2007). Somente o vírus da influenza A (VIA) é capaz de causar doença clínica em suínos e afeta também humanos e outras espécies, sendo este um fator importante para seu papel como zoonose (SCHAEFER et al., 2019). Duas glicoproteínas de superfície principais estão presentes no envelope viral: hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) (GAMBLIN & SKEHEL, 2010). Com base nas propriedades antigênicas da HA e da NA, os vírus da influenza são divididos em 18 subtipos de HA (H1–H18) e 11 subtipos de NA (N1–N11) (GAMBLIN & SKEHEL, 2010; TONG et al., 2013). A glicoproteína HA se liga aos receptores do hospedeiro e facilita a invasão do vírus, permitindo a replicação viral nas células do trato respiratório, que acompanha o surgimento dos sinais clínicos da fase aguda da doença, enquanto que a glicoproteína NA atua como um sítio de ativação enzimática (SCHAEFER et al., 2019; DAVID et al., 2020).

O vírus foi descrito pela primeira vez como causador da influenza em suínos em 1918 (KOEN, 1919), com a pandemia da gripe espanhola. Em 2009, ocorreu a detecção do vírus H1N1 pandêmico e a influenza ganhou maior notoriedade, passando a ser detectado em granjas no Brasil. Antes disso, haviam poucas evidências da circulação do agente nos rebanhos brasileiros (SCHAEFER et al., 2019). Em 2011 foram isolados pela primeira vez em suínos do Brasil VIA dos subtipos H1N2 e H3N2 (BIONDO et al., 2014; SCHAEFER et al., 2015). A pandemia de 2009 levou a uma preocupação crescente sobre a transmissão de viroses suínas para humanos. No entanto, estudos após a pandemia mostraram que são os vírus humanos que são transmitidos para os suínos e resultam em uma transmissão contínua, sendo muito mais frequentes do que a infecção de humanos por vírus de origem suína (NELSON et al., 2014; RAJAO et al., 2019).

Os vírus da influenza aviária se ligam especificamente aos receptores de ácido siálico α -2, 3-galactose, que são abundantes nas células epiteliais da traqueia de aves, enquanto que os vírus da influenza humana têm afinidade com os receptores de ácido siálico α -2, 6-galactose, que são abundantes na traqueia de humanos. No entanto, os suínos possuem os dois receptores de ácido siálico, tanto α -2, 3- quanto α -2, 6-galactose, permitindo que sejam susceptíveis tanto aos vírus de origem humana quanto aviária (ITO et al., 1998). Historicamente, acredita-se que os suínos sejam hospedeiros intermediários ou “recipientes de mistura” do vírus influenza devido à essa suscetibilidade à infecção pelo vírus de influenza tanto de origem humana quanto de origem aviária e acabam se tornando hospedeiros para a emergência de novos vírus através de rearranjos ou trocas de genes (SCHOLTISSEK, 1990; DUCATEZ et al., 2011; SCHAEFER et al., 2015; SCHAEFER et al., 2019; RAJAO et al., 2019).

Devido ao potencial de transmissão dos vírus humanos para os suínos, os trabalhadores de granjas desempenham um papel fundamental na dinâmica da enfermidade, pois estão em contato direto com os animais (RAJAO et al., 2019; LI & ROBERTSON, 2021). Vírus da influenza de origem humana foram relatados circulando em suínos em diversos países da África, Ásia, Europa e América, incluindo o Brasil (NELSON et al., 2014; CAPPUCCIO et al., 2011; GOMAA et al., 2018; NELSON et al., 2015a; SCHAEFER et al., 2015). A transmissão de vírus humanos para os suínos resulta no estabelecimento de várias linhagens virais de origem humana, aumentando a diversidade antigênica do vírus da influenza globalmente (RAJAO et al., 20109).

3. TRANSMISSÃO, PREVALÊNCIA E IMPACTO ECONÔMICO

A suinocultura passou, nas últimas décadas, por um processo de intensificação que tornou o controle de doenças um desafio. O grande aumento no tamanho dos sistemas de produção trouxe paralelamente um aumento na densidade animal em determinadas áreas geográficas, aumentando a pressão de infecção (SOBESTIANSKY, 2002; ZANELLA et al., 2016). O principal método de produção usado pela indústria suína brasileira é a produção integrada, onde várias fazendas são coordenadas e cada uma é responsável por uma etapa da fase de produção (SILVA et al., 2019).

Com relação ao vírus da influenza, houve uma mudança em sua dinâmica, podendo surgir na forma de surtos ou na forma endêmica. Em sistemas de criação não-intensivos, a influenza aparece na forma de surtos, apresentando sinais clínicos em todo rebanho seguido por uma rápida recuperação e desenvolvimento da imunidade de rebanho (OLSEN et al., 2012). Com a mudança para a suinocultura intensiva, as granjas se tornaram infectadas por um período maior, por conta da alta rotatividade e introdução de animais no rebanho, o que caracteriza a forma endêmica (LI & ROBERTSON, 2021; LAGAN et al., 2024).

Como agente endêmico nas granjas (OLSEN, 2000), relatos de múltiplas cepas co-circulando em rebanhos comerciais simultaneamente foram descritos (DIAZ et al., 2017). As matrizes e leitões desmamados são considerados os reservatórios para o vírus (LOEFFEN et al., 2009) e os responsáveis por manter sua forma endêmica (WHITE et al., 2017), que ocorre principalmente após o desmame (21 ou 28 dias de idade), afetando leitões em lotes sucessivos na fase de creche e favorecendo constantes problemas sanitários nas granjas (SCHAEFER et al., 2019; LI & ROBERTSON., 2021).

A imunidade de rebanho em populações altamente densas pode variar devido a diferenças na idade e origem dos animais, exposição prévia ao vírus ou aplicação de vacina e, especialmente, devido à taxa de reposição intensiva, que contribui para uma introdução constante de animais susceptíveis no rebanho (TORREMORELL et al., 2012), que não possuíam proteção prévia contra o vírus da influenza circulante na granja, mantendo uma população susceptível em constantemente renovação (LI & ROBERTSON 2021; LAGAN et al., 2024).

A principal via de transmissão da influenza suína é através do contato direto com secreções oro nasais de animais infectados (VAN REETH et al., 2019). A transmissão por via de aerossóis também se mostrou possível durante surtos da doença em rebanhos, tornando uma fonte de infecção importante e um risco de exposição para os humanos durante os surtos (NEIRA et al., 2016). Além dos aerossóis, os fômites (ferramentas de manejo e vestimentas dos trabalhadores como botas e luvas) têm uma participação importante na disseminação da doença como uma rota indireta (ALLERSON et al., 2013a; VAN REETH et al., 2019).

Outras vias de transmissão são importantes para a introdução do vírus em granjas comerciais: o contato do rebanho com animais selvagens (da SILVA ANDRADE et al., 2022) e a introdução de animais de reposição sem devida realização de quarentena e vacinação (RYT-HANSEN et al., 2022). Além disso, os trabalhadores que têm contato direto com os animais devem ser vacinados anualmente contra influenza (SCHAEFER et al., 2019), a fim de evitar a transmissão do vírus da influenza humana para os suínos e possíveis novos rearranjos virais (RAJAO et al., 2019).

A influenza está associada com alta morbidade e, embora a mortalidade seja considerada baixa (<1%), as consequências econômicas são significativas em granjas comerciais, com queda de desempenho devido ao aumento da conversão alimentar e aos custos de medicamentos antimicrobianos para controlar infecções secundárias (ALVAREZ et al., 2015).

Com distribuição mundial, a prevalência do vírus da influenza nos Estados Unidos foi avaliada por CORZO et al. (2013) que encontrou 90,6% de prevalência nos rebanhos e 4,6% de prevalência individual através de uma detecção por RT-PCR em tempo real. Na Europa, um estudo avaliou os rebanhos da Bélgica, França, Itália e Espanha, encontrando uma prevalência de 90% nas granjas de ciclo completo, com um nível de prevalência individual de 62%. Entre as granjas positivas, 49% estavam infectadas com um subtipo, 38% com dois subtipos e 3,9% com três subtipos virais (KYRIAKIS et al., 2013).

No Brasil, o agente está difundido nos rebanhos comerciais de suínos (MORÉS et al., 2015; SCHAEFER et al., 2011). Com relação à prevalência do vírus da influenza no Brasil, SILVA et al. (2019) encontrou um alto número de matrizes soropositivas para VIA (aproximadamente 64% das porcas amostradas) em granjas comerciais no sul do Brasil. Em todas as granjas avaliadas, os anticorpos para o VIA foram produzidos pela exposição natural ao vírus, uma vez que as porcas não foram vacinadas contra a enfermidade. O subtipo de VIA mais prevalente em porcas foi o H1N1pdm09, e a coinfeção com o vírus H1N2 foi observada em 90,5% dos rebanhos estudados (SILVA et al., 2019).

Em um estudo recente, FERREIRA et al. (2022) amostrou leitões de creche de diferentes granjas do estado de Santa Catarina e, através do ensaio de RT-qPCR com amostras de swab nasal, encontrou uma positividade de 70,3% (297/423). Os leitões

amostrados apresentavam sinais de tosse e hipertermia no momento da coleta de amostras. Após a subtipagem, o subtipo mais prevalente foi o H3N2, seguido pelo H1N1pdm. O subtipo H1N2 foi encontrado somente em ensaios sorológicos (FERREIRA et al., 2022).

O impacto econômico do VIA para os produtores de suínos apresenta uma perda financeira estimada por DONOVAN (2005) e HADEN et al. (2012) de US\$ 10,31 e US\$3,23, respectivamente, por suíno produzido. Além disso, comparando animais com e sem lesões pulmonares ao abate, FERRAZ et al. (2020) estimou uma perda de US\$6,55 por animal com lesões pulmonares ao abate.

Além das perdas relacionadas com condenação de carcaças, a influenza afeta também os parâmetros produtivos dos rebanhos. As granjas positivas e vacinadas para influenza, quando comparadas a granjas negativas, têm maior mortalidade de animais, com redução de 19.4 toneladas de carne produzida por ano, além do maior consumo de ração, fazendo com que os animais fiquem uma semana a mais em cada estágio de produção (DÍAZ et al., 2020).

4. COMPLEXO DAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DE SUÍNOS

A incidência de doenças respiratórias é maior em suínos do que em outras espécies de animais domésticos, pois a produção intensiva e a alta densidade animal favorecem a transmissão e a persistência de patógenos na granja (OPRIESSNIG et al., 2011). As infecções respiratórias são o principal problema sanitário a ser controlado, tendo como consequências a redução da produtividade e do ganho de peso, aumento da mortalidade e dos custos com medicamentos antimicrobianos, sem mencionar as questões relacionadas ao bem-estar animal (TORREMORELL et al., 2009). As doenças respiratórias ganharam maior espaço devido à queda na circulação e na qualidade do ar disponível nos galpões com o aumento da densidade de animais alojados, mistura de animais de diferentes origens e estresse (BARCELLOS et al., 2008a; MORÉS et al., 2015).

Na maioria das vezes, os quadros clínicos respiratórios nas fases de crescimento e terminação são causados pela associação de dois ou mais microrganismos (HANSEN et al., 2010; OPRIESSNIG et al., 2011). Essa associação de dois ou mais patógenos nas infecções respiratórias é conhecido como complexo

das doenças respiratórias dos suínos (CDRS). O CDRS é uma síndrome multifatorial que afeta o sistema respiratório de suínos em todo o mundo, sendo uma das principais causas de perdas na produção (CHAE, 2016). Fatores não infecciosos associados ao manejo, como densidade animal, controle insuficiente da temperatura, mistura de leitões de várias origens e outros como umidade, ventilação insuficiente, altas concentrações de amônia, poeira e altos níveis de estresse (HANSEN et al., 2010; OPRIESSNIG et al., 2011; CHAE, 2016; MORÉS et al., 2015; BARCELLOS et al., 2008) contribuem para o surgimento do CDRS.

Entre os agentes infecciosos que fazem parte do CDRS, estão presentes os agentes virais considerados agentes primários: o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV), vírus da influenza (VIA) e circovírus suíno tipo 2 (PCV2). Como agentes primários bacterianos, podemos citar o *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (OPRESSING et al., 2011). O vírus da influenza suína é o patógeno viral primário mais importante no Brasil, seguido pelo circovírus suíno tipo 2 (PCV2), já que o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRSV) nunca foi relatado no país (RECH et al., 2018).

Os patógenos considerados agentes primários causam imunossupressão, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias e destruição do epitélio respiratório (SAADE et al., 2020). Assim, eles reduzem a defesa do trato respiratório e facilitam a invasão de patógenos secundários, que estão presentes normalmente na microbiota do sistema respiratório (OPRIESSNIG et al., 2011). Entre os patógenos secundários do CDRS podemos citar a *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Glaesserella parasuis*, *M. hyorhinis* e *Streptococcus suis* (BROCKMEIER et al., 2014).

O grande impacto econômico decorrente dos problemas respiratórios se deve ao agravamento das taxas de conversão alimentar, redução do ganho de peso dos animais, aumento da morbidade, mortalidade, dos custos com medicamentos e perda da qualidade da carcaça ou até mesmo condenações no frigorífico devido a presença de lesões pulmonares (SZEREDI et al., 2015). As alterações patológicas pulmonares e sinais clínicos apresentados pelos animais acometidos pelo CDRS dependem do tipo de patógeno envolvido, dos fatores ambientais e da sinergia causada pelas co-infecções (SAADE et al., 2020).

DÍAZ et al. (2020) avaliou o impacto econômico do CDRS em rebanhos da Irlanda. Em granjas de ciclo completo positivas para patógenos respiratórios do CDRS, como PRRSv, influenza ou *M. hyopneumoniae*, o lucro anual é menor e o risco de perdas econômicas aumentou consideravelmente com a positividade aos patógenos. Nesse estudo de DÍAZ et al. (2020), as granjas positivas para *M. hyopneumoniae* foram as que tiveram maior perda do lucro anual. Isso pode ser devido aos efeitos sinérgicos entre patógenos respiratórios (OPRIESSNIG et al., 2011), pois as co-infecções bacterianas-virais podem exacerbar a patogenicidade das doenças respiratórias (OPRIESSNIG et al., 2011; THACKER et al., 2001; DEBLANC et al., 2012). Neste estudo, as fazendas positivas para *M. hyopneumoniae* tinham maior probabilidade de também serem positivas para PRRSv e/ou VIA.

5. PATOGENIA

O curso de infecção da influenza em suínos é curto, de 5 a 7 dias, e a replicação viral é limitada ao trato respiratório, infectando principalmente as células epiteliais que revestem a superfície do trato respiratório, da mucosa nasal aos alvéolos (JANKE, 2014).

A lesão microscópica característica da fase aguda é a bronquite necrosante e a bronquiolite. Lesões de pneumonia intersticial e bronquite/bronquiolite epitelial proliferativa observadas no exame histopatológico são compatíveis com o quadro crônico provocado por este vírus (SCHAEFER et al., 2011). Na microscopia, podem ser observados focos de necrose coagulativa nos alvéolos, epitélio bronquial e bronquiolar, reação inflamatória-exsudativa nos brônquios, bronquíolos e alvéolos e áreas de atelectasia com espessamento dos septos alveolares (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

Como o vírus entra no pulmão através das vias aéreas, a manifestação macroscópica mais consistente da infecção pelo vírus influenza é a broncopneumonia crânio-ventral (MAES et al., 2023). O pulmão com lesões de influenza apresenta lóbulos com áreas multifocais de consolidação vermelho-escuras bem demarcadas e presença de exsudato espumoso nas passagens aéreas (JANKE, 2014). A lesão macroscópica da influenza é muito semelhante às lesões causadas por *M. hyopneumoniae* (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). Em sua forma aguda

grave, o pulmão encontra-se difusamente congestionado com edema interlobular proeminente e espuma extensa nos brônquios e traqueia, como resultado de uma resposta exagerada de citocina (JANKE, 2014).

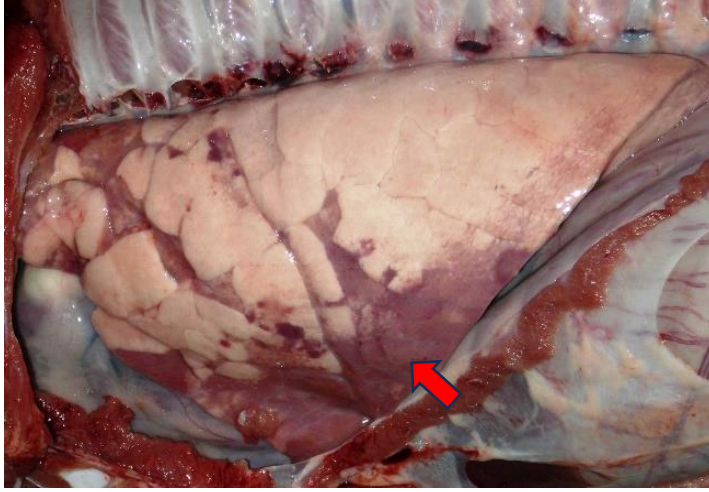


Figura 24. Pulmão com áreas vermelhas e firmes, característico da consolidação pulmonar crânio-ventral multifocal causada pela influenza. Fonte: Imagem cedida pelo médico veterinário Marcos Zanella Mores, analista da EMBRAPA Suínos e Aves.

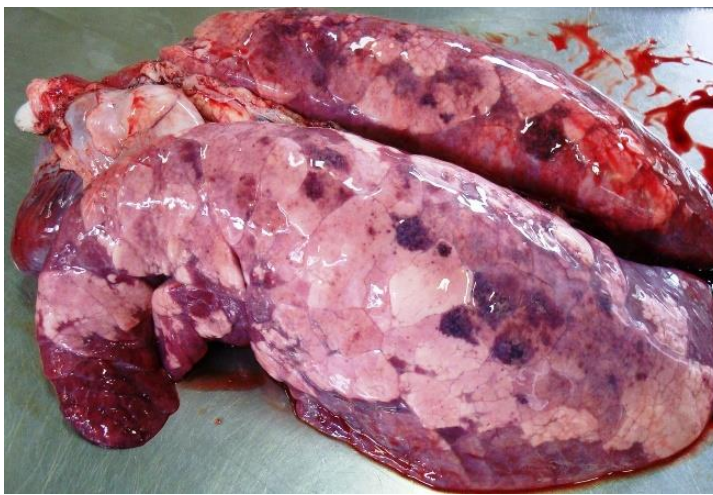


Figura 25. Consolidação pulmonar multifocal. Fonte: Imagem cedida pelo médico veterinário Marcos Zanella Mores, analista da Embrapa Suínos e Aves.

Na ocorrência de uma epidemia de influenza, quando o vírus entra em um rebanho sem imunidade prévia (suínos soronegativos), a doença é caracterizada por surtos de infecção respiratória aguda podendo atingir 100% de morbidade (SCHAEFER et al., 2019). Os sinais clínicos observados são hipertermia (40,5°C - 41,5°C), anorexia, relutância do suíno em levantar-se, taquipneia, conjuntivite, secreção nasal mucoide discreta, espirros, dispneia e, após alguns dias, observa-se tosse (VAN REETH & VINCENT, 2019). Podem estar presentes infecções secundárias por bactérias como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Glaesserella parasuis* e *Streptococcus suis* tipo 2, o que resulta em uma intensificação dos sinais clínicos (DEBLANC et al., 2013).

As matrizes infectadas pelo vírus da influenza podem apresentar sinais clínicos reprodutivos como retorno irregular ao estro, aborto ou parto prematuro e maior incidência de leitões natimortos e mumificados (SCHAEFER et al., 2019). O quadro reprodutivo causado pela influenza acontece devido à febre, pois não há evidências claras de que os vírus da influenza infectem o trato reprodutivo ou induzam diretamente doenças reprodutivas (VAN REETH & VINCENT, 2019). A inflamação pode causar a liberação de prostaglandinas, que causa luteólise e subsequente perda do controle da gestação devido à diminuição da produção de progesterona (MAES et al., 2023).

Em rebanhos parcialmente imunes ao vírus, os sinais clínicos da infecção não são evidentes, mas a presença do vírus pode afetar o desempenho do rebanho pelo aumento da taxa de conversão alimentar. Os suínos infectados consomem uma quantidade maior de ração e necessitam de um maior tempo para atingir o peso de abate quando comparados a suínos não infectados (SCHAEFER et al., 2019).

5. DIAGNÓSTICO

Os sinais clínicos das enfermidades respiratórias em suínos não são patognomônicos (MAES et al., 2023) e, no caso da influenza, podem ser confundidos com os sinais de outras enfermidades respiratórias. Portanto, o diagnóstico não pode ser baseado em sinais clínicos, sendo necessário detectar a presença do agente (SCHAEFER et al., 2019).

5.1 AMOSTRAGEM E SELEÇÃO DE ANIMAIS

A escolha do animal para a realização dos exames laboratoriais é muito importante para o correto diagnóstico da influenza. A forma mais eficaz de realizar o diagnóstico é por meio da amostragem de múltiplos animais, pois as chances de encontrar animais no pico da eliminação viral durante a fase aguda da doença são maiores (SCHAEFER et al., 2019).

Suínos começam a excretar o vírus 24 a 48 horas pós-infecção e o pico da eliminação do vírus acontece entre quatro a oito dias após a infecção viral, caracterizando a fase aguda, na qual é possível ser feita a detecção direta do agente (SCHAEFER et al., 2013 e 2019).

O surgimento dos sinais clínicos respiratórios não indica que o animal está eliminando o vírus, pois, embora a tosse seja um sinal característico da influenza em suínos, quando o animal começa a manifestá-la, em muitos casos, o período de eliminação já cessou e o animal pode estar acometido por outros agentes respiratórios que intensificam a manifestação clínica (JANKE, 2014). Um bom indicador da fase aguda da infecção viral é o aumento da temperatura corporal (hipertermia), que pode ocorrer 24 horas pós-infecção (SCHAEFER et al., 2019; JANKE, 2014).

As amostras coletadas são frequentemente analisadas em pools. A amostragem *antemortem* envolve a coleta de secreção nasal, fluido oral e soro. As amostras *postmortem* incluem a coleta de swab traqueal ou fluido de lavado broncoalveolar e porções frescas e fixadas em formalina do pulmão (JANKE, 2014; SCHAEFER et al., 2019).

5.2 HISTOPATOLOGIA

As amostras para o diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico devem ser acondicionadas em formalina tamponada a 10% e mantidas em temperatura ambiente (23°C). A presença de lesões histológicas características de infecção pelo VIA, quando visualizadas, não são confirmatórias da presença do vírus (SCHAEFER et al., 2019).

O exame histopatológico do tecido pulmonar permite visualizar as lesões agudas que são quase patognomônicas e permite visualizar lesões crônicas, que permanecerão mesmo após o vírus ser eliminado (JANKE, 2014).

A confirmação da presença do vírus da influenza é feita por meio da técnica de imuno-histoquímica (IHQ), sempre em associação com a visualização das lesões histológicas. O anticorpo preferido é um anticorpo monoclonal contra a nucleoproteína tipo A conservada porque ele detectará o vírus influenza de todos os subtipos (JANKE, 2014).

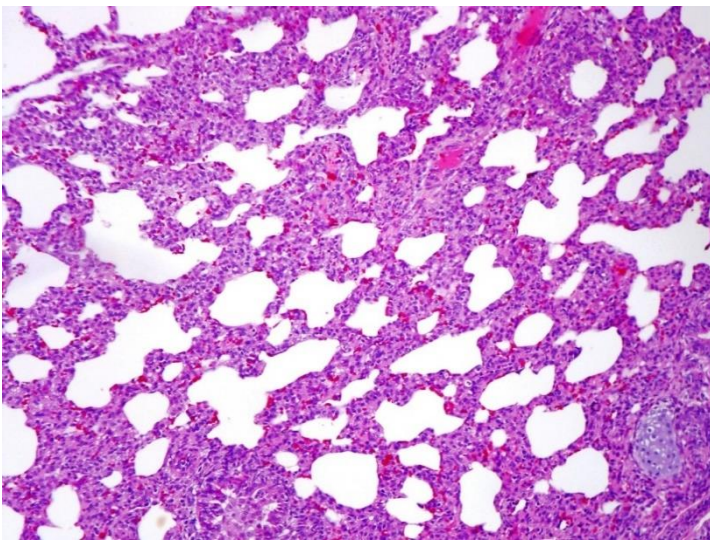


Figura 26. Espessamento dos septos alveolares por infiltração linfoplasmocitária – pneumonia intersticial. Fonte: Imagem cedida pelo médico veterinário Marcos Zanella Mores, analista da Embrapa Suínos e Aves.

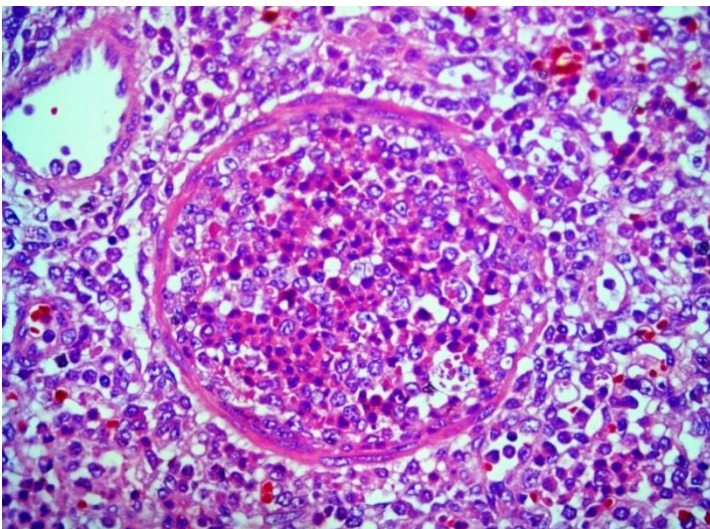


Figura 27. Bronquiolite necrótica aguda. Fonte: Imagem cedida pelo médico veterinário Marcos Zanella Mores, analista da Embrapa Suínos e Aves.

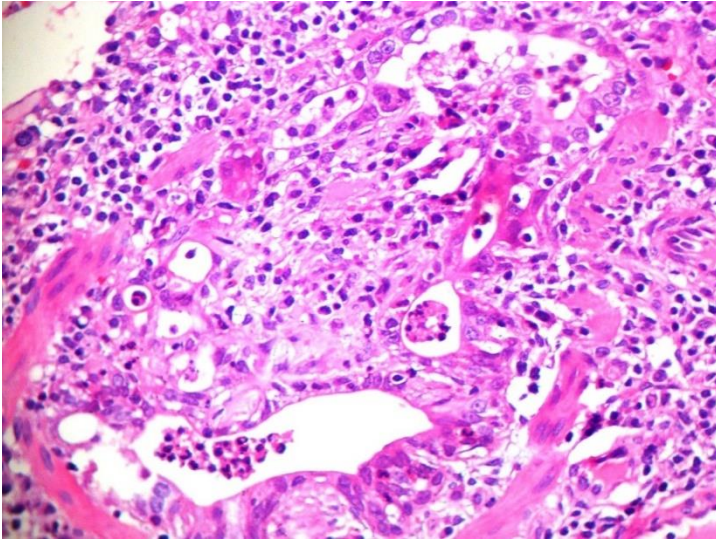


Figura 28. Bronquiolite epitelial proliferativa crônica. Fonte: Imagem cedida pelo médico veterinário Marcos Zanella Mores, analista da Embrapa Suínos e Aves.

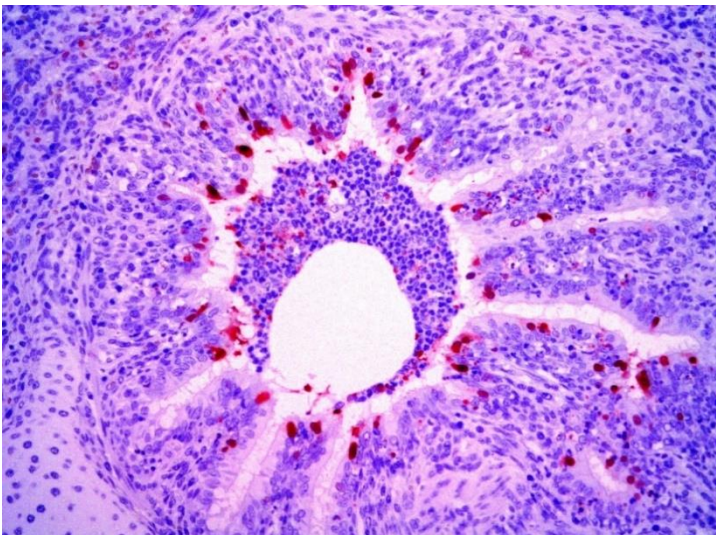


Figura 31. Imuno-histoquímica (IHQ) positiva para influenza A. Marcação vermelha no epitélio bronquiolar. Fonte: Imagem cedida pelo médico veterinário Marcos Zanella Mores, analista da Embrapa Suínos e Aves.

5.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Para o diagnóstico virológico, as técnicas moleculares que detectam o RNA viral, como RT-PCR e RT-qPCR são as mais sensíveis e específicas, permitindo a detecção do ácido nucleico viral mesmo em amostras com baixa carga viral ou contendo vírus não viável (ZHANG et al., 2014). As técnicas de PCR são usadas atualmente rotineiramente para diagnóstico porque um grande número de amostras pode ser manuseado de forma eficiente e porque o método é menos afetado pela qualidade da amostra (JANKE, 2014).

Os ensaios de PCR para o vírus da influenza têm como alvo um fragmento conservado do gene M. Para a subtipagem, é necessário utilizar primers específicos para diferentes segmentos do gene, principalmente HA e NA (HENRITZI et al., 2020). Ensaios de PCR em tempo real para influenza foram desenvolvidos em 2004 (RICHT et al., 2004) e, quando comparado com a PCR convencional, pode ser realizado em um tempo menor e diferenciar os subtipos de VIA, além de permitir a quantificação da carga viral e não apresentar chances de contaminação cruzada das amostras com a manipulação após a reação de PCR (LI & ROBERTSON, 2021).

Com relação à preocupação com a saúde pública, a detecção de co-infecções com diferentes cepas virais em um rebanho é muito importante para a vigilância epidemiológica da influenza (LI & ROBERTSON, 2021). Ensaios de RT-qPCR Multiplex podem diferenciar os subtipos H1, H3, N1 e N2 do vírus, porém a eficiência depende dos primers utilizados serem específicos e não apresentarem incompatibilidades com a sequência-alvo, com primers desatualizados resultando em uma sensibilidade baixa. Os primers e sondas utilizados nas reações de RT-qPCR devem ser atualizados constantemente com a sequência-alvo do genoma viral do vírus circulante para manter um nível ótimo de detecção molecular (YANG et al., 2014; LI & ROBERTSON, 2021).

5.4 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Para a detecção de anticorpos são utilizadas amostras de soro, que devem ser armazenadas a 4°C até o envio ao laboratório e depois mantidas a -20°C (CULHANE & DETMER, 2014). Quando o objetivo do diagnóstico for a detecção de anticorpos, o soro deve ser coletado entre 10 e 14 dias pós-infecção (dpi) (SCHAEFER et al., 2019).

Testes sorológicos contra o vírus da influenza têm como alvo os anticorpos do hospedeiro contra o vírus. O uso de testes sorológicos para a influenza possui valor diagnóstico limitado, uma vez que a doença está amplamente disseminada em rebanhos suínos (LI & ROBERTSON, 2021). Além disso, a utilização de vacinas contra o VIA dificulta a interpretação dos resultados sorológicos, uma vez que os testes não diferenciam anticorpos induzidos pela vacinação de anticorpos produzidos após infecção natural (JANKE, 2014). Os testes sorológicos mais comuns são a inibição da hemaglutinação (HI) e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Kits comerciais de ELISA foram desenvolvidos para detectar anticorpos para a nucleoproteína (NP) do vírus da influenza A por ser uma proteína conservada no vírus (GOODELL et al., 2016). Os testes por ELISA estão disponíveis para facilitar o teste de um grande número de amostras, no entanto, devido a variação antigênica, co-infecções e uso generalizado de vacinas comerciais e autógenas, o diagnóstico da infecção por influenza através do uso de técnicas sorológicas se tornou muito mais difícil (JANKE, 2014).

O teste de HI é mais simples e tem custo menor, além de ser mais rápido do que o ELISA, porém a escolha do antígeno se torna complexa devido à diversidade de vírus da influenza, tornando o teste menos sensível para vigilância quando vírus heterólogos estão presentes (GOODHELL et al., 2016). Para a realização do teste de HI, hemácias de espécies diferentes como galinhas, perus e porquinhos da índia podem ser utilizadas e a espécie da qual as hemácias são coletadas pode impactar os títulos do teste de HI para o vírus da influenza (WIRIYARAT et al., 2010; OVSYANNIKOVA et al., 2014; LI & ROBERTSON, 2021).

As vantagens da utilização de testes sorológicos para influenza são o custo e a facilidade de execução, além de ser um teste mais sensível para detecção de animais expostos ao vírus anteriormente, pois os anticorpos podem permanecer por até 1,5 meses pós-infecção (GOODELL et al., 2016). Entre as limitações da sorologia, a mais importante é que a informação obtida mostra a exposição prévia e não a condição atual dos animais, além de não ser possível realizar o isolamento viral ou obter informações sobre potencial pandêmico de diferentes cepas (LI & ROBERTSON, 2021). Reações cruzadas podem acontecer entre linhagens diferentes dentro de um subtipo ou entre subtipos diferentes e a presença de anticorpos de

origem materna também interfere nos resultados (ALLERSON et al., 2013b; DETMER et al. 2013).

5.5 ISOLAMENTO VIRAL

As amostras para o diagnóstico virológico devem ser armazenadas a 4°C até o envio ao laboratório e depois devem ser mantidas a -80°C. Testes diagnósticos para detecção viral devem ser aplicados em amostras biológicas coletadas durante a fase aguda da infecção (4 dpi - 8 dpi), que coincide com o período de excreção do vírus. Amostras coletadas após este período podem ter um resultado falso-negativo. Um bom indicador da fase aguda da excreção viral é a hipertermia (SCHAEFER et al., 2019).

O isolamento do vírus pode ser conduzido em ovos de galinha embrionados ou em várias linhagens celulares estabelecidas (células MDCK) (CHIAPPONI et al., 2010, SCHAEFER et al., 2013). Antes do desenvolvimento das metodologias de reação em cadeia da polimerase (PCR), o crescimento do vírus em fluidos alantoides era monitorado por testes de HA. Atualmente, as técnicas de PCR são usadas para detectar e caracterizar vírus influenza isolados em ovos ou culturas de células (SCHAEFER et al., 2013 e 2019).

Os procedimentos de isolamento são usados com mais frequência para produção de vacinas autógenas ou para amplificação do título do vírus para facilitar a determinação do subtipo do que para diagnóstico de rotina (SCHAEFER et al., 2019). O isolamento viral é um procedimento difícil, com custo elevado e demorado, mas é necessário quando o vírus é utilizado para pesquisas envolvendo patogenicidade e monitoramento genético (DETMER et al., 2013; RAJAO et al., 2019).

6. TRATAMENTO

O tratamento medicamentoso dos animais com sinais clínicos característicos de influenza pode ser feito com o uso de antitérmicos, expectorantes e antimicrobianos para combater infecções bacterianas secundárias (SCHAEFER et al., 2013; TORREMORELL et al., 2009, 2012; WHITE et al., 2017). O uso de antibióticos de amplo espectro pode ser administrado nos animais doentes pela água para reduzir

a febre e os sinais clínicos, ajudando também no combate à infecção por agentes secundários. A administração de ibuprofeno, por via parenteral, também se mostrou eficiente para reduzir a febre e a mortalidade, se administrado 24 horas após o surto (SOBESTIANSKY, 2007).

7. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE

Quando realizadas corretamente, as medidas de controle contra a influenza podem aumentar a produtividade, melhorar o bem-estar animal e reduzir o risco de pandemias humanas, além de melhorar o estado de saúde do rebanho. Entre as medidas de controle, as estratégias mais conhecidas são a vacinação e o uso de práticas de biossegurança (TORREMORELL et al., 2012). Protocolos de vacinação contra a influenza não são bem descritos no Brasil, com apenas uma vacina comercial disponível e um único laboratório que produz vacinas autógenas. Portanto, protocolos de biossegurança podem contribuir para o controle e prevenção de infecções em rebanhos brasileiros. Esses protocolos ajudam na prevenção da introdução do vírus no plantel e transmissão do mesmo através de procedimentos sanitários básicos (SCHAEFER et al., 2019).

7.1 BIOSSEGURIDADE

A biossegurança abrange conjuntos de práticas que são padronizadas para reduzir o risco de introdução de patógenos e prevenir a disseminação de agentes endêmicos dentro ou mesmo entre locais de produção animal (AMASS & CLARK, 1999; LAMBERT et al., 2012). No geral, os resultados esperados da aplicação de práticas de biossegurança são maiores lucros, melhor bem-estar animal e respostas eficientes a medicamentos e vacinas (BRENNAN & CHRISTLEY, 2012). A aplicação de práticas de biossegurança também produziu impactos positivos com relação à diminuição do uso de antibióticos na cadeia suína na Europa (LAANEN et al., 2013).

Vale ressaltar que a adoção de programas de biossegurança deve ser individual, ou seja, não pode ser padronizado para todos os produtores, pois depende dos recursos disponíveis e da localização, instalações, genética, assistência técnica, nutrição e outros fatores que individualizam as condições de cada produtor,

transformando o planejamento em um processo dinâmico, com adaptações aos riscos, expectativas, demandas e orçamento de cada granja (HECK, 2006).

Entre as medidas de biossegurança, as que possuem papel importante para o controle do vírus da influenza serão enumerados a seguir.

7.1.1 BOAS PRÁTICAS DE PRODUÇÃO E VAZIO SANITÁRIO ENTRE LOTES

Manter boas condições de limpeza e desinfecção das instalações é importante para o controle do vírus da influenza (SCHAEFER et al., 2019). Os vírus da influenza são sensíveis às condições ambientais. Desinfetantes químicos como 0,1 mol/L NaOH, 70% etanol, 70% 1-propanol e óxido de etileno podem inativar o vírus (JEONG et al., 2010). No entanto, a eficiência da inativação dos desinfetantes é reduzida em temperaturas mais baixas e quando o ambiente está contaminado com matéria orgânica (LI & ROBERTSON, 2021). Assim, torna-se necessário cuidado ao realizar a desinfecção de instalações contaminadas com o vírus da influenza, removendo toda a matéria orgânica antes da desinfecção (HAAS et al., 1995; BOTNER & BELSHAM, 2012). A infectividade do vírus pode ser mantida por mais de seis semanas em ambientes úmidos a 5 °C, enquanto que a 20 °C pode permanecer viável por até 14 dias (BOTNER E BELSHAM 2012; LI & ROBERTSON, 2021).

Manter boas condições de produção auxiliam no controle da influenza. O risco de infecção é aumentado com temperaturas mais frias (FABLET et al., 2013), ventilação inadequada, alta densidade de animais (MASTIN et al., 2011), excesso de poeira e má ventilação (BARCELLOS et al., 2008). A presença de divisórias abertas (grades) entre baias de creche também foi relacionada com o aumento do risco de infecção, aumentando o contato direto entre animais (SIMON-GRIFE et al., 2011).

Outros aspectos que devem ser avaliados são a ausência ou manejo incorreto do sistema all-in-all-out e adequado vazio sanitário entre lotes (FABLET et al., 2013). O vazio sanitário é o período em que a instalação permanece vazia após ser realizada a limpeza seguida de desinfecção, permitindo a destruição de microrganismos que se tornam sensíveis à ação das pressões físicas naturais como ausência de matéria orgânica e secagem das instalações (BARCELLOS et al., 2008). Intervalos de vazio sanitário de 5 dias para maternidade ou creche e um período maior que este (7 dias)

para terminação (AMARAL et al., 2006), auxiliam na redução dos patógenos e controle de enfermidades nas granjas.

7.1.2 INTRODUÇÃO DE ANIMAIS NO REBANHO

A introdução de animais é a principal via de introdução de um patógeno no rebanho (BOTTOMS et al., 2013). As fêmeas de reposição desempenham um papel fundamental na introdução do vírus da influenza no plantel, uma vez que a maioria dos rebanhos comerciais só introduz novos animais para substituição do plantel reprodutor (DIAZ et al., 2015; RYT-HANSEN et al., 2019). No caso do vírus influenza, dependendo da frequência com que novos animais são introduzidos nos rebanhos suínos, infecções e reinfecções com diferentes cepas podem surgir (VAN REETH et al., 2019). A introdução de um maior número de marrãs infectadas foi frequentemente associada a maior soroprevalência do vírus da influenza em granjas (CORZO et al., 2013; SIMON-GRIFÉ et al., 2011; WHITE et al., 2017). Em locais que fazem a compra de fêmeas de reposição de fontes externas, a soroprevalência do vírus da influenza se mostrou 38% maior do que em granjas que produzem as fêmeas de reposição internamente (SILVA et al., 2019).

Ao introduzir animais no plantel reprodutivo, é recomendado realizar o procedimento de quarentena. A quarentena é um período que os animais adquiridos devem permanecer separados dos demais animais do plantel até que seja feito o monitoramento de sinais clínicos e realizados os exames laboratoriais, para comprovar que os animais estão livres de enfermidades originadas da granja de origem ou do transporte (NEUMANN & HALL, 2019). O tempo de quarentena varia de 30 a 60 dias, dependendo do programa de monitoramento de cada propriedade, e pode ser feito em conjunto com a prática de aclimação (NEUMANN & HALL, 2019). Na aclimação, as leitoas de reposição precisam ser vacinadas ou expostas às doenças conhecidas como endêmicas na propriedade, tendo a oportunidade de se adaptar aos microrganismos e patógenos que circulam na granja e se preparar para a reprodução (com duração de 40 dias em média) (SILVA et al., 2019; (NEUMANN & HALL, 2019). Segundo o estudo realizado por SILVA et al. (2019), do manejo de aclimação para as fêmeas de reposição, com uso de vacinação e manejo all in/all out nas unidades de aclimação resultou em uma redução significativa de leitoas positivas para influenza no final do período de aclimação.

Assim, as leitoas que foram infectadas pelo VIA antes ou durante o período de aclimação terão tempo para se recuperar da infecção antes de terem contato com os animais do rebanho (SILVA et al., 2019). Tais práticas têm sido apontadas como uma medida eficiente de controle para o vírus PRRS (DEE et al., 1995) e *Mycoplasma hyopneumoniae* (GARZA-MORENO et al., 2018; NATHUES et al., 2014).

Quando a prática de aclimação e/ou quarentena não é realizada e acontece uma alta frequência de introdução de animais de diferentes origens, a oportunidade para a entrada do vírus influenza nos rebanhos aumenta (SILVA et al., 2019; RYT-HANSEN et al., 2022). Ter fêmeas positivas para o vírus no início da quarentena indica que o vírus foi introduzido do rebanho fornecedor ou introduzido no rebanho durante a quarentena como consequência de medidas de biossegurança inadequadas (ALLERSON et al., 2013a, TORREMORELL et al., 2012). Portanto, a aplicação de uma quarentena adequada é considerada uma medida positiva para a prevenção da entrada do vírus influenza. Outra opção é aplicar uma vacinação primária (*prime-boost*) nas fêmeas de reposição dentro da quarentena antes que as leitoas entrem no rebanho de matrizes (RYT-HANSEN et al., 2022).

7.1.3 MISTURA DE LOTES DE DIFERENTES ORIGENS

Para estratégia de controle da influenza, deve-se evitar mistura de lotes de leitões de diversas origens (SCHAEFER et al., 2019). Com essa mistura, há uma maior chance de ocorrer a introdução de animais portadores do vírus e, também, da introdução de cepas virais heterólogas às cepas presentes no rebanho, contribuindo para o aumento da variabilidade genética do vírus (RAJAO et al., 2019; LAGAN et al., 2024).

7.1.4 TRANSPORTE DE SUÍNOS

A principal forma de introdução do vírus em uma granja é através da introdução de animais infectados. Como parte das medidas de controle, deve-se evitar a movimentação de animais na fase aguda da infecção, quando há excreção viral (SCHAEFER et al., 2019). Isso acontece quando há transporte de leitões após o desmame para locais distantes e contribui para a disseminação do VIA em novas regiões (NELSON et al., 2015). Na América do Norte, esse transporte indiscriminado

de leitões após o desmame é considerado uma das principais rotas de disseminação do vírus entre os plantéis (DIAZ et al., 2015; DIAS et al., 2024).

7.1.5 CONTATO DE SUÍNOS COM OUTROS ANIMAIS

Como parte do controle do vírus da influenza, deve-se adotar a utilização de cercas de proteção ao redor da granja e telas anti-pássaros para evitar o contato dos suínos com outras espécies de animais (SCHAEFER et al., 2019). No estudo realizado por SILVA et al. (2019), a presença de redes anti-pássaros foi relacionada com uma menor soroprevalência de influenza, devido à proteção contra a transmissão indireta do vírus por vetores (ALLERSON et al., 2013a; SILVA et al., 2019).

As aves selvagens são reservatórios para o vírus da influenza A (ALEXANDER, 2007), sendo comprovado experimentalmente que suínos podem ser infectados com cepas de influenza aviária (KIDA et al., 1994). Além da proteção contra os VIAs, as redes anti-pássaros podem prevenir infecções de outras enfermidades, uma vez que as aves podem ser reservatórios de muitos outros patógenos, como *Streptococcus suis* (MESSIER et al., 1994), *Bordetella bronchiseptica* (FARRINGTON & JORGENSON, 1976) e vírus da PRRS (ZIMMERMAN et al., 1997).

Além dos pássaros, outra espécie que merece destaque são os javalis (*Sus scrofa*). Em estudos anteriores, os javalis foram considerados reservatórios de vários patógenos que podem ser transmitidos para os suínos e também para o homem (CLEVELAND et al., 2017).

As medidas de biosseguridade adotadas pelas fazendas devem prevenir o contato dos javalis com os suínos domésticos. Javalis de vida livre representam um problema de saúde animal com disseminação de patógenos e até mesmo zoonoses (MENG et al., 2009). Em um estudo realizado por da SILVA ANDRADE et al. (2022), os javalis selvagens do estado do Rio Grande do Sul (Brasil) foram amostrados e avaliados quanto à presença de agentes infecciosos e, apesar de o vírus da influenza não ter sido detectado por métodos moleculares (PCR), alguns animais apresentaram anticorpos anti-H1N1pdm09, indicando exposição prévia ao vírus da influenza em 35,5% dos javalis avaliados (16/45). A presença dos anticorpos sugere que os animais podem ter tido contato prévio com suínos domésticos ou humanos e podem participar da via de transmissão do vírus da influenza (da SILVA ANDRADE et al., 2022).

7.1.6 CONTATO DE PESSOAS GRIPADAS COM SUÍNOS

Outro aspecto importante sobre o controle da influenza em suínos é realizar o controle do contato das pessoas que apresentam sinais de gripe (com febre) com suínos e realizar a vacinação anual contra o vírus da influenza em todos que trabalham em contato com os animais (veterinários, suinocultores, motoristas que transportam animais e colaboradores) (SCHAEFER et al., 2019).

A rota de transmissão do vírus por pessoas infectadas não pode ser negligenciada, uma vez que a interação entre humanos e suínos aumenta as chances de transmissão do vírus entre as espécies (RAJAO et al., 2019). Em um estudo realizado na China, foi descoberto que trabalhadores da suinocultura têm pouco conhecimento sobre a transmissão do vírus da influenza entre humanos e suínos (LI et al., 2020). Outro estudo demonstrou que a presença de trabalhadores com sintomas de influenza estava significativamente associada com a presença do vírus da influenza suína em granjas na Noruega (GRONTVEDT et al., 2013). A prevenção da transmissão do VIA de suínos para humanos e vice-versa pode acontecer com medidas sanitárias básicas, como higiene pessoal, evitar contato direto de pessoas doentes com suínos saudáveis e de pessoas saudáveis com suínos doentes, e realizar a vacinação de trabalhadores da suinocultura como maneira de prevenir o aumento da diversidade genética do vírus circulante (LI & ROBERTSON, 2021).

7.1.7 LIMPEZA E DESINFECÇÃO DE FÔMITES

Os fômites são uma importante via indireta de disseminação do vírus dentro da granja, incluindo ferramentas e instrumentos usados no manejo até as mãos e vestimentas dos trabalhadores. Os leitões recém-nascidos são infectados pela exposição aos fômites e materiais contaminados, mãos ou roupas dos trabalhadores que manuseiam os animais (LOPEZ-MORENO et al., 2022a,b; ALLERSON et al., 2013a). As práticas de manejo podem facilitar a disseminação do vírus dentro do rebanho, como a adoção cruzada de leitões e o uso de mães de leite (NELSON et al., 2015; LOPEZ-MORENO et al., 2022b). Mães de leite são porcas lactantes que, quando sua ninhada original é desmamada, são usadas para adotar leitões menos viáveis de outras ninhadas. Os úberes dessas porcas podem estar contaminados com

o vírus e servir como fonte de infecção para os suínos recém-adotados (GARRIDO-MANTILLA et al., 2019).

Em um estudo realizado por LOPEZ-MORENO et al. (2022a) foi testada a combinação da vacinação das porcas e aumento das medidas de biosseguridade pré-desmame para limitar a transmissão da influenza entre leitões e permitir o desmame de leitões livres do vírus. Individualmente, essas abordagens demonstraram atrasar (LOPEZ-MORENO et al., 2022a) ou reduzir as infecções pelo vírus ao desmame (CHAMBA et al., 2020), e em conjunto, essa combinação de intervenções mostrou-se promissora como um meio de reduzir e potencialmente eliminar as infecções pelo vírus da influenza em grupos de leitões desmamados (LOPEZ-MORENO et al., 2022a). As medidas de biosseguridade avaliadas por LOPEZ-MORENO et al. (2022a) foram: não mover leitões entre ninhadas após 3 dias de idade, trocar luvas ao manusear diferentes leitegadas, não pisar em gaiolas, realizar desinfecção diária de ferramentas e limitar o uso de mães de leite. Como resultado, houve uma redução e atraso das infecções pelo VIA em leitões durante as primeiras 2 semanas de idade.

7.1.8 TRÂNSITO DE PESSOAS E VEÍCULOS NA PROPRIEDADE

Outro fator importante no controle da influenza é o controle do trânsito de pessoas e de veículos na propriedade. O acesso descontrolado de veículos e visitantes dentro da granja pode aumentar as chances de ocorrer a introdução de patógenos através da contaminação de veículos, roupas, sapatos e fômites (SIMON-GRIFE et al., 2011; ALLERSON et al., 2013a; ER et al., 2016). Na Espanha, Simon-Grife et al. (2011) relatou que o acesso descontrolado de pessoas e veículos à granja como sendo um dos fatores de risco para a soropositividade das propriedades para o vírus da influenza.

7.2 O PAPEL DOS ANTICORPOS MATERNAIS NA PROTEÇÃO

Em granjas comerciais, as matrizes são vacinadas na pré-cobertura (VINCENT et al., 2008; CADOR et al., 2016) para evitar consequências reprodutivas causadas pelo vírus da influenza. Como resultado desta vacinação regular, os anticorpos maternos são transferidos para a grande maioria dos leitões. Esses anticorpos fornecem aos animais recém-nascidos proteção parcial temporária contra a infecção,

que pode trazer resultados diferentes, incluindo suscetibilidade reduzida à infecção e/ou redução da eliminação em caso de infecção (PAPATSIROS et al., 2023).

Leitões recém-desmamados têm altos níveis de anticorpos devido à vacinação da porca. No entanto, a eficácia dos anticorpos neste estágio é incerta, com vários estudos indicando proteção incompleta contra a infecção pelo vírus e seus sinais clínicos (RYT-HANSEN et al., 2019a; ROSE et al., 2013; LAGAN et al., 2024). Além disso, se o leitão for exposto ao vírus e ainda contar com a presença de anticorpos maternos, as respostas imunológicas serão prejudicadas e podem facilitar infecções recorrentes (ROSE et al. 2013, LAGAN et al 2024).

Os leitões desmamados são considerados o principal reservatório para o vírus da influenza nas granjas comerciais e atuam ativamente na circulação contínua do vírus nas granjas (LAGAN et al., 2024). Essa população de leitões desmamados apresenta status sorológico diverso e variável suscetibilidade ao vírus, pois os animais a partir da quarta semana de idade começam a passar por um declínio na imunidade materna e aumento da suscetibilidade às infecções (LAGAN et al., 2024). Apesar disso, acredita-se que os anticorpos maternos forneçam pelo menos uma proteção parcial para os leitões até 10 semanas e, portanto, a evolução nesse estágio de produção é caracterizada pela diminuição da imunidade e aumento da suscetibilidade à infecção (CADOR et al., 2016).

LAGAN et al. (2024) obteve uma positividade de 15,1% (196/1299) para o vírus da influenza através de detecção por RT-PCR em leitões de diferentes fases de produção, sendo que a grande maioria das amostras positivas (183 de 196) foram obtidas de leitões desmamados entre 4 e 12 semanas de idade.

A prevalência muito alta do vírus da influenza pós-desmame sugere que a exposição seja frequente e que os leitões sejam infectados em um estágio inicial após a diminuição da imunidade materna. Após a recuperação, esses animais apresentariam uma resposta humoral e reduziriam a população susceptível. (LAGAN et al., 2024). No entanto, a alta taxa de rotatividade, incluindo a transferência dos animais mais velhos já expostos ao vírus para a terminação e a introdução de leitões recém-desmamados sem exposição prévia, significa que a proporção de animais suscetíveis à infecção é mantida em um nível suficiente para sustentar uma infecção contínua (LAGAN et al., 2024).

No estudo de LAGAN et al. (2024), a detecção de anticorpos para o vírus da influenza em amostras de fluido oral demonstrou alta soroprevalência em animais de terminação. Isso sugere que a soroconversão ocorreu após a infecção natural nas unidades de creche, uma vez que o vírus estava quase completamente ausente nos rebanhos de terminação. O vírus pode ser introduzido nas unidades de terminação, porém não resulta em grandes surtos devido ao grau de imunidade dos animais nessa etapa de produção (LAGAN et al., 2024).

No estudo conduzido por CADOR et al. (2016), em condições experimentais, os anticorpos maternos derivados da vacinação da matriz com a mesma cepa usada posteriormente para o desafio dos leitões restringiram a transmissão do vírus (ALLERSON et al., 2013b). Por outro lado, leitões com anticorpos maternos heterólogos (vacina e cepa de desafio diferentes) não mostraram nenhuma proteção significativa contra a infecção (ALLERSON et al., 2013b; RAJAO et al., 2016). Outros estudos experimentais confirmaram que, mesmo na presença de imunidade passiva materna, os leitões não estão totalmente protegidos, restringindo o benefício dos anticorpos maternos à redução dos sinais clínicos apenas (BOSWORTH et al., 2010; LOEFFEN et al., 2003; KITIKOON et al., 2006).

CADOR et al. (2016) realizaram um estudo em condições experimentais para estimar os parâmetros de transmissão do vírus da influenza em grupos de leitões pós-desmame com diferentes níveis de anticorpos maternos. Como resultado, a transmissão por aerossóis e fômites se mostrou importante para animais de creche, no qual os animais mais velhos podem transmitir indiretamente o vírus da influenza para os animais mais novos de outros lotes. A transmissão por via de aerossóis se mostrou um ponto-chave para a transmissão do vírus, destacando sua importância na disseminação e persistência endêmica da influenza em rebanhos. Quanto aos níveis de anticorpos maternos, a diferença entre níveis de anticorpos maternos ao desmame está relacionada com maior susceptibilidade à infecção pelo vírus, que é maior nos leitões desmamados com níveis menores de anticorpos maternos (CADOR et al., 2016).

8. VACINAÇÃO

As vacinas são uma estratégia importante para controlar influenza em suínos. Estratégias eficazes de vacinação são um desafio por conta da circulação de múltiplos subtipos, da diversidade antigênica e da rápida evolução viral (VINCENT et al., 2017). Estudos recentes destacam o valor da vacinação contra a influenza na indústria, não apenas para limitar a replicação do vírus nos animais, mas também para proteger a saúde pública, limitando o surgimento de novos rearranjos com potenciais zoonóticas e/ou pandêmicos (LI et al., 2022, PAPATSIROS et al., 2023).

A vacina para influenza está entre as principais medidas profiláticas. A vacina comercial disponível no Brasil contém o vírus inativado (*whole inactivated virus*, WIV) com adjuvante oleoso e é administrado por via intramuscular (SCHAEFER et al., 2019). Essas vacinas dependem do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes para hemaglutinina (HA) do VIA e reduzem a doença clínica contra o vírus homólogo, mas têm eficácia limitada com vírus com deriva antigênica (heterólogo), dependendo da similaridade entre o vírus vacinal e o vírus circulante para apresentar bons resultados, com redução dos sinais clínicos e da excreção viral (SCHAEFER et al., 2019; BRAND et al., 2024; GAUGER et al., 2012).

Porém, no caso de vírus antigenicamente diferentes (heterólogo), essas vacinas são menos efetivas e resultam na intensificação dos sinais clínicos da doença, induzindo o fenômeno conhecido como doença respiratória exacerbada associada à vacinação (*vaccine-associated enhanced respiratory disease*, VAERD) (GAUGER et al., 2011; RAJÃO et al., 2014, SCHAEFER et al., 2019), que é caracterizada por pneumonia broncointersticial grave com infiltrados linfocíticos, neutrófilos nos lúmens bronquiolares e alveolares e desregulação de citocinas pró-inflamatórias (GAUGER et al., 2011; GAUGER et al., 2012; RAJAO et al., 2016; SCHAEFER et al., 2019, Brand e al., 2024).

Embora clinicamente difícil ser diagnosticada a campo, VAERD é causada devido ao uso de vacinas WIV com adjuvantes oleosos e circulação endêmica de vírus geneticamente diferentes. A VAERD demonstrou ser uma reação que depende do tipo de adjuvante utilizado e o adjuvante com maior efeito é o oleoso (SOUZA et al., 2018; BRAND et al., 2024).

Embora o VIA cause morbidade significativa e perda econômica em suínos, normalmente não é uma doença respiratória grave sem outros cofatores (RAJAO et al., 2014), portanto o diagnóstico presuntivo de VAERD acontece quando há evidências de influenza com sinais clínicos graves sem complicações secundárias. O diagnóstico é desafiador, sendo necessário observar as lesões macroscópicas e histológicas em conjunto com a identificação das cepas circulantes no rebanho e das cepas utilizadas na vacinação (BRAND et al., 2024).

A vacinação de fêmeas de reposição na quarentena e a vacinação em massa de matrizes anualmente são importantes métodos para reduzir a infecção do VIA em leitões ao desmame (SILVA et al., 2019). Em geral, as vacinas contendo vírus inativado são utilizadas em matrizes na fase de pré-cobertura, de forma a induzir a presença de imunidade passiva em leitões durante o início da fase de creche (RAJAO et al., 2014). Porém, devido a presença de uma alta diversidade genética nos vírus circulantes, o controle pela vacinação tem se tornado desafiador. Com isso, surgiram no mercado as vacinas autógenas, utilizando os vírus inativados e são produzidas a partir do isolamento viral do vírus circulante no rebanho onde a vacina será aplicada (SCHAEFER et al., 2019; DIAS et al., 2024).

Nos Estados Unidos, há vacinas comerciais com o vírus vivo atenuado (*live-attenuated influenza virus* – LAIV) licenciadas para uso em suínos, sendo uma alternativa à proteção limitada fornecida pelas vacinas de vírus inativado (GENZOW et al., 2017). A vantagem das vacinas LAIV é a capacidade de promover a proteção homólogo total e uma proteção heteróloga parcial, sem o risco de causar VAERD e sua resposta imune não sofre influência pela presença de anticorpos maternos (VINCENT et al., 2007 e 2012; MA, 2020). Entretanto, há o risco de ocorrer recombinação entre o vírus presente na vacina e o vírus de circulação endêmica, podendo resultar no surgimento de novas variantes virais (SHARMA et al., 2020; PETRO-TURNQUIST et al., 2024).

A vacinação de suínos contra o VIA é rotineiramente realizada pelos produtores de suínos na América do Norte e Europa (MA & RICHT, 2010; RAJÃO et al., 2018). Entretanto, a vacinação não é uma prática rotineira nas granjas brasileiras. No Brasil, está disponível comercialmente desde junho de 2014 uma vacina contra o vírus influenza H1N1pdm09. E, desde 2017, vacinas autógenas também têm sido comercializadas (SCHAEFER et al., 2019).

9. CONCLUSÃO

O vírus da influenza suína está espalhado por rebanhos ao redor do mundo e demonstrou impactar negativamente a produção animal, além de apresentar um risco zoonótico para a saúde pública. A etapa mais importante para prevenir a infecção de um rebanho pelo vírus é impedir sua introdução, por meio de práticas de biossegurança externa. Com o vírus já disseminado nos rebanhos comerciais, é importante reduzir sua transmissão dentro da granja, buscando uma combinação da vacinação das matrizes e uma biossegurança interna reforçada.

Apesar de o papel dos anticorpos de origem materna ser controverso, a vacinação das matrizes continua sendo um método de controle da influenza muito importante para a redução dos sinais clínicos, embora não impeça a infecção. O grande desafio, porém, é a alta variabilidade genética do vírus, que dificulta a produção de vacinas comerciais homólogas a todas as cepas virais circulantes e, assim, compromete uma proteção eficiente. Uma alternativa disponível na indústria é a produção de vacinas autógenas, que são produzidas a partir do isolado viral circulante em cada rebanho, individualmente.

A proteção dos suínos contra a influenza também é um programa de proteção à saúde humana, e a vigilância dos vírus da influenza deve ser feita de maneira coordenada, acompanhando a disseminação dos vírus de origem humana para animais e vice e versa, permitindo a detecção de novos rearranjos virais e atualizações vacinais para cada região. Para prevenir o surgimento de uma nova pandemia pelo vírus da influenza, é fundamental monitorar a deriva genética, as coinfeções com diferentes subtipos de virais em granjas de suínos e o surgimento de novos rearranjos virais. Para isso, é necessário desenvolver pesquisas voltadas para o isolamento viral, subtipagem e sequenciamento genético dos vírus circulantes nas granjas.

10. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, D. J. An overview of the epidemiology of avian influenza. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5637–5644, 2007. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.10.051

ALLERSON, M. W.; CARDONA, C. J.; TORREMORELL, M. Indirect transmission of influenza A virus between pig populations under two different biosecurity settings. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e67293, 2013a. DOI: 10.1371/journal.pone.0067293

ALLERSON, M.; Deen, J.; Detmer, S. E. et al. The impact of maternally derived immunity on influenza A virus transmission in neonatal pig populations. **Vaccine**, v. 31, n. 3, p. 500–505, 2013b. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.023

ALVAREZ, J.; SARRADELL, J.; KERKAERT, B. et al. Association of the presence of influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sow farms with post-weaning mortality. **Preventive veterinary medicine**, v. 121, n. 3–4, p. 240–245, 2015. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2015.07.003.

AMASS DVM, S. F.; KIRK CLARK DVM, L. Biosecurity considerations for pork production units. **J Swine Health Prod**, v.7, p 217–28, 1999.

AMARAL, A. L.; SILVEIRA, P. R. S.; LIMA, G. J. M. M. Boas Práticas de Produção de Suínos. **Embrapa Suínos e Aves - Circular Técnica** 50, 2006.

BARCELLOS, D. E. S. N.; BOROWSKI, S. M.; GHELLER, N. B.; SANTI, M.; MORES, T. J. Relação entre ambiente, manejo e doenças respiratórias em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 87–93, 2008a.

BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, T. J.; SANTI, M.; GHELLER, N. B. Avanços em programas de biosseguridade para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 33–46, 2008b.

BIONDO, N.; SCHAEFER, R.; GAVA, D.; CANTAO, M. E.; SILVEIRA, S.; MORES, M. A. Z.; ZANELLA, J. R. C.; BARCELLOS, D. E. S. N. Genomic analysis of influenza A vírus from captive wild boars in Brazil reveals a human-like H1N2 influenza virus. **Vet Microbiology**, v. 168, p. 34–40, 2014.

BOSWORTH, B.; Erdman, M. M.; Stine, D. L. et al. Replicon particle vaccine protects swine against influenza. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 33, n. 6, p. e99–e103, 2010. DOI: 10.1016/j.cimid.2010.05.002

BØTNER, A.; BELSHAM, G. J. Virus survival in slurry: analysis of the stability of foot-and-mouth disease, classical swine fever, bovine viral diarrhoea and swine influenza viruses. **Veterinary microbiology**, v. 157, n. 1–2, p. 41–49, 2012. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.12.010

BOTTOMS, K.; POLJAK, Z.; DEWEYET, C. al. Evaluation of external biosecurity practices on southern Ontario sow farms. **Preventive veterinary medicine**, v. 109, n. 1–2, p. 58–68, 2013. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2012.08.013

BRAND, M. W.; SOUZA, C. K.; GAUGER, P. et al. Biomarkers associated with vaccine-associated enhanced respiratory disease following influenza A virus infection

in swine. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 273, n. 110787, p. 110787, 2024. DOI: 10.1016/j.vetimm.2024.110787

BRENNAN, M. L.; CHRISTLEY, R. M. Biosecurity on cattle farms: A study in north-west England. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e28139, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0028139

BROCKMEIER, S. L.; HALBUR, P. G.; THACKER, E. L. Porcine Respiratory Disease Complex. Em: BROGDEN, K. A.; GUTHMILLER, J. M. (Eds.). **Polymicrobial Diseases**. Washington, DC, USA: ASM Press, p. 231–258, 2014.

CADOR, C.; Hervé, S.; Andraud, M. et al. Maternally-derived antibodies do not prevent transmission of swine influenza A virus between pigs. **Veterinary research**, v. 47, n. 1, p. 86, 2016. DOI: 10.1186/s13567-016-0365-6

CAPPUCCIO, J. A.; PENA, L.; DIBARBORA, M.; RIMONDI, A.; PINEYRO, P.; INSARRALDE, L. et al. Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a non-contemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. **The Journal of general virology**, v. 92, n. Pt 12, p. 2871–2878, 2011. DOI: 10.1099/vir.0.036590-0

CHAE, C. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. J.* 212, 1–6, 2016.

CHAMBA PARDO, F. O.; ALLERSON, M. W.; CULHANE, M. R. et al. Effect of influenza A virus sow vaccination on infection in pigs at weaning: A prospective longitudinal study. **Transboundary and emerging diseases**, v. 68, n. 1, p. 183–193, 2021. DOI: 10.1111/tbed.13688

CHIAPPONI, C.; ZANNI, I.; GARBARINO, C. et al. Comparison of the usefulness of the CACO-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza A viruses. **Journal of virological methods**, v. 163, n. 1, p. 162–165, 2010. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.09.017

CLEVELAND, C. A. DENICOLA, A.; DUBEY, J. P. et al. Survey for selected pathogens in wild pigs (*Sus scrofa*) from Guam, Mariana Islands, USA. **Veterinary microbiology**, v. 205, p. 22–25, 2017. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.05.001

CORZO, C. A., CULHANE, M., JULEEN, K., STIGGER-ROSSER, E., DUCATEZ, M. F., WEBBY, R. J., & LOWE, J. F. Active surveillance for influenza A virus among swine, midwestern United States, 2009-2011. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.6, p.954–960, 2013. DOI: 10.3201/eid1906.121637

CULHANE, M. R.; DETMER, S. E. Sample types, collection, and transport for influenza A viruses of swine. **Methods in Molecular Biology**, v. 1161, p. 259-263, 2014.

CULHANE, M.; GARRIDO-MANTILLA, J.; TORREMORELL, M. Specimen types, collection, and transport for influenza A viruses of swine. Em: **Methods in Molecular**

Biology. New York, NY: Springer US, p. 273–280, 2020. DOI: 10.1007/978-1-0716-0346-8_19

da SILVA ANDRADE, J.; Loiko, M. R.; Schmidt, C.; Vidaletti, M. R.; Lopes, B. C.; Cerva, C.; Varela, A. P. M.; Tochetto, C.; Maciel, A. L. G.; Bertagnolli, A. C.; Rodrigues, R. O.; Roehe, P. M.; Lunge, V. R.; Mayer, F. Q. Molecular survey of porcine respiratory disease complex pathogens in Brazilian wild boars. **Preventive veterinary medicine**, v. 206, n. 105698, p. 105698, 2022. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2022.105698

DAVID, E. S.; DAVID, L. S.; LESLIE, D. S. Influenza. In: DAVID, E. S.; MARTINE, B.; CATHERINE, M. L.; LARRY, R. M.; VENUGOPAL, N.; DAVID, L. S. **Diseases of poultry**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, p. 210–256. 2020.

DEBLANC, C.; GORIN, S.; QUÉGUINER, S. et al. Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* modifies outcomes of infection with European swine influenza virus of H1N1, but not H1N2, subtype. **Veterinary microbiology**, v. 157, n. 1–2, p. 96–105, 2012. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.12.027

DEE, S. A.; JOO, H. S.; PIJOAN, C. **Controlling the spread of PRRS virus in the breeding herd through management of the gilt pool**. *Swine Heal*. [s.l.], 1995.

DETMER, S.; GRAMER, M.; GOYAL, M. et al. Diagnostics and surveillance for swine influenza. **Current Topics in Microbiology and Immunology** 370: 85–112, 2013.

DIAS, A. S. et al. Detection and characterization of influenza A virus endemic circulation in suckling and nursery pigs originating from vaccinated farms in the same production system. *Viruses*, v. 16, n. 4, p. 626, 2024. DOI: 10.3390/v16040626.

DIAZ, A.; PEREZ, A.; SREEVATSAN, S. et al. Association between influenza A virus infection and pigs subpopulations in endemically infected breeding herds. **PLoS one**, v. 10, n. 6, p. e0129213, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0129213

DIAZ, A.; MARTHALER, D.; CORZO, C. et al. Multiple genome constellations of similar and distinct influenza A viruses co-circulate in pigs during epidemic events. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 11886, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-11272-3

DÍAZ, J. A. D.; FITZGERALD, R. M.; SHALLOO, L. et al. Financial analysis of herd status and vaccination practices for porcine reproductive and respiratory syndrome virus, swine influenza virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae* in farrow-to-finish pig farms using a bio-economic simulation model. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, 2020. DOI: 10.3389/fvets.2020.556674

DONOVAN, T. S. The role of influenza on growing pig performance. Em: **Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference**. [s.l.]. p. 97–98, 2005.

DUCATEZ, M. F.; HAUSE, B.; STIGGER-ROSSER, E.; DARNELL, D.; CORZO, C. Multiple reassortment between pandemic (H1N1) 2009 and endemic Influenza

viruses in pigs, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1624-1629, 2011. DOI: 10.3201/1709.110338

ER, C.; Skjerve, E.; Brun, E. et al. Occurrence and spread of influenza A(H1N1)pdm09 virus infection in Norwegian pig herds based on active serosurveillance from 2010 to 2014. **Epidemiology and infection**, v. 144, n. 15, p. 3148–3165, 2016. DOI: 10.1017/S0950268816001424

FABLET, C.; SIMON, G.; DORENLOR, V. et al. Different herd level factors associated with H1N1 or H1N2 influenza virus infections in fattening pigs. **Preventive veterinary medicine**, v. 112, n. 3–4, p. 257–265, 2013. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.07.006

FARRINGTON, D. O.; JORGENSEN, R. D. Prevalence of Bordetella bronchiseptica in certain central Iowa. **J. Wildl. Dis.** 1976. DOI: 10.7589/0090-3558-12.4.523.

FERREIRA, M. V.; GAVA, D.; SCHAEFER, R.; PIERROZAN, R. L.; ZANELLA, J. R. C. Influenza A virus circulation in pig nurseries in the state of Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 57, 2022.

GAMBLIN, S. J.; SKEHEL, J. J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. **J Biol Chem**, v. 285, n. 37, p. 28403–28409, 2010. DOI: 10.1074/jbc.R110.129809

GARRIDO-MANTILLA, J.; Alvarez, J.; Culhane, M. et al. Comparison of individual, group and environmental sampling strategies to conduct influenza surveillance in pigs. **BMC veterinary research**, v. 15, n. 1, 2019. DOI: 10.1186/s12917-019-1805-0

GARZA-MORENO, L.; SEGALÉS, J.; PIETERS, M. et al. Acclimation strategies in gilts to control Mycoplasma hyopneumoniae infection. **Veterinary microbiology**, v. 219, p. 23–29, 2018. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.04.005

GAUGER, P. C.; Vincent, A. L.; Loving, C. L. et al. Enhanced pneumonia and disease in pigs vaccinated with an inactivated human-like (δ -cluster) H1N2 vaccine and challenged with pandemic 2009 H1N1 influenza virus. **Vaccine**, v. 29, n. 15, p. 2712–2719, 2011. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.082

GAUGER, P. C.; Vincent, A. L.; Loving, C. L. et al. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. **Veterinary pathology**, v. 49, n. 6, p. 900–912, 2012. DOI: 10.1177/0300985812439724

GENZOW, M.; GOODELL, C.; KAISER, T. J.; JOHNSON, W.; EICHMEYER, M. Live attenuated influenza virus vaccine reduces virus shedding of newborn piglets in the presence of maternal antibody. *Influenza Other Respir Viruses* 12(3), 353–359, 2017.

GOMAA, M. R.; KANDEIL, A.; EL-SHESHENY, R.; SHEHATA, M. M.; MCKENZIE, P. P.; WEBBY, R. J. et al. Evidence of infection with avian, human, and swine influenza viruses in pigs in Cairo, Egypt. **Archives of virology**, v. 163, n. 2, p. 359–364, 2018. DOI: 10.1007/s00705-017-3619-3

GOODELL, C. K.; PRICKETT, J.; KITTAWORNRADET A. et al. Evaluation of screening assays for the detection of influenza A virus serum antibodies in swine. **Transboundary and emerging diseases**, v. 63, n. 1, p. 24–35, 2016. DOI: 10.1111/tbed.12214

GRØNTVEDT, C. A.; ER, C.; GJERSET, B. et al. Influenza A(H1N1)pdm09 virus infection in Norwegian swine herds 2009/10: the risk of human to swine transmission. **Preventive veterinary medicine**, v. 110, n. 3–4, p. 429–434, 2013. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.02.016

HAAS, B.; AHL, B.; BÖHM, R. et al. Inactivation of viruses in liquid manure: -EN- -FR- -ES-. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 14, n. 2, p. 435–445, 1995. DOI: 10.20506/rst.14.2.844

HADEN, C.; PAINTER, T.; FANGMAN, T.; HOLTKAMP, D. Assessing production parameters and economic impact of swine influenza, PRRS and mycoplasma hyopneumoniae on finishing pigs in a large production system. **AASV Annual Meeting**, v. 2012, p. 75–76, 2012.

HANSEN, M. S., PORS, S. E., JENSEN, H. M. E. et al. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of comparative pathology**, v. 143, n. 2–3, p. 120–131, 2010. DOI: 10.1016/j.jcpa.2010.01.012

HECK, A. Biosseguridade na suinocultura: aspectos práticos. Florianópolis. Anais eletrônicos: 2005.

HENRITZI, D.; PETRIC, N. S.; LEWIS, A. et al. Surveillance of European domestic pig populations identifies an emerging reservoir of potentially zoonotic swine influenza A viruses. **Cell host & microbe**, v. 28, n. 4, p. 614–627.e6, 2020. DOI: 10.1016/j.chom.2020.07.006

ITO, T.; COUCEIRO, J. N.; KELM, S.; BAUM, L. G.; KRAUSS, S.; CASTRUCCI, M. R. et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. **J Virol**, v. 72, n. 9, p. 7367–7373, 1998. DOI: 10.1128/JVI.72.9.7367-7373.1998

JANKE, B. H. Influenza A virus infections in swine: Pathogenesis and diagnosis. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 2, p. 410–426, 2014. DOI: 10.1177/0300985813513043

JEONG, E. K.; BAE, J. E.; KIM, I. S. Inactivation of influenza A virus H1N1 by disinfection process. **American journal of infection control**, v. 38, n. 5, p. 354–360, 2010. DOI: 10.1016/j.ajic.2010.03.003

KIDA, H.; ITO, T.; YASUDA, J. et al. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. **The Journal of general virology**, v. 75 (Pt 9), n. 9, p. 2183–2188, 1994. DOI: 10.1099/0022-1317-75-9-2183

KITIKOON, P.; Nilubol, D.; Erickson, B. J. et al. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 117–128, 2006. DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.02.008

KOEN, J. A practical method for field diagnosis of swine disease. **Am J Vet Med**, S.I., v. 14. p. 468–470. 1919.

KYRIAKIS, C.S.; ROSE, N.; FONI, E.; MALDONADO, J.; LOEFFEN, W. L.; MADEC, F.; SIMON, G.; VAN REETH, K. Influenza A virus infection dynamics in swine farms in Belgium, France, Italy and Spain, 2006-2008. **Veterinary microbiology**, v. 162, n. 2–4, p. 543–550, 2013. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.11.014

LAANEN, M.; PERSOONS, D.; RIBBENS, S. et al. Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. **Veterinary journal** (London, England: 1997), v. 198, n. 2, p. 508–512, 2013. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.08.029

LAGAN, P.; HAMILL, M.; CULL, S. et al. Swine influenza A virus infection dynamics and evolution in intensive pig production systems. **Virus evolution**, v. 10, n. 1, p. veae017, 2024. DOI: 10.1093/ve/veae017

LAMBERT, M.-È.; POLJAK, Z.; ARSENAULT, J. et al. Epidemiological investigations in regard to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Quebec, Canada. Part 1: Biosecurity practices and their geographical distribution in two areas of different swine density. **Preventive veterinary medicine**, v. 104, n. 1–2, p. 74–83, 2012. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2011.12.004

LI, Y.; EDWARDS, J.; HUANG, B. et al. Risk of zoonotic transmission of swine influenza at the human-pig interface in Guangdong Province, China. **Zoonoses and public health**, v. 67, n. 6, p. 607–616, 2020. DOI: 10.1111/zph.12723

LI, Y.; ROBERTSON, I. The epidemiology of swine influenza. **Animal diseases**, v. 1, n. 1, p. 21, 2021. DOI: 10.1186/s44149-021-00024-6

LOEFFEN, W. L. A.; Heinen, P. P.; Bianchi, A. T. et al. Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 92, n. 1–2, p. 23–35, 2003. DOI: 10.1016/s0165-2427(03)00019-9

LOEFFEN, W. L. HUNNEMAN, W. A.; QUAK, J.; VERHEIJDEN, J. H.; STEGEMAN, J. A. Population dynamics of swine influenza virus in farrow-to-finish and specialised finishing herds in the Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1–2, p. 45–50, 2009. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.01.004

LOPEZ-MORENO, G.; GARRIDO-MANTILLA, J.; SANHUEZA, J. M. et al. Evaluation of dam parity and internal biosecurity practices in influenza infections in piglets prior to weaning. **Preventive veterinary medicine**, v. 208, n. 105764, p. 105764, 2022. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2022.105764

LOPEZ-MORENO, G.; SCHMITT, C.; SPRONK, T. et al. Evaluation of internal farm biosecurity measures combined with sow vaccination to prevent influenza A virus infection in groups of due-to-wean pigs. **BMC veterinary research**, v. 18, n. 1, 2022b. DOI: 10.1186/s12917-022-03494-z

MA, W.; RICHT, J. A. Swine influenza vaccines: current status and future perspectives. **Animal health research reviews**, v. 11, n. 1, p. 81–96, 2010. DOI: 10.1017/S146625231000006X

MA, W. Swine influenza virus: Current status and challenge. **Virus research**, v. 288, n. 198118, p. 198118, 2020.

MAES, D.; SIBILA, M.; PIETERS, M. et al. Review on the methodology to assess respiratory tract lesions in pigs and their production impact. **Veterinary research**, v. 54, n. 1, 2023. DOI: 10.1186/s13567-023-01136-2

MASTIN, A.; ALARCON, P.; PFEIFFER, D. et al. Prevalence and risk factors for swine influenza virus infection in the English pig population. **PLoS currents**, v. 3, p. RRN1209, 2011. DOI: 10.1371/currents.RRN1209

MENG, X. J.; LINDSAY, D. S.; SRIRANGANATHAN, N. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 2697–2707, 2009. DOI:10.1098/rstb.2009.0086.

MESSIER, S.; HIGGINS, R.; DE HERDT, P.; DOM, P.; DUCATELLE, R.; DESMIDT, M. Streptococcus suis infections in birds. **Avian Pathol.** 23, 721–724, 1994. DOI: 10.1080/03079459408419040.

MORÉS, M. A. Z.; OLIVEIRA FILHO, J. X.; REBELATTO, R.; KLEIN, C. S.; BARCELLOS, D. E. N.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N. Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. **Pesquisa veterinária brasileira [Brazilian journal of veterinary research]**, v. 35, n. 8, p. 725–733, 2015. DOI: 10.1590/S0100-736X2015000800004

NATHUES, H.; CHANG, Y. M.; WIELAND, B. et al. Herd-level risk factors for the seropositivity to Mycoplasma hyopneumoniae and the occurrence of enzootic pneumonia among fattening pigs in areas of endemic infection and high pig density. **Transboundary and emerging diseases**, v. 61, n. 4, p. 316–328, 2014. DOI: 10.1111/tbed.12033

NEIRA, V.; RABINOWITZ, P.; RENDAH, A.; PACCHA, B.; GIBBS, S. G.; TORREMORELL, M. Characterization of Viral Load, Viability and Persistence of Influenza A Virus in Air and on Surfaces of Swine Production Facilities. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146616, 2016.

NELSON, M. I.; WENTWORTH, D. E.; CULHANE, M. R.; VINCENT, A. L.; VIBOUD, C.; LAPOINTE, M. P. et al. Introductions and evolution of human-origin seasonal influenza A viruses in multinational swine populations. **J Virol**, v. 88, n. 17, p. 10110–10119, 2014. DOI: 10.1128/JVI.01080-14

NELSON, M. I.; SCHAEFER, R.; GAVA, D.; CANTAO, M. E.; CIACCI-ZANELLA, J. R. Influenza A viruses of human origin in swine, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 8, p. 1339–1347, 2015a. DOI: 10.3201/eid2108.141891

NELSON, M., VIBOUD, C., VINCENT, A. et al. Global migration of influenza A viruses in swine. **Nature communications**, v. 6, p. 6696, 2015. DOI: 10.1038/ncomms7696

NEUMANN, E. J.; HALL, W.F. Disease Control, Prevention, and Elimination. In: ZIMMERMAN, J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W.; ZHANG, J. (Ed.) **Diseases of Swine**. 11th. Ames: John Wiley & Sons, 2019. p. 123-157.

OLSEN, C. W.; CAREY, S.; HINSHAW, L.; KARASIN, A. I. Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States. **Archives of Virology**, v. 145, n. 7, p. 1399-419, 2000. DOI: 10.1007/s007050070098

OLSEN, C. W. et al. Influenza virus. In ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER L. A.; RAMIREZ A.; SCHWARTZ K. J.; STEVENSON, G. W. et al. (ed.) **Diseases of Swine**, New Jersey, United States, Wiley-Blackwell: Hoboken, 10th ed. p. 557–71, 2012.

OPRIESSNIG, T.; GIMÉNEZ-LIROLA, L. G.; HALBUR, P. G. Polymicrobial respiratory disease in pigs. **Animal health research reviews**, v. 12, n. 2, p. 133–148, 2011. DOI: 10.1017/S1466252311000120

OVSYANNIKOVA, I. G.; WHITE, S. J.; Albrecht R. A. et al. Turkey versus guinea pig red blood cells: Hemagglutination differences alter hemagglutination inhibition responses against influenza A/H1N1. **Viral immunology**, v. 27, n. 4, p. 174–178, 2014. DOI: 10.1089/vim.2013.0111

PAPATSIROS, V. G.; Papakonstantinou, G. I.; Meletis, E. et al. Seroprevalence of swine influenza A virus (swIAV) infections in commercial farrow-to-finish pig farms in Greece. **Veterinary sciences**, v. 10, n. 10, 2023. DOI: 10.3390/vetsci10100599

PETRO-TURNQUIST, E.; PEKAREK, M. J.; WEAVER, E. A. Swine influenza A virus: challenges and novel vaccine strategies. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 14, p. 1336013, 2024.

RAJAO, D. S.; Anderson, T. K.; Gauger, P. C. et al. Pathogenesis and vaccination of influenza A virus in swine. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 385, p. 307–326, 2014. DOI: 10.1007/82_2014_391

RAJAO, D. S.; SANDBULTE, R. M.; GAUGER, P. C. et al. Heterologous challenge in the presence of maternally-derived antibodies results in vaccine-associated enhanced respiratory disease in weaned piglets. **Virology**, v. 491, p. 79–88, 2016. DOI: 10.1016/j.virol.2016.01.015

RAJAO, D. S.; VINCENT, A. L.; PEREZ, D. R. Adaptation of human influenza viruses to swine. **Frontiers in veterinary science**, v. 5, p. 347, 2019. DOI: 10.3389/fvets.2018.00347

RECH, R. R.; GAVA, D.; SILVA, M. C. et al. Porcine respiratory disease complex after the introduction of H1N1/2009 influenza virus in Brazil. **Zoonoses and public health**, v. 65, n. 1, 2018. DOI: 10.1111/zph.12424

RICHT, J. A.; LAGER, K. M.; CLOUSER, D. F. et al. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the detection and differentiation of north American swine influenza viruses. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 16, n. 5, p. 367–373, 2004. DOI: 10.1177/104063870401600501

ROSE, N.; Hervé, S.; Eveno, E. et al. Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pig farms: evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and reassortment events. **Veterinary research**, v. 44, p. 72, 2013. DOI: 10.1186/1297-9716-44-72

RYT-HANSEN, P.; Larsen, I.; Kristensen, C. S. et al. Longitudinal field studies reveal early infection and persistence of influenza A virus in piglets despite the presence of maternally derived antibodies. **Veterinary research**, v. 50, n. 1, p. 36, 2019b. DOI: 10.1186/s13567-019-0655-x

RYT-HANSEN, P.; PEDERSEN, A. G.; LARSEN, I. et al. Acute Influenza A virus outbreak in an enzootic infected sow herd: Impact on viral dynamics, genetic and antigenic variability and effect of maternally derived antibodies and vaccination. **PLoS one**, v. 14, n. 11, p. e0224854, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0224854

RYT-HANSEN, P.; HENRIETTE, G. N.; SIMON, S. S. et al. The role of gilts in transmission dynamics of swine influenza virus and impacts of vaccination strategies and quarantine management. **Porcine health management**, v. 8, n. 1, p. 19, 2022. DOI: 10.1186/s40813-022-00261-2

SAADE, G.; DEBLANC, C.; BOUGON, J. et al. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. **Veterinary research**, v. 51, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s13567-020-00807-8

SCHAEFER, R.; ZANELLA, J. R. C.; BRENTANO, L.; VINCENT, A. L.; RITTERBUSCH, G. A.; CARON, L.; MORES, N. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 761-767, 2011.

SCHAEFER, R.; RECH, R. R.; SILVA, M. C. et al. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa veterinária brasileira [Brazilian journal of veterinary research]**, v. 33, n. 1, p. 61–73, 2013. DOI: 10.1590/S0100-736X2013000100012

SCHAEFER, R.; RECH, R. R.; GAVA, D.; CANTAO, M. E.; SILVA, M. C. da; SILVEIRA, S.; ZANELLA, J. R. C. A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, n. 1, p. 29-38, 2015.

SCHAEFER, R.; GAVA, D.; ZANELLA, J. R. C. **Como identificar e controlar a influenza em suínos**. Concórdia. Embrapa Suínos e Aves. ISSN 01016245; 207. 2019.

SCHOLTISSEK, C. Pigs as ‘mixing vessels’ for the creation of new pandemic influenza A viruses. **Med Principles Pract**, v. 2, n. 2, p. 65–71, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1159/000157337>

SHARMA, A.; ZELLER, M. A.; LI, G.; HARMON, K. M.; ZHANG, J.; HOANG, H.; ANDERSON, T. K.; VINCENT, A. L.; GAUGER, P. C. Detection of live attenuated influenza vaccine virus and evidence of reassortment in the U.S. swine population. *J Vet Diagn Invest*, 2020. DOI: 1040638720907918.

SHAW, M. & PALESE, P. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. **Fields Virology**. Philadelphia. Lippincott-Raven Press. 2007. p. 1647-1689.

SILVA, A. P. S. P.; COSTA, E. F.; SOUSA E SILVA, G. et al. Biosecurity practices associated with influenza A virus seroprevalence in sows from southern Brazilian breeding herds. **Preventive veterinary medicine**, v. 166, p. 1–7, 2019. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2019.02.013

SIMON-GRIFÉ, M.; MARTÍN-VALLS, G. E.; VILAR, M. J. et al. Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. **Veterinary microbiology**, v. 149, n. 1–2, p. 56–63, 2011. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.10.015

SOBESTIANSKY J. **Sistema Intensivo de Produção de Suínos: Programa de Biossegurança**. Goiânia: Gráfica art3, 107p. 2002.

SOBESTIANSKY, J. **Doenças dos suínos**. 2. ed. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007.

SOUZA, C. K.; Rajão, D. S.; Sandbulte, M. R. et al. The type of adjuvant in whole inactivated influenza A virus vaccines impacts vaccine-associated enhanced respiratory disease. **Vaccine**, v. 36, n. 41, p. 6103–6110, 2018. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.08.072

SZEREDI, L.; CSÁGOLA, A.; DÁN, Á.; DENCISO, L. Vascular lesions and pneumonia in a pig fetus infected by porcine circovirus type 2. **Acta veterinaria Hungarica**, v. 63, n. 2, p. 215–222, 2015. DOI: 10.1556/004.2015.019

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. DOI: 10.1128/JCM.39.7.2525-2530.2001

TONG, S.; ZHU, X.; LI, Y.; SHI, M.; ZHANG, J.; BOURGEOIS, M.; et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, e1003657. 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003657

TORREMORELL, M.; JUAREZ, A.; CHAVEZ, E. et al. Procedures to eliminate H3N2 swine influenza virus from a pig herd. **The veterinary record**, v. 165, n. 3, p. 74–77, 2009. DOI: 10.1136/vetrec.165.3.74

TORREMORELL, M.; ALLERSON, M.; CORZO, C.; DIAZ, A.; GRAMER, M. Transmission of influenza A virus in pigs. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. Suppl. 1, p. 68-84, 2012. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2011.01300.x

VAN REETH, K.; VINCENT, A. L. Influenza Viruses. In: ZIMMERMAN, J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W.; ZHANG, J. (Ed.) **Diseases of Swine**. 11th. Ames: John Wiley & Sons, 2019. p. 576-593.

VINCENT, A. L.; MA, W.; LAGER, K. M.; JANKE, B. H.; WEBBY, R. J.; GARCIA-SASTRE, A.; RICHT, J. A. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. *Vaccine* 25(47), 7999–8009, 2007.

VINCENT, A. L.; MA, W.; LAGER, K. M. et al. Swine influenza viruses a North American perspective. **Advances in virus research**, v. 72, p. 127–154, 2008. DOI: 10.1016/S0065-3527(08)00403-X

VINCENT, A. L., MA, W., LAGER, K. M., RICHT, J. A., JANKE, B. H., SANDBULTE, M. R., et al. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease. *J. Virol.* 86, 10597–10605, 2012. doi: 10.1128/JVI.01439-12

VINCENT, A. L. Perez, D. R.; Rajao, D. et al. Influenza A virus vaccines for swine. **Veterinary microbiology**, v. 206, p. 35–44, 2017. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.11.026

WHITE, L.A. TORREMORELL, M.; CRAFT, M. E. Influenza A virus in swine breeding herds: combination of vaccination and biosecurity practices can reduce likelihood of endemic piglet reservoir. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 138, p. 55-69, 2017.

WIRIYARAT, W.; Lerdsamran, H.; Pooruket, P. al. Erythrocyte binding preference of 16 subtypes of low pathogenic avian influenza and 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses. **Veterinary microbiology**, v. 146, n. 3–4, p. 346–349, 2010. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.05.031

YANG, J.-R. CHUAN-YI, K.; HUANG, H. al. Newly emerging mutations in the matrix genes of the human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses reduce the detection sensitivity of real-time reverse transcription-PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 1, p. 76–82, 2014. DOI: 10.1128/JCM.02467-13

ZANELLA, J. R. C.; MORÉS, N.; BARCELLOS, D. E. S. N. DE. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 443–453, 2016. DOI: 10.1590/S0100-204X2016000500004

ZHANG, J.; HARMON, K. M. RNA extraction from swine samples and detection of influenza A virus in swine by real-time RT-PCR. Em: **Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Springer US, p. 295–310, 2020. DOI: 10.1007/978-1-0716-0346-8_21

ZIMMERMAN, J. J.; YOON, K. J.; PIRTLE, E. C. et al. Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. **Veterinary microbiology**, v. 55, n. 1–4, p. 329–336, 1997. DOI: 10.1016/s0378-1135(96)01320-x