

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Nágila Rocha Aguilar

**Detecção do vírus Influenza A em fezes, secreção nasal e amostras ambientais: uma abordagem abrangente para amostras de campo de suínos.**

Belo Horizonte  
2024

Nágila Rocha Aguilar

**Detecção do vírus Influenza A em fezes, secreção nasal e amostras ambientais: uma abordagem abrangente para amostras de campo de suínos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

**Área de concentração:** Medicina Veterinária Preventiva

**Linha de Pesquisa:** Diagnóstico, epidemiologia e controle das doenças dos animais.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra Erica Azevedo Costa

**Coorientadores:** Dra Bruna Coelho Lopes

Belo Horizonte  
2024

A283d      Aguilar, Nágila Rocha, 1996 -  
Detecção do vírus Influenza A em fezes, secreção nasal e amostras ambientais: uma abordagem abrangente para amostras de campo de suínos/ Nágila Rocha Aguilar. -2024.  
102f: il.

Orientadora: Erica de Azevedo Costa  
Coorientadora: Bruna Coelho Lopes

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva  
Inclui Bibliografia  
Inclui Anexos

1. Suíno - Doenças - Teses - 2. Vírus da Influenza - Teses - I. Costa, Erica de Azevedo - II. Lopes, Bruna Coelho - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária IV. Título.

CDD – 636.089 26

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - NÁGILA ROCHA AGUILAR**

Às 09:00 horas do dia 05 de fevereiro de 2024, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

**“DETECÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA A EM FEZES, SECREÇÃO NASAL E AMOSTRAS AMBIENTAIS: UMA ABORDAGEM ABRANGENTE PARA AMOSTRAS DE CAMPO DE SUÍNOS.”**

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina Veterinária Preventiva**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Erica Azevedo Costa**, após informar o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

<b>Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)</b>	<b>Aprovado(a)</b>	<b>Reprovado(a)</b>
Erica Azevedo Costa	x	
Bruna Coelho Lopes	x	
Roberto Mauricio Carvalho Guedes	x	
Ana Luiza Soares Fraiha	x	
Beatriz Senra Alvares da Silva Santos	x	
Sabrynna Brito Oliveira	x	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

<b>Aprovado(a)</b>	x	<b>Reprovado(a)</b>	
--------------------	---	---------------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 05 de fevereiro de 2024.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Erica Azevedo Costa, Professora do Magistério Superior**, em 05/02/2024, às 13:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Beatriz Senra Alvares da Silva Santos, Usuário Externo**, em 06/02/2024, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Coelho Lopes, Usuário Externo**, em 06/02/2024, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sabryna Brito Oliveira, Usuário Externo**, em 06/02/2024, às 21:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Luiza Soares Fraiha, Usuária Externa**, em 20/02/2024, às 15:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Mauricio Carvalho Guedes, Professor do Magistério Superior**, em 21/02/2024, às 22:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2991697** e o código CRC **6FD60914**.

## AGRADECIMENTOS

Vou iniciar meus agradecimentos citando uma frase da música do SEVENTEEN que define este ano em que dediquei a este projeto: "Posso dizer com orgulho que não estou sozinha". Chegar ao final do mestrado foi possível graças à generosidade e apoio de muitas pessoas, às quais sou profundamente grata.

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sei que não estou sozinha nessa trajetória. A minha família, em especial aos meus pais, cujo esforço foi fundamental para que eu alcançasse este momento, e aos meus irmãos pelo constante apoio e orações.

Quero estender meus agradecimentos as minhas “mães científicas”: minha orientadora de milhões Proof. Erica, que com paciência e amor, me guiou desde o período da residência até este ano no mestrado, sempre compartilhando suas ideias “de milhões” para dominar o mundo. A Bruna minha coorientada, pelos ensinamentos e a generosidade ao ajudar os “pobres de reagentes”. Agradeço também à Bia, cuja paciência infinita foi crucial para impulsionar adiante este projeto.

Expresso minha gratidão à Brenda, que tornou o mestrado mais agradável; obrigada pela amizade valiosa. A Sabryna e a Bruna, meu reconhecimento pela ajuda incansável em todos os momentos. A todos do laboratório LPVA que me ajudaram. Aos funcionários e veterinários da granja onde realizamos as coletas, agradeço pela colaboração e paciência com nosso grupo. A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigado. Estamos todos juntos nessa conquista.

## RESUMO

O vírus da Influenza A (IAV) de origem suína representa uma ameaça global, afetando tanto a saúde animal quanto a economia na indústria suinícola. Em suínos, provoca doença respiratória aguda, resultando em perdas econômicas substanciais devido à redução no ganho de peso, custos de tratamento e prolongamento do tempo até o abate. O RNA do vírus influenza é constantemente detectado em fezes de aves e há relatos esporádicos de detecção em humanos. Em ambos, a replicação viral nas células intestinais, permite a transmissão fecal-oral. Em suínos, a presença viral nas fezes sugere o trato intestinal como uma via de infecção, contribuindo para a disseminação do vírus entre os animais e no ambiente. O propósito deste estudo consiste em identificar a presença do vírus Influenza A nas fezes de suínos naturalmente infectados em uma granja de ciclo completo, ao mesmo tempo em que investiga a capacidade de disseminação do vírus no ambiente. Foi realizada a coleta de um total de 702 amostras, abrangendo suabes nasal e retal, soro, amostras de leite/colostró de matrizes lactantes na maternidade, e amostras ambientais, incluindo efluentes brutos e tratados. Essas amostras foram obtidas em uma granja comercial situada em Urucânia, Minas Gerais, que apresenta histórico recorrente de doença respiratória. Realizamos a técnica de transcriptase reversa precedida de PCR quantitativo (RT-qPCR) para detectar a proteína M do vírus influenza A, além de RT-PCR nested para a identificação dos subtipos virais. No caso das amostras de soro, conduzimos o teste de inibição de hemaglutinação (HI) para avaliar a titulação de anticorpos neutralizantes. As amostras positivas de suabe retal, nasal e ambientais foram inoculadas em monocamada celular, para avaliar a viabilidade viral. Detectamos a presença do RNA do vírus influenza A em 27% (67/244) das amostras de suabe nasal, 22% (54/245) das amostras de suabe retal e em 31% (4/13) das amostras ambientais. Uma taxa de positividade de 20% (12/59) foi constatada nas amostras de leite e colostró de matrizes lactantes na maternidade. O isolamento viral foi possível em amostras de suabe retal, suabe nasal e efluente bruto. Nosso estudo destaca preocupações significativas, especialmente em relação à transmissão do vírus entre os suínos. A persistência do vírus nas fezes pode ser um fator contribuinte para os problemas recorrentes de influenza A em granjas, conforme evidenciado pela contaminação ambiental constante. Além disso, a infecção precoce dos leitões na maternidade, através das fezes e do leite das matrizes, pode ser um componente adicional desse cenário complexo.

**PALAVRAS CHAVE:** Dinâmica de transmissão, efluentes, fezes, Influenza suína, leite, RT-qPCR, vigilância epidemiológica

## ABSTRACT

The swine-origin Influenza A virus poses a global threat, impacting both animal health and swine industry's economy. The infection induces acute respiratory disease in pig, resulting in substantial economic losses, including reduced weight gain, treatment costs, and extended time to slaughter. The presence of virus's RNA has been observed in human feces, and in birds, viral replication in intestinal cells allows fecal-oral transmission. Viral presence in swine feces emphasizes the intestinal tract as an entry and infection route, contributing to virus spread among animals and in the environment. This study aims to identify the presence of Influenza A virus in the feces of naturally infected swine from a complete-cycle farm while investigating the virus's dissemination capacity in the environment. A total of 702 samples were collected, including nasal and rectal swabs, serum, milk/colostrum samples from lactating sows in the maternity ward, and environmental samples, including raw and treated effluents. These samples were obtained from a commercial farm in Urucânia, Minas Gerais/Brazil, with a recurring history of respiratory disease. We conducted reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) to detect the influenza A virus M protein and conventional reverse transcription PCR to identify the viral subtypes. For serum samples, the hemagglutination inhibition test assessed neutralizing antibody titers. Positive samples from rectal, nasal swabs, and environmental samples were inoculated into a cell monolayer. We identified the presence of influenza A virus RNA in 27% of nasal swab samples, 22% of rectal swab samples, and 31% of environmental samples. A positivity rate of 20% was observed in milk and colostrum samples from lactating sows in the maternity ward. Viral isolation was successful for rectal swab, nasal swab, and raw effluent samples. Our study underscores significant concerns, particularly regarding virus transmission among swine. The virus's persistence in feces may contribute to recurrent influenza A issues on farms, as evidenced by constant environmental contamination. Additionally, early infection of piglets in the maternity ward, through feces and maternal milk, may be an additional component of this complex scenario.

**KEYWORDS:** Dynamics of transmission, effluents, feces, swine influenza, milk, RT-qPCR, epidemiological surveillance

---

## Lista de Figuras

---

<b>Figura 1-</b>	Estrutura do IAV, destacando suas principais proteínas e componentes: Hemaglutinina (HA), Neuraminidase (NA), Proteína de Matriz (M1), Canal de Íon (M2), Ribonucleoproteína (RNP), Polimerase Básica 2 (PB2), Polimerase Básica 1 (PB1), Polimerase Ácida (PA) e Nucleoproteína (NP). Fonte: Adaptado de Flores, 2017.	20
<b>Figura 2-</b>	Padrões de receptores de ácido siálico dos tipos $\alpha$ 2,3 e $\alpha$ 2,6 presentes em hospedeiros do vírus Influenza A. Distribuição dos receptores de ácido siálico $\alpha$ 2,3 em aves e $\alpha$ 2,6 em seres humanos. Fonte: Adaptado de Taubenberger et al., 2010	21
<b>Figura 3-</b>	Representação do ciclo de replicação do Vírus Influenza A. O diagrama esquematiza os passos cruciais do ciclo de replicação do vírus influenza A, destacando a ligação viral à célula hospedeira, entrada, replicação do RNA viral, montagem e liberação de novos vírions. Fonte: Adaptado de Hutchinson et al., 2018.	23
<b>Figura 4-</b>	Matriz com Dificuldade Respiratória e Secreção Nasal Purulenta. Fonte: Elaborado pela autora	46
<b>Figura 5-</b>	Estação de tratamento de efluentes (ETRA). A) Reator biológico. B) Lagoa para armazenar a água de reuso após o tratamento. Fonte: Elaborado pela autora	48
<b>Figura 6-</b>	Representação da estação de tratamento para reuso de água da granja estudada. 1- Biodigestor; 2-Lagoas que antecedem o reator biológico e servem para armazenar e dosar o efluente. 4- Lagoa aeróbia ou “reator biológico” conectado ao “decanter” (decantador de sólidos ou sedimentador). 5- Decanter; 6- Lagoa de polímero. 7- Lagoa de decantação. 8/9- Flotador. 10- Separadora. 12- Tanques que recebe água tratada para reuso. 13- Lagoas que servem de reservatório da água de reuso, porém nesta primeira lagoa essa água recebe aeração.14- - Lagoas que servem de reservatório da água de reuso. Fonte: Elaborado pela autora	49
<b>Figura 7-</b>	Processo de Coleta de Amostras no Ambiente da Granja. A) Coleta do efluente bruto na saída do galpão da maternidade; B) coleta do suabe retal nos leitões da maternidade; C) limpeza do úbere das matrizes; D) Coleta de leite. Fonte: Elaborado pela autora	51
<b>Figura 8-</b>	Análise de Regressão Linear entre os Valores de CT e Diluições do RNA do vírus pH1N1. A série de diluições padrão segue uma escala	

---

---

	decrecente da esquerda para a direita, iniciando com a maior concentração do padrão. A linha horizontal que atravessa todas as curvas representa o limiar para o ciclo de quantificação (Cq). Fonte: Software QuantStudio 1 Real-Time PCR System	61
<b>Figura 9-</b>	Distribuição da positividade de amplificação de RNA do Influenza A por RT-qPCR em Amostras de suabe nasal e retal de diferentes categorias.	62
<b>Figura 10-</b>	Porcentagem de amostras positivas para a amplificação do RNA do Influenza A por RT-qPCR em amostras de leite e colostro.	65
<b>Figura 11-</b>	Porcentagem de amostras positivas para os subtipos H1hu, H3 e pH1N1 utilizando a técnica de Nested RT-PCR em diferentes tipos de amostras. Fonte: Elaborado pela autora	68
<b>Figura 12-</b>	Células MDCK CCL34 (rim canino Madin-Darby). A) Controle de célula inoculado com DMEM; B) 7 passagem da amostra de suabe retal matriz com 90 dias de gestação; C) 6 passagem da amostra de suabe retal do leitão com 35 dias; D) 6 passagem da amostra de suabe retal terminação de 130 dias. As setas pretas destacam os efeitos citopáticos provocados pela influenza A, após 72 horas de inoculação. Aumento 500x.	69
<b>Figura 13-</b>	Células MDCK CCL34 (rim canino <i>Madin-Darby</i> ). As setas pretas destacam os efeitos citopáticos provocados pela infecção viral da gripe. A) Controle de célula inoculado com DMEM; B) 6 passagem da amostra de efluente do galpão de terminação de 150 dias. Aumento 500x. Fonte: Elaborado pela autora.	70
<b>Figura 14-</b>	Eletroforese em gel de agarose exibindo os resultados da reação de RT-PCR para a detecção de HA e NA nos inóculos. As amostras de 1 a 4 foram colocadas em duplicata para a HA e de 1 a 3 em duplicata para a NA, com a amostra 4 em uniplicata. A amostra 1 corresponde ao suabe nasal do animal de 60 dias; a amostra 2, inóculo de suabe retal do animal de 130 dias; a amostra 3, inóculo de suabe retal do animal de 35 dias; e a amostra 4, ao efluente bruto. Os produtos amplificados para a HA possuem aproximadamente 1800 pb e para NS 900bp, enquanto para a NA, a amplificação é de 1500 pb.	71
<b>Figura 15-</b>	Árvore filogenética molecular de várias sequências do segmento genético viral HA, incluindo a sequência da amostra de suabe nasal de um animal de 60 dias. (A/swine/pdmN1/Brazil/2023 H1N1), a amostra está destacada em vermelho. As amostras em tons de preto-cinza representam variantes norte-americanas; Em vermelho,	72

---

---

amostras brasileiras e norte-americanas da linhagem pandêmica; Em azul royal, linhagem de origem sazonal humana; Em azul lilás, outra linhagem de origem sazonal humana; E em azul médio, uma terceira linhagem de origem sazonal humana.

**Figura 16-** Árvore filogenética molecular da sequência da NA do inóculo de suabe nasal de um animal de 60 dias (A/swine/pdmN1/Brazil/2023 H1N1), destacando a amostra em vermelho. Na legenda, laranja representa a linhagem N1 clássica, azul indica a origem sazonal humana, e vermelho denota a origem pandêmica. 73

**Figura 17-** Títulos de HI nas amostras de soro de matrizes: pH1N1 (Verde Claro), H3N2 (Vermelho) e H1hu (Verde-Água). G45 – Gestantes 45 dias ; G 90 - Gestantes 90 dias ; G 114- Gestantes 114 dias ; MT - Lactantes 20 dias; LC - Leitoas chegada ; LF - Leitoas flushing A) Matrizes com 45 dias de gestação; B) Matrizes com 90 dias de gestação; C) Matrizes com 114 dias de gestação; D) Matrizes na maternidade com 20 dias de lactação; E) Leitoa chegada; F) Leitoas de Flushing 74

**Figura 18-** Títulos de HI nas Amostras de Soro dos animais da creche e recria: pH1N1 (Verde Claro), H3N2 (Vermelho) e H1hu (Verde-Água). L23 - Leitão 23 dias; L35 - Leitão 35 dias; L 45 - Leitão 45 dias. A) Leitões 23 dias; B) Leitões 35 dias; C) Animal com 45 dias; D) Animal com 60 dias. Fonte: Elaborado no programa GraphPad Prism versão 6.0 75

**Figura 19-** Titulos HI amostra de Soro dos animais da Terminação: pH1N1 (Verde Claro), H3N2 (Vermelho) e H1hu (Verde-Água). A) Animais com 100 dias; B) Animais com 130 dias; C) Animais com 150 dias. Fonte: Elaborado no programa GraphPad Prism versão 6. 76

---

---

---

### Lista de Tabelas

---

<b>Tabela 1-</b>	Número de amostras coletadas de suabe nasal, suabe retal e soro em diferentes categorias de suínos durante as duas coletas de 2023.	50
<b>Tabela 2-</b>	Quantidade e Tipos de Amostras Ambientais Coletadas	52
<b>Tabela 3-</b>	Quantidade e Tipos de Amostras de Leite Coletadas.	53
<b>Tabela 4-</b>	Sequência dos pares de primers utilizados para as reações de triagem e subtipagem das amostras de suabe retal, suabe nasal, leite e amostras ambientais.	57
<b>Tabela 5-</b>	Pares de primers empregados na amplificação dos genes NA e HA dos isolados.	59
<b>Tabela 6-</b>	Distribuição de amostras positivas de suabe nasal e retal para Influenza A - Valores totais e percentuais por categoria na granja.	62
<b>Tabela 7-</b>	Amostras Ambientais Positivas e Valores de pH.	64
<b>Tabela 8-</b>	Distribuição das amostras positivas para os subtipos de influenza pH1N1, H3N2 e H1hu em diferentes categorias de animais, juntamente com o número total de amostras testadas em cada categoria. As amostras estão agrupadas de acordo com a categoria animal.	66

---

### Lista de Apêndice

---

<b>Tabela Suplementar 1-</b>	Resultados Positivos para Influenza A na Primeira Coleta de Fevereiro de 2023	99
<b>Tabela Suplementar 2-</b>	Confirmação Positiva para Influenza A na Segunda Coleta de Agosto de 2023 em Leitões da Maternidade	101
<b>Tabela Suplementar 3-</b>	Confirmação Positiva para Influenza A nas Amostras de Leite e Colostro.	102

---

---

## Lista de Abreviaturas

---

ATAnD - Digestor Anaeróbico no Solo à Temperatura Ambiente e Sistema de Estufa  
BSA- albumina de soro bovino  
ECP - Efeito citopático  
Ct- Limite de ciclo  
CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente  
°C- grau celsius.  
DNA- Ácido Desoxirribonucleico  
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio  
DQO- Demanda Química de Oxigênio  
DMEM- *Eagle modificado por Dulbecco*  
ELISA- Ensaio por Imunoabsorção Enzimática  
ETEI – Estação de Tratamento de Efluente Industrial  
ETRA- Estação de Tratamento para Reuso de Água  
EID<sub>50</sub> - Dose Infectante por Embriões  
g- gramas  
HA – Hemaglutinina  
pH1N1 – vírus H1N1 pandêmico  
HA - Hemaglutinação  
HI – Inibição da hemaglutinação  
IAV – Vírus influenza A  
M - Proteína de matriz  
MDCK - Madin-Darby Canine kidney cells  
µm- micrômetro  
µM- micromolar  
µl- microlitro  
mM- milimolar  
mm- milímetro  
M- molar  
ml- mililitro  
NA - Neuraminidase  
NP – Nucleoproteína  
NS - Proteína não estural  
NCBI - Centro Nacional de Biotecnologia  
PVC - Circovírus suíno  
PB2 - Polimerase básica 2  
PB1 - Polimerase básica 1  
PA - Polimerase ácida  
PBS - Solução salina tamponada com fosfato  
pb – pares de base  
PoNoVs - *Norovírus* suínos  
PoSaVs - *Sapovírus* suínos  
LOD- limite de detecção  
RNA- Ácido ribonucleico  
mRNA- RNA mensageiro  
RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa Quantitativa  
RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa  
RVs – *Rotavírus*  
RVA – *Rotavírus A*

RVB – *Rotavírus B*

RVC – *Rotavírus C*

R<sup>2</sup>- coeficiente de determinação

SN – Soroneutralização

SISNAMA- Sistema Nacional do Meio Ambiente

SPF- Livres de patógenos específicos

SSS - Sistema de Processamento de Sólidos de Separação de Sólidos/Nitrificação-  
Desnitrificação/Remoção de Fósforo Solúvel

swIAV – Vírus influenza A de origem suína

SA- ácido siálico

TPCK-tripsina

TCID<sub>50</sub> -doses infecciosas de cultura de tecido

TRIG -gene interno de rearranjo triplo

UV- luz ultravioleta

UI- unidade internacional

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	17
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	17
3.1. Objetivo geral .....	17
3.2. Objetivos específicos .....	18
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
4.1. Estrutura viral .....	18
4.2. Replicação .....	20
4.3. Epidemiologia.....	23
4.4. Patogenia e sinais clínicos .....	26
4.5. Detecção do vírus influenza nas fezes de diversos animais .....	27
4.6. Detecção do vírus Influenza nas fezes de suínos.....	29
4.7. Monitoramento de Influenza A em Diferentes Tipos de Amostras.....	31
4.8. Monitoramento de Influenza A em Amostras Ambientais de Suínos .....	33
4.9. Diagnóstico.....	35
4.10. Tratamento e Controle .....	38
4.11. Tecnologias para o tratamento de efluentes de suíno .....	38
4.11.1. Tratamento biológico.....	40
4.11.2. Técnica de Tratamento de efluentes para reaproveitamento da água.....	42
4.11.3. Regulamentação Ambiental para Destinação de efluentes tratados .....	44
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
5.1. Comissão de Ética .....	45
5.2. História e Funcionamento da Granja .....	45
5.2.1. Histórico da granja .....	45
5.2.2. Sistema de tratamento da água de reuso da granja .....	46
5.2.3. Água de consumo dos animais .....	49
5.3. Coleta e Processamento das Amostras .....	49
5.3.1. Coleta das amostras .....	50
5.3.2. Recuperação e concentração das amostras ambientais.....	53
5.3.3. Curva de eficiência de amplificação do RT-qPCR .....	54
5.3.4. Extração e detecção do genoma viral .....	54
5.4. Isolamento do vírus .....	57
5.5. Sequenciamento.....	58
5.6. Análise Sorológica.....	60
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>

6.1. Avaliação da Eficiência de Amplificação .....	60
6.2. Taxa de detecção das amostras de secreção nasal e fezes .....	61
6.3. Amostras Ambientais.....	63
6.4. Taxa de detecção das amostras de leite e colostro de matrizes lactentes na maternidade .....	65
6.5. Subtipagem de vírus influenza A em amostras positivas na triagem.....	65
6.6. Isolamento das amostras positivas.....	68
6.7. Sequenciamento e Análise filogenética .....	70
6.8. Análise sorológica .....	73
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>87</b>
<b>10. INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES.....</b>	<b>99</b>

## 1. INTRODUÇÃO

1 A família *Orthomyxoviridae* engloba nove gêneros, com o gênero *Alphainfluenzavirus*  
2 sendo responsável pelo vírus da gripe. Pertencente à espécie Influenza A, esse vírus  
3 demonstra a capacidade de infectar uma ampla diversidade de aves e mamíferos. Seu genoma  
4 viral é composto por oito segmentos de RNA de fita simples, com polaridade negativa,  
5 protegidos por um envelope lipídico (ICTV, 2023).

6 Devido ao seu genoma de RNA segmentado, os vírus influenza A apresentam uma  
7 considerável variabilidade genética e antigênica. Essa variabilidade se dá por meio de dois  
8 mecanismos distintos: mutações pontuais, denominadas “*antigenic drift*”, e rearranjo no  
9 genoma viral, conhecidas como “*antigenic shift*”. Esses mecanismos têm o potencial de  
10 permitir que o vírus evite a detecção pelo sistema imunológico, o que, por sua vez, exige  
11 ajustes frequentes na formulação das vacinas. (TAUBENNERGER et al., 2010; CRISCI et  
12 al., 2013; CHEN et al., 2011). Algumas desses mecanismos podem conferir vantagens na  
13 replicação e persistência do vírus em diferentes hospedeiros e no ambiente (ABDELWHAB  
14 et al., 2023).

15 Apesar dos impactos na saúde animal, o vírus Influenza A (IAV) de origem suína é uma  
16 ameaça significativa para a economia e a saúde pública e animal em todo o mundo, devido  
17 à sua natureza zoonótica. Os subtipos de IAV são classificados com base na antigenicidade  
18 dessas duas proteínas. Atualmente, são conhecidos 18 subtipos de HA (H1 a H18) e 11  
19 subtipos de NA (N1 a N11) (CRISCI et al., 2013; TONG et al., 2013; CHEN et al., 2011).

20 Em suínos, o IAV é uma das principais causas de doença respiratória aguda, levando a  
21 consideráveis prejuízos econômicos devido à redução no ganho de peso, custos associados  
22 ao tratamento da doença e ao prolongamento do tempo necessário para atingir o peso de  
23 abate. Os surtos de IAV são marcados por uma alta taxa de ocorrência da doença (podendo  
24 afetar até 100% do rebanho). Apesar da baixa taxa de mortalidade, o IAV acarreta perdas  
25 econômicas significativas na indústria suinícola (CRISCI et al., 2013).

26 Os suínos desempenham um papel fundamental como hospedeiros atuando como “sítios  
27 de mistura”, eles são suscetíveis à infecção tanto pelo vírus de origem humana quanto aviária  
28 (TAUBENNERGER et al., 2010). A infecção pelo IAV é considerada endêmica no Brasil,  
29 e foram documentados casos da presença dos subtipos H3N2, H1hu (incluindo H1N2 e

30 H1N1 de origem sazonal humana) e pH1N1 no rebanho suíno do país (BRENTANO et al.,  
31 2002; SCHAEFER et al., 2011).

32 A presença do vírus influenza na população suína teve seus primeiros registros durante a  
33 pandemia de gripe espanhola nos Estados Unidos em 1918. O primeiro indício da circulação  
34 do IAV entre suínos ocorreu em 1957, durante a pandemia da gripe asiática. No ano de 1976,  
35 houve o primeiro isolamento do vírus em suínos, juntamente com a confirmação da  
36 transmissão suíno-humano por meio de um trabalhador de fazenda (SCHULTZ-CHERRY  
37 et al., 2013). Com o decorrer dos anos, devido à sua propensão a mutações, novos subtipos  
38 do vírus foram identificados em diversas nações. Atualmente, a influenza suína é  
39 reconhecida como uma doença comum nas Américas do Norte e do Sul, na Europa, bem  
40 como em algumas regiões da Ásia e África (OIE, 2020).

41 No Brasil, a presença do IAV de origem suína (swIAV) foi primeiramente documentada  
42 em 1930, com o primeiro isolamento do vírus ocorrendo em 1978, no estado de Minas  
43 Gerais. Durante a pandemia de IAV da linhagem pH1N1 em humanos, que ocorreu em 2009,  
44 análises sorológicas revelaram a presença da linhagem H1N1 pandêmico em suínos,  
45 sugerindo que os seres humanos poderiam ser uma possível fonte de infecção para os suínos.  
46 Após essa pandemia, o vírus pH1N1 tornou-se endêmico na população suína do Brasil  
47 (BRENTANO et al., 2002; ZANELLA et al., 2011; SCHAEFER et al., 2011).

48 A infecção pelo IAV é resultante do contato direto ou indireto, com secreções de animais  
49 infectados. O vírus se reproduz inicialmente nas células epiteliais da mucosa do trato  
50 respiratório superior, provocando a destruição dessas células em um período de 24 a 72 horas  
51 após a infecção. A infecção do trato respiratório inferior ocorre de forma mais tardia, entre  
52 72 e 96 horas após a infecção. Em mamíferos, essa infecção pode resultar em condições  
53 como pneumonia intersticial, consolidação pulmonar com coloração variando de roxa a  
54 vermelho-escura, bronquite e edema interlobular (JANKE, 2013; LYOO et al., 2014).

55 Além disso, a infecção pelo IAV também pode levar à presença do vírus nas fezes. Casos  
56 de detecção do RNA viral nas fezes de humanos e outros mamíferos foram documentados,  
57 incluindo subtipos como o H5N1 em gatos e raposas (SPICKLER et al., 2016). Nas aves, a  
58 eliminação do vírus através das fezes é um método de disseminação comum. Portanto, a  
59 identificação da viabilidade do vírus nas fezes sugere sua presença no ambiente, criando uma  
60 possível rota de transmissão fecal-oral entre os animais, incluindo seres humanos.

61 Estabelecer um sistema eficiente de coleta de amostras de fezes e amostras ambientais é  
62 crucial para aplicar testes de diagnóstico, permitindo o monitoramento do vírus e a  
63 implementação de medidas de controle apropriadas (SPICKLER et al., 2016).

64 No estudo adicional conduzido por Kawaoka et al. (1987), uma inoculação intranasal em  
65 dois suínos, administrando linhagens do IAV. Os resultados destacaram que os subtipos  
66 H1N1, H2N2 e H3N2 foram capazes de se replicar no trato respiratório desses suínos. No  
67 entanto, apenas o subtipo H3N2 de origem humana foi identificado nas amostras de fezes  
68 dos animais, sugerindo a possibilidade de replicação do vírus no intestino dos suínos. Essa  
69 descoberta enfatiza a relevância dos suínos na disseminação do vírus da influenza suína,  
70 indicando a contribuição potencial do trato intestinal na excreção viral e na transmissão  
71 desses agentes infecciosos entre os animais e no ambiente.

72 O controle de IAV em suínos é uma tarefa desafiadora, devido à grande diversidade  
73 genética do vírus, à presença simultânea de múltiplas linhagens nas granjas e à constante  
74 introdução de novas variantes provenientes de seres humanos. Ainda que haja estratégias  
75 para gerenciar a doença, como a vacinação que visa reduzir os sintomas clínicos, detectar o  
76 IAV em rebanhos que já estão endêmicos pode ser um verdadeiro desafio. A detecção e  
77 caracterização do vírus torna-se fundamental, especialmente em rebanhos que estão sob  
78 programas de controle, onde decisões relacionadas ao movimento de suínos e estratégias de  
79 vacinação precisam ser tomadas (GARRIDO-MANTILLA et al., 2019).

80 A prática da vigilância desempenha um papel fundamental no controle, eliminação e  
81 prevenção da influenza nos rebanhos suínos. Geralmente, essa vigilância ocorre de duas  
82 formas: a primeira é através da necropsia de animais e submissão de tecidos de suínos  
83 (principalmente pulmões) que apresentam sintomas clínicos da doença à laboratórios de  
84 diagnóstico. A segunda envolve a submissão regular de amostras adequadas para a idade dos  
85 suínos, como suabes nasais, fluidos orais e lenços umedecidos no úbere das matrizes na  
86 maternidade com o intuito de monitorar o status da influenza nas granjas (GARRIDO-  
87 MANTILLA et al., 2019). Vale ressaltar que a vigilância de amostras ambientais, como  
88 efluentes brutos, água de reuso da granja e água dos bebedouros dos suínos, bem como  
89 amostras biológicas dos animais, como fezes e leite das matrizes na maternidade,  
90 desempenham um papel crucial na detecção e acompanhamento do vírus da influenza em  
91 populações animais. Isso, por sua vez, contribui significativamente para as medidas de  
92 prevenção e controle da doença nas criações suínas.

93 A utilização da detecção de influenza em águas residuais humanas tem surgido como uma  
94 estratégia promissora para o monitoramento e vigilância de diversos vírus, como Influenza  
95 e SARS-CoV. Estudos indicam as vantagens desse método, pois ele oferece uma visão  
96 abrangente da circulação do vírus em uma comunidade, sendo capaz de detectar o RNA do  
97 vírus tanto em indivíduos sintomáticos quanto assintomáticos. Essa abordagem pode  
98 desempenhar um papel crucial na identificação de novos subtipos do vírus, além de mostrar  
99 que os níveis de RNA de influenza presentes em águas residuais estão relacionados com as  
100 taxas de incidência na comunidade (WOLFE et al., 2022; MERCIER et al., 2022).

101 Embora haja relatos bem documentados da presença do RNA do IAV em fezes e  
102 ambientes relacionados a seres humanos e aves, notamos a falta de pesquisas abrangentes  
103 que investiguem a detecção do IAV nas fezes e efluentes provenientes de instalações de  
104 suinocultura. Esta lacuna de conhecimento é crítica, uma vez que mesmo que o vírus tenha  
105 uma capacidade limitada de replicação no intestino, a possibilidade de que o vírus seja  
106 liberado através das fezes sugere uma potencial via de transmissão fecal-oral entre animais,  
107 com implicações inclusive para a saúde humana. Portanto, é de suma importância estabelecer  
108 um sistema eficaz e prático de coleta de amostras de fezes e do ambiente, que permita a  
109 realização de testes diagnósticos rápidos e eficazes. Isso possibilitaria o monitoramento  
110 contínuo da circulação de diferentes subtipos do vírus e na população suína. O entendimento  
111 da disseminação do vírus no ambiente é crucial para a implementação de estratégias de  
112 controle e prevenção, resguardando a saúde animal e humana de possíveis surtos e  
113 pandemias.

114

## 115 **2. HIPÓTESE**

116 Há excreção de vírus nas fezes de suínos infectados com Influenza A de origem humana,  
117 uma vez que existem relatos de detecção do RNA viral em fezes e no ambiente de seres  
118 humanos e aves. Isso sugere que há detecção de vírus no ambiente, e de forma viável, como  
119 nova forma de transmissão entre suínos.

## 120 **3. OBJETIVOS**

### 121 **3.1 Objetivo Geral**

122 O objetivo do trabalho é detectar a presença do vírus Influenza A nas fezes de suínos  
123 infectados naturalmente em granjas comerciais de ciclo completo no estado de Minas Gerais  
124 durante o ano de 2023, e também detectar a presença do vírus no ambiente.

125

### 126 **3.2 Objetivos Específicos**

127 - Adequar a técnica de RT-qPCR para detecção do RNA do IAV em amostras de fezes e  
128 ambientais (água de reuso, efluentes, água de bebedouro);

129 - Detectar a presença do RNA do IAV nas fezes dos suínos, efluentes, águas de reuso  
130 utilizado nas granjas e na água do bebedouro dos animais;

131 - Fazer o isolamento viral em cultivo celular para verificar a viabilidade do vírus  
132 identificado nas amostras de fezes e ambientais;

133

## 134 **4. REVISÃO DE LITERATURA**

135

### 136 **4.1. Estrutura viral**

137

138 A família *Orthomyxoviridae* é composta por nove gêneros, incluindo  
139 *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*,  
140 *Isavirus*, *Mykissvirus*, *Quaranjavirus*, *Sardinovirus* e *Thogotovirus*, que têm a capacidade  
141 de infectar uma variedade de espécies, tanto de mamíferos quanto de aves (ICTV, 2021).

142

143 O vírus da gripe, pertencente ao gênero *Alphainfluenzavirus* e à espécie *Influenza A*,  
144 possui partículas virais com uma forma esférica e um diâmetro que varia de 80 a 120 nm.  
145 Seu genoma consiste em oito segmentos de RNA de fita simples com polaridade negativa,  
146 envolvidos por um envelope lipídico que mede de 10 a 14 nm e contém espículas  
147 (TAUBENNERGER et al., 2010).

148

149 Cada segmento do genoma viral desempenha um papel na codificação de proteínas  
150 específicas (Figura 1). Os segmentos 1, 2 e 3 codificam as proteínas PB2 (Polimerase básica  
151 2), PB1 (Polimerase básica 1) e PA (Polimerase ácida). Por sua vez, as proteínas HA  
152 (Hemaglutinina), NP (Nucleoproteína) e NA (Neuraminidase) são codificadas pelos

153 segmentos 4, 5 e 6, respectivamente. Por fim, os segmentos 7 e 8 são responsáveis pela  
154 codificação das proteínas M (Proteína de matriz) e NS (Proteína não estrutural),  
155 respectivamente (BOUVIER et al., 2008; CRISCI et al., 2013).

156 A polimerase da influenza é um complexo heterotrimérico composto por três proteínas:  
157 PA, PB1 e PB2. Ela desempenha papéis centrais no ciclo de vida do vírus e é diretamente  
158 responsável pela síntese de RNA, tanto para a replicação viral quanto para a transcrição (LIU  
159 et al., 2009). A nucleoproteína NP é altamente expressa e desempenha um papel fundamental  
160 na síntese do nucleocapsídeo. A proteína de matriz se divide em duas partes: a proteína M1,  
161 com função estrutural, e a proteína M2, responsável pela regulação do trânsito de íons  
162 (BOUVIER et al., 2008).

163 A proteína HA é uma das mais abundantes no vírus da influenza e desempenha um papel  
164 crucial na infecção. Ela se liga aos receptores de ácido siálico  $\alpha 2,6$  e  $\alpha 2,3$  presentes nas  
165 células do trato respiratório do hospedeiro, permitindo que o vírus entre no citoplasma  
166 celular por fusão do envelope. Além disso, a HA possui atividade hemaglutinante, o que  
167 significa que o vírus pode se ligar aos receptores na superfície dos glóbulos vermelhos. Essa  
168 capacidade de hemaglutinação é usada em testes de diagnóstico para avaliar a presença de  
169 anticorpos neutralizantes no soro, impedindo a ligação entre a HA e os receptores nos  
170 glóbulos vermelhos (CRISCI et al., 2013; CHEN et al., 2011).

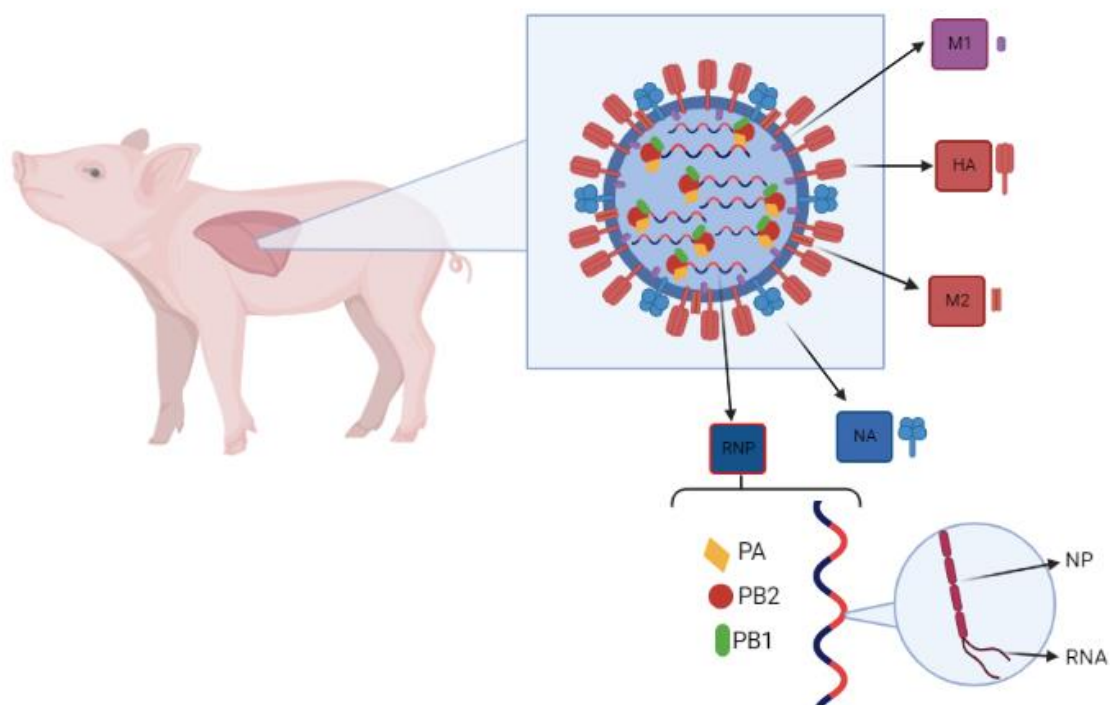
171

172 Por outro lado, a proteína NA está presente em menor quantidade na superfície viral em  
173 comparação com a HA. Sua principal função é liberar o vírus das células hospedeiras,  
174 removendo os receptores de ácido siálico da superfície celular. Além de sua função na  
175 liberação viral, a NA também remove resíduos de ácido siálico do próprio envelope do vírus,  
176 impedindo a aglutinação das partículas virais, o que aumentaria sua capacidade de infectar  
177 outras células. Acredita-se que a NA auxilie o vírus na quebra das mucinas presentes nas  
178 secreções do trato respiratório, permitindo que ele penetre nas células epiteliais respiratórias  
179 e possa desempenhar um papel na entrada do vírus nessas células. Anticorpos contra a NA,  
180 bem como inibidores da neuraminidase, podem bloquear a liberação viral, inibindo assim a  
181 replicação do vírus (BOUVIER et al., 2008).

182 As glicoproteínas HA e NA são os principais componentes do envelope do IAV. Os  
183 subtipos virais são classificados com base na antigenicidade dessas duas proteínas, e  
184 atualmente foram classificados 18 subtipos de HA (de H1 a H18) e 11 subtipos de NA (de  
185 N1 a N11) (CRISCI et al., 2013; TONG, et al 2013; CHEN et al., 2011).

186

187



188 **Figura 1:** Estrutura do IAV, destacando suas principais proteínas e componentes: Hemaglutinina (HA),  
 189 Neuraminidase (NA), Proteína de Matriz (M1), Canal de Íon (M2), Ribonucleoproteína (RNP), Polimerase  
 190 Básica 2 (PB2), Polimerase Básica 1 (PB1), Polimerase Ácida (PA) e Nucleoproteína (NP). Fonte: Adaptado  
 191 de Flores, 2017.

192

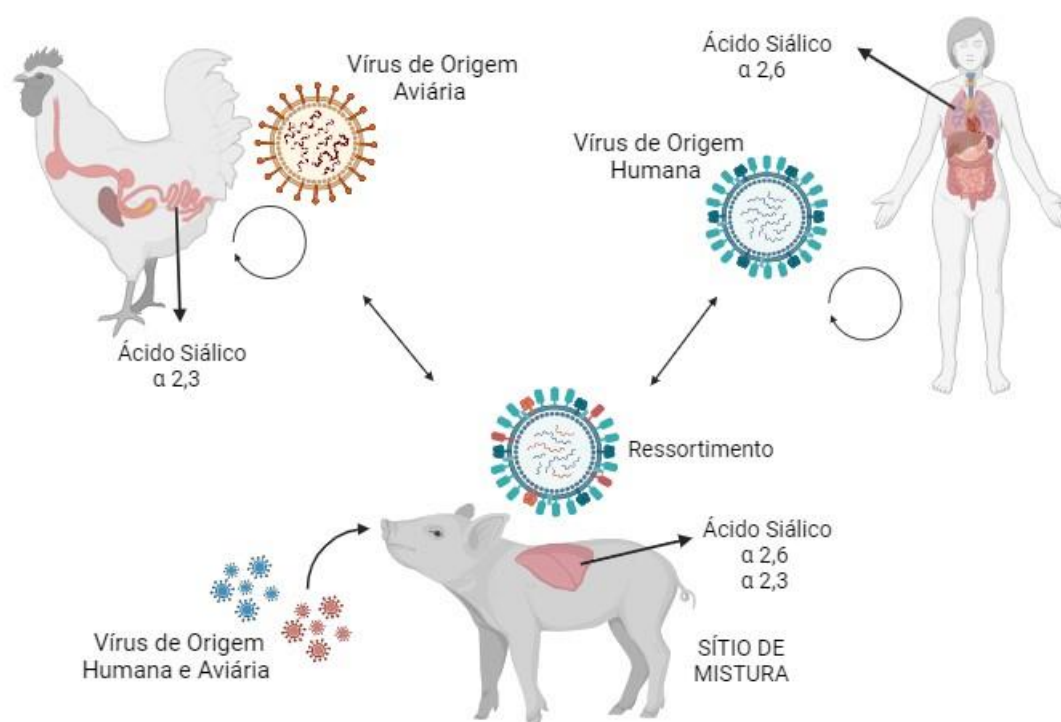
## 193 4.2. Replicação

194

195 Os vírus influenza identificam o ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) na superfície  
 196 da célula do hospedeiro. Os ácidos siálicos são açúcares ácidos compostos por nove átomos  
 197 de carbono que são frequentemente encontrados nas extremidades de várias moléculas de  
 198 glicoproteínas. Como resultado, eles estão presentes em uma ampla variedade de células e  
 199 em muitas espécies animais (BOUVIER et al., 2008).

200 O tipo de ligação ao ácido siálico é um fator determinante na seleção do hospedeiro e das  
 201 células que o vírus pode infectar. Alguns tipos de HA têm afinidade pelos receptores  $\alpha 2,6$ ,  
 202 que são comuns nas células da traqueia humana, enquanto outros preferem os  $\alpha 2,3$ , que são  
 203 predominantes nas células intestinais das aves (Figura 2) (TAUBENNERGER et al., 2010).  
 204 Os suínos, por sua vez, possuem ambos os tipos de receptores em seu trato respiratório e

205 intestinal, o que os torna suscetíveis a diferentes subtipos do vírus da influenza (NELLI et  
 206 al., 2010).



207

208 **Figura 02:** Padrões de Receptores de ácido siálico  $\alpha 2,3$  e  $\alpha 2,6$  em hospedeiros do vírus Influenza A.  
 209 Distribuição dos receptores de ácido siálico  $\alpha 2,3$  em aves e receptores  $\alpha 2,6$  em seres humanos. Fonte: Adaptado  
 210 de Taubenberger et al., 2010

211

212 A proteína HA tem uma estrutura composta por três partes idênticas. Possui duas regiões  
 213 bem distintas: uma parte longa, que parece uma espiral com três hélices alfa enroladas, e  
 214 uma parte arredondada no topo dessa espiral. Essa parte arredondada é chamada de "cabeça"  
 215 da molécula, que é o local onde a molécula se conecta ao receptor de ácido siálico. Durante  
 216 o processo de replicação do vírus, a proteína HA é dividida em duas partes, conhecidas como  
 217 HA1 e HA2, por enzimas chamadas serina proteases. Essa divisão é uma modificação pós-  
 218 tradução necessária para que o vírus seja capaz de infectar células. Acredita-se que a parte  
 219 HA2 seja fundamental na fusão do envelope viral com as membranas das células  
 220 hospedeiras, enquanto a parte HA1 contém o local de ligação ao receptor e as áreas que  
 221 podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico, ou seja, os locais onde os anticorpos  
 222 podem se ligar (BOUVIER et al., 2008).

223 Depois que a proteína HA do vírus se liga ao ácido siálico, ocorre a adsorção do vírus na  
224 célula hospedeira (Figura 3). A acidez do compartimento dentro da célula, chamado de  
225 endossomo, é fundamental para retirar a camada que envolve o vírus, e isso acontece de duas  
226 maneiras. O ambiente ácido dentro do endossomo desencadeia uma mudança na forma da  
227 proteína HA do vírus, isso faz com que o peptídeo de fusão, seja exposto. Esse peptídeo de  
228 fusão é responsável por iniciar a fusão entre o envelope viral e a membrana do endossomo,  
229 criando um pequeno orifício através do qual os componentes virais, conhecidos como RNPs,  
230 podem entrar no interior da célula hospedeira (BOUVIER et al., 2008).

231 Além disso, íons de hidrogênio presentes no endossomo são direcionados para dentro da  
232 partícula viral por meio de uma proteína M2. A acidificação interna do vírion, facilitada pelo  
233 canal M2, desestabiliza as interações entre proteínas no interior do vírus, permitindo a  
234 liberação dos RNPs virais para o interior do citoplasma da célula hospedeira. Isso marca o  
235 início da infecção viral no interior da célula (BOUVIER et al., 2008).

236 Depois de serem liberados, os RNPs (Complexos de Ribonucleoproteína) seguem um  
237 caminho direcionado para o núcleo da célula hospedeira. O núcleo é o local onde ocorre toda  
238 a síntese do RNA do vírus influenza. Isso inclui a produção de RNA mensageiro (mRNA),  
239 que atua como um modelo para a célula hospedeira traduzir proteínas virais. Além disso, os  
240 segmentos de RNA viral de sentido negativo (vRNA), que formam os genomas da nova  
241 geração do vírus, também são produzidos no núcleo (BOUVIER et al., 2008; TE VELTHUIS  
242 et al., 2016).

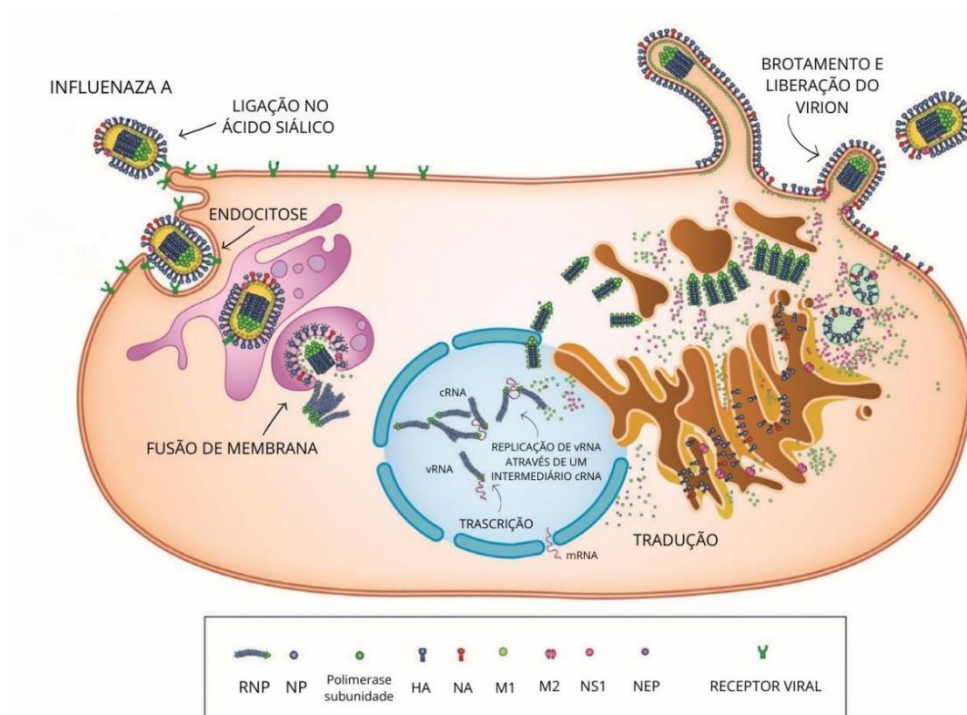
243 A RNA polimerase dependente de RNA viral, que faz parte dos RNPs importados para o  
244 núcleo, utiliza o vRNA de sentido negativo, como um modelo para criar duas formas de  
245 RNA de sentido positivo. Essas duas formas de RNA de sentido positivo têm finalidades  
246 distintas. A primeira funciona como modelos de mRNA, que a célula hospedeira utiliza para  
247 sintetizar proteínas virais. A segunda forma, conhecida como intermediários de RNA  
248 complementar (cRNA), é usada pela RNA polimerase para gerar cópias adicionais de vRNA  
249 genômico de sentido negativo. Isso permite a replicação e propagação do genoma viral  
250 (BOUVIER et al., 2008; TE VELTHUIS et al., 2016).

251 As proteínas do envelope viral, incluindo HA, NA e M2, são produzidas a partir do  
252 mRNA viral em ribossomos associados ao retículo endoplasmático, onde passam por  
253 dobramento e, em seguida, são direcionadas para o aparelho de Golgi para modificações pós-

254 tradução. Essas proteínas são encaminhadas para a membrana celular, onde ocorre a  
255 montagem do vírion (BOUVIER et al., 2008).

256 O processo de egresso do vírus influenza ocorre na membrana celular, iniciado pelo  
257 acúmulo da proteína M1 no lado citoplasmático da bicamada lipídica. Durante esse processo,  
258 as proteínas HA continuam a se ligar às moléculas de ácido siálico na superfície celular até  
259 que as partículas virais sejam liberadas graças à atividade da proteína NA. A principal função  
260 da NA é destruir os receptores de ácido siálico, da superfície da célula hospedeira. Isso  
261 permite que as partículas virais sejam liberadas (BOUVIER et al., 2008).

262



263

264 **Figura 03:** Representação do ciclo de replicação do vírus Influenza A. O diagrama esquematiza os passos  
265 cruciais do ciclo de replicação do vírus influenza A, destacando a ligação viral à célula hospedeira, entrada,  
266 replicação do RNA viral, montagem e liberação de novos vírions. Fonte: Adaptado de HUTCHINSON et  
267 al., 2018.

268

### 269 4.3. Epidemiologia

270

271 O primeiro registro de um surto de doença respiratória aguda em suínos foi em 1918,  
272 durante a pandemia da gripe espanhola entre humanos nos Estados Unidos. Durante os anos  
273 1920, vários episódios de surtos da doença em suínos foram relatados e descritos como uma  
274 forma de gripe de alta incidência e baixa mortalidade entre os animais (KOEN, 1919).

275

276 No contexto da pandemia da gripe asiática em humanos, que começou na China em 1957,  
277 observou-se que suínos e equinos que viviam nas proximidades de indivíduos infectados  
278 apresentavam sintomas clínicos semelhantes. Para compreender o papel epidemiológico  
279 desses animais durante a pandemia, testes sorológicos foram conduzidos em suínos e  
280 equinos. Este estudo revelou que o mesmo vírus influenza que afetava os humanos estava  
281 circulando entre esses animais, mesmo que alguns deles não apresentassem sintomas clínicos  
282 (CHERRY et al., 2011).

283

284 Entre os anos de 1970 e 1976, estudos sorológicos com indivíduos que tiveram contato  
285 direto com suínos apontaram para a possibilidade de transmissão do vírus influenza suíno  
286 para seres humanos. Em 1976, ocorreu o primeiro registro de isolamento desse vírus  
287 proveniente de amostras de suínos e em um trabalhador da fazenda nos Estados Unidos, o  
288 que comprovou a transmissão entre as espécies (CHERRY et al., 2011).

289 Na América do Norte, o subtipo predominante entre os suínos era o H1N1 clássico  
290 (cH1N1), que se originou em 1918. Contudo, a partir da década de 1990, surgiram outros  
291 subtipos/linhagens do IAV, como o H3N2, H1N2 e H1N1 denominado de TRIG (gene  
292 interno de rearranjo triplo), resultante de rearranjos entre os segmentos genéticos do cH1N1  
293 e outros subtipos de origem aviária e humana. O rearranjo do H3N2 TRIG de origem humana  
294 com o cH1N1 gerou novos *clusters*, denominados de alfa, beta e gama. Durante os anos  
295 2000, nos rebanhos suínos, foram identificadas duas novas linhagens nas quais as proteínas  
296 HA e NA provinham de origem humana, denominadas  $\delta 1$  (H1N2) e  $\delta 2$  (H1N1) (CHERRY  
297 et al., 2011).

298 No Brasil, relatos de suínos apresentando sinais clínicos de doença respiratória aguda  
299 remontam a 1930, embora a confirmação da presença do vírus nos rebanhos brasileiros só  
300 tenha ocorrido em 1978, quando o vírus foi isolado pela primeira vez. Após testes de inibição  
301 da hemaglutinação (HI), foi confirmado que o vírus isolado no Brasil estava relacionado ao  
302 H1N1 clássico norte-americano (CUNHA et al., 1978; SCHAEFER et al., 2011).

303 Até 2009, a presença do vírus da gripe suína era relativamente insignificante na indústria  
304 suinícola do Brasil. Poucos estudos haviam sido conduzidos sobre a ocorrência de surtos da  
305 gripe suína. Análises sorológicas revelaram uma baixa presença de anticorpos contra os  
306 subtipos H1N1 e H3N2, tanto de origem humana quanto suína. No entanto, após a  
307 emergência do vírus pH1N1 em humanos, diversos surtos de doenças respiratórias agudas  
308 em suínos de várias idades começaram a ser documentados no Brasil (CIACCI-ZANELLA  
309 et al., 2015; DIAS et al., 2015; RAJÃO et al., 2013; VINCENT et al., 2014:).

310 Sequências genéticas de isolados virais obtidos a partir de amostras de suabe nasal e  
311 pulmões coletadas entre 2009 e 2012, em diferentes estados do Brasil, foram submetidas a  
312 uma análise detalhada. Esta análise revelou que os subtipos de origem humana H3N2, H1N1,  
313 H1N2 circularam na população humana entre 1990 e 2000, antes de serem transmitidos para  
314 os suínos. Os suínos parecem atuar como mantenedores desses vírus, mesmo quando não  
315 circulam mais em humanos. A partir de 2009, o pH1N1 passou a se recombinar com os vírus  
316 de origem humana, desencadeando surtos de doença respiratória em suínos e aumentando a  
317 diversidade genética dos vírus influenza no Brasil (NELSON et al., 2015).

318 A ocorrência do pH1N1 apresentou uma queda notável entre 2017 e 2018, enquanto  
319 houve um aumento da ocorrência do H3N2 durante o mesmo período. No entanto, em 2019,  
320 observou-se um aumento das linhagens de origem sazonal humana (H1N1 e H1N2 de  
321 origem humana). (CHAVES et al., 2022; FRAIHA et al., 2021).

322 Em 2017, observou-se um aumento significativo na ocorrência de H3N2 em suínos,  
323 possivelmente associado ao aumento da prevalência desse subtipo de vírus Influenza A na  
324 população humana brasileira. Dados sorológicos da OMS (2018) indicaram que, durante  
325 2017, houve uma alta incidência de H3N2 na população humana brasileira, com uma  
326 presença menos expressiva de pH1N1 (FRAIHA et al., 2021).

327 Em 2020 e 2021, análises sorológicas confirmaram um aumento nas coinfeções  
328 triplas pH1N1 + H3N2 + H1N1. Os três têm uma relevância significativa em termos de  
329 saúde pública devido ao seu potencial de zoonose. Isso ressalta a importância da vigilância  
330 contínua e do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico ágeis e eficazes. É importante  
331 destacar que essas coinfeções são preocupantes, pois desafia os animais com diferentes  
332 subtipos e linhagens, aumentando o risco de rearranjos genéticos e o surgimento de novas  
333 linhagens e subtipos virais (CHAVES et al., 2022).

334

335

#### 4.4. Patogenia e sinais clínicos

336

337

338

339

340

341

342

A infecção pelo IAV é estabelecida por meio do contato direto ou indireto com as secreções de animais infectados. Nas primeiras 24 a 72 horas após a infecção, o vírus começa a replicar nas células epiteliais que revestem o trato respiratório superior. Conforme a replicação avança, ocorre a destruição das células hospedeiras, geralmente por apoptose, e há a liberação de novas partículas virais. Esse processo também resulta na descamação das células epiteliais, expondo a camada basal em toda a mucosa do trato respiratório (JANKE, 2013; FLORES, 2017).

343

344

345

346

347

A infecção do trato respiratório inferior se manifesta de forma mais tardia, geralmente entre 72 e 96 horas após a infecção inicial. Em mamíferos, o IAV induz uma inflamação subaguda nas mucosas do trato respiratório superior. No trato inferior, podem ocorrer alterações graves, como pneumonia intersticial, lesões multifocais até uma consolidação coalescente marrom-avermelhada, bronquite e edema interlobular (LYOO et al., 2014).

348

349

350

351

352

353

O período de incubação do vírus influenza em mamíferos varia de 1 a 3 dias, podendo se estender até 4 dias. Nas aves, esse período pode ser mais curto, de horas a duas semanas, especialmente em aves que vivem em grupos. Em mamíferos, é comum que o vírus seja disseminado antes do início dos primeiros sintomas clínicos, e o período de liberação do vírus pode durar de 7 a 10 dias, embora, dependendo da carga viral do paciente, isso possa se estender por semanas (JANKE, 2013).

354

355

356

357

358

359

O vírus da gripe pode ser eliminado por meio de secreções nasais, conforme relatado em humanos e suínos, ou por meio de fezes contaminadas, como ocorre em aves. Já foram relatados casos de presença de RNA viral nas fezes de humanos e outros mamíferos. Em animais como gatos e raposas, foi detectado o subtipo H5N1 (linhagem asiática) nas fezes. Em guaxinins submetidos à infecção experimental, foi observada uma dispersão viral nas fezes com uma quantidade reduzida do subtipo humano H3N2 (SPICKLER et al., 2016).

360

361

362

363

Em suínos, a infecção se manifesta de forma aguda no trato respiratório superior, podendo resultar em sintomas clínicos específicos de gripe, como tosse, corrimento nasal e ocular, além de sintomas menos específicos, como febre, apatia e perda de peso (KOCER et al., 2013).

364 Pesquisas em seres humanos revelaram que o vRNA pode ser identificado em amostras  
365 de escarro, mesmo em quantidades mínimas, por um período de até 10 dias após a infecção.  
366 Além disso, em amostras fecais, foi possível detectar a presença do vírus por um período de  
367 até 2 semanas. No mesmo estudo, foi verificado a possibilidade de infecção viral no epitélio  
368 intestinal. Isso foi evidenciado em uma biópsia realizada em um paciente que apresentava  
369 enterite, com evidências de inflamação no cólon, incluindo ocorrência linear e nível de  
370 erosão da mucosa. A análise da região do cólon sigmoide demonstrou um resultado positivo  
371 para o IAV (HIROSE et al., 2016)

372

#### 373 **4.5. Detecção do vírus Influenza nas fezes de diversos animais**

374 As aves migratórias são os hospedeiros naturais dos vírus influenza. A maioria desses  
375 animais infectados não manifesta sintomas da doença. A capacidade do vírus influenza se  
376 ligar aos receptores de ácido siálico  $\alpha 2,3$  no trato intestinal das aves possibilita sua  
377 replicação. Isso torna a infecção por via fecal-oral um modo comum de transmissão viral  
378 (TAUBENNERGER et al., 2010).

379 A capacidade de sobrevivência do vírus influenza nas fezes é afetada por diversos fatores,  
380 incluindo o subtipo do vírus, o tipo de fezes (de qual espécie elas provêm), as características  
381 físicas das fezes e a temperatura em que as fezes são mantidas durante o processo (DE  
382 BENEDICTIS et al., 2007).

383 Pesquisas demonstram que em experimentos com patos infectados, foi observada uma  
384 liberação consideravelmente maior do vírus através das fezes em comparação com as  
385 secreções nasais, ao longo de um período de aproximadamente 6 a 7 dias (WEBSTER et al.,  
386 1978). Importante notar que a excreção viral através da cloaca pode persistir por um período  
387 mais longo, chegando a até 28 dias (HINSHAW et al., 1980).

388 Em um surto de gripe aviária altamente patogênica na Pensilvânia entre 1983 e 1985,  
389 causado pelo vírus H5N2, foi observado que o vírus permaneceu detectável e viável nas  
390 fezes por mais de 44 dias. Além disso, foi observado que o vírus pode estar presente nas  
391 fezes com concentrações tão altas quanto  $10^7$  TCID<sub>50</sub> (doses infecciosas de cultura de tecido)  
392 por grama (UTTERBACK et al., 1984).

393 A temperatura ambiente desempenha um papel crucial na capacidade de sobrevivência  
394 do vírus da gripe aviária. Em um país de clima tropical, onde as temperaturas podem variar  
395 entre 24 e 42°C em diversas regiões, foi conduzido um estudo para avaliar a resistência do  
396 vírus H5N1 em fezes úmidas e secas sob diferentes condições de temperatura,  
397 especificamente a 4, 24, 37 e 42°C. Os resultados indicaram que o vírus permaneceu viável  
398 por aproximadamente 24 horas a 37°C e 18 horas a 42°C. Entretanto, nas fezes úmidas e  
399 secas, sua capacidade de sobrevivência se estende por até 5 dias a 24°C (KURMI et al.,  
400 2013). É importante destacar que a capacidade de sobrevivência a 37°C e 42°C foi  
401 notavelmente superior aos resultados de um estudo anterior, que relatou que o vírus H5N1  
402 foi inativado em meia hora nessas temperaturas na presença de luz solar e até 4 dias à sombra,  
403 a uma temperatura entre 25 e 32°C. Isso sugere que a exposição de fezes infectadas ao vírus  
404 da luz solar pode acelerar o processo de inativação devido à secagem mais rápida e à  
405 influência da radiação solar (CHUMPOLBANCHORN et al., 2006; KURMI et al., 2013)

406 Os resultados de uma outra pesquisa revelam que, em fezes de pato inoculadas em um  
407 ambiente experimental com subtipos diferentes, mostra que a capacidade infecciosa de  
408 diversos subtipos do vírus da gripe aviária pode ser mantida por longos períodos,  
409 especialmente em temperaturas baixas. A persistência do vírus varia significativamente,  
410 entre os diversos subtipos do IAV testados. Este estudo registra que o vírus pode manter sua  
411 capacidade de infectar nas fezes de patos por períodos diversos. Essa durabilidade varia de  
412 alguns dias, aproximadamente 2 dias em temperaturas de 30°C, a 3 a 4 dias a 20°C. Além  
413 disso, a viabilidade do vírus pode estender-se por algumas semanas a 10°C (10 a 14 dias) e  
414 até vários meses a 0°C (31 a 35 dias). (NAZIR et al., 2011).

415 Em seres humanos, é comum a manifestação de doença no trato respiratório. Alguns  
416 estudos, realizados durante as epidemias de influenza tipo A e B nos anos de 1973 e 1988,  
417 relatam que adultos e crianças hospitalizadas apresentavam sintomas gastrointestinais e  
418 infecções. Além disso, esses pacientes tinham presença de RNA viral tanto nas fezes quanto  
419 no suabe nasal (KERR et al., 1975; ARMSTRONG et al., 1991).

420 Em 2009, foram identificados RNA de H1N1 pandêmico nas fezes de pacientes que  
421 apresentavam sintomas de infecções gastrointestinais (YOO et al., 2010; CHAN et al., 2009).  
422 Além disso, entre os anos de 2015 e 2018, foram relatados casos em que o IAV foi detectado  
423 em fezes de crianças hospitalizadas que apresentavam sintomas gastrointestinais (XIE et al.,  
424 2020). Em 2018 e 2019, também foram detectados o RNA do vírus da influenza do tipo A e

425 B em amostras de fezes de adultos. Estudos *in vitro*, que empregam culturas de células  
426 intestinais, sugerem a possibilidade de replicação do vírus no intestino (KHATIB et al.,  
427 2021).

428 Um estudo realizado entre 2014 e 2015 no Japão relatou o caso de um paciente que,  
429 durante uma infecção por influenza, desenvolveu sintomas de enterite. Durante um  
430 procedimento de colonoscopia, foi observada uma inflamação na região do cólon. Uma  
431 biópsia subsequente detectou o RNA viral, revelando uma possível infecção no epitélio  
432 intestinal (HIROSE et al., 2016).

433 Todos esses estudos mostraram que pacientes de diferentes faixas etárias podem  
434 apresentar sintomas respiratórios e/ou gastrointestinais, com a presença do vírus da influenza  
435 A ou B nas fezes. No entanto, ainda não foi identificada a origem desse vírus, e não há  
436 estudos que tenham confirmado a presença de receptores  $\alpha 2,6$  na mucosa intestinal de seres  
437 humanos. Com isso, permanece incerto se a transmissão fecal-oral é possível em humanos,  
438 como ocorre em aves (KHATIB et al., 2021).

439 O vRNA e vírus infecciosos também foram encontrados no intestino, fezes e amostras  
440 retais de outros mamíferos que foram experimentalmente infectados com várias estirpes do  
441 IAV. A infecção de furões com diferentes vírus, incluindo aqueles de origem humana ou  
442 provenientes de suínos e aves, levaram à detecção do vírus em amostras de suabe retal e em  
443 tecido intestinal (MAINES et al., 2009).

#### 444 **4.6. Detecção do vírus Influenza nas fezes de suínos**

445 Em suínos, foi identificada a presença do IAV de origem humana (H3N2) nas fezes. Em  
446 estudos realizados por Kawaoka et al 1986, dois porcos foram inoculados por via intranasal  
447 com aproximadamente  $10^6$  EID<sub>50</sub> (Dose Infectante por Embriões) de diferentes linhagens de  
448 IAV, incluindo H3N2 de origem humana, H1N1 suíno, H3N2 suíno e H2N2 aviário. Todos  
449 esses vírus foram detectados no trato respiratório dos suínos, no entanto, apenas o vírus  
450 H3N2 humano foi detectado nas fezes em um suíno, com a recuperação de  $10^{4,8}$  EID<sub>50</sub>/g de  
451 vírus nas fezes. É importante notar que os níveis virais encontrados nos órgãos respiratórios  
452 foram de  $10^{\geq 4,5}$  EID<sub>50</sub>/ml no lavado nasal e de  $10^{2,5}$  EID<sub>50</sub>/ml na traquéia.

453 O RNA da linhagem H1N1 de origem suína já foi identificado em amostras intestinais de  
454 suínos infectados, embora em quantidades baixas e sem a presença do vírus infeccioso.

455 Segundo De Vleeschauwer et al., (2009), sugeriu-se que o vRNA presente no intestino desse  
456 animal não ocorreu devido à replicação ativa do vírus no trato intestinal, mas, a partir de  
457 secreções respiratórias contendo o vírus ingerido pelo animal. Isso também pode explicar  
458 porque o RNA viral só foi detectado em suínos com quantidades relativamente elevadas de  
459 vírus no trato respiratório.

460 Em outro estudo, realizou-se uma investigação minuciosa para identificar o local de  
461 replicação do vírus em suínos. Durante um período de 14 dias, foram coletadas amostras de  
462 suabe traqueal e nasal, sangue e fezes, por duas vezes ao dia. Após a coleta, as amostras  
463 foram injetadas nas cavidades alantoides de ovos para avaliar a capacidade infecciosa.  
464 Surpreendentemente, nas amostras de sangue e fezes não foi detectado o IAV (KIDA et  
465 al.,1994).

466 Quanto aos sintomas gastrointestinais, observamos que eles podem se manifestar em  
467 animais infectados com a linhagem H1N1 pandêmico. Isso foi evidenciado em um  
468 experimento em que alguns suínos foram experimentalmente infectados com o vírus por via  
469 intranasal, enquanto outros tiveram contato com os suínos previamente infectados. Tanto os  
470 suínos infectados quanto aqueles que tiveram contato com eles apresentaram sintomas leves,  
471 incluindo febre, espirros, corrimento nasal e diarreia (LANGE et al.,2009).

472 Os receptores de ácido siálico (SA)  $\alpha$ 2,3-Gal e SA  $\alpha$ 2,6-Gal, que desempenham um papel  
473 fundamental de ligação do vírus influenza nas células do hospedeiro, foram identificados no  
474 duodeno de suínos. Contudo, é importante notar que o receptor SA  $\alpha$ 2,3-Gal foi identificado  
475 em pequenas áreas, principalmente nas margens do revestimento intestinal. Por outro lado,  
476 o receptor SA  $\alpha$ 2,6-Gal apresentou uma presença mais expressiva, sendo encontrado tanto  
477 ao longo das margens do revestimento quanto nas células caliciformes. Conforme  
478 avançamos para as porções mais inferiores do intestino, a presença dos receptores SA  
479 demonstra um aumento gradual (NELLI et al., 2010).

480 No entanto, houve uma notável presença dos receptores SA  $\alpha$ 2,3-Gal e SA  $\alpha$ 2,6-Gal tanto  
481 nas margens do revestimento quanto nas células caliciformes. Foi notado que esses dois tipos  
482 de receptores coexistiam frequentemente nas células caliciformes. Além disso, a expressão  
483 do receptor SA  $\alpha$ 2,6-Gal parecia variar ao longo das células caliciformes do cólon, com uma  
484 presença mais acentuada na região da cripta em comparação com a superfície luminal  
485 (NELLI et al., 2010).

486 Os resultados dos estudos sugerem que o IAV tem o potencial de se replicar no intestino  
487 dos suínos. Isso ressalta a relevância dos suínos na propagação do vírus da gripe suína, e o  
488 trato intestinal pode desempenhar um papel na excreção do vírus e na transmissão desses  
489 agentes infecciosos entre os animais e no ambiente.

#### 490 **4.7. Monitoramento de Influenza A em Diferentes Tipos de Amostras**

491 A transmissão dos IAVs de origem aviária é amplamente conhecida por ocorrer através  
492 do contato entre hospedeiros infectados e suscetíveis. Além disso, a transmissão via água  
493 emergiu como um mecanismo de disseminação fundamental, especialmente em patos  
494 domésticos e aves selvagens. Estudos demonstraram que os vírus podem ser isolados em  
495 fontes de água frequentadas por aves selvagens, e nesses ambientes, eles retêm sua  
496 capacidade infecciosa por semanas, possibilitando o isolamento de vírus viáveis (PAWAR  
497 et al., 2019).

498 A capacidade de sobrevivência dos vírus da influenza aviária no ambiente é influenciada  
499 por uma série de fatores, que incluem características químicas e físicas como umidade,  
500 temperatura, pH, salinidade, e a presença de compostos orgânicos. Além disso, a própria  
501 variante do vírus influencia sua resistência ao ambiente (PAWAR et al., 2019).

502 Estudos indicam que a carga viral tende a diminuir em pH ácido, geralmente variando de  
503 6,0 a 4,6, uma vez que o pH ácido afeta a estrutura do vírus (RAMEY et al., 2020; NAZIR  
504 et al., 2011). O vírus pode ser identificado em amostras de sedimentos de lagos por períodos  
505 de 2 dias a 30°C, de 3 a 4 dias a 20°C, de 10 a 14 dias a 10°C e, surpreendentemente, de 31  
506 a 35 dias a 0°C (NAZIR et al., 2011). Outro estudo revelou que o vírus pode permanecer  
507 viável por um período significativo de 209 a 229 dias em uma temperatura média das águas  
508 superficiais que variou de -0,1 a 22,9°C (RAMEY et al., 2020). Surpreendentemente, a  
509 precipitação do vírus em fontes de água, sejam elas municipais, superficiais ou marítimas,  
510 não parece afetar sua viabilidade, visto que os vírus têm a capacidade de se reproduzir em  
511 ovos embrionados de galinha, mostrando sua resiliência em diferentes ambientes aquosos  
512 (NAZIR et al., 2011).

513 De maneira interessante, a água destinada ao consumo das aves e acondicionada em  
514 recipientes situados dentro das gaiolas de aves domésticas em mercados tem apresentado  
515 uma frequência maior de isolamento de vírus influenza em comparação com amostras

516 obtidas de esfregaços fecais, traqueais e cloacais. Isso ressalta a importância da água como  
517 um meio de transmissão significativo para esses vírus (KALE et al., 2013).

518 Durante o pico de uma epidemia de gripe aviária H5, na província de Hubei na China, a  
519 taxa positiva mensal de detecção de IAV variou entre 1,88% e 2,49% em um total de 7.132  
520 amostras ambientais coletadas ao longo de um período de quatro meses, abrangendo o  
521 inverno e a primavera. As taxas de positividade foram mais elevadas nos mercados urbanos  
522 e rurais de aves vivas e nas unidades de abate e processamento de aves, especialmente  
523 durante o abate e a criação mista, em comparação com outros locais de monitoramento. A  
524 análise revelou que as amostras com taxas de positividade mais elevadas, principalmente nas  
525 tábuas de cortar, águas residuais de aves, amostras fecais e água potável de aves, estavam  
526 consistentes com os resultados da vigilância em outras regiões da China. Portanto, esses  
527 achados destacam que os mercados urbanos e rurais de aves vivas e as instalações de abate  
528 e processamento de aves, onde as amostras com alta taxa de positividade se concentram em  
529 áreas como tábuas de cortar, águas residuais de aves, amostras fecais e água potável de aves,  
530 continuam a representar locais de risco significativos de transmissão do vírus (LIU et al.,  
531 2020).

532 A análise do vírus da influenza em amostras de águas residuais humanas representa uma  
533 estratégia promissora na vigilância e monitoramento deste agente infeccioso. Essa  
534 abordagem oferece uma série de vantagens evidentes, uma vez que permite uma visão mais  
535 abrangente da propagação do vírus em uma comunidade. Isso ocorre porque a detecção de  
536 RNA do vírus pode ser realizada em amostras de indivíduos que manifestam sintomas da  
537 doença, bem como naqueles que são portadores assintomáticos do vírus (WOLFE et al.,  
538 2022; MERCIER et al., 2022).

539 Resultados de um estudo, conforme apresentado por Wolfe et al. (2022), demonstram  
540 uma forte correlação entre a presença do RNA do vírus da influenza A em amostras de águas  
541 residuais e a taxa de incidência do vírus em comunidades. Além disso, o estudo observou  
542 que o RNA do vírus influenza A é mais frequentemente detectado em amostras sólidas de  
543 águas residuais do que em amostras líquidas, o que sugere que a vigilância de águas residuais  
544 do vírus pode ser mais sensível e eficaz quando se concentra na fração sólida. Esses  
545 resultados destacam o potencial do monitoramento do RNA do IAV em águas residuais  
546 como uma ferramenta valiosa para a vigilância e detecção precoce de surtos de gripe,

547 especialmente em situações em que os métodos clínicos tradicionais podem ter limitações  
548 (WOLFE et al., 2022).

549 Em um surto de IAV em humanos na cidade de Ottawa no Canadá, amostras de águas  
550 residuais foram analisadas para a detecção dos subtipos H1N1 e H3N2, sendo o H3N2 o  
551 vírus predominante em toda a cidade. Surpreendentemente, o H3N2 foi identificado nas  
552 amostras de esgoto 17 dias antes do primeiro caso de IAV ser relatado pela vigilância clínica,  
553 destacando a utilidade da detecção em águas residuais como um indicador precoce de surtos  
554 (MERCIER et al.,2022).

555 O vírus Influenza pode ser transmitido de forma bidirecional por meio de mecanismos de  
556 transmissão respiratória e mamária. Essa transmissão resultou em doenças respiratórias  
557 graves e mortalidade nos filhotes. O vírus foi detectado nas glândulas mamárias e no leite  
558 das fêmeas que estavam amamentando filhotes inoculados com o vírus H1N1 de 2009,  
559 sugerindo que a infecção poderia ocorrer por meio do contato com o leite materno. Os  
560 filhotes pareciam se infectar via glândulas mamárias, ao invés pela via respiratória, o que  
561 resultava em doenças graves e morte. Além disso, a infecção por influenza nos tecidos  
562 mamários pode piorar ou aumentar a incidência de mastite em mães que estão amamentando  
563 (PAQUETTE et al., 2015).

564

#### 565 **4.8. Monitoramento de Influenza A em Amostras Ambientais de Suínos**

566 A detecção do vírus influenza em amostras do ambiente, como bioaerossóis, fluido oral  
567 e amostragem de superfícies, já está firmemente estabelecida na suinocultura. O IAV já foi  
568 identificado e isolado em mercados de suínos em várias fontes, incluindo fluidos orais,  
569 amostras de ar coletadas nas áreas de detenção dos animais, grades dos currais de suínos,  
570 portas que conduzem à área de detenção dos animais, pias ou torneiras localizada dentro da  
571 área de atendimento, mostrando que o vírus continua viável no ambiente (CHOI et al., 2015).

572 Durante surtos de IAV em suínos, foi observado que o ar e as superfícies dos galpões da  
573 granja continham quantidades consideráveis do vírus, o que potencialmente colocava tanto  
574 suínos quanto os funcionários em risco de exposição. A presença do vírus no ar persistiu ao  
575 longo dos surtos agudos da doença, estendendo-se por cerca de 20 dias. O ápice de detecção  
576 viral nas amostras de ar ocorreu entre o 7º e o 11º dia após o início dos surtos. Os níveis  
577 máximos de vírus no ar variaram entre as instalações afetadas e estiveram na ordem de

578 grandeza de  $10^4$  a  $10^7$  de cópias de RNA por metro cúbico de ar. Dado esses achados e a  
579 possível relação com a transmissão do vírus entre suínos e seres humanos, é plausível  
580 considerar que essa via aérea representa um risco significativo para a saúde de ambas as  
581 populações, uma vez que o IAV foi consistentemente isolado no ar em diferentes momentos  
582 ao longo dos surtos (NEIRA et al., 2016).

583 Um método inovador de amostragem, utilizando a pele do úbere de porcas lactantes, tem  
584 se mostrado altamente eficaz na detecção do IAV. Este método, que representa grupos de  
585 leitões lactantes, provou ser capaz de identificar ninhadas positivas para o vírus e produzir  
586 IAV viável. A taxa de detecção e isolamento do IAV em lenços umedecidos do úbere  
587 demonstrou eficácia semelhante à obtida em esfregaços orofaríngeos. A fonte mais provável  
588 do vírus presente na pele do úbere parece ser as secreções nasais e orais deixadas pelos  
589 leitões durante o processo de amamentação. Este novo enfoque de amostragem da pele do  
590 úbere não apenas se apresenta como uma técnica eficaz e prática para identificar ninhadas  
591 infectadas por influenza, mas também sugere que os lenços umedecidos sejam uma opção  
592 viável e acessível para detectar e isolar o IAV em suínos antes do desmame. Esta é uma  
593 descoberta de grande relevância, visto que os leitões antes do desmame representam um  
594 reservatório bem conhecido do vírus em rebanhos reprodutores, tornando-os um alvo crucial  
595 para programas de vigilância. Além disso, esses resultados indicam que a pele contaminada  
596 pode servir como um meio de transmissão do IAV dentro e entre ninhadas de suínos  
597 (GARRIDO-MANTILLA et al., 2019).

598 A coleta de amostras de efluentes de rebanhos suínos desempenha um papel crucial na  
599 detecção de alguns patógenos. Amostras de sistemas de tratamento de efluentes foram  
600 utilizadas para investigar a presença de vírus de DNA, notadamente o adenovírus suíno  
601 (PAdV) e o circovírus suíno (PCV2). Esses vírus são reconhecidos por sua estabilidade  
602 ambiental e pela comum excreção nas fezes e urina de suínos. Os resultados revelaram uma  
603 alta prevalência desses vírus em todas as amostras coletadas, inclusive na água tratada no  
604 final do sistema. Partículas não danificadas de PAdV e PCV2 foram identificadas em todos  
605 os locais de amostragem. Isso sugere que esses vírus podem resistir aos processos  
606 convencionais de tratamento de águas residuais. Essas descobertas têm implicações  
607 significativas para a gestão de água e resíduos em contextos relacionados à produção suína  
608 (VIANCELLI et al., 2012).

609 Vírus de RNA também já foram detectados em amostras de efluentes de suínos, em  
610 particular o vírus da hepatite E (HEV). Das instalações de compostagem examinadas, 80%,  
611 testaram positivas para a presença do HEV. Uma análise mais detalhada mostrou que o HEV  
612 foi detectado em 100% das amostras em duas instalações, dependendo do estágio do  
613 processo de tratamento. Não foi detectado em amostras sólidas ou líquidas após essa fase do  
614 tratamento. Essas descobertas oferecem informações valiosas sobre a persistência do HEV  
615 em instalações de tratamento de efluentes de suínos (GARCÍA et al., 2014).

616

#### 617 **4.9. Diagnóstico**

618

619 Dado que a IAV é altamente contagiosa e afeta significativamente os suínos em uma  
620 granja, é crucial realizar um diagnóstico rápido e eficaz para conter a propagação da doença  
621 (FLORES, 2017). A escolha criteriosa dos suínos a serem amostrados é o primeiro passo  
622 fundamental na obtenção de uma amostra confiável para o diagnóstico. Isso ocorre porque  
623 os primeiros sete dias após a contaminação representam o período de maior excreção viral,  
624 tornando essencial coletar amostras de suínos na fase aguda da doença, caracterizada por  
625 sintomas como tosse e febre. É recomendável evitar a coleta de amostras de suínos que  
626 morreram de forma natural ou receberam tratamento medicamentoso, uma vez que o tecido  
627 pode ter sofrido autólise e a administração de medicamentos pode reduzir a probabilidade  
628 de isolar bactérias responsáveis por infecções secundárias (SCHAEFER et al., 2013).

629 Quando se trata de diagnosticar IAV em suínos vivos, a secreção nasal se destaca como  
630 a amostra mais apropriada para isolamento viral ou testes moleculares. Para coletar o muco  
631 nasal, é aconselhável usar suabe sintéticos com cerca de 15 centímetros de comprimento.  
632 Após a coleta, o suabe é imerso em um meio de transporte, como o solução salina tamponada  
633 com fosfato (PBS), que é complementado com antibiótico e antifúngico. O material coletado  
634 deve ser armazenado a uma temperatura de 4°C e encaminhado ao laboratório dentro de, no  
635 máximo, 48 horas após a coleta (SCHAEFER et al., 2013).

636 Além disso, amostras de soro podem ser colhidas para diagnósticos sorológicos, como  
637 os testes de Inibição da Hemaglutinação (HI) e o Ensaio por Imunoabsorção Enzimática  
638 (ELISA) (FLORES, 2017).

639 Os tecidos do trato respiratório, tais como pulmão, brônquios, traqueia e cornetos  
640 nasais, são considerados amostras ideais para diagnóstico, uma vez que são os locais  
641 primários de replicação do vírus no organismo suíno. Em casos *pos-mortem* de suínos  
642 afetados pela IAV, os exames histopatológicos desempenham um papel fundamental na  
643 compreensão da patogenia do vírus nesses animais (DETMER et al 2012).

644

645 Especificamente, regiões que exibem características típicas de pneumonia, como áreas  
646 de coloração avermelhada e consolidada, devem ser coletadas junto com fragmentos dos  
647 brônquios e bronquíolos. Essas amostras devem ser mantidas refrigeradas quando destinadas  
648 ao isolamento viral e testes moleculares. Simultaneamente, é recomendado que sejam  
649 fixadas em formol quando destinadas a exames histopatológicos e imuno-histoquímicos,  
650 proporcionando assim uma avaliação completa da infecção por IAV e seus efeitos nos  
651 tecidos pulmonares (SCHAEFER et al 2013).

652 Para o diagnóstico direto da influenza suína, uma técnica eficaz é a RT-PCR (Reação  
653 em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa) ou RT-qPCR (Reação em  
654 Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa Quantitativa), que permite a  
655 amplificação do material genético do vírus. Essa abordagem é aplicável a diversos tipos de  
656 amostras, incluindo fluidos e tecidos, e é altamente específica e sensível, o que a torna capaz  
657 de detectar o genoma viral mesmo em amostras de campo com níveis baixos de RNA viral  
658 (DETMER et al., 2012; SCHAEFER et al., 2013).

659

660 Para detecção do IAV, *primers* são projetados para amplificar genes conservados,  
661 como os da matriz ou da nucleoproteína. Essa técnica serve como um teste de triagem. Para  
662 a detecção de subtipos, é necessário a utilização de *primers* específicos para as glicoproteínas  
663 de superfície HA (hemaglutinina) e NA (neuraminidase) (DETMER et al., 2012;  
664 SCHAEFER et al., 2013).

665 Técnicas de PCR que utilizam sondas fluorescentes são úteis para quantificar o  
666 genoma viral amplificado durante a reação, fornecendo assim informações sobre a  
667 quantidade de ácido nucleico viral presente na amostra. Essa abordagem é valiosa no  
668 diagnóstico preciso da infecção por influenza suína, auxiliando na compreensão da carga  
669 viral e no monitoramento da doença (DETMER et al., 2012; SCHAEFER et al., 2013).

670 O isolamento viral é uma técnica altamente sensível e considerada o padrão-ouro para  
671 o diagnóstico de influenza. Nesse método, as amostras são inoculadas em culturas de células  
672 suscetíveis ao vírus da influenza, como as células MDCK (*Madin-Darby Canine kidney*  
673 *cells*), e são observadas ao longo de um período de 24 a 72 horas para detectar sinais de  
674 replicação viral, culminando no desenvolvimento do efeito citopático (ECP) nas células. O  
675 ECP é caracterizado pelas alterações nas células hospedeiras induzidas pela ação do vírus  
676 (DETMER et al., 2013).

677 Amostras de campo geralmente contêm quantidades limitadas de vírus, tornando  
678 necessárias passagens cegas adicionais para amplificar o viral a ponto de causar o ECP. Além  
679 disso, o isolamento viral em ovos específicos de embrião de galinha SPF (*Specific Pathogen-*  
680 *Free*) ainda é uma abordagem usada, pois pode resultar em títulos virais mais elevados do  
681 que os obtidos com o isolamento viral em culturas celulares. Para confirmar definitivamente  
682 a presença do vírus, testes como RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com  
683 Transcrição Reversa) e testes de hemaglutinação (HA), geralmente são realizados como  
684 procedimentos complementares (DETMER et al 2013; FLORES, 2017).

685 Exames sorológicos para detecção de anticorpos contra o vírus da influenza em suínos  
686 podem ser empregados para identificar possíveis infecções ou determinar se os animais  
687 foram vacinados. Nos suínos infectados pelo vírus, a produção de anticorpos normalmente  
688 começa após aproximadamente sete dias de infecção e pode perdurar por até cerca de 10  
689 semanas. O teste convencional para identificar anticorpos neutralizantes é o teste de HI  
690 (inibição da hemaglutinação). Esse exame avalia a habilidade dos anticorpos presentes no  
691 soro dos animais de se ligarem ao vírus de referência, impedindo que a hemaglutinina (HA)  
692 do vírus se conecte aos receptores nas superfícies dos eritrócitos. Isso resulta na falta de  
693 hemaglutinação. No teste de HI, o soro dos animais é diluído seriadamente na escala 1:2, e  
694 um resultado positivo, geralmente com uma leitura superior a 1:40, indica a presença de  
695 anticorpos neutralizantes. Quanto maior o título do HI, mais recente foi a infecção. Este teste  
696 também possibilita a identificação de anticorpos contra linhagens de HA específicas do IAV  
697 (DETMER et al., 2012; FLORES, 2017; DIAS et al., 2015).

698

699 Outro exame utilizado para detectar anticorpos neutralizantes no soro dos animais é a  
700 soroneutralização (SN). Neste teste, o soro dos animais é diluído em série em uma placa e é  
701 incubado com linhagens do vírus de referência. Após um período de incubação, células

702 MDCK são adicionadas. Caso o soro dos animais contenha anticorpos, ocorrerá a ligação e  
703 neutralização do vírus, impedindo sua replicação nas células e, a ausência do  
704 desenvolvimento do ECP. Esses exames sorológicos são valiosos para avaliar a resposta  
705 imunológica dos suínos à infecção ou vacinação pelo IAV (DETMER et al., 2012; FLORES,  
706 2017).

707

#### 708 **4.10. Tratamento e Controle**

709

710 A infecção pelo IAV em suínos não possui um tratamento específico. No entanto, é  
711 possível utilizar agentes antimicrobianos para tratar infecções bacterianas secundárias, que  
712 frequentemente ocorrem em conjunto. Para suínos que manifestam sintomas típicos da  
713 infecção pelo IAV, é crucial mantê-los em baias limpas e secas, além de minimizar o estresse  
714 durante a fase aguda da doença (SOBESTIANSKY et al., 2007; FLORES, 2017).

715

716 Para prevenir a introdução do vírus nas instalações de criação, medidas rigorosas de  
717 biossegurança devem ser implementadas. Isso inclui a proibição da entrada de materiais  
718 contaminados, a restrição da movimentação de funcionários entre galpões com diferentes  
719 categorias de suínos, a vacinação dos funcionários e a proibição da entrada de pessoas com  
720 sintomas gripais. Além disso, é essencial realizar a limpeza e desinfecção das baias antes de  
721 introduzir novos animais (FLORES, 2017; TORREMORELL et al., 2020).

722 A imunização é a estratégia mais amplamente empregada para controlar e prevenir a  
723 influenza suína, e a constante variabilidade genética dos IAV exige adaptações contínuas  
724 nas formulações das vacinas (TORREMORELL et al., 2020). No Brasil, uma vacina  
725 comercial inativada, direcionada a linhagem pH1N1, foi autorizada em 2014, e vacinas  
726 autógenas, a partir de 2017, receberam aprovação para uso no país. Com múltiplas linhagens  
727 de vírus da influenza suína em circulação, não é garantido que todas as vacinas proporcionem  
728 uma proteção eficaz aos animais (VAN REETH et al., 2013; CHEN et al., 2012). Assim, a  
729 vigilância constante dos IAVs que afetam os suínos se torna importante para orientar as  
730 atualizações dos subtipos nas vacinas e para oferecer informações fundamentais na aplicação  
731 de estratégias de controle nas propriedades. A realização de análises sorológicas é de extrema  
732 importância para monitorar a prevalência dos subtipos circulantes do vírus da influenza  
733 (SOBESTIANSKY et al., 2007)

734

#### 735 **4.11. Tecnologias para o tratamento de efluentes de suíno**

736

737 Na atividade suinícola, o aproveitamento de recursos, especialmente a água, é  
738 fundamental. A água desempenha papéis cruciais na propriedade, como fornecida aos  
739 animais, resfriamento (por meio de nebulização) e higienização das instalações. O consumo  
740 significativo de água é um desafio na suinocultura, estimando-se que cada animal possa  
741 exigir até 72,9 litros diários em granjas de ciclo completo, sendo a maior parte destinada à  
742 limpeza dos ambientes de alojamento, segundo a Fundação do Meio Ambiente (FATMA)  
743 do Estado de Santa Catarina. A relevância da água no manejo dos projetos suínos é  
744 facilmente compreendida, e os custos associados ao desperdício desse recurso podem ser  
745 consideráveis, atingindo R\$ 7,50 para cada 1000 litros (SOUZA et al., 2017).

746

747 A quantidade e qualidade dos efluentes produzidos nas granjas são influenciadas por  
748 diversos fatores, como o tipo de bebedouro, os procedimentos de limpeza, o desvio de águas,  
749 os comedouros e o tipo de ração. Em média, suínos geram cerca de 6,7 kg de dejetos por dia  
750 a cada 100 kg de peso vivo. A produção varia em diferentes contextos, estimando-se entre  
751 60 a 100 litros por matriz por dia em granjas de ciclo completo, 35 a 60 litros em granjas  
752 produtoras de leitões, e 4,5 a 7,5 litros por cabeça por dia em granjas de produção de suínos  
753 terminados (DIAS et al., 2011). Os efluentes, são compostos por urina, fezes, resíduos de  
754 ração, poeira, água e outros elementos do processo produtivo, apresentam características  
755 como coloração escura, consistência variável e elevadas concentrações orgânicas, além de  
756 propriedades físicas, químicas e biológicas diversas. A composição química dos efluentes  
757 suínos varia conforme a fase de produção e a dieta (SOUZA et al., 2017).

758

759 A biodiversidade dos efluentes na suinocultura reflete uma ampla variedade na  
760 microbiota. Essa microbiota é caracterizada por uma concentração elevada de  
761 microrganismos, incluindo patógenos. O manejo inadequado desses efluentes pode acarretar  
762 sérios riscos à saúde humana e animal, sendo uma fonte potencial de transmissão de doenças.  
763 Ao analisar a distribuição taxonômica dos microrganismos presentes nos efluentes de suínos,  
764 observamos que 83,7% pertencem ao grupo Bactéria, seguido por 12,8% de Archaea, 3% de  
765 Eukaryota e 0,5% de outros (DUDA et al., 2015).

766

767 O manejo dos efluentes na suinocultura desempenha um papel crucial na gestão  
768 ambiental e no aproveitamento sustentável desses resíduos. Esse processo deve abranger

769 cinco etapas cruciais: produção, coleta, armazenagem, tratamento, distribuição e utilização  
770 dos dejetos, tanto na forma sólida quanto líquida (DIAS et al., 2011).

771

772 Quanto ao tratamento desses dejetos suínos, geralmente empregam-se processos  
773 físicos, químicos e biológicos para a transformação ou remoção da carga poluente presente  
774 nos efluentes. Esses procedimentos de tratamento de dejetos orgânicos são comumente  
775 divididos em três categorias: física, química e biológica. O tratamento físico engloba etapas  
776 como a separação de fases, utilizando processos de sedimentação, centrifugação,  
777 peneiramento, filtração ou separação química, desidratação para redução da umidade para  
778 níveis em torno de 10 a 15%. O tratamento químico, por sua vez, baseia-se na adição de  
779 coagulantes ou floculantes químicos aos dejetos para promover a separação das fases  
780 líquidas e sólidas. Já o tratamento biológico, um processo natural, pode ser aplicado aos  
781 dejetos sólidos ou líquidos, sendo controlado ou não, e podendo ser aeróbico ou anaeróbico  
782 (DIAS et al., 2011).

783

784 No Brasil, o manejo tradicional inclui o armazenamento em esterqueiras e o tratamento  
785 por lagoas de decantação. Essa abordagem é favorecida devido aos seus baixos custos de  
786 implementação e operação, bem como pela facilidade operacional. Os efluentes tratados  
787 dessa maneira não apenas podem ser reaproveitados como fertilizante na lavoura, mas  
788 também possibilitam a reciclagem da água proveniente do processo de decantação para reuso  
789 nas instalações da granja. Esse duplo aproveitamento não só contribui para a sustentabilidade  
790 agrícola ao fornecer nutrientes valiosos para as plantações, mas também destaca a eficiência  
791 na gestão dos recursos hídricos dentro da própria granja (CARDOSO et al., 2015).

792

#### 793 **4.11.1. Tratamento biológico**

794

795 No processo de tratamento biológico, ocorre a degradação biológica dos efluentes por  
796 microrganismos aeróbios e anaeróbios, resultando em um material estável e livre de  
797 organismos patogênicos. Os sistemas de tratamento de águas residuais que utilizam  
798 processos naturais para remover poluentes da água, são denominadas lagoas de estabilização.  
799 Essas lagoas são projetadas para permitir a decomposição biológica de matéria orgânica,  
800 reduzindo assim a carga poluente da água. Existem diferentes tipos de lagoas de  
801 estabilização, sendo as duas principais categorias as lagoas aeradas e as lagoas facultativas  
802 (NUVOLARI et al., 2011).

803

804 As lagoas aeradas surgiram como resposta à necessidade de redução da área necessária  
805 para o tratamento em comparação com as lagoas de estabilização, essas lagoas são projetadas  
806 para promover a aeração da água, introduzindo oxigênio para sustentar a atividade de  
807 microrganismos aeróbios. A presença de oxigênio estimula a decomposição da matéria  
808 orgânica. No entanto, dependem da introdução artificial de oxigênio necessário pelos  
809 organismos decompositores da matéria orgânica solúvel. A energia de aeração possibilita a  
810 manutenção da massa líquida em total suspensão, resultando na formação de flocos  
811 biológicos para subsequente separação na unidade seguinte de sedimentação (NUVOLARI  
812 et al., 2011).

813

814 As lagoas facultativas são projetadas para operar tanto em condições aeróbias quanto  
815 anaeróbias, permitindo a decomposição da matéria orgânica em ambientes com diferentes  
816 níveis de oxigênio. As lagoas facultativas têm zonas mais profundas e menos aeradas,  
817 proporcionando condições anaeróbias, enquanto as áreas mais superficiais são expostas ao  
818 ar para condições aeróbias. Essa alternância promove diferentes processos de decomposição  
819 (NUVOLARI et al., 2011).

820

821 Outra técnica que pode ser utilizado é biodigestor, um reator cuja função primordial é  
822 a decomposição da carga orgânica presente nos resíduos, opera em condições anaeróbias,  
823 resultando na produção de um efluente líquido, denominado biofertilizante, e na geração de  
824 biogás. A decomposição dos dejetos resulta na formação de um gás de elevado potencial  
825 energético, apto a substituir fontes como lenha, gasolina e GLP. Além disso, os resíduos  
826 podem ser utilizados para propósitos agrônômicos, atuando como biofertilizante e  
827 proporcionando carga orgânica (DIAS et al., 2011).

828

829 O biodigestor requer um tempo de retenção hidráulica mais curto e uma área menor  
830 para a degradação anaeróbica, em contraste com os sistemas de tratamento em lagoas. É  
831 crucial salientar que o biodigestor deve ser empregado apenas em propriedades com  
832 extensão agrícola compatível com o volume de biofertilizante gerado, uma vez que não é  
833 uma unidade de tratamento completa, mas sim uma etapa integrante do sistema de  
834 tratamento. A eficácia do biodigestor na degradação da matéria orgânica contida nos  
835 resíduos é influenciada por diversos fatores, como temperatura, concentração de sólidos  
836 voláteis e atividade dos micro-organismos presentes no sistema, reforçando a sua posição

837 como parte integrante de um sistema de tratamento de dejetos, e não como a etapa final do  
838 processo (DIAS et al., 2011).

839

#### 840 **4.11.2. Técnica de Tratamento de efluentes para reaproveitamento da água**

841

842 No estágio inicial do tratamento de água, ocorre o processo crucial de coagulação antes  
843 da etapa de decantação. Nessa fase, a água bruta é submetida à adição de coagulantes, como  
844 o Sulfato de Alumínio ou outros agentes coagulantes, desencadeando a formação de flocos.  
845 Esses flocos têm a propriedade magnética de atrair as partículas de sujeira presentes na água,  
846 aglutinando-as para facilitar a posterior remoção. Um aspecto fundamental para o sucesso  
847 desse processo é manter o pH do efluente em uma faixa neutra, criando as condições ideais  
848 para a coagulação efetiva. Esse método não apenas contribui para a clarificação da água, mas  
849 também representa uma etapa primordial na remoção de impurezas, preparando-a para as  
850 próximas fases do tratamento (PEDROSO et al., 2012).

851

852 A decantação é uma etapa crucial em sistemas de tratamento de águas residuais. Essa  
853 fase visa separar sólidos e lodo da água tratada, garantindo uma qualidade ainda maior antes  
854 de qualquer descarte ou reúso. Após o tratamento aerado, a água passa para uma lagoa de  
855 decantação para permitir que os sólidos em suspensão se depositem no fundo da lagoa. Nesse  
856 ambiente mais calmo, a velocidade do fluxo da água diminui, proporcionando a  
857 sedimentação de sólidos e lodo (LIMA et al., 2011; NUVOLARI et al., 2011).

858

859 A água permanece na lagoa de decantação por um período, permitindo que os sólidos  
860 mais pesados, como partículas sedimentáveis e lodo, se depositem no fundo da lagoa. A  
861 decantação após o tratamento aerado é fundamental para garantir que a água final seja clara  
862 e tenha uma carga de sólidos reduzida. Essa fase contribui para a eficiência global do sistema  
863 de tratamento de águas residuais e pode variar em sua implementação de acordo com as  
864 características específicas do local e as necessidades do tratamento (LIMA et al., 2011;  
865 NUVOLARI et al., 2011).

866

867 No cenário brasileiro, existem diretrizes para o lançamento de efluentes em corpos  
868 d'água. No entanto, essa normativa não define critérios específicos relacionados aos padrões  
869 de segurança para a reutilização da água na produção animal, criando assim uma lacuna

870 regulatória nesse contexto. Como resultado, a qualidade exata da água reutilizada nas  
871 instalações de criação após o tratamento permanece desconhecida.

872

873 Em um estudo que investigou a qualidade do efluente após dois tratamentos distintos,  
874 o primeiro sistema de tratamento foi composto por uma fase de separação sólido-líquido  
875 utilizando uma peneira, um reservatório de equalização, um tanque de decantação, um reator  
876 anaeróbio, um reator aeróbio e um segundo tanque de decantação. No segundo sistema, por  
877 sua vez, incorporou um digestor anaeróbio seguido por lagoas seriadas, anaeróbias,  
878 facultativas e de maturação. Para a detecção de alguns vírus de DNA como *adenovírus* suíno  
879 (PAdV), *circovírus* suíno (PCV2), *parvovírus* suíno (PPV1) e vírus *torque teno* (TTV) no  
880 término do tratamento (VIANCELLI et al., 2013).

881

882 Os resultados do primeiro sistema revelaram uma significativa redução de 1 log (90%)  
883 na concentração de PAdV no efluente final, enquanto não foi observada diminuição  
884 apreciável do PCV2 ao longo do processo de tratamento, Já os genomas do TTV foram  
885 positivos em 16%, 11% e 27% das amostras de esterco bruto, após tratamento físico e  
886 efluente final, respectivamente, enquanto a porcentagem de amostras positivas para PPV1  
887 permaneceu constante no esterco bruto, após tratamento físico e no efluente final (11%). No  
888 segundo sistema, PPV1 e TTV foram detectados no esterco bruto (11%) e no efluente do  
889 biodigestor (11%), mas ausentes no efluente final, e tanto PAdV foi detectado no efluente  
890 final (VIANCELLI et al., 2013).

891

892 Em um outro estudo foi conduzido para identificar vírus entéricos suínos de RNA,  
893 incluindo *norovírus* suínos (PoNoVs) e *sapovírus* suínos (PoSaVs), bem como *rotavírus*  
894 (RVs, grupos A,B e C), em efluentes submetidos a diferentes tratamentos. Os resultados  
895 divergiram entre RV-A e RV-C em comparação com PoSaV e PoNoV (COSTANTINI et  
896 al., 2007).

897

898 Com a aplicação da tecnologia ATAnD (Digestor Anaeróbico no Solo à Temperatura  
899 Ambiente e Sistema de Estufa), tanto RV-A quanto RV-C foram identificados nos efluentes  
900 do digestor anaeróbico. Amostras pós-tratamento do local CWM (gerenciamento  
901 convencional de resíduos) apresentaram detecção de RV-A, assim como amostras pós-  
902 tratamento do local CWS (separação de sólidos do líquido e, em seguida, o tratamento do

903 líquido resultante em zonas úmidas construídas) por meio de PCR seminested  
904 (COSTANTINI et al., 2007).

905

906 Nos locais onde tanto RV-A quanto RV-C foram identificados, os resultados foram  
907 geralmente congruentes. Na tecnologia AUFBS (Sistema de Biofiltração Aeróbia de Fluxo  
908 Ascendente), ambos os vírus foram detectados por PCR seminested em amostras coletadas  
909 nas lagoas ao final do tratamento. No SSS (Sistema de Processamento de Sólidos de  
910 Separação de Sólidos/Nitrificação-Desnitrificação/Remoção de Fósforo Solúvel), amostras  
911 do produto final ensacado e do líquido obtido após a remoção do fósforo apresentaram  
912 positividade para ambos os vírus (COSTANTINI et al., 2007).

913

914

#### 915 **4.11.3. Regulamentação Ambiental para Destinação de efluentes tratados**

916

917 O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), como órgão consultivo e  
918 deliberativo do Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA), tem um papel crucial na  
919 definição de diretrizes e normas técnicas para a proteção ambiental e o uso sustentável dos  
920 recursos. No contexto da destinação de efluentes suínos, as resoluções do CONAMA, como  
921 a nº 357/2005, alterada pelas resoluções nº 410/2009 e nº 430/2011, são fundamentais. Essas  
922 resoluções abordam a classificação e o enquadramento dos corpos de água, estabelecendo  
923 condições e padrões para o lançamento de efluentes em corpos d'água em nível federal. Em  
924 âmbito estadual, Minas Gerais segue as diretrizes da Deliberação Normativa Conjunta  
925 COPAM/CERH nº 1/2008. Os padrões de lançamento de efluentes incluem parâmetros como  
926 pH, temperatura, sólidos sedimentáveis, óleos e graxas, DBO (Demanda Bioquímica de  
927 Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio), com limites específicos a serem  
928 seguidos para garantir a sustentabilidade ambiental (COUTO et al., 2019).

929

930 Caso o efluente tratado esteja em conformidade com as normas estabelecidas, torna-  
931 se passível de reutilização em diferentes contextos. Pode ser reintegrado à própria estrutura  
932 da granja, proporcionando uma forma sustentável de gerenciamento interno. Além disso, se  
933 houver áreas agrícolas próximas, o efluente tratado pode ser liberado para uso na irrigação,  
934 contribuindo para práticas agrícolas sustentáveis e promovendo a reciclagem de recursos  
935 dentro do ciclo produtivo. Essa abordagem alinha-se às diretrizes ambientais, maximizando  
936 a eficiência e minimizando o impacto no ecossistema circundante (COUTO et al., 2019).

937

938

## 939 **5. Material e Métodos**

### 940 **5.1. Comissão de Ética:**

941 O projeto foi autorizado para execução pelo Comitê de Ética no Uso de Animais  
942 (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob número de protocolo 259/2023.

### 943 **5.2. História e Funcionamento da Granja**

#### 944 **5.2.1. Histórico da granja**

945 No decorrer do ano de 2023, um total de 702 amostras foi coletado e submetido a testes  
946 para a detecção do IAV. Essas amostras foram coletadas em uma granja de suínos de ciclo  
947 completo localizada no município de Urucânia, na região da Zona da Mata, no estado de  
948 Minas Gerais. A granja abriga aproximadamente 70.000 cabeças e possui unidades de  
949 produção que abrangem todas as fases da criação, incluindo machos reprodutores, reposição,  
950 matrizes, gestação, maternidade, creche e terminação.

951 Na granja analisada, os leitões são desmamados por volta dos 23 dias e encaminhados  
952 para a creche. Os suínos terminados são direcionados ao frigorífico da própria granja para o  
953 abate, o qual ocorre em aproximadamente 150 dias quando os mesmos alcançam o peso  
954 ideal. As marrãs de reposição provêm de outro sítio externo pertencente ao sistema da granja,  
955 onde estão localizadas as avós. A origem das avós está vinculada a uma empresa de genética.

956 Esta fazenda tem enfrentado um histórico persistente de problemas respiratórios por  
957 aproximadamente quatro anos, impactando todas as categorias de suínos, desde as marrãs de  
958 reposição até as matrizes gestantes, passando pelos animais da maternidade, creche e  
959 terminação. Essa situação tem resultado em taxas significativas de mortalidade devido a  
960 doenças respiratórias (Figura 4). Especificamente, os problemas respiratórios afetavam os  
961 leitões na maternidade, a creche (com uma taxa de mortalidade que chegou a 10%), e a fase  
962 de recria.

963

964  
965  
966  
967  
968  
969



970 **Figura 04:** Matriz com Dificuldade Respiratória e Secreção Nasal Purulenta. Fonte: Elaborado pela autora  
971

972 Para enfrentar esse desafio de saúde, inicialmente, a fazenda implementou uma  
973 estratégia de vacinação com uma vacina comercial inativada contra a linhagem pH1N1. Essa  
974 estratégia envolveu uma vacinação em massa de todas as categorias da granja por 10 meses  
975 consecutivos, com intervalos de 4 meses entre cada ciclo, visando proporcionar proteção  
976 tanto individual quanto coletiva.

977 No entanto, diante da persistência dos casos de influenza na granja, nos últimos três  
978 anos, a fazenda decidiu adotar a utilização de uma vacina autógena contra pH1N1, H3N2 e  
979 H1 sazonal humano em sua população de suínos. Os leitões recebem duas doses: a primeira  
980 aos 21 dias de idade e a segunda aos 42 dias. As marrãs de reposição são submetidas a duas  
981 doses, administradas com um intervalo de quatro semanas entre a primeira e a segunda. Além  
982 disso, as matrizes prenhas são vacinadas duas vezes, a primeira dose administrada aos 70  
983 dias de gestação, seguida pela segunda dose aos 90 dias de gestação.

#### 984 **5.2.2. Sistema de tratamento da água de reuso da granja**

985 O sistema de tratamento de efluente da granja estudada, representa uma estratégia  
986 abrangente e eficiente para gerenciar os resíduos gerados pela criação de suínos. Este sistema  
987 desempenha um papel crucial na gestão ambiental responsável dos resíduos e na promoção  
988 da sustentabilidade.

989 A estrutura de produção da granja é composta por um sistema integrado que abrange  
990 a criação, com as instalações dos suínos, abate e industrialização de suínos (frigorífico).  
991 Existem dois tipos distintos de efluentes gerados: um proveniente do frigorífico e outro da  
992 granja. O efluente do frigorífico passa por tratamento na ETEI – Estação de Tratamento de

993 Efluente Industrial, onde o lodo é removido por meio de processos físico-químicos. A água  
994 residuária resultante desse processo é direcionada para a granja de suínos. O efluente da  
995 granja de suínos é conduzido a um grande tanque coletor, onde ocorre a homogeneização e,  
996 em seguida, é dosado para a peneira. Nesse ponto, a parte sólida peneirada é encaminhada  
997 para compostagem, enquanto a parte líquida é direcionada para o biodigestor.

998 O líquido proveniente do biodigestor é misturado com a água residuária do frigorífico  
999 e segue para a próxima etapa. Esses efluentes, contêm uma quantidade significativa de  
1000 matéria orgânica e outros poluentes. Nessa segunda etapa, o efluente é recebido em uma  
1001 grande lagoa intermediária que permite o armazenamento temporário dos efluentes e o início  
1002 do processo de tratamento. O efluente percorre dois caminhos: uma parte é destinada à  
1003 fertirrigação de áreas de pastagens, capineiras e lavoura de milho, enquanto a outra parte  
1004 segue para o tratamento de reuso.

1005 A ETRA (Estação de Tratamento para Reuso de Água) da granja desempenha um  
1006 papel essencial ao receber o efluente, proveniente tanto do frigorífico quanto da granja para  
1007 o tratamento biológico. Sua capacidade de tratamento varia de 80 a 120 metros cúbicos por  
1008 hora, dependendo do grau de qualidade exigido na saída, o que está diretamente relacionado  
1009 à finalidade do reuso da água. Com base na qualidade necessária, controla-se o volume de  
1010 tratamento. A ETRA opera 24 horas por dia, durante os 365 dias do ano, garantindo um  
1011 tratamento contínuo.

1012 Posteriormente, o efluente é bombeado para a ETRA, que desempenha um papel  
1013 essencial na purificação e condicionamento dos efluentes. Na ETRA, ocorrem processos  
1014 físico-químico, para separar sedimentos e remover coloides e minerais, tornando o efluente  
1015 mais adequado para tratamento posterior. O princípio fundamental do tratamento baseia-se  
1016 na técnica de "Flotação", para a qual são utilizados produtos químicos, tanto orgânicos  
1017 quanto inorgânicos. Isso inclui coagulantes, como cloreto férrico, sulfato ferroso, taninos,  
1018 entre outros; floculantes, que podem ser aniônicos, catiônicos, iônicos ou não iônicos; e  
1019 alcalinizantes, como soda, barrilha e leite de cal. O uso adequado desses produtos permite a  
1020 coagulação e floculação, que aglutina toda a matéria orgânica e outros componentes.

1021 Antes de atingir o reator biológico, o efluente passa por lagoas de equalização,  
1022 responsáveis por armazenar e dosar o efluente de forma a garantir a concentração e o volume  
1023 ideais para o tratamento biológico subsequente. O reator biológico, também conhecido como

1024 lagoa aeróbia, é onde ocorre a degradação da matéria orgânica (Figura 5). O efluente tratado  
1025 é então encaminhado para o decantador, onde as partículas sedimentáveis são separadas do  
1026 líquido. É crucial destacar que, nesse sistema, a eficiência é maximizada graças ao ciclo de  
1027 recirculação dos materiais sedimentados ou decantados, que retornam ao reator biológico.  
1028 Isso otimiza a degradação dos resíduos orgânicos.

1029 O sistema prossegue com um decantador secundário, onde o líquido sobrenadante,  
1030 com uma baixa quantidade de sólidos em suspensão, é direcionado para uma lagoa de  
1031 polimento. A lagoa de polimento tem a função de remover quaisquer resíduos  
1032 remanescentes, assegurando que o efluente tratado cumpra os padrões ambientais  
1033 estabelecidos. A água tratada e clarificada é retirada pelo fundo por meio do transbordo  
1034 lateral. Essa água tratada é direcionada para dois tanques receptores de 25.000 litros cada e,  
1035 posteriormente, para a lagoa aeradora, de onde é transferida para os tanques de  
1036 armazenamento (Figura 5). A partir desses tanques, a água é bombeada para as caixas  
1037 distribuidoras, onde fica pronta para o reuso.



1038 **Figura 05:** Estação de Tratamento de Efluentes (ETRA). A) Reator biológico. B) - Lagoa para armazenar a  
1039 água de reuso depois do tratamento. Fonte: Elaborado pela autora  
1040

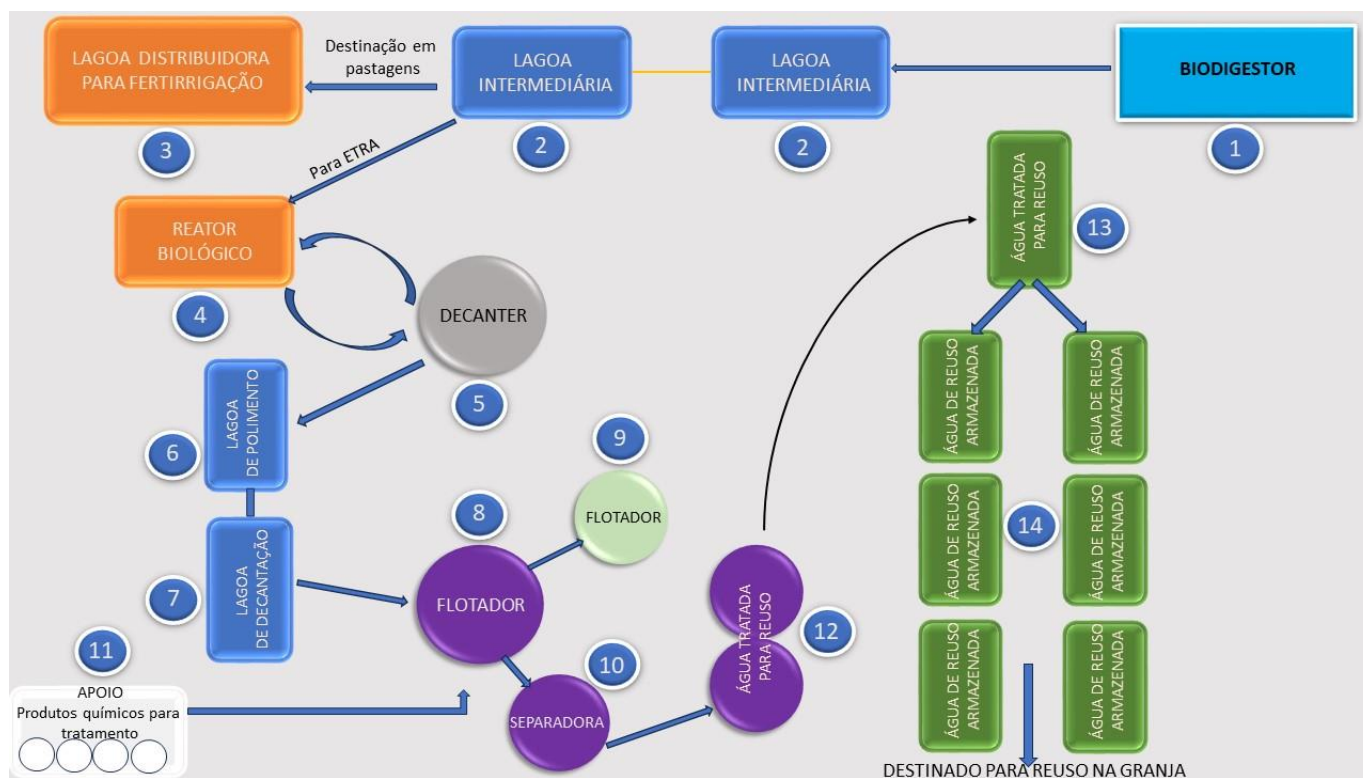
1041

1042 A água tratada, resultado de todo esse processo, é reutilizada em diversas atividades  
1043 da granja, como lavagem de baias dos galpões, jardinagem, banho de suínos destinados ao  
1044 frigorífico, lavagem de pisos, entre outras. Isso não só reduz o desperdício de água, mas  
1045 também minimiza o impacto ambiental, pois a água é reaproveitada de maneira eficaz.

1046 Além disso, o sistema conta com tanques receptores de lodo, que coletam e secam os  
1047 resíduos sólidos resultantes do processo de tratamento. A granja mantém um controle  
1048 rigoroso da qualidade da água tratada, com um galpão equipado com painéis de controle para

1049 a injeção de produtos químicos, monitoramento do pH e outros parâmetros essenciais para  
 1050 garantir a eficácia do tratamento. A Figura 6 ilustra de forma abrangente todo o processo de  
 1051 tratamento da ETRA.

1052



1053 **Figura 06:** Representação da estação de tratamento para reúso de água da granja estudada. 1- Biodigestor; 2-  
 1054 Lagoas que antecedem o reator biológico e servem para armazenar e dosar o efluente. 4- Lagoa aeróbia ou  
 1055 “reator biológico” conectado ao “decanter” (decantador de sólidos ou sedimentador). 5- Decanter; 6- Lagoa de  
 1056 polímero. 7- Lagoa de decantação. 8/9- Flotador. 10- Separadora. 12- Tanques que recebe água tratada para  
 1057 reúso. 13- Lagoas que servem de reservatório da água de reúso, porém nesta primeira lagoa essa água recebe  
 1058 aeração. 14- - Lagoas que servem de reservatório da água de reúso. Fonte: Elaborado pela autora

1059

### 1060 5.2.3. Água de consumo dos animais

1061 A água fornecida para os suínos beberem provém de uma fonte subterrânea a uma  
 1062 profundidade de 80 metros. Essa água é armazenada em reservatórios de água, que são  
 1063 tanques de aço inoxidável, antes de ser disponibilizada para os suínos. Não é realizado  
 1064 tratamento com a água antes de fornecê-la aos animais, sendo a água subterrânea considerada  
 1065 adequada para consumo direto.

1066

### 1067 5.3. Coleta e Processamento das Amostras

1068 **5.3.1. Coleta das amostras**

1069 Ao longo do ano de 2023, conduzimos três fases de coleta de amostras: a primeira  
 1070 ocorreu em fevereiro, a segunda em abril e a terceira em agosto. Na primeira coleta, foram  
 1071 coletadas 289 amostras de suabes retais e nasais, com o intuito de detectar a presença do  
 1072 vírus, além de 141 amostras de soro, para análise sorológica. As amostras foram coletadas  
 1073 em diferentes categorias na granja, como de marrãs, matrizes gestantes em diferentes  
 1074 estágios de gestação, abrangendo os setores de maternidade, creche, recria e terminação.  
 1075 (Tabela 1). A segunda coleta, concentrou-se em amostras ambientais, totalizando 13  
 1076 amostras (Tabela 2). Na terceira visita, coletamos 200 amostras de suabes retais e nasais de  
 1077 leitões de diferentes dias de nascimento (1 dia; 10 dias; 20 dias) na maternidade e 59  
 1078 amostras de leite e colostro de matrizes lactentes (Tabela 3).

1079 **Tabela 01:** Número de amostras coletadas de suabe nasal, suabe retal e soro em diferentes categorias de  
 1080 suínos durante as duas coletas de 2023.

<b>CATEGORIA</b>	<b>SUABE NASAL</b>	<b>SUABE RETAL</b>	<b>SORO</b>	<b>DATA DA COLETA</b>
Leitoas chegada	10	10	10	FEV. 2023
Leitoas flushing	10	10	10	FEV. 2023
Gestantes 45 dias	10	10	10	FEV. 2023
Gestantes 90 dias	10	10	10	FEV. 2023
Gestantes 114 dias	10	10	10	FEV. 2023
Lactantes 20 dias	9	9	10	FEV. 2023
Leitão 1 dia	33	33	-	<b>AGO.2023</b>
Leitão 10 dias	33	33	-	<b>AGO.2023</b>
Leitão 20 dias	34	34	-	<b>AGO.2023</b>
Leitão 23 dias	10	10	10	FEV. 2023
Leitão 35 dias	11	11	11	FEV. 2023
Leitão 45 dias	15	15	15	FEV. 2023
Recria 60 dias	15	15	15	FEV. 2023
Terminação 100 dias	10	10	10	FEV. 2023
Terminação 130 dias	10	10	10	FEV. 2023
Terminação 150 dias	14	15	10	FEV. 2023
<b>Total</b>	<b>244</b>	<b>245</b>	<b>141</b>	-

1081

1082

1083 A seleção dos suínos para a coleta baseou-se na presença de sintomas clínicos  
1084 característicos da gripe em suíno, tais como tosse, espirros, perda de peso, prostração e  
1085 diarreia. Para a coleta de secreção nasofaríngea, foram utilizados suabes com ponta rayon  
1086 em fibra sintética, com aproximadamente 15cm de comprimento. Os suabes foram  
1087 previamente umedecidas em uma solução de transporte composta por solução salina  
1088 tamponada com fosfato 1x (PBS), em seguida, foram introduzidos suavemente nas narinas  
1089 dos animais, seguindo a direção dorso-medial ao longo do septo nasal. Foi realizado um  
1090 movimento circular com o suabe para garantir a cobertura da maior parte da superfície da  
1091 mucosa nasal. Para a coleta de fezes dos animais foram utilizados suabe sintéticos com 15  
1092 cm de comprimento. Os suabes foram umedecidos em PBS 1X e em seguida introduzidos  
1093 suavemente no reto dos animais, seguindo uma direção caudo-cranial acompanhando a  
1094 região do reto, conforme procedimento descrito por SCHAEFER (2013) (Figura 7). Após a  
1095 coleta, os suabes foram diluídos em 3 ml de solução PBS suplementado com 1% de  
1096 antibiótico (10,000 units/mL de Penicilina + 10,000 µg/mL de Estreptomicina).



1097

1098 **Figura 07:** Processo de Coleta de Amostras no Ambiente da Granja. A) Coleta do efluente bruto na saída do  
1099 galpão da maternidade; B) coleta do suabe retal nos leitões da maternidade; C) limpeza do úbere das matrizes;  
1100 D) Coleta de leite. Fonte: Elaborado pela autora

1101

1102 Para coleta de sangue e obtenção de soro, foram utilizados seringas de 10 mL e agulhas  
 1103 descartáveis e estéreis; para leitões de creche, agulhas com tamanho de 25 x 8 ou 25 x 10 e  
 1104 para suínos em crescimento e terminação, foram utilizadas agulhas 40 x 12 ou 40 x 16.  
 1105 Durante o procedimento, os suínos foram devidamente contidos, para garantir segurança e  
 1106 conforto e o sangue foi coletado da fossa jugular direita (SCHAEFER et al., 2013).

1107 A coleta das amostras ambientais envolveu a obtenção de 500 mL de efluente bruto  
 1108 da saída do galpão, água de reúso (efluente submetido a tratamento biológico) e água de  
 1109 consumo dos animais (Figura 7). Após a coleta, realizou-se a avaliação imediata do pH de  
 1110 cada amostra. Todas essas amostras foram devidamente armazenadas em frascos estéreis,  
 1111 seguindo o procedimento descrito em Wolfe (2022).

1112

1113 **Tabela 02:** Quantidade e Tipos de Amostras Ambientais Coletadas

<b>TIPO DE AMOSTRA</b>	<b>LOCAL DE COLETA</b>	<b>DATA DA COLETA</b>	<b>QUANTIDADE COLETA</b>
Água de reúso	Lagoas que servem de reservatório da água de reúso	ABR.2023	1
Água de reúso	Galpão da gestação	ABR.2023	1
Água de reúso	Galpão da creche	ABR.2023	1
Água	Tanque de armazenamento para toda granja	ABR.2023	1
Água	Chupeta maternidade	ABR.2023	1
Efluente	Galpão das leitoas de chegada	ABR.2023	1
Efluente	Galpão terminação 150 dias	FEV. 2023	1
Efluente	Frigorífico pós-tratamento químico	ABR.2023	1
Efluente	Galpão da creche	ABR.2023	1
Efluente	Galpão da maternidade 1	ABR.2023	1
Efluente	Galpão da maternidade 2	AGO.2023	1
Efluente	Galpão da maternidade 3	AGO.2023	1
Efluente	Galpão da maternidade 4	AGO.2023	1
<b>TOTAL</b>			<b>13</b>

1114

1115 Após a administração de 10 UI de ocitocina por via intravenosa na veia auricular,  
 1116 utilizando uma agulha de calibre 20 x 1,5 polegadas. Na primeira etapa de coleta, foram  
 1117 obtidas 23 amostras, compostas por 7 amostras de colostro e 16 de leite. É importante

1118 ressaltar que, durante esse processo não foi realizada a devida higienização dos úberes das  
 1119 matrizes. Na segunda fase de coleta, foram obtidas aproximadamente 36 amostras,  
 1120 consistindo em 10 amostras de colostro e 26 de leite. Diferentemente da coleta anterior,  
 1121 durante este processo adotamos uma prática de higienização rigorosa dos úberes das matrizes  
 1122 com a higienização das tetas com lenço umedecido e álcool 80%, com o intuito de remover  
 1123 quaisquer sujidades (MARTINS et al., 2007) (Figura 7). Cerca de 20 mL de leite e colostro  
 1124 foram manualmente coletados de cada fêmea a partir do "pool" de tetas funcionais, conforme  
 1125 descrito por Martins (2007). As amostras foram posteriormente homogeneizadas e  
 1126 armazenadas em duplicata em recipientes estéreis a uma temperatura de -80°C para análises  
 1127 posteriores.

1128 **Tabela 03:** Quantidade e Tipos de Amostras de Leite Coletadas.

<b>TIPO DE AMOSTRA</b>	<b>QUANTIDADE DE AMOSTRA</b>	<b>DATA DA COLETA</b>
COLOSTRO	7	JUNHO/2023
LEITE	16	JUNHO/2023
COLOSTRO	10	AGOSTO/2023
LEITE	26	AGOSTO/2023
<b>TOTAL</b>	<b>59</b>	

1129

### 1130 **5.3.2. Recuperação e concentração das amostras ambientais**

1131 Para amostras de água, por apresentarem concentrações virais relativamente baixas,  
 1132 optamos pelo método de filtração em membrana eletronegativa para a concentração do vírus.  
 1133 A retirada de vírus de matrizes aquáticas é efetuada por meio da adsorção em um filtro de  
 1134 membrana, seguida pela recuperação por eluição, processo denominado eluição por adsorção  
 1135 de vírus (VIRADEL) (CORPUZ et al., 2020; ABREU et al., 2022). Quando utilizamos esse  
 1136 método, é necessário acidificar a amostra com ácido acético (1M) até atingir um pH entre 3  
 1137 e 3,5. Essa acidificação induz a protonação do capsídeo da proteína, invertendo a carga  
 1138 elétrica na superfície viral. Na etapa seguinte, 100 ml das amostras de água passam por esse  
 1139 filtro de membrana de carga eletronegativa HAWP04700 de éster de celulose, com poros de  
 1140 0,45µm e diâmetro de 47mm (MILLIPORE, Darmstadt, Alemanha). Os vírus com carga  
 1141 positiva são, então, retidos na superfície devido à atração eletrostática entre as partículas

1142 virais e a membrana. Após o processo de filtração, a membrana foi removida e a extração  
1143 foi realizada utilizando kit específico (LOPES et al., 2022; CHERNICHARO et al., 2021).

1144 A detecção do vRNA do IAV é mais comum na fração sólida do que na fração líquida  
1145 nas águas residuais de humano (WOLFE et al., 2022). Portanto, nas amostras de efluente e  
1146 água de reuso, não realizamos nenhum processo de filtração. Dessa forma, coletamos o  
1147 efluente bruto e água de reuso diretamente das granjas para a subsequente extração do RNA  
1148 viral.

### 1149 **5.3.3. Curva de eficiência de amplificação do RT-qPCR**

1150  
1151 Foi conduzida uma curva padrão para avaliar a eficiência de amplificação da reação  
1152 RT-qPCR para a triagem das amostras, utilizando os *primers* para a detecção da proteína M  
1153 do vírus influenza A, conforme descrito por ELLIS & CURRAN (2001), juntamente com a  
1154 sonda descrita por TERRIER (2011).

1155

1156 Para elaborar a curva de eficiência de amplificação na PCR quantitativa, foram  
1157 realizadas reações utilizando um isolado do vírus pH1N1, proveniente de pulmão de animal  
1158 com sinais clínicos respiratórios, originário de granja suína brasileira (RAJÃO et al., 2013).  
1159 A curva-padrão abrangeu aproximadamente cinco pontos, sendo cada ponto executado em  
1160 triplicata em uma diluição de uma série de diluição padrão de 10 vezes.

### 1161 **5.3.4. Extração e detecção do genoma viral**

1162 O RNA viral foi extraído das amostras de suabe nasal e suabe retal utilizando o Mini  
1163 kit de RNA viral QIAamp (*Qiagen*), e para as amostras ambientais e amostras de leite foi  
1164 utilizado o *AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen)*, de acordo com as normas do fabricante.  
1165 Os extraídos foram armazenados a -80°C, até o momento do uso.

1166 As amostras de águas residuais brutas, demonstram maior turbidez, sólidos suspensos  
1167 e concentrações de matéria orgânica. Além disso, os efluentes contêm concentrações  
1168 elevadas de compostos inibidores de reações de qPCR, tais como ácidos húmicos, fúlvicos  
1169 e metais pesados. Essas características impactam diretamente na precisão da detecção de  
1170 vírus nessas amostras (PRADO et al., 2019).

1171 Com o objetivo de reduzir a presença de possíveis inibidores, todas as amostras  
1172 extraídas de suabe retal, amostras ambientais e de leite (n = 317) foram submetidas à triagem

1173 para a detecção da proteína M do IAV, utilizando diluições de ácidos nucleicos de 10 e 100  
1174 vezes em uma solução de águas *UltraPure DNase/RNase-Free*.

1175 Em seguida, submeteram-se essas amostras diluídas aos testes de detecção da proteína  
1176 M do IAV por RT-qPCR (Triagem), conforme descrito por ELLIS & CURRAN (2001). Foi  
1177 utilizado o *SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit w/ROX (Life Technologies,*  
1178 *Carlsbad, CA, EUA)* para a transcrição reversa e amplificação do genoma viral. Todas as  
1179 etapas foram executadas no sistema *QuantStudio 1 Real-Time PCR*. O volume total da  
1180 reação foi de 25 µl para cada reação, contendo 2 µl de RNA extraído, 0,4 µM de cada primer,  
1181 0,2 µM de sonda, 0,5 µM de ROX Dye, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub> e 1 µL  
1182 de *SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix*.

1183 A configuração térmica adotada compreendeu um ciclo único de transcrição reversa  
1184 com duração de 30 minutos a 50 °C, seguido por 2 minutos a 95 °C para inativação da  
1185 transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase. A amplificação do cDNA ocorreu ao  
1186 longo de 45 ciclos, com desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento a 55 °C por 30  
1187 segundos. As etapas de ciclagem foram conduzidas conforme as instruções fornecidas pelos  
1188 kits utilizados. Foram consideradas como positivas as amostras que apresentaram uma curva  
1189 sigmoide característica e alcançaram valores de ciclo de limiar atingindo o máximo de 40.

1190 As amostras positivas para IAV foram subtipadas com o ensaio *nested RT-PCR* para  
1191 a amplificação da HA do IAV (FRAIHA et al., 2021) utilizando *SuperScript™ III One-Step*  
1192 *RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Carlsbad, CA,*  
1193 *EUA)*. O volume final da reação foi de 25 µl para cada reação contendo 2 µl de RNA extraído,  
1194 0,4 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub> e 1 µL da *SuperScript™*  
1195 *III RT/Platinum™ Taq Mix*.

1196 O perfil térmico compreendeu um ciclo único de transcrição reversa por 30 minutos a  
1197 50 °C, seguido de 2 minutos a 95 °C para inativação da transcriptase reversa e ativação da  
1198 DNA polimerase. A amplificação do cDNA foi realizada ao longo de 40 ciclos, incluindo  
1199 desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos para os *primers*  
1200 da H1 e 52 °C para o H3, extensão a 68 °C por 1 minuto e extensão final de 5 minutos a 68  
1201 °C. As etapas de ciclagem foram conduzidas conforme as instruções fornecidas pelos kits  
1202 utilizados.

1203 Para a transcrição reversa e amplificação do genoma e na segunda reação foi utilizado  
1204 *Platinum™ Taq DNA Polimerase Brasil (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA)*. Um  
1205 microlitro da primeira reação de RT-PCR foi usado como molde para a segunda reação de  
1206 PCR. A segunda reação foi realizada em 25 µL total da reação contendo 0,5 µM de cada  
1207 primer, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP e 3U de Taq DNA polimerase.

1208 O perfil térmico da segunda reação envolveu um único ciclo de 2 minutos a 95 °C para  
1209 ativar a Taq DNA polimerase. A amplificação do DNA ocorreu ao longo de 40 ciclos,  
1210 compreendendo desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos  
1211 para os *primers* pH1N1 e H3N2, e a 55 °C para o H1hu, seguido de extensão a 72 °C por 1  
1212 minuto, com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. As etapas de ciclagem foram  
1213 conduzidas conforme as instruções fornecidas pelos kits utilizados.

1214 No processo de análise das amostras positivas para IAV, foi conduzida a subtipagem  
1215 utilizando o ensaio RT-PCR, focado na amplificação da NA do vírus para identificação dos  
1216 subtipos N1 e N2 (CHOI et al., 2002). Utilizamos o SuperScript™ III One-Step RT-PCR  
1217 System with Platinum™ Taq DNA Polymerase, com um volume total de reação de 25 µl  
1218 para cada amostra. Cada reação incluiu 2 µl de RNA extraído, 0,4 µM de cada primer, 200  
1219 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub>, com 1 µL do mix SuperScript™ III RT/Platinum™  
1220 Taq. O protocolo de amplificação de DNA consistiu em uma etapa inicial de transcrição  
1221 reversa a 45 °C por 30 minutos por 2 minutos a 94 °C para inativação da transcriptase reversa  
1222 e ativação da DNA polimerase, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30  
1223 segundos, anelamento a 60 °C por 45 segundos e extensão a 68 °C por 45 segundos. A etapa  
1224 final da PCR foi concluída com uma extensão a 68 °C por 5 minutos.

1225 Os amplicons foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose a 2%,  
1226 corados com brometo de etídio e examinados sob luz ultravioleta (UV) para visualizar os  
1227 resultados.

1228 Os *primers* utilizados na reação de RT-qPCR para a triagem das amostras de suabe  
1229 retal, suabe nasal, leite e amostras ambientais e de subtipagem estão detalhados nas Tabela  
1230 4.

1231

1232

1233

1234 **Tabela 04:** Sequência dos pares de *primers* utilizados para as reações de triagem e subtipagem das  
 1235 amostras de suabe retal, suabe nasal, leite e amostras ambientais.  
 1236

REAÇÃO	TIPO/SUB TIPO	PRIMERS	SEQUÊNCIA (5'-3')	TAMANHO (bp)
RT-PCR	1ªReação/ H1	FW1H1 RV1H1	AGCAAAAGCAGGGGAAAAYA <sup>1</sup> CCCATAGYAYRAGGACTTC <sup>1</sup>	616bp
	2ªReação/ H1N1pdm	FW2H1PDM RV2H1PDM	CCAATCATGACTCGAACAAAC <sup>1</sup> ATAGCACGAGGACTTCTTTCT <sup>1</sup>	159bp
	2ªReação/ H1hu	FW2H1DEL TA RV2H1DEL TA	GCGTTGCCGGATGGATCTTA <sup>1</sup> ACAGACCATTCTTCCCCGTCA <sup>1</sup>	303bp
	1ªReação/ H3	FW1H3 RV1H3	ATATGTTCAAACGTCAGGGAGA <sup>1</sup> GTCGATTGCTGCTTGAGTGC <sup>1</sup>	544bp
	2ªReação/ H3N2	FW1H3 RV2H3	ATATGTTCAAACGTCAGGGAGA <sup>1</sup> TTCCCATTTGGAGTGACGCA <sup>1</sup>	279bp
	Reação/ N1	N1F N1R	GGT TCC AAA GGA GAC ATT TTT G <sup>2</sup> CTA TCC AAA CAC CAT TGC CAT A <sup>2</sup>	754pb
Reação/ N2	N2F N2R	TGC GAT CCT GAC AAG TGT TAT C <sup>2</sup> CAG ACA CAT CTG ACA CCA GGA T <sup>2</sup>	502pb	
RT- qPCR	Influenza A	AM <i>Forward</i> AM <i>Reverse</i> AM <i>Probe</i>	GAGTCTTCTAACMGAGGTTCGAAACGTA <sup>3</sup> GGGCACGGTGAGCGTRAA <sup>3</sup> JUN- TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA- QSY <sup>4</sup>	

1237

1238 Fonte: <sup>1</sup>FRAIHA et al., 2019; <sup>2</sup>CHOI et al., 2002; <sup>3</sup>ELLIS et al., 2001; <sup>4</sup>TERRIER et al., 2011.

1239

#### 1240 5.4. Isolamento do vírus

1241 Para avaliar a viabilidade do vírus, amostras de suabe nasal, retal e efluente positivas  
 1242 para IAV foram diluídas (diluição 1:3) em solução salina tamponada com fosfato,  
 1243 concentrada 1 vez (PBS 1X, pH 7.4), suplementado com 1% de antibiótico (penicilina  
 1244 10.000 UI/mL e estreptomicina 10.000µg/mL) e filtradas utilizando filtros 0,22 µm. Foram  
 1245 inoculadas 200 µL de cada amostra filtrada em ovos embrionados de galinha com 10 a 11  
 1246 dias de incubação na região da cavidade alantoide. A maioria dos IAV se replica  
 1247 eficientemente nesse ambiente, tornando os ovos um substrato ideal para a amplificação viral  
 1248 de amostras de campo. Após incubação a 37°C durante três dias, o líquido alantóide foi  
 1249 coletados. (EISFELD et al., 2014).

1250 Para as passagens seguintes, empregou-se a linhagem celular MDCK CCL34 (rim  
1251 canino *Madin-Darby*). As células MDCK foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio  
1252 *Eagle modificado por Dulbecco* completo (DMEM; SIGMA), contendo 1 mM de piruvato  
1253 de sódio, 4,5 mg/ml de L-glicose, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, e  
1254 suplementado com 5% de soro fetal bovino (KRAUSS et al., 2012; MACHADO et al.,  
1255 2010).

1256 Para a inoculação, as células foram cultivadas até atingirem cerca de 80-90% de  
1257 confluência (3 x 10<sup>5</sup> células) em meio de infecção composto por DMEM suplementado  
1258 com 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) e TPCK-tripsina na concentração 1:1.000. Em  
1259 seguida, 500 µL de cada amostra da passagem anterior foram inoculados na monocamada  
1260 celular. Após a inoculação, as garrafas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e uma  
1261 avaliação diária microscópica foi conduzida para observar efeitos citopáticos (ECP), como  
1262 arredondamento celular e desprendimento da superfície de crescimento, ao longo de 3 a 5  
1263 dias. Quando ≥90% das células se separaram da monocamada, o meio foi clarificado por  
1264 centrifugação para sedimentar os detritos celulares (3.200 g a 4 °C por 10 minutos), e o  
1265 sobrenadante foi coletado e as alíquotas restantes foram congeladas a -80 °C (KRAUSS et  
1266 al., 2012; MACHADO et al., 2010).

## 1267 **5.5. Sequenciamento**

1268 As amostras que apresentaram efeito citopático foram extraídas e submetidas ao  
1269 protocolo adaptado de amplificação dos segmentos HA e NA do genoma viral descrito por  
1270 Hoffmann (2001). Foram utilizados o Kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with*  
1271 *Platinum™ Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA)* transcrição  
1272 reversa e amplificação do cDNA. O volume total de reação foi de 50 µl para, contendo 10 µl  
1273 de RNA extraído, 0,6 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub> e 2 µL  
1274 da *SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix* (Tabela 5).

1275 As fases de ciclagem foram ajustadas com base nas orientações dos kits empregados,  
1276 seguindo também o protocolo descrito por HOFFMANN (2001). Um ciclo único de  
1277 transcrição reversa foi realizado por 60 minutos a 50 °C, seguido por 2 minutos a 94 °C para  
1278 inativação da transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase. A amplificação do cDNA  
1279 ocorreu ao longo de 40 ciclos, abrangendo desnaturação a 94 °C por 20 segundos,

1280 anelamento a 58 °C por 30 segundos para HA e 52 °C para NA, extensão a 68 °C por 7  
1281 minutos, com uma extensão final de 5 minutos a 68 °C.

1282 **Tabela 05:** Pares de primers empregados na amplificação dos genes NA e HA dos isolados.

GENE	PRIMERS	SEQUÊNCIA (5'-3')	TAMANHO (bp)
HA	Bm-HA-1 <i>Forward</i>	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG	1778bp
	Bm-NS-890R <i>Reverse</i>	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	
NA	Ba-NA-1 <i>Forward</i>	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT	1413bp
	Ba-NA-1413R <i>Reverse</i>	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	

1283

1284 Fonte: HOFFMANN et al., 2001

1285 Os amplicons passaram por análise eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com  
1286 brometo de etídio e inspecionado sob luz ultravioleta (UV) para a visualização. Os  
1287 fragmentos correspondentes a HA e NA foram isolados e purificados utilizando o kit  
1288 *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL)*, conforme instruções do  
1289 fabricante.

1290 Os amplicons purificados foram sequenciados por eletroforese capilar, de acordo com  
1291 instruções do kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, em equipamento ABI 3730  
1292 (*Applied Biosystems*, EUA). As reações de sequenciamento foram realizadas em triplicata,  
1293 em ambas as direções, utilizando os *primers* específicos (*forward* e *reverse*) descritos  
1294 anteriormente (Tabela 06). Os dados das sequências de nucleotídeos foram analisados e  
1295 montados usando a ferramenta SnapGene 6.1.1. e, posteriormente, sequências referência  
1296 dos genes de HA e NA foram obtidas do National Center for Biotechnology Information  
1297 (NCBI) conforme TOCHETTO et al (2023), JUNQUEIRA et al (2023) e NELSON et al  
1298 (2015), para sequências brasileiras de origem suína, e ANDERSON et al (2016) e CHANG  
1299 et al (2019) para sequências norte americanas de origem suína. O alinhamento das  
1300 sequências de cada segmento foi realizado pelo MAFFT v7.471 (KATO E STANDLEY,  
1301 2013) utilizando o método de global-pair com ajuste de direção seguida de correção manual  
1302 pelo programa Aliview v1.28 (Uppsala,SE) (LARSON,2014). As árvores filogenéticas  
1303 foram construídas pelo método de máxima verossimilhança pelo IQ-TREE2 (v.2.1.3)

1304 (MINH et al, 2020), sendo a árvore de HA construída utilizando o modelo GTR+F+I+G4 e  
1305 a de NA utilizando TiM2 +F +I + G4, conforme recomendações de  
1306 KALYAANAMOORTHY et al (2017). O método de ultrafast Bootstrap foi aplicado com  
1307 1000 réplicas (HOAND et al., 2018). A visualização gráfica final das árvores foi gerada pela  
1308 ferramenta online ITOL (LETUNIC E BORK, 2019).

1309

## 1310 **5.6. Análises sorológicas**

1311 Foram examinadas 141 amostras de soro para detecção de anticorpos neutralizantes  
1312 por meio da técnica de Inibição da Hemaglutinação (HI) contra as linhagens brasileiras  
1313 H3N2, pH1N1 e H1hu de IAV de origem suína, previamente caracterizados (FRAIHA et al.,  
1314 2021). O protocolo utilizado seguiu as diretrizes estabelecidas pela Organização Mundial  
1315 da Saúde (OMS, 2002).

1316 Os soros dos animais foram inativados a 56°C por 30 minutos e sujeitos a tratamento  
1317 com Caolin 20 % para reduzir possíveis inibidores da hemaglutinação presentes no soro. No  
1318 teste de Inibição da Hemaglutinação (HI), foram empregadas hemácias de peru diluídas a  
1319 1% em PBS 1x. O soro tratado foi diluído em PBS na placa de 96 poços com fundo em V,  
1320 começando com a primeira diluição 1:20, considerada negativa, seguida pelas diluições 1:40  
1321 até a diluição 1:2560, consideradas positivas.

1322

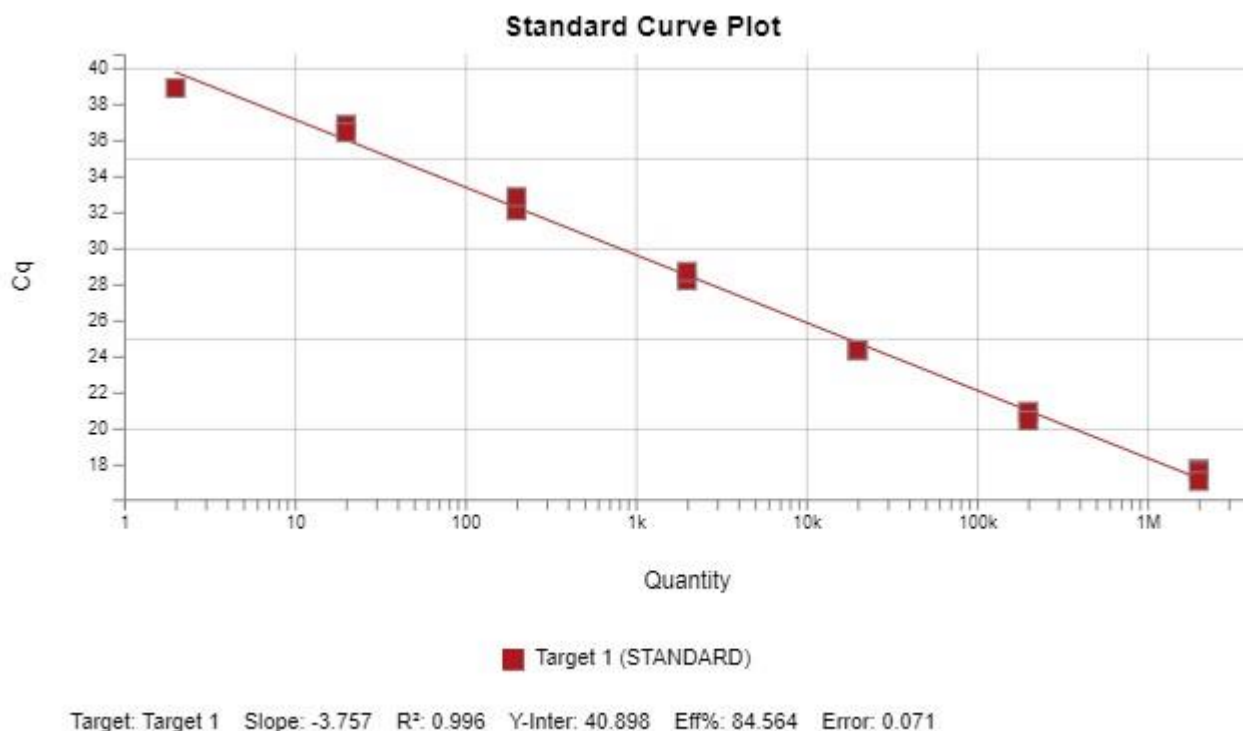
1323

## 1324 **6. RESULTADOS**

1325

### 1326 **6.1. Avaliação da Eficiência de Amplificação**

1327 O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) atingiu 0,996 , enquanto a inclinação da reta (slope)  
1328 foi de -3,757. A eficiência de amplificação, calculada em 84,564 %, ressalta a capacidade  
1329 consistente da reação em amplificar eficientemente o alvo desejado ao longo dos ciclos de  
1330 PCR (Figura 8). O limite de detecção (LOD), foi estabelecido em Ct de 40, tanto em amostras  
1331 de suabe nasal, retal e amostras ambientais.



1332

1333 **Figura 08:** Análise de Regressão Linear entre os Valores de CT e Diluições do RNA do Vírus pH1N1. A série  
 1334 de diluições padrão segue uma escala decrescente da esquerda para a direita, iniciando com a maior  
 1335 concentração do padrão. A linha horizontal que atravessa todas as curvas representa o limiar para o ciclo de  
 1336 quantificação (Cq). Fonte: *Software QuantStudio 1 Real-Time PCR System*

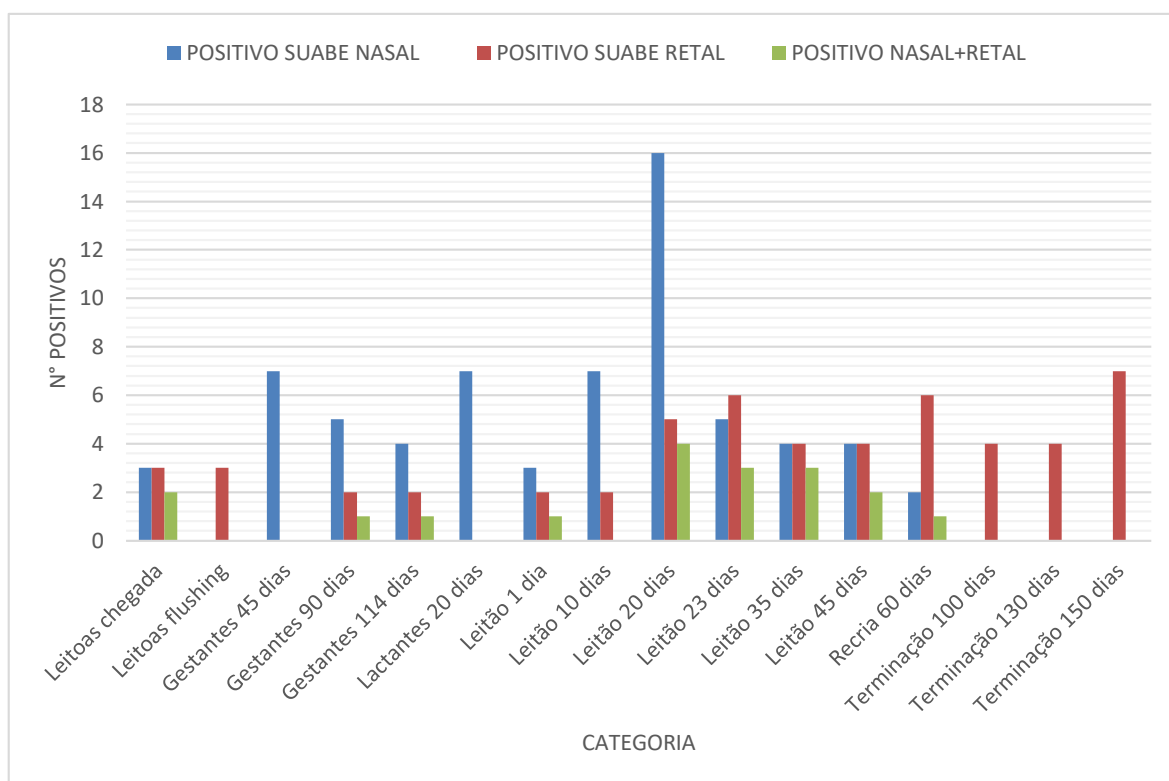
## 1337 **6.2. Taxa de detecção das amostras de secreção nasal e fezes**

1338 Das 244 amostras de suabe nasal coletadas das diversas categorias da granja, 67  
 1339 (67/244 - 27%) foram positivas para IAV. As categorias com maior incidência de animais  
 1340 positivos foram: Matrizes com 20 dias de lactação, registrando 7 amostras (7/9 – 77%);  
 1341 Matrizes com 45 dias de gestação, com 7 amostras (7/10 – 70%); Matrizes com 90 dias de  
 1342 gestação, apresentando 5 amostras (5/10 – 50%); Leitão na creche com 23 dias de idade,  
 1343 com 5 amostras (5/10 – 50%); Leitão na maternidade com 20 dias de idade, contabilizando  
 1344 16 amostras (16/34 – 47%) (Figura 9). Notavelmente, os animais terminados de 100, 130 e  
 1345 150 dias não apresentaram nenhuma amostra positiva (Tabela 6).

1346 No que diz respeito ao suabe retal coletado das 245 amostras, 54 (54/245- 22%) foram  
 1347 positivas para IAV. Entre as categorias que apresentaram maior positividade: Leitões na  
 1348 creche com 23 dias de idade registraram 6 amostras (6/10 – 60%); Animais terminados de  
 1349 150 dias apresentaram 7 amostras (7/15 – 47%); Animais na fase de recria com 60 dias de

1350 idade totalizaram 6 amostras (6/15 – 40%); Animais na fase de terminação com 100 e 130  
 1351 dias, cada categoria com 4 amostras (4/10 – 40%). Notavelmente, matrizes com 20 dias de  
 1352 lactação e matrizes com 45 dias de gestação não apresentaram nenhuma amostra positiva  
 1353 (Figura 9).

1354 Das 121 amostras positivas de suabe retal e nasal, 18 (18/121 - 15%) foram positivas  
 1355 tanto na secreção nasal quanto nas fezes. As categorias que apresentaram o maior número  
 1356 de amostras positivas em ambos os tipos de amostras foram: Leitões na creche com 35 dias  
 1357 de idade, com 3 amostras (3/8 – 37%); Leitoas de reposição, registrando 2 amostras (2/6 –  
 1358 33%); Leitões na creche com 23 dias de idade, com 3 amostras (3/11 – 27%); Leitões com  
 1359 45 dias de idade, com 2 amostras (2/8 – 25%) (Figura 9).



1360

1361 **Figura 09:** Distribuição da positividade de amplificação de RNA do Influenza A por RT-qPCR em Amostras  
 1362 de suabe nasal e retal de diferentes categorias.

1363

1364

1365

1366 **Tabela 06:** Distribuição de amostras positivas de suabe nasal e retal para Influenza A - Valores totais e  
 1367 percentuais por categoria na granja.  
 1368

<b>CATEGORIA</b>	<b>POSITIVOS SUABE NASAL</b>	<b>POSITIVOS SUABE RETAL</b>	<b>POSITIVO NASAL+ RETAL</b>
<b>Leitoas chegada</b>	3/10 (30%)	3/10 (30%)	2/6 (33%)
<b>Leitoas flushing</b>	0(0%)	3/10 (30%)	0(0%)
<b>Gestantes 45 dias</b>	7/10 (70%)	0 (0%)	0(0%)
<b>Gestantes 90 dias</b>	5/10 (50%)	2/10 (20%)	1/7 (14%)
<b>Gestantes 114 dias</b>	4/10 (40%)	2/10 (20%)	1/6 (17%)
<b>Lactantes 20 dias</b>	7/9 (77%)	0(0%)	0(0%)
<b>Leitão 1 dia</b>	3/33 (9%)	2/33 (6%)	1/5 (20%)
<b>Leitão 10 dias</b>	7/33 (21%)	2/33 (6%)	0(0%)
<b>Leitão 20 dias</b>	16/34 (47%)	5/34 (15%)	4/21 (19%)
<b>Leitão 23 dias</b>	5/10 (50%)	6/10 (60%)	3/11 (27%)
<b>Leitão 35 dias</b>	4/11 (36%)	4/11 (36%)	3/8 (37%)
<b>Leitão 45 dias</b>	4/15 (26%)	4/15 (27%)	2/8 (25%)
<b>Recria 60 dias</b>	2/15 (13%)	6/15 (40%)	1/8 (12%)
<b>Terminação 100 dias</b>	0(0%)	4/10 (40%)	0(0%)
<b>Terminação 130 dias</b>	0(0%)	4/ 10 (40%)	0(0%)
<b>Terminação 150 dias</b>	0(0%)	7/15 (47%)	0(0%)
<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>54</b>	<b>18</b>

### 1369 **6.3. Amostras Ambientais**

1370 Entre as 13 amostras ambientais, incluindo água, efluente e água de reuso, coletadas  
 1371 em diversas categorias e locais na granja, identificamos 4 amostras positivas para IAV,  
 1372 representando uma taxa de positividade de 31%. Essas amostras positivas incluíram água de  
 1373 reuso da lagoa de reservatório, água de reuso utilizada no galpão de gestação, efluente  
 1374 coletado do galpão de terminação dos animais de 150 dias e o efluente do galpão da  
 1375 maternidade 3.

1376 As análises de pH das amostras de efluente bruto, água de reuso e água de consumo  
 1377 dos animais revelaram valores próximos à neutralidade, variando entre 6,50 e 8,0. Destaca-  
 1378 se que as amostras de água de reuso exibiram um pH mais alcalino em comparação com as  
 1379 demais amostras (Tabela 7).

1380

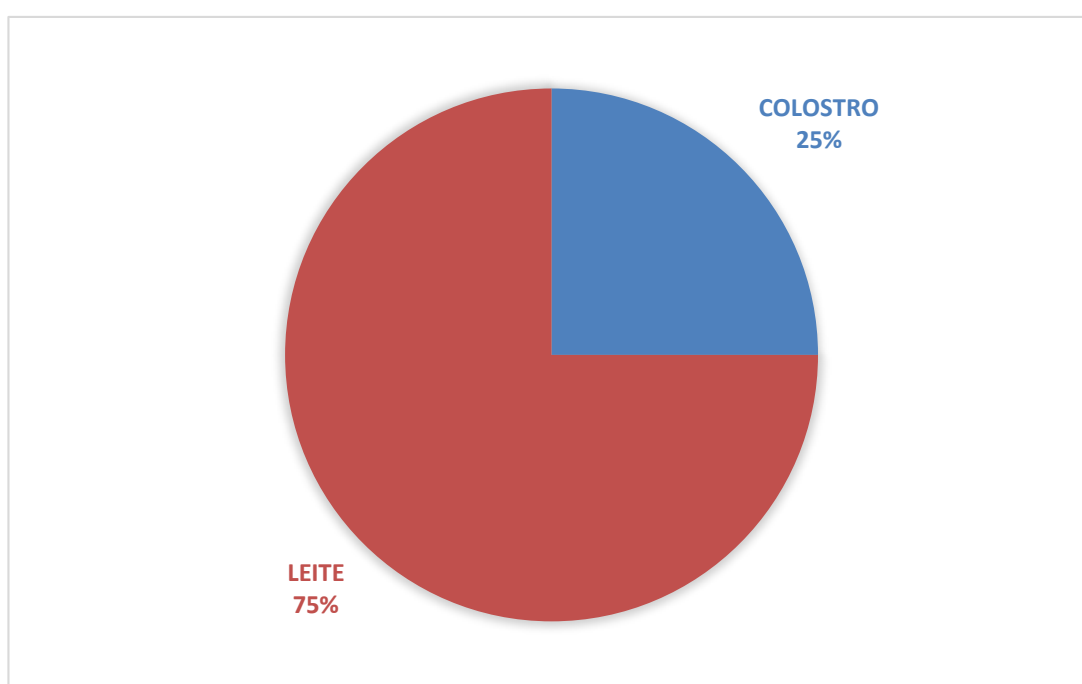
1381 **Tabela 07:** Amostras Ambientais Positivas e Valores de pH.

1382

<b>TIPO DE AMOSTRA</b>	<b>LOCAL DE COLETA</b>	<b>Valor de Ct</b>	<b>Valor de pH</b>
<b>Água de reuso</b>	Lagoas que servem de reservatório da água de reuso	36.758	7.8
<b>Água de reuso</b>	Galpão da gestação	36.589	7.9
<b>Água de reuso</b>	Galpão da creche	Indeterminado	8
<b>Água</b>	Tanque de armazenamento para toda granja	Indeterminado	-
<b>Água</b>	Chupeta maternidade	Indeterminado	7.1
<b>Efluente</b>	Galpão das leitoas de chegada	Indeterminado	-
<b>Efluente</b>	Galpão terminação 150 dias	31.17	7,60
<b>Efluente</b>	Frigorifico pós-tratamento químico	Indeterminado	6,50
<b>Efluente</b>	Galpão da creche	Indeterminado	7,04
<b>Efluente</b>	Galpão da maternidade 1	Indeterminado	7,27
<b>Efluente</b>	Galpão da maternidade 2	Indeterminado	7,34
<b>Efluente</b>	Galpão da maternidade 3	36.467	7,71
<b>Efluente</b>	Galpão da maternidade 4	Indeterminado	7,69

1383 **6.4. Taxa de detecção das amostras de leite e colostro de matrizes lactentes na**  
1384 **maternidade**

1385 Das 59 amostras obtidas de leite e colostro das matrizes lactentes na maternidade,  
1386 identificamos 12 amostras positivas para IAV, representando uma taxa de 20%. Essas  
1387 amostras positivas distribuíram-se entre 3 amostras de colostro (25%) e 9 amostras de leite  
1388 (75%) (conforme mostrado na Figura 10). Notavelmente, 75% (9/12) das amostras foram  
1389 positivas durante a primeira coleta, sendo 1 amostra de colostro e 8 de leite, enquanto 25%  
1390 (3/12) foram identificadas na segunda coleta, compreendendo 2 amostras de colostro e 1 de  
1391 leite.



1392

1393 **Figura 10:** Porcentagem de amostras positivas para a amplificação do RNA do Influenza A por RT-qPCR  
1394 em amostras de leite e colostro.

1395 **6.5. Subtipagem de vírus influenza A em amostras positivas na triagem**

1396 Entre as 146 amostras positivas para IAV, abrangendo suabe retal, suabe nasal,  
1397 ambiental, leite e colostro, um total de 82 amostras passaram pelo processo de subtipagem.  
1398 Essa seleção englobou todas as amostras positivas nas categorias de amostras ambientais,  
1399 totalizando aproximadamente 4 amostras, além de leite e colostro durante a triagem,  
1400 totalizando cerca de 12 amostras.

1401 Foram incluídas também amostras que apresentaram resultados positivos  
 1402 simultaneamente nos suabes retal e nasal, sendo aproximadamente 18 amostras de suabe  
 1403 retal e 18 amostras de suabe nasal. Além disso, foram consideradas aquelas com valores de  
 1404 Ct mais baixos, abrangendo 16 amostras de suabe retal e 14 amostras de suabe nasal (Tabela  
 1405 8).

1406

1407 **Tabela 08:**Distribuição das amostras positivas para os subtipos de influenza pH1N1, H3N2 e H1hu em  
 1408 diferentes categorias de animais, juntamente com o número total de amostras testadas em cada categoria. As  
 1409 amostras estão agrupadas de acordo com a categoria animal.

CATEGORIA	pH1N1	H3N2	H1hu
<b>Leitoas chegada</b>	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
<b>Leitoas flushing</b>	0/2(0%)	0/2 (0%)	0/2(0%)
<b>Gestantes 45 dias</b>	0/0 (0%)	0/0 (0%)	0/0(0%)
<b>Gestantes 90 dias</b>	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
<b>Gestantes 114 dias</b>	2/4 (50%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
<b>Lactantes 20 dias</b>	1/2 (50%)	0/2(0%)	0/2(0%)
<b>Leitão 1 dia</b>	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
<b>Leitão 10 dias</b>	0/4 (0%)	1/4 (25%)	1/4(25%)
<b>Leitão 20 dias</b>	0/16 (0%)	8/16 (50%)	1/16 (6%)
<b>Leitão 23 dias</b>	1/6 (17%)	4/6 (67%)	0/6 (0%)
<b>Leitão 35 dias</b>	1/6 (17%)	1/6 (17%)	0/6 (0%)
<b>Leitão 45 dias</b>	0/5 (0%)	2/5 (40%)	2/5 (40%)
<b>Recria 60 dias</b>	0/4 (0%)	2/4 (50%)	0/4 (0%)
<b>Terminação 100 dias</b>	0/2(0%)	0/2 (0%)	0/2(0%)
<b>Terminação 130 dias</b>	0/2(0%)	0/2 (0%)	0/2(0%)
<b>Terminação 150 dias</b>	1/2(50%)	0/2 (0%)	0/2(0%)
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>18</b>	<b>5</b>

1410

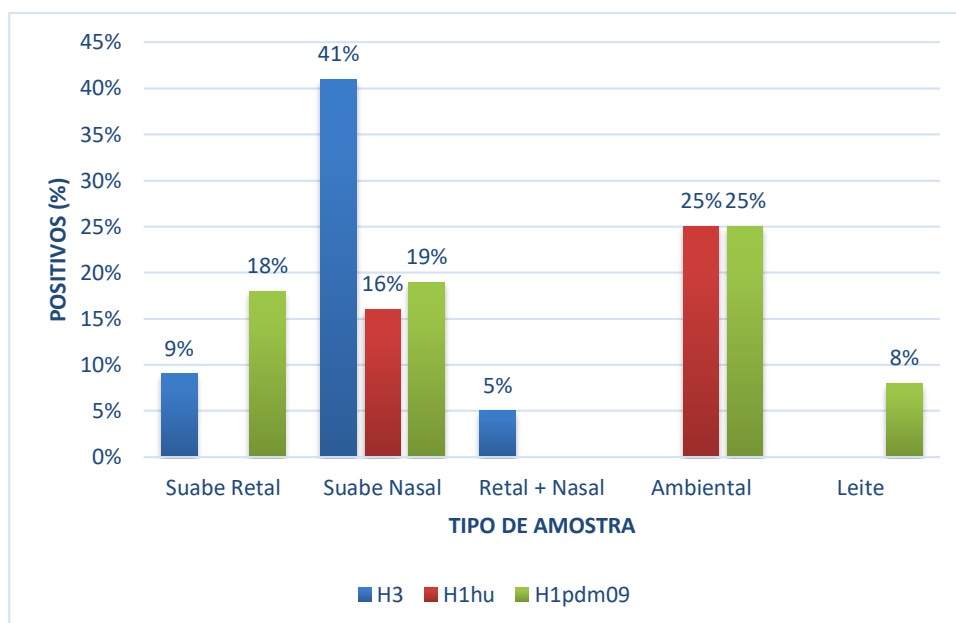
1411

1412 Após a análise de subtipagem das amostras de suabe nasal, constatou-se que foram  
1413 subtipadas 32 (32/82-39%) amostras. Dessas, 41% (13/32) foram identificadas como  
1414 positivas para H3, 19% (6/32) para H1pdm09 e 16% (5/32) para H1hu. Por outro lado, nas  
1415 amostras de suabe retal, foram subtipadas 34 amostras (34/82-41,5%). Dessas, 9% (3/34)  
1416 foram positivas para H3, 18% (6/34) para H1pdm09, não sendo detectada nenhuma amostra  
1417 positiva para H1hu.

1418 Dentre as amostras que foram positivas tanto no suabe retal quanto no suabe nasal, 5%  
1419 (2/36) foram positivas para o subtipo H3. Em relação à coinfeção, 6% (5/82) das amostras  
1420 apresentaram coinfeção dupla, com 80% (4/5) delas sendo positivas para H3+H1hu e 20%  
1421 (1/5) para H1pdm09+H1hu (Figura 11).

1422 Das 4 amostras ambientais subtipadas, identificou-se que uma amostra de água de reuso da  
1423 lagoa de reservatório foi positiva para H1pdm09, enquanto a água de reuso utilizada no  
1424 galpão de gestação apresentou positividade para H1hu. Em relação às 12 amostras de leite e  
1425 colostro subtipadas, apenas uma amostra de leite foi positiva para H1hu (Figura 11).

1426 As seis amostras que apresentaram positividade para H1hu na subtipagem *nested* RT-  
1427 PCR foram posteriormente submetidas a um ensaio de RT-PCR para identificar os subtipos  
1428 N1 e N2. Nesse processo, conseguimos realizar a subtipagem de duas amostras provenientes  
1429 de suabe nasal. Uma delas foi identificada como H1N1, enquanto a outra revelou uma  
1430 coinfeção pelos subtipos H1N1 e H3N2 (Figura 11).



1431

1432 **Figura 11:** Porcentagem de Amostras Positivas para os Subtipos H1hu, H3 e pH1N1 Utilizando a Técnica  
 1433 de Nested RT-PCR em Diferentes Tipos de Amostras. Fonte: Elaborado pela autora

#### 1434 6.6. Isolamento das amostras positivas

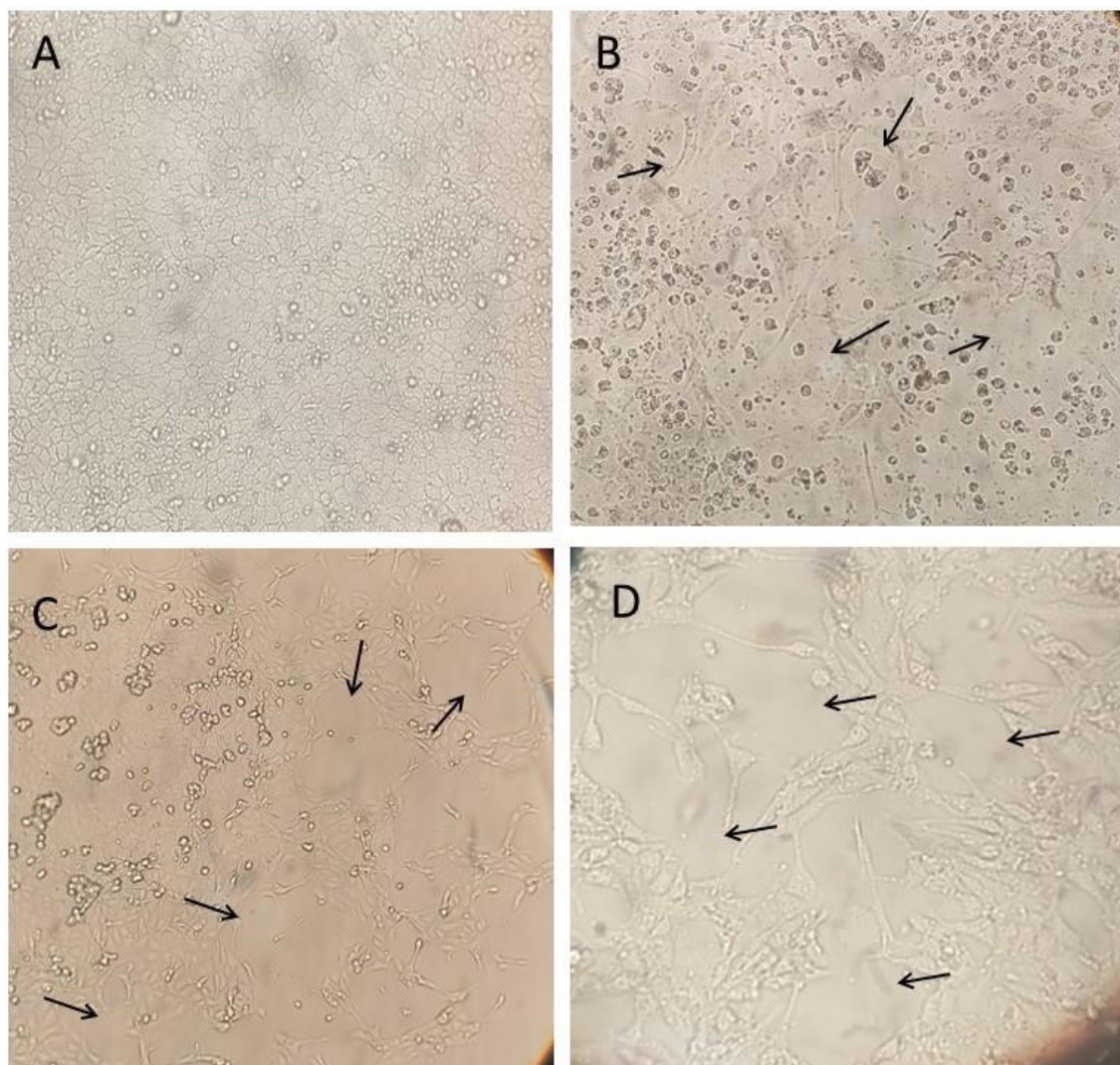
1435 Para o isolamento viral, foram selecionadas três amostras de suabe retal provenientes  
 1436 de diferentes categorias, escolhidas com base em seus valores de Ct mais baixos. Destacam-  
 1437 se a Amostra Animal 10 da categoria de matrizes com 90 dias de gestação, a Amostra Animal  
 1438 1 da categoria de leitão com 35 dias e a Amostra Animal 7 da terminação de 130 dias.

1439 Além dessas amostras, foi realizado o isolamento viral de uma amostra ambiental, mais  
 1440 especificamente, o efluente proveniente do galpão dos animais de 150 dias, que apresentou  
 1441 o Ct mais baixo. Cada amostra passou por 6 a 7 passagens para visualizar possíveis efeitos  
 1442 citopáticos (ECP), como arredondamento celular e desprendimento da superfície de  
 1443 crescimento.

1444 Na inoculação da amostra de suabe retal proveniente da matriz com 90 dias de  
 1445 gestação, os ECPs começaram a se evidenciar a partir da quinta passagem de forma mais  
 1446 lenta, atingindo 30% de efeito em 96 horas após a inoculação. Na sétima passagem,  
 1447 observou-se um aumento para 60% no ECP, identificado 72 horas após a inoculação (Figura  
 1448 12 - B). Durante a análise por RT-qPCR para detectar a proteína M do vírus influenza A,  
 1449 obteve-se um resultado positivo.

1450 Durante a inoculação da amostra de suabe retal do leitão com 35 dias (Animal 1), os  
1451 ECPs começaram a se manifestar na quarta passagem, atingindo 50% de efeito em 96 horas  
1452 após a inoculação. Na sexta passagem (Figura 12- C), o ECP aumentou para 80%, detectado  
1453 72 horas após a inoculação. Nesse ponto, uma análise por RT-qPCR para a proteína M do  
1454 vírus influenza A foi realizada, resultando em um teste positivo.

1455 Já na inoculação da amostra de suabe retal do animal de terminação com 130 dias, os  
1456 ECPs surgiram de forma mais acelerada em comparação com outros inóculos. Em apenas  
1457 três passagens, atingiram 60% de efeito em 72 horas após a inoculação. Na sexta passagem,  
1458 houve um aumento para 90% no ECP, identificado 72 horas após a inoculação, conforme  
1459 ilustrado na Figura 12 -D. A análise por RT-qPCR para detecção da proteína M do vírus  
1460 influenza A também resultou em um teste positivo.



1461

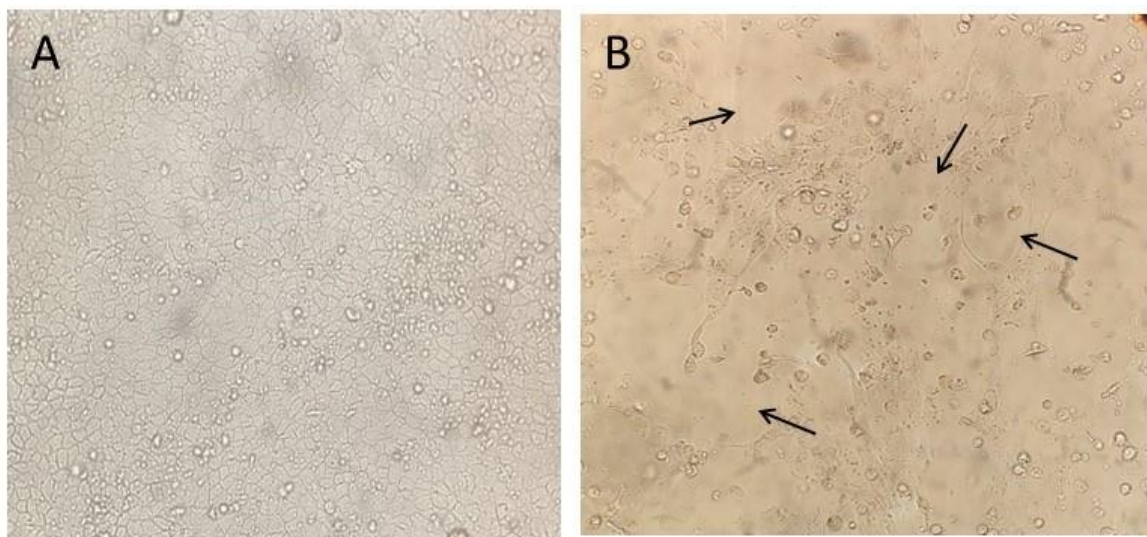
1462 **Figura 12:** Células MDCK CCL34 (rim canino *Madin-Darby*). As setas pretas destacam os efeitos  
1463 citopáticos provocados pela influenza A, após 72 horas de inoculação. A) Controle de célula inoculado com

1464 DMEM; B) 7 passagem da amostra de suabe retal matriz com 90 dias de gestação; C) 6 passagem da amostra  
1465 de suabe retal do leitão com 35 dias; D) 6 passagem da amostra de suabe retal terminação de 130 dias.  
1466 Aumento 500x.

1467

1468 No caso da amostra de efluente proveniente do galpão dos animais de 150 dias, os  
1469 efeitos citopáticos emergiram na quarta passagem, alcançando 50% de ECP em 96 horas  
1470 após a inoculação. Na sexta passagem, houve um aumento para 80% no ECP, identificado  
1471 72 horas após a inoculação, como demonstrado na Figura 13 -B. A análise por RT-qPCR  
1472 para detecção da proteína M do vírus influenza A resultou em um teste positivo.

1473



1474

1475 **Figura 13:** Células MDCK CCL34 (rim canino *Madin-Darby*). As setas pretas destacam os efeitos  
1476 citopáticos provocados pela infecção viral da gripe. A) Controle de célula inoculado com DMEM; B) 6  
1477 passagem da amostra de efluente do galpão de terminação de 150 dias. Aumento 500x. Fonte: Elaborado pela  
1478 autora

1479

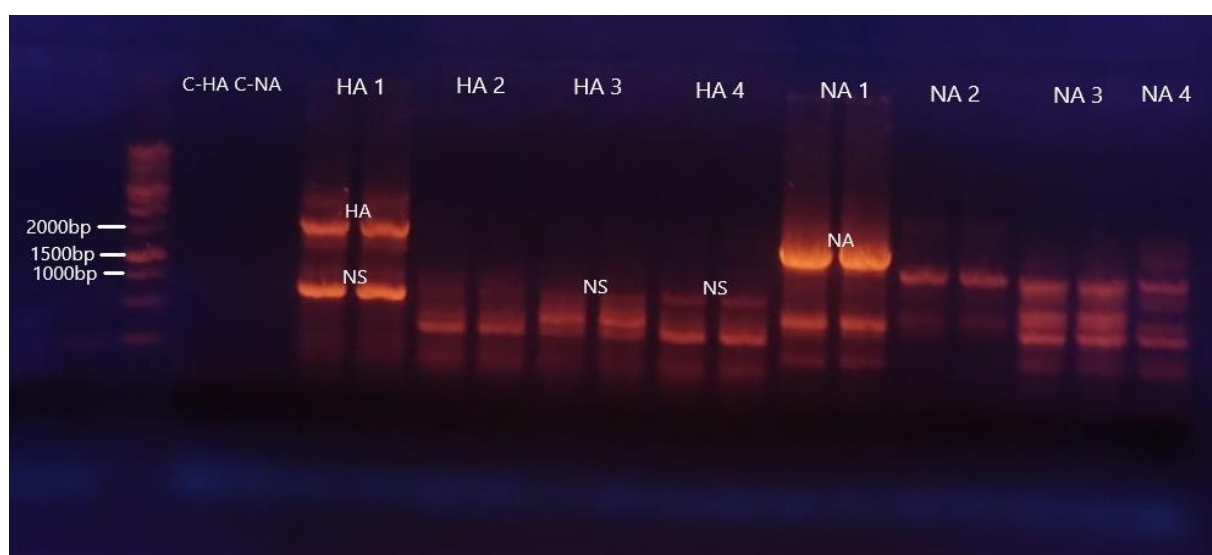
1480 Foi realizado o isolamento da amostra de suabe nasal do animal 10 da categoria de  
1481 recria com 60 dias. Neste caso, a amostra foi submetida apenas à primeira passagem em ovos  
1482 embrionados de galinha, com um período de inoculação de 72 horas. Após a inoculação, a  
1483 análise por RT-qPCR para a detecção da proteína M do vírus influenza A resultou em um  
1484 teste positivo. Não foram realizadas passagens subsequentes nas células MDCK CCL34.

1485

## 6.7. Sequenciamento e Análise filogenética

1486 Na tentativa de amplificação de NA e HA a partir do inóculo viral, registramos sucesso  
 1487 apenas na amostra de suabe nasal do animal de 60 dias. Infelizmente, nos inoculantes  
 1488 provenientes de efluente bruto e fezes, não foi possível capazes de amplificar completamente  
 1489 os fragmentos maiores, como os de 1800 pb da HA, obtendo apenas fragmentos menores,  
 1490 especificamente da NS com 900 pb nos inóculos de suabe retal do leitão de 35 dias e no  
 1491 efluente bruto (Figura 14). No entanto, com o inoculante de suabe nasal, conseguimos  
 1492 sequenciar com sucesso 1.712 pares de bases da HA e 1.391 pares de bases da NA.

1493

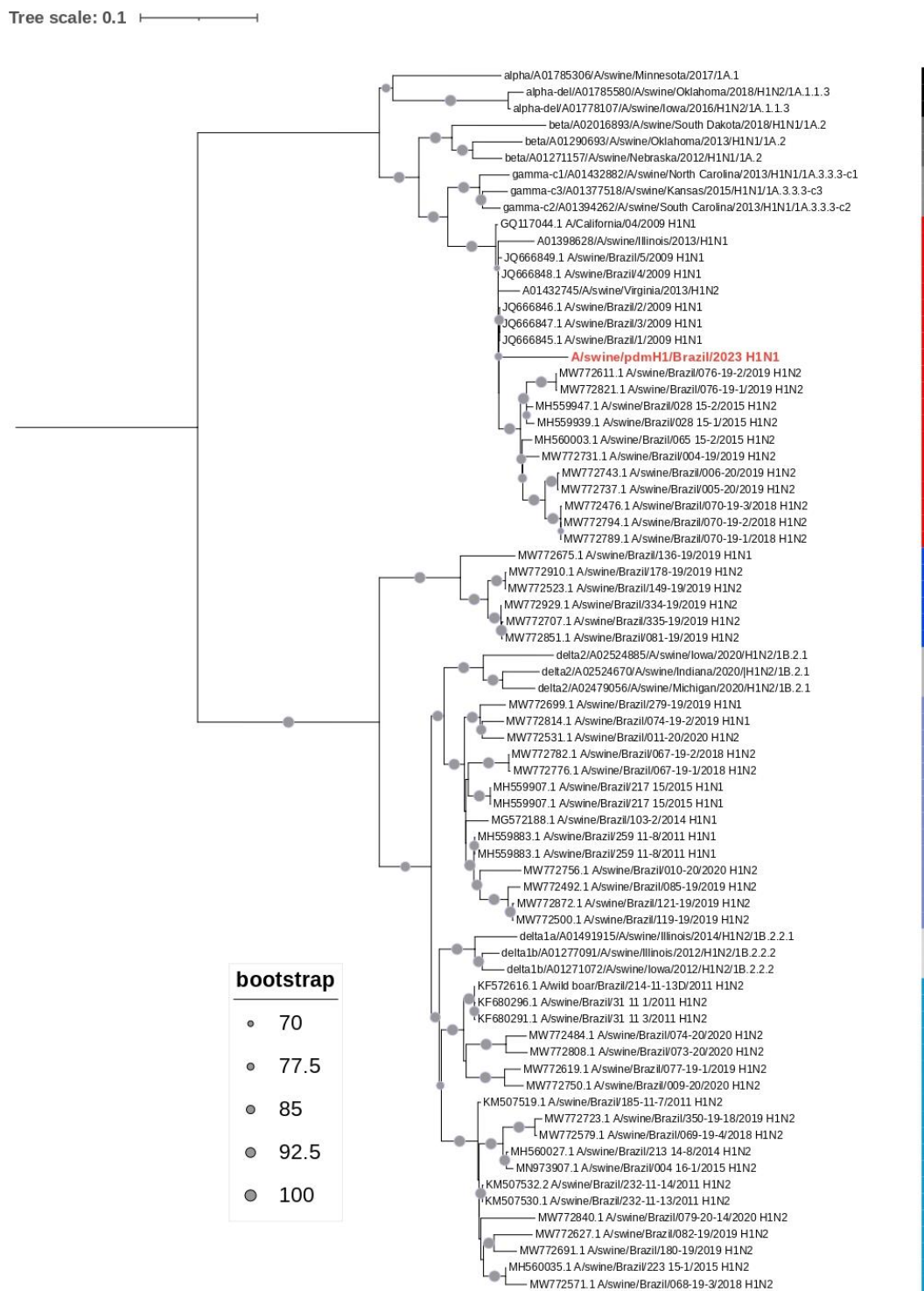


1494

1495 **Figura 14:** Eletroforese em gel de agarose exibindo os resultados da reação de RT-PCR para a detecção de  
 1496 HA e NA nos inóculos. As amostras de 1 a 4 foram colocadas em duplicata para a HA e de 1 a 3 em duplicata  
 1497 para a NA, com a amostra 4 em uniplicata. A amostra 1 corresponde ao suabe nasal do animal de 60 dias; a  
 1498 amostra 2, inoculo de suabe retal do animal de 130 dias; a amostra 3, inoculo de suabe retal do animal de 35  
 1499 dias; e a amostra 4, ao efluente bruto. Os produtos amplificados para a HA possuem aproximadamente 1800  
 1500 pb e para NS 900bp, enquanto para a NA, a amplificação é de 1500 pb.

1501 Nas análises filogenéticas do segmento HA do inóculo, observamos que ele se alinha  
 1502 com as amostras do clado que inclui as amostras brasileiras e norte-americanas da linhagem  
 1503 H1 de origem suína de 2009 a 2019, da linhagem pandêmica (Figura 15) (RAJÃO et al.,  
 1504 2013). A sequência de NA também agrupou-se em um clado que contém amostras de N1 de  
 1505 origem pandêmica do Brasil e norte-americanas, confirmando que o isolado consiste em uma

1506 sequência genética do vírus pandêmico H1N1, que foi introduzido na população suína e  
 1507 humana em 2009 (Figura 16).

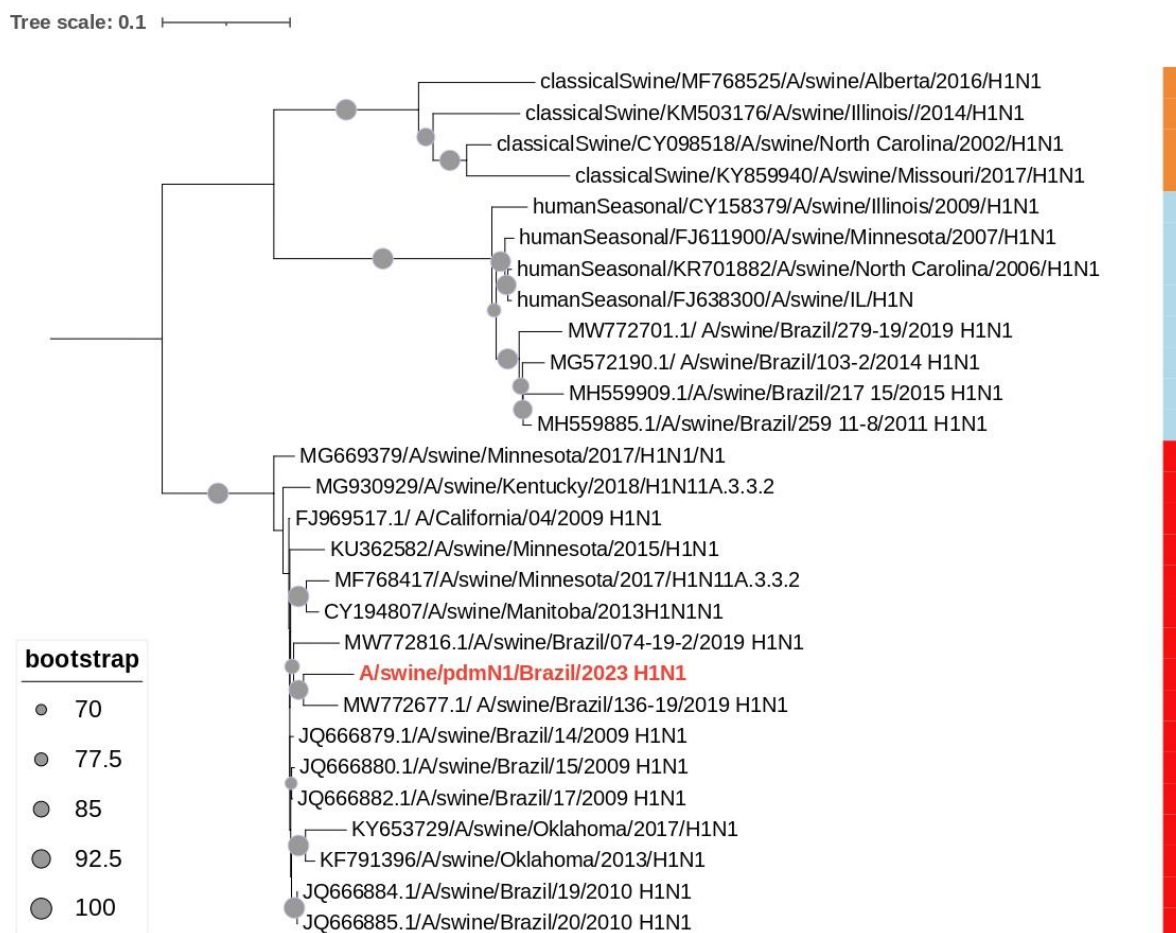


1508

1509 **Figura 15:** Árvore filogenética molecular de várias sequências do segmento genético viral HA, incluindo a  
 1510 sequência da amostra de suabe nasal de um animal de 60 dias. (A/swine/pdmN1/Brazil/2023 H1N1), a amostra  
 1511 está destacada em vermelho. As amostras em tons de preto-cinza representam variantes norte-americanas; Em  
 1512 vermelho, amostras brasileiras e norte-americanas da linhagem pandêmica; Em azul royal, linhagem de origem

1513 sazonal humana; Em azul lilás, outra linhagem de origem sazonal humana; E em azul médio, uma terceira  
1514 linhagem de origem sazonal humana.

1515



1516

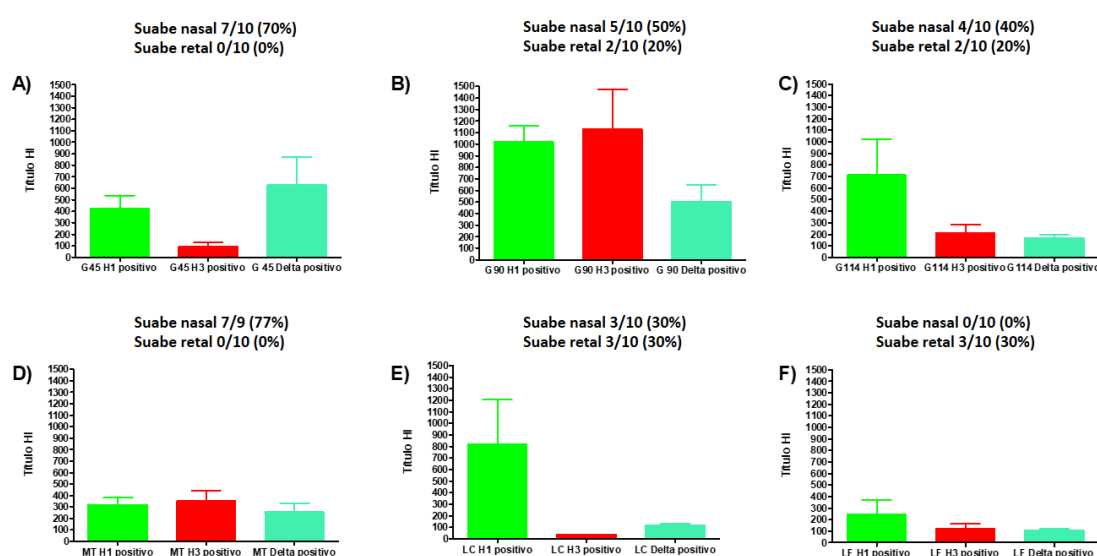
1517 **Figura 16:** Árvore filogenética molecular de várias sequências do segmento genético viral HA,  
1518 incluindo a sequência da amostra de suabe nasal de um animal de 60 dias.  
1519 (A/swine/pdmN1/Brazil/2023 H1N1), destacando a amostra em vermelho. Na legenda, laranja representa a  
1520 linhagem N1 clássica, azul indica a origem sazonal humana, e vermelho denota a origem pandêmica.

## 1521 6.8. Análise sorológica

1522 Das 141 amostras de soro coletadas, aproximadamente 82% (115/141) foram positivas  
1523 no teste HI. A distribuição dos subtipos revelou que 81% (115/141) para pH1N1, 72%  
1524 (102/141) foram positivas para H1hu e, 45% (63/141) para H3N2 e. Quanto às coinfeções  
1525 entre os subtipos, 49% (56/115) das amostras apresentaram coinfeção entre pH1N1+H3N2,  
1526 78% (90/115) entre pH1N1+H1hu e 47% (55/115) coinfeção tripla entre  
1527 pH1N1+H1hu+H3N2.

1528 Os subtipos pH1N1, H3N2 e H1hu foram identificados em todas as categorias, com  
 1529 prevalência destacada em certas condições. Notavelmente, matrizes com 45 dias de gestação  
 1530 exibiram altos títulos, especialmente para H1hu, e títulos mais baixos para H3N2. Matrizes  
 1531 com 90 dias de gestação registraram títulos elevados para pH1N1 e H3N2. Já matrizes com  
 1532 114 dias de gestação e leitoas de reposição apresentaram títulos elevados para pH1N1, com  
 1533 títulos mais baixos para os outros subtipos. Matrizes na maternidade com 20 dias de lactação  
 1534 e leitoas de flushing mostraram títulos mais baixos para os três subtipos (Figura 17).

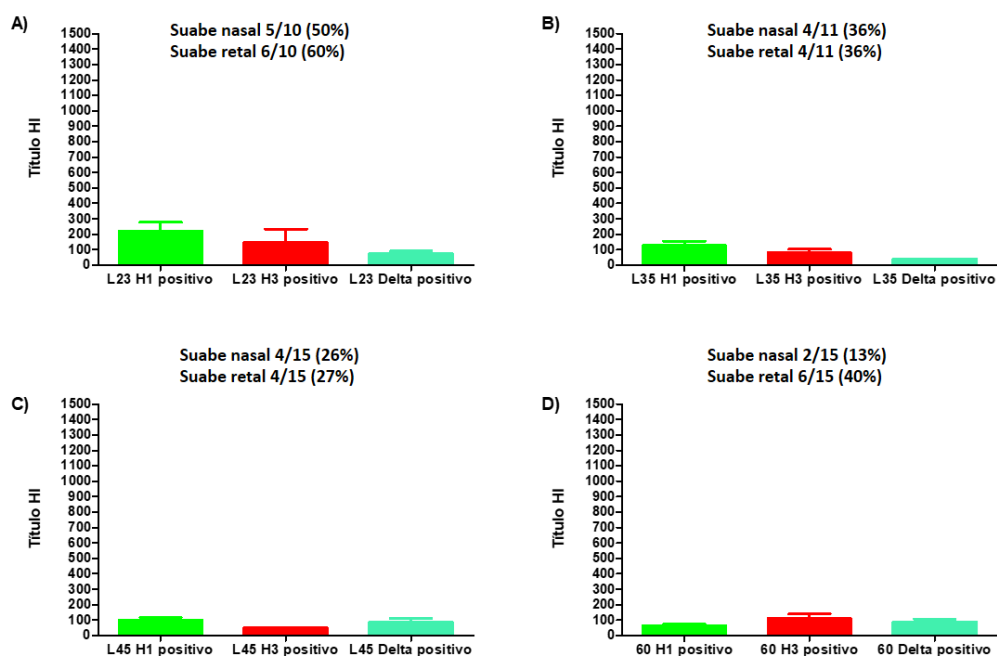
1535



1536 **Figura 17:** Títulos de HI nas Amostras de Soro de Matrizes: pH1N1 (Verde Claro), H3N2 (Vermelho) e  
 1537 H1hu (Verde-Água). G45 – Gestantes 45 dias ; G 90 - Gestantes 90 dias ; G 114- Gestantes 114 dias ; MT -  
 1538 Lactantes 20 dias; LC - Leitoas chegada ; LF - Leitoas flushing A) Matrizes com 45 dias de gestação; B)  
 1539 Matrizes com 90 dias de gestação; C) Matrizes com 114 dias de gestação; D) Matrizes na maternidade com  
 1540 20 dias de lactação; E) Leitoa chegada; F) Leitoas de Flushing. Fonte: Elaborado no programa GraphPad  
 1541 Prism versão 6.0

1542

1543 Os leitões na creche e recria exibem, em geral, títulos mais baixos em comparação com  
 1544 outras faixas etárias para os subtipos pH1N1, H3N2 e H1hu. Destaca-se que apenas os leitões  
 1545 com 23 dias de idade apresentaram um título de anticorpos um pouco mais elevado para  
 1546 pH1N1 em comparação com os outros subtipos, como mostra a figura 18.

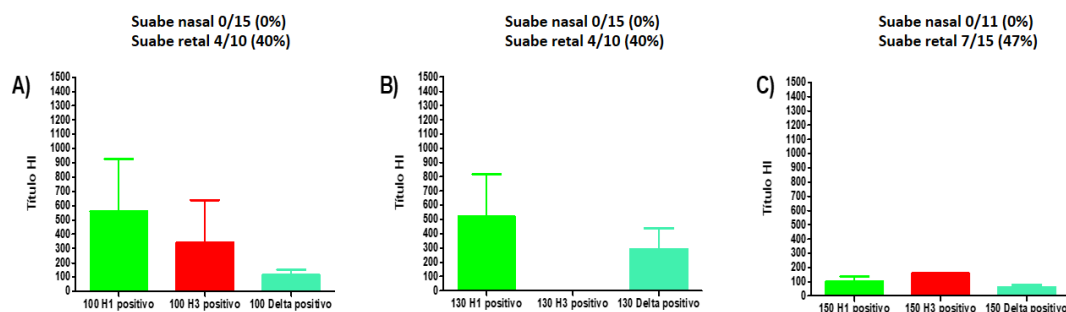


1547

1548 **Figura 18:** Títulos de HI nas Amostras de Soro dos animais da creche e recria: pH1N1 (Verde Claro), H3N2  
 1549 (Vermelho) e H1hu (Verde-Água). L23 - Leitão 23 dias; L35 - Leitão 35 dias; L 45 - Leitão 45 dias. A)  
 1550 Leitões 23 dias; B) Leitões 35 dias; C) Animal com 45 dias; D) Animal com 60 dias. Fonte: Elaborado no  
 1551 programa GraphPad Prism versão 6.0

1552 Os animais de terminação, especialmente aqueles com 100 e 130 dias, demonstram  
 1553 altos títulos para o pH1N1. Notavelmente, os animais de 130 dias não apresentam titulação  
 1554 para o H3N2, enquanto os animais de 150 dias exibem títulos mais baixos para os três  
 1555 subtipos (figura19).

1556



1557

1558 **Figura 19:** Títulos HI amostra de Soro dos animais da Terminação: pH1N1 (Verde Claro), H3N2  
 1559 (Vermelho) e H1hu (Verde-Água). A) Animais com 100 dias; B) Animais com 130 dias; C) Animais com  
 1560 150 dias. Fonte: Elaborado no programa GraphPad Prism versão 6.

1561

1562

## 1563 7. DISCUSSÃO

1564

1565 Durante a análise das amostras de suabe retal, identificamos o RNA do vírus influenza  
 1566 em animais de praticamente todas as categorias. Isso evidencia que o IAV pode ser detectado  
 1567 nas fezes dos suínos, corroborando com as descobertas de KAWAOKA (1986). Além disso,  
 1568 nossos resultados sugerem que a presença do vírus não se limita a animais infectados  
 1569 experimentalmente, conforme mencionado em estudos anteriores (DE VLEESCHAUWER  
 1570 et al.,2009), podendo também ser detectado em amostras de fezes de animais naturalmente  
 1571 infectados.

1572 Na comparação entre o número de animais com resultados positivos nos suabes nasal  
 1573 e retal, observamos uma proporção quase equivalente, com 27% dos animais apresentando  
 1574 positividade no suabe nasal e 22% no suabe retal. Quanto às amostras dos animais que  
 1575 testaram positivo tanto na secreção nasal quanto nas fezes, constatamos uma porcentagem  
 1576 menor, representando apenas 18% do total de 121 amostras positivas (soma dos suabes nasal  
 1577 e retal). Notamos variações entre as categorias, onde os animais mais velhos na fase de  
 1578 terminação foram positivos apenas nas fezes, enquanto as matrizes lactantes e matrizes com  
 1579 45 dias de gestação, apresentaram positividade exclusivamente na secreção nasal.

1580

1581 Os resultados de quantificação das amostras de suabe retal foram mais baixos em  
1582 comparação com as amostras de suabe nasal. Essa observação fica evidente nos casos dos  
1583 animais de 35 e 45 dias que testaram positivo em ambas as amostras, apresentando uma  
1584 média de Ct de 24.49 no suabe nasal e uma média de 38.72 no suabe retal (Tabela  
1585 Suplementar1- 2). Essa discrepância pode estar relacionada à carga viral nas fezes, que tende  
1586 a ser mais baixa do que na secreção nasal. Além disso, a presença significativa de inibidores  
1587 de reações de qPCR nas amostras fecais, combinada com a diluição do material genético em  
1588 uma base de 10, pode ter contribuído para uma menor sensibilidade nos testes  
1589 (FRUEHWIRTH et al.,2020)

1590 A interpretação desses resultados também pode ser influenciada pelo momento da  
1591 coleta. Por exemplo, em algumas categorias, tanto nos suabes retal quanto nasal, observamos  
1592 valores mais baixos de quantificação. Isso é evidenciado na categoria de leitões de chegada,  
1593 onde um animal com o resultado positivo, com Ct de 39.29 no suabe nasal e 40.58 no suabe  
1594 retal. Esses resultados sugerem que, possivelmente, as amostras foram coletadas no final da  
1595 infecção nesse animal. Em outros casos, observou-se que os animais apresentaram valores  
1596 quase idênticos em ambas as amostras, como no caso de uma matriz com 90 dias de gestação,  
1597 que apresentou um valor de Ct de 37.59 no suabe retal e 38.9 no suabe nasal (Tabela  
1598 Suplementar 1- 2). Esses resultados também podem indicar a possibilidade de o animal estar  
1599 reduzindo a carga viral na secreção nasal enquanto mantém a presença nas fezes.

1600 Estudos em humanos, como descrito por HIROSE (2016), mostraram que pacientes  
1601 positivos para influenza liberaram o vírus pelo sistema respiratório em altas cargas virais,  
1602 principalmente nos primeiros 4 dias de infecção. Em contraste, nas fezes, o vírus é detectado  
1603 em títulos virais mais baixos, mas por um período mais prolongado, podendo persistir por  
1604 até 24 dias.

1605 Uma limitação deste estudo é a falta de acompanhamento contínuo desses animais ao  
1606 longo do período de infecção, o que impossibilita a confirmação precisa do momento em  
1607 que os animais deixam de liberar o vírus na secreção nasal e continuam nas fezes. Portanto,  
1608 sugere-se a realização de novos estudos para investigar mais detalhadamente a dinâmica  
1609 temporal da infecção e a persistência do vírus em diferentes amostras.

1610 Quanto à viabilidade do vírus nas amostras de fezes, o isolamento viral em amostras  
1611 de suabe retal de três animais mesmo com carga viral baixa, evidencia que o vírus liberado

1612 nas fezes desses animais permanece viável. Esse achado sugere que as fezes suínas podem  
1613 representar um meio de contaminação ambiental e uma potencial via de transmissão fecal-  
1614 oral entre os animais, assemelhando-se ao que ocorre em aves.

1615 Embora tenhamos detectado o vírus viável nas fezes dos suínos, não conseguimos  
1616 confirmar a razão dessa presença. Os suínos apresentam receptores  $\alpha 2,3$ -Gal e SA  $\alpha 2,6$ -Gal  
1617 nas margens do revestimento intestinal e nas células caliciformes (NELLI et al., 2010),  
1618 indicando a possibilidade de replicação do IAV nas células intestinais, similar ao que ocorre  
1619 em aves. Outra explicação para essa detecção pode ser que, ao infectar e replicar no trato  
1620 respiratório superior, o muco contendo vírus, ao ser engolido, tenha sido protegido pelo  
1621 muco altamente viscoso à base de goma guar e mucina. Esse muco, originado da  
1622 expectoração, secreção nasal e outras secreções da membrana mucosa, demonstra resistência  
1623 ao ácido gástrico e ao suco biliar/pancreático. Ele atua como uma barreira protetora para as  
1624 partículas virais, impedindo que sejam inativadas ou degradadas pelos sucos  
1625 gastrointestinais, e, como resultado, permanece detectável nas fezes, conforme descrito por  
1626 Hirose (2017). No entanto, essa teoria não explica a presença do vírus nos suínos que foram  
1627 positivos apenas no suabe retal.

1628 Estudos tem demonstrado que os IAV podem infectar macrófagos, uma vez que  
1629 antígeno viral tem sido detectado em macrófagos in vivo, sugerindo que essas células podem  
1630 ser infectadas diretamente pelo IAV (SAKABE et al., 2011, CLINE et al., 2017). Entretanto,  
1631 se sua replicação é produtiva ou abortiva tem sido tema de debates (LONDRIGAN et al.,  
1632 2015; CLINE et al., 2017). Alguns autores sugerem que a replicação do IAV em macrófagos  
1633 depende tanto da estirpe viral como do tipo de macrófago (NICOL et al., 2014). A evidência  
1634 mais convincente e consistente de replicação produtiva tem sido demonstrada com vírus  
1635 aviário de alta patogenicidade HPAI H5N1, mas uma replicação baixa a moderada com  
1636 algumas estirpes de vírus influenza sazonal tem sido também relatada (PERRONE et al.,  
1637 2008; SAKABE et al., 2011; HOEVE et al., 2012; LODRIGAN et al., 2015; CLINE et al.,  
1638 2017). Alguns autores sugerem que macrófagos infectados pelo IAV, mesmo que não haja  
1639 replicação viral, podem auxiliar, em alguns casos, na disseminação viral pelo organismo,  
1640 sendo possível a detecção do RNA viral em outros locais que não sejam o trato respiratório.

1641 Também identificamos o RNA do IAV em amostras ambientais, evidenciando que os  
1642 animais não apenas liberam o vírus na secreção nasal, mas também nas fezes, contribuindo  
1643 para a contaminação do ambiente. Detectamos o vírus em amostras de efluente bruto de

1644 galpões que apresentavam elevado número de animais positivos para IAV. Por exemplo, no  
1645 efluente do galpão dos animais de terminação com 150 dias, observamos 47% de animais  
1646 positivos nas fezes, enquanto nenhum animal apresentava resultado positivo nas amostras  
1647 de secreção nasal. É relevante ressaltar que conseguimos isolar essa amostra de efluente em  
1648 cultura celular, o que indica a viabilidade do vírus. Esse cenário destaca a relevância das  
1649 fezes na disseminação do vírus no ambiente. Além disso, identificamos o vírus no efluente  
1650 da maternidade, onde leitões de diferentes idades foram positivos tanto no suabe retal quanto  
1651 nasal, como nas matrizes lactantes, onde a detecção predominante ocorreu no suabe nasal,  
1652 com 77% de positividade.

1653 Outras amostras ambientais que apresentaram detecção do IAV foram as provenientes  
1654 da água de reuso. Mesmo após passar pelo tratamento biológico, ainda conseguimos  
1655 identificar o RNA do vírus, tanto nas lagoas que servem como reservatório quanto na água  
1656 de reuso utilizada no galpão das matrizes gestantes. Essa água desempenha um papel crucial  
1657 na limpeza das baias dos animais, sendo essencial também para a higienização de  
1658 equipamentos, incluindo botas dos funcionários e outros instrumentos utilizados no galpão.  
1659 A detecção do RNA do vírus sugere que essa água pode representar uma nova fonte de  
1660 contaminação ambiental e, potencialmente, uma via de infecção para os animais. Entretanto,  
1661 dado que não conseguimos isolar o vírus dessas amostras, não podemos afirmar com certeza  
1662 se ele permanece viável e se pode causar infecções nos animais.

1663 Notamos que tanto as amostras de efluente quanto de água de reuso exibiam um pH  
1664 alcalino, oscilando entre 7,60 e 7,9, sugerindo que essa condição pode ter propiciado a  
1665 permanência do vírus nesses ambientes. A tendência a um pH mais neutro nas amostras de  
1666 água de reuso pode ser atribuída à necessidade de manter o efluente próximo a um pH neutro  
1667 para facilitar os processos de coagulação e floculação. É plausível que esse ajuste de pH,  
1668 essencial para esses procedimentos, tenha, por sua vez, favorecido a viabilidade do vírus  
1669 nessas amostras ao final do tratamento. Estudos anteriores, conduzidos em amostras de água  
1670 de superfície frequentadas por aves migratórias, indicam que a redução do pH para níveis  
1671 ácidos, geralmente variando de 6,0 a 4,6, pode resultar em uma diminuição da carga viral.  
1672 Isso ocorre devido ao impacto do pH ácido na estrutura do vírus, o que contribui para a  
1673 compreensão do contexto pH-vírus em ambientes aquáticos (RAMEY et al., 2020).

1674 Não podemos afirmar com certeza a eficiência dos sistemas de tratamento na remoção  
1675 de partículas virais. Alguns estudos indicaram a persistência do SARS-CoV-2 mesmo após

1676 o tratamento de águas residuais humanas, revelando a presença de cópias virais em baixas  
1677 concentrações nas saídas do sistema (BALDOVIN et al., 2021; RIMOLDI et al., 2020).  
1678 Como mostram nossos resultados, as amostras de água de reuso apresentaram menor carga  
1679 viral. Similarmente, em estudos que envolveram o tratamento de efluentes suínos, observou-  
1680 se a presença de partículas de PAdV e PCV2 na água tratada no final do processo  
1681 (VIANCELLI et al., 2012). Além disso, a detecção de RNA de rotavírus após o tratamento  
1682 de diferentes tipos de efluentes também foi registrada (COSTANTINI et al., 2007).

1683 Essa persistência pode estar relacionada ao tempo de retenção hidráulica em cada  
1684 estágio do processo de tratamento (VIANCELLI et al., 2012). É conhecido que, quanto  
1685 maior o tempo de retenção da água, menor a presença de partículas virais (COSTANTINI et  
1686 al., 2007). Vale destacar que a inativação viral progrediu de maneira mais rápida na parte  
1687 líquida em comparação com a parte sólida dos efluentes (PESARO et al., 1995). Essas  
1688 considerações sugerem que a eficácia do tratamento pode variar dependendo das condições  
1689 específicas de cada sistema e tipo de efluentes tratados.

1690 Vírus envelopados são geralmente menos estáveis no ambiente em comparação com  
1691 vírus sem envelope. Assim, uma explicação adicional para a detecção e persistência do vírus  
1692 influenza nas amostras de efluentes tratados pode estar relacionada ao fato de que os sólidos  
1693 suspensos presentes no efluente podem desempenhar um papel protetor contra a inativação.  
1694 Já se sabe que certos métodos de tratamento de efluentes de suínos não conseguem remover  
1695 uma proporção significativa dos sólidos suspensos totais presentes nesses efluentes  
1696 (OLIVEIRA et al., 2009). Alguns estudos sugerem que certos vírus podem ser mais estáveis  
1697 na fração sólida das águas residuais (GUNDY et al., 2009; WOLFE et al., 2022; MERCIER  
1698 et al., 2022).

1699 Com base nessas descobertas, é importante reconsiderar a abordagem de tratamento  
1700 na granja, especialmente ao lidar com a inativação do IAV nas águas de reuso. A fim de  
1701 prevenir essa contaminação ambiental e a potencial recirculação do vírus nas instalações dos  
1702 animais, novas estratégias devem ser contempladas.

1703 Uma alternativa para melhorar a qualidade da água de reuso seria a implementação de  
1704 um processo de inativação após a última lagoa, como elevar o pH para valores superiores a  
1705 10 por meio da aplicação de cal hidratada (2%), pois o vírus tende a ser inativado em  
1706 ambientes com pH extremos (VANOTTI et al., 2005). Além disso, implementação da luz

1707 UV, prática já empregada em alguns tratamentos de água para consumo humano e na  
1708 liberação de águas residuais pós-tratamento (ARAÚJO et al., 2016). Outra estratégia mais  
1709 viável é a utilização de produtos químicos, como o cloro, a eficácia do cloro como agente  
1710 sanitizante para inativação viral atinge seu ápice de rapidez e eficácia quando a água mantém  
1711 um pH próximo de 6,5, com uma concentração de aproximadamente 0,2 mg/L  
1712 (NASCIMENTO et al., 2014). Para águas que entram em contato com os suínos, é essencial  
1713 monitorar os níveis de cloro livre, pois altos níveis, devido à sensibilidade aguçada dos  
1714 suínos aos aspectos de sabor e odor, podem resultar na produção de compostos voláteis com  
1715 odores desagradáveis. A Norma Brasileira Regulamentadora NBR13.969 (1997) estabelece  
1716 critérios para a prática de reuso de águas residuais. Para usos como lavagens de pisos,  
1717 calçadas, irrigações de jardins e outros com contato direto do usuário com a água, é  
1718 recomendado que o nível de cloro residual presente na água esteja entre 0,5 mg/L<sup>-1</sup> a 1,5  
1719 mg/L<sup>-1</sup>.

1720 Nos nossos resultados, também identificamos a presença do vírus influenza A nas  
1721 amostras de leite e colostro das matrizes lactantes na maternidade. Observamos que nos  
1722 animais da maternidade apresentaram um número significativo de amostras positivas, tanto  
1723 nas secreções nasais quanto nas fezes dos leitões de diferentes idades, destacando,  
1724 principalmente, a ocorrência em leitões com apenas 1 dia de vida. Isso sugere que as matrizes  
1725 podem ser uma fonte de infecção para os leitões, tanto por meio das fezes quanto do leite. A  
1726 possível contaminação do leite/colostro pode ser atribuída ao ambiente, uma vez que as  
1727 matrizes residem em gaiolas com contato direto com fezes contaminadas. Essa presença do  
1728 vírus nessas secreções (leite/colostro) destaca a importância do ambiente contaminado na  
1729 transmissão do vírus para leitões de diferentes idades.

1730 Não podemos conclusivamente afirmar se a presença do vírus no leite e colostro se  
1731 deve à infecção direta da glândula mamária e à liberação do vírus, assemelhando-se ao que  
1732 foi observado em furões inoculados com o vírus H1N1 pandêmico de 2009 (PAQUETTE et  
1733 al., 2015). Em nosso estudo, não implementamos a higienização adequada da glândula  
1734 mamária das matrizes, o que poderia ter prevenido a contaminação ambiental. Vale notar  
1735 que as amostras apresentaram uma carga viral mais baixa, fenômeno que pode ser explicado  
1736 pela descrição de Paquette (2015), que sugere que o vírus no leite pode ser diluído ou  
1737 concentrado, dependendo da plenitude da glândula mamária no momento da ordenha (Tabela  
1738 Suplementar 3). Essa compreensão adicional acrescenta uma perspectiva importante ao

1739 entendimento da transmissão do vírus por meio do leite. Se a detecção do vírus no leite se  
1740 deve à contaminação ambiental, destaca-se a importância crucial de higienizar  
1741 adequadamente os úberes das matrizes, especialmente no início da amamentação de leitões  
1742 mais jovens. Além disso, é fundamental realizar a coleta regular das fezes dessas matrizes  
1743 para prevenir o contato direto dos leitões com as fezes, reduzindo assim a possibilidade de a  
1744 matriz deitar-se sobre as fezes.

1745 No que diz respeito à subtipagem das amostras positivas durante a triagem,  
1746 observamos que, nos suabes retais, conseguimos detectar apenas dois subtipos: o pH1N1 e  
1747 o H3N2 de origem humana. Isso corrobora com outros estudos que, ao detectarem o vírus  
1748 nas fezes suínos, relataram a presença dos subtipos H3N2 de origem humana e o H1N1 de  
1749 origem aviária (DE VLEESCHAUWER et al., 2009; KAWAOKA et al., 1986). A razão pela  
1750 qual encontramos apenas esses subtipos específicos nas fezes de suínos não está clara, dado  
1751 que vários subtipos do vírus já foram identificados em fezes tanto de humanos quanto de  
1752 aves. Notamos que na granja, onde realizamos nossa pesquisa, circulavam os três subtipos,  
1753 e no suabe nasal detectamos todos os três. Em relação a outras amostras, como as ambientais,  
1754 observamos a presença apenas das linhagens H1hu e pH1N1.

1755 Uma hipótese para esse achado poderia estar relacionada às características específicas  
1756 desses subtipos, talvez por sua capacidade de replicação em regiões específicas, como o  
1757 intestino dos suínos no caso das amostras de suabe retal, ou por uma maior resistência ao  
1758 ambiente, como evidenciado nas amostras ambientais. Outra possibilidade é o fato dos  
1759 nossos testes de subtipagem ter limitações de sensibilidade, uma vez que não conseguimos  
1760 subtipar muitas amostras de suabe retal - de um total de 34, apenas 9 foram subtipadas. Isso  
1761 pode ser atribuído à presença de inibidores nas amostras de fezes e à baixa carga viral  
1762 inerente às amostras fecais.

1763 Através do sequenciamento do inóculo de suabe nasal, confirmamos a presença do  
1764 pH1N1 entre os animais de recria. A comparação com os resultados de subtipagem obtidos  
1765 por meio da técnica RT-PCR revelou que tanto as amostras de suabe nasal quanto retal dos  
1766 animais de 60 dias foram positivas para pH1N1. Observamos que nosso inóculo se alinha  
1767 com amostras suínas brasileiras, corroborando a presença desse subtipo entre os suínos  
1768 estudados.

1769 Finalmente, nas análises das amostras de leite, identificamos exclusivamente o subtipo  
1770 pH1N1, corroborando com as descobertas de Paquette (2015), que também apontou a  
1771 presença desse subtipo no leite e nas glândulas mamárias de furões. Este achado é ainda mais  
1772 significativo quando consideramos que detectamos o pH1N1 em amostras ambientais. No  
1773 entanto, a incerteza persiste quanto à origem dessa presença viral no leite, se por  
1774 contaminação ambiental direta ou se há uma relação intrínseca com a replicação nas  
1775 glândulas mamárias. Essa questão destaca a complexidade da dinâmica viral em diferentes  
1776 contextos e destaca a necessidade de pesquisas mais aprofundadas.

1777 Ao analisar a sorologia dos animais na granja, notamos uma resposta robusta contra  
1778 IAV. Cerca de 82% dos animais apresentaram resultados positivos nos testes de HI,  
1779 indicando a presença de anticorpos neutralizantes contra os três subtipos do vírus em  
1780 praticamente todas as categorias avaliadas. Destaca-se um maior percentual de animais com  
1781 resposta positiva para a linhagem pH1N1, alcançando 81%, e uma notável incidência de  
1782 coinfeção entre pH1N1 e H3N2, atingindo 78%.

1783 Na categoria das matrizes de reprodução, notamos que as leitoas de reposição chegam  
1784 à granja com níveis elevados de anticorpos contra o vírus pH1N1. Essas leitoas são vacinadas  
1785 com uma vacina autógena inativada contra os três subtipos de IAV de origem suína. A  
1786 elevada presença de anticorpos neutralizantes contra um subtipo pode sugerir uma possível  
1787 infecção. Analisando os resultados do RT-qPCR, observamos que 30% dos animais foram  
1788 positivos tanto no suabe nasal quanto no retal, indicando que essas leitoas já chegam  
1789 infectadas à granja. Vale destacar que a granja produz suas próprias matrizes, indicando a  
1790 circulação do vírus no galpão das multiplicadoras.

1791 Quanto às matrizes gestantes, as de 45 dias apresentaram níveis altos de anticorpos  
1792 contra a linhagem H1hu e médio contra as outras linhagens. Comparando esses resultados  
1793 com a detecção do RNA viral, constatamos que 70% das matrizes eram positivas, indicando  
1794 que esses níveis de anticorpos neutralizantes são resultado de uma infecção. As matrizes  
1795 recebem duas doses da vacina, uma aos 70 dias e outra aos 90 dias. Observamos um aumento  
1796 nos anticorpos nas porcas com 90 dias de gestação devido à primeira dose da vacina. No  
1797 entanto, notamos níveis elevados para os três subtipos nessa categoria. Considerando que o  
1798 vírus já está circulando no galpão das gestantes de 45 dias, isso pode explicar esses níveis  
1799 elevados. Nas gestantes de 90 dias, 50% são positivas no suabe nasal e 20% no retal,  
1800 indicando a circulação contínua do vírus.

1801 Em relação aos resultados obtidos nos leitões e nos animais de creche, observamos  
1802 títulos mais baixos contra os três subtipos. Vale ressaltar que esses animais receberam duas  
1803 doses da vacina após o desmame, aos 21 dias, e um reforço aos 42 dias. Ao analisar os  
1804 resultados do RT-qPCR, identificamos que os leitões na maternidade, de diferentes idades,  
1805 foram positivos para IAV, alcançando uma taxa de 47% nos animais positivos com 20 dias  
1806 de idade. Além disso, esses animais na maternidade apresentaram sintomas respiratórios. As  
1807 matrizes lactantes também foram positivas, indicando a circulação do vírus na maternidade.  
1808 No entanto, elas exibiram níveis médios de anticorpos, sugerindo uma possível imunidade  
1809 materna fraca.

1810 Observamos que o vírus também estava circulando na creche, com 50% dos leitões de  
1811 23 dias sendo positivos no suabe nasal e 60% no retal, e outras categorias também  
1812 apresentando a presença do vírus. Era esperado que os leitões na creche e recria  
1813 apresentassem níveis elevados de anticorpos neutralizantes devido à imunização e à  
1814 circulação do vírus na maternidade. De acordo com Rose (2013), a falta de soroconversão  
1815 em animais infectados precocemente pode ser explicada pela resposta humoral  
1816 comprometida nesses leitões, resultando em uma imunidade mais fraca. A formação de  
1817 anticorpos anti-HA é quase suprimida, e a resposta das células T também é mais fraca. Além  
1818 disso, esses leitões tendem a excretar o vírus por um período mais prolongado. Esses dados  
1819 podem explicar a recorrência dos problemas de influenza na granja, especialmente nas fases  
1820 da creche e recria, associadas a altas taxas de mortalidade.

1821 Nos animais de terminação, como os animais de 100 dias observamos uma titulação  
1822 média de anticorpos, os quais diminuem progressivamente à medida que os animais  
1823 envelhecem, chegando a níveis mais baixos por volta dos 150 dias. Mesmo com a circulação  
1824 do vírus nessas categorias, notamos a detecção do RNA viral apenas nas fezes em todas as  
1825 três categorias, com cerca de 47% dos animais de 150 dias testados positivos. Apesar do  
1826 contato com o vírus, notamos que os animais de 100 dias começaram a aumentar os títulos  
1827 de anticorpos, indicando uma resposta imunológica em evolução.

1828 Esperava-se que os animais na fase de terminação apresentassem níveis mais elevados  
1829 de anticorpos, especialmente considerando a circulação do vírus nas fases anteriores, como  
1830 creche e recria. No entanto, a queda nos títulos de anticorpos pode ser atribuída ao mesmo  
1831 fenômeno observado na creche e recria, onde a infecção precoce dos animais pode continuar  
1832 a afetar a resposta imunológica mesmo na fase de terminação.

1833 Uma limitação em nosso estudo foi a ausência de acompanhamento do mesmo animal  
1834 ao longo de todas as fases, o que impediu a avaliação contínua dos títulos de anticorpos  
1835 neutralizantes durante o crescimento. Dessa forma, não podemos confirmar algumas teorias,  
1836 como a hipótese da infecção precoce, anteriormente relatada por Rose (2013).

1837 Os resultados de nosso estudo destacam uma preocupação significativa, especialmente  
1838 no que diz respeito à transmissão do vírus entre os animais. A persistência do vírus nas fezes  
1839 pode ser um fator contribuinte para os problemas recorrentes de IAV em granjas, conforme  
1840 evidenciado pela contaminação ambiental constante. Estudos prévios indicam que o vírus  
1841 mantém sua viabilidade por mais tempo na parte sólida das fezes, resultando em uma  
1842 potencial fonte contínua de transmissão entre os animais. Além disso, a infecção precoce dos  
1843 leitões na maternidade, através das fezes e do leite das matrizes, pode ser um componente  
1844 adicional desse cenário complexo. Descobrimos que as amostras de efluentes suínos podem  
1845 sugerir um meio eficaz para monitorar e realizar a vigilância do vírus da influenza a nível de  
1846 rebanho.

1847 A persistência do vírus nas fezes e a contaminação ambiental constante aumentam  
1848 significativamente o potencial de exposição e transmissão para trabalhadores da granja,  
1849 veterinários e outros profissionais que lidam diretamente com os suínos e o ambiente  
1850 contaminado.

1851 Essas conclusões enfatizam a necessidade de implementar estratégias preventivas  
1852 eficazes para conter a propagação do vírus na suinocultura. Medidas como a limpeza  
1853 rigorosa das baias, visando evitar a permanência prolongada de fezes dos animais e seu  
1854 contato com outros animais, especialmente na maternidade, tornam-se imperativas. Além  
1855 disso, é crucial adotar procedimentos adequados para o tratamento dos efluentes dos animais,  
1856 contribuindo assim para reduzir potenciais fontes de contaminação ambiental. Essas práticas  
1857 são essenciais para fortalecer as estratégias de controle e prevenção em granjas suínas.

1858 Os resultados do nosso estudo abrem portas para diversas perguntas que necessitam de  
1859 investigações futuras para serem respondidas. Algumas dessas indagações incluem: Qual é  
1860 o motivo da presença do vírus nas fezes dos animais, pode ser indicativo de replicação viral  
1861 nas células intestinais? Como ocorre a relação entre a liberação do vírus na secreção nasal e  
1862 nas fezes? O vírus mantém seu potencial infeccioso em amostras ambientais mesmo após o  
1863 tratamento? Por quanto tempo o vírus pode ser detectado nessas amostras ambientais e nas

1864 fezes dos animais? Há evidências de liberação direta do vírus pelo leite das matrizes? Essas  
1865 questões são cruciais para uma compreensão mais abrangente da dinâmica de disseminação  
1866 do vírus influenza A no ambiente.

1867

## 1868 **8. CONCLUSÕES**

1869

1870

1871 As conclusões deste estudo revelam que IAV foi detectado em amostras de fezes de  
1872 animais naturalmente infectados, abrangendo tanto aqueles com positividade na secreção  
1873 nasal quanto aqueles positivos apenas nas fezes. Além disso, confirmamos a presença do  
1874 RNA viral em amostras ambientais, tanto em efluentes brutos quanto em amostras tratadas  
1875 biologicamente. É notável que o vírus manteve sua viabilidade em amostras de fezes e  
1876 efluentes brutos. Além disso, identificamos o RNA viral em amostras de leite e colostro de  
1877 matrizes lactantes.

1878

1879 A partir dessas descobertas, podemos concluir que IAV possui o potencial não apenas  
1880 de ser eliminado pela secreção nasal, como tradicionalmente considerado, mas também por  
1881 meio das fezes, sugerindo uma nova via de transmissão. Além disso, o vírus demonstrou um  
1882 potencial significativo de contaminação ambiental, representando riscos não apenas para  
1883 outros animais na granja, mas também para os seres humanos. Esses resultados destacam a  
1884 importância de considerar múltiplas vias de disseminação do vírus, influenciando estratégias  
1885 de prevenção e controle.

1886

1887

1888

1889

1890

1891

1892

1893

1894

1895

1896

1897

1898

1899

1900

1901

1902

1903

1904

## 1905 **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1906

1907

1908 Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2022. Disponível em:  
1909 <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2022/05/Relatorio-Anual-ABPA-2022-vf.pdf>.

1910 Acessado em 11 de outubro de 2022

1911

1912 AL KHATIB, Hebah A. et al. Molecular and biological characterization of influenza A  
1913 viruses isolated from human fecal samples. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 93, p.  
1914 104972, 2021.

1915

1916 ARMSTRONG, Kenneth L.; FRASER, David KB; FAOAGALI, Joan L. Gastrointestinal  
1917 bleeding with influenza virus. *Medical journal of Australia*, v. 154, n. 3, p. 180-182, 1991.

1918

1919 ABREU, Mariana Aparecida de Freitas et al. Study of the sewage from a municipality in  
1920 southern Minas Gerais, Brazil: correlation of physical and chemical variables, COVID-19  
1921 cases, and SARS-CoV-2 RNA concentration. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 27, p.  
1922 967-974, 2022.

1923

1924 ARAÚJO, Iria S. et al. Avaliação de sistema de tratamento de dejetos suínos instalado no  
1925 Estado de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 16, p.  
1926 745-753, 2012.

1927

1928 ARAÚJO, Karla Santos de et al. Processos oxidativos avançados: uma revisão de  
1929 fundamentos e aplicações no tratamento de águas residuais urbanas e efluentes industriais.  
1930 *Revista Ambiente & Água*, v. 11, p. 387-401, 2016.

1931

1932 BRENTANO, Liana et al. Levantamento soroepidemiológico para dispositivo de transporte  
1933 e solução de gastroenterite dos vírus de influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no  
1934 Brasil. *Embrapa Suínos e Aves-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, 2002.

1935

1936 BOUVIER, Nicole M.; PALESE, Peter. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, v. 26, p.  
1937 D49-D53, 2008.

1938

- 1939 BALDOVIN, Tatjana et al. SARS-CoV-2 RNA detection and persistence in wastewater  
1940 samples: An experimental network for COVID-19 environmental surveillance in Padua,  
1941 Veneto Region (NE Italy). *Science of The Total Environment*, v. 760, p. 143329, 2021.  
1942
- 1943 CIACCI-ZANELLA, Janice Reis et al. Influenza A virus infection in Brazilian swine herds  
1944 following the introduction of pandemic 2009 H1N1. *Veterinary Microbiology*, v. 180, n. 1-  
1945 2, p. 118-122, 2015.  
1946
- 1947 CHAVES, Maria Vitória. et al. (21-24 de June de 2022). Occurrence of antibodies against  
1948 Swine Influenza Virus subtypes in the South and. IPVS2022 26th international pig veterinary  
1949 society, p. 711.  
1950
- 1951 CRISCI, Elisa et al. Influenza virus in pigs. *Molecular immunology*, v. 55, n. 3-4, p. 200-  
1952 211, 2013.  
1953
- 1954 CHEN, Li-Mei et al. Receptor specificity of subtype H1 influenza A viruses isolated from  
1955 swine and humans in the United States. *Virology*, v. 412, n. 2, p. 401-410, 2011..  
1956
- 1957 CHEN, Qi et al. Vaccine development for protecting swine against influenza virus. *Animal*  
1958 *health research reviews*, v. 13, n. 2, p. 181-195, 2012.  
1959
- 1960 CHAN, Martin CW et al. Seasonal influenza A virus in feces of hospitalized adults.  
1961 *Emerging infectious diseases*, v. 17, n. 11, p. 2038, 2011.  
1962
- 1963 CHOI, Young Ki; GOYAL, Sagar M.; JOO, Han Soo. Retrospective analysis of etiologic  
1964 agents associated with respiratory diseases in pigs. *The Canadian veterinary journal*, v. 44,  
1965 n. 9, p. 735, 2003.  
1966
- 1967 CHOI, Mary J. et al. Live animal markets in Minnesota: a potential source for emergence of  
1968 novel influenza A viruses and interspecies transmission. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61,  
1969 n. 9, p. 1355-1362, 2015.  
1970

- 1971 CUNHA, R. G.; VINHA, V. R.; PASSOS, W. D. Isolation of a strain of Myxovirus  
1972 influenzae-A suis from swine slaughtered in Rio de Janeiro. *Revista brasileira de biologia*,  
1973 v. 38, n. 1, p. 13-17, 1978.
- 1974
- 1975 CHUMPOLBANCHORN, Kamlang et al. The effect of temperature and UV light on  
1976 infectivity of avian influenza virus (H5N1, Thai field strain) in chicken fecal manure. 2006.
- 1977 CORPUZ, Mary Vermi Aizza et al. Viruses in wastewater: occurrence, abundance and  
1978 detection methods. *Science of the Total Environment*, v. 745, p. 140910, 2020.
- 1979
- 1980 CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos et al. Nota Técnica-Metodologia para  
1981 concentração e quantificação do novo coronavírus em amostras de água e esgoto por técnicas  
1982 moleculares. Agência Nacional de Águas (ANA), p. 1-14, 2021.
- 1983
- 1984 CARDOSO, Bárbara Françoise; OYAMADA, Graciela Cristine; DA SILVA, Carlos  
1985 Magno. Produção, tratamento e uso dos dejetos suínos no Brasil. *Desenvolvimento em*  
1986 *questão*, v. 13, n. 32, p. 127-145, 2015.
- 1987
- 1988 COUTO, Gustavo Ragassi de Assis et al. Análise ambiental de sistemas de tratamento de  
1989 dejetos da suinocultura no município de Patrocínio–MG. 2019.
- 1990
- 1991 CHOI, Y. K. et al. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2  
1992 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *Journal of virological*  
1993 *methods*, v. 102, n. 1-2, p. 53-59, 2002.
- 1994
- 1995 COSTANTINI, Verónica P. et al. Effects of different animal waste treatment technologies  
1996 on detection and viability of porcine enteric viruses. *Applied and Environmental*  
1997 *Microbiology*, v. 73, n. 16, p. 5284-5291, 2007.
- 1998
- 1999 CLINE, Troy D.; BECK, Donald; BIANCHINI, Elizabeth. Influenza virus replication in  
2000 macrophages: balancing protection and pathogenesis. *The Journal of general virology*, v. 98,  
2001 n. 10, p. 2401, 2017.
- 2002
- 2003 DETMER, Susan et al. Diagnostics and surveillance for swine influenza. *Swine Influenza*,  
2004 p. 85-112, 2012.

2005

2006 DIAS, Alessandra S. et al. Distribution of antibodies against influenza virus in pigs from  
2007 farrow-to-finish farms in Minas Gerais state, Brazil. *Influenza and other respiratory*  
2008 *viruses*, v. 9, n. 3, p. 161-167, 2015.

2009 DIAS, Alexandre César et al. Manual brasileiro de boas práticas agropecuárias na produção  
2010 de suínos. Brasília, DF: ABCS, 2011.

2011

2012 DUDA, Rose Maria et al. A balanced microbiota efficiently produces methane in a novel  
2013 high-rate horizontal anaerobic reactor for the treatment of swine wastewater. *Bioresource*  
2014 *technology*, v. 197, p. 152-160, 2015.

2015

2016 DE VLEESCHAUWER, Annel et al. Comparative pathogenesis of an avian H5N2 and a  
2017 swine H1N1 influenza virus in pigs. *PloS one*, v. 4, n. 8, p. e6662, 2009.

2018

2019 DE BENEDICTIS, P.; BEATO, M. S.; CAPUA, I. Inactivation of avian influenza viruses  
2020 by chemical agents and physical conditions: a review. *Zoonoses and public health*, v. 54, n.  
2021 2, p. 51-68, 2007.

2022

2023 ELLIS, Joanna S.; CURRAN, Martin D. Simultaneous molecular detection and confirmation  
2024 of influenza AH5, with internal control. *Diagnostic Virology Protocols*, p. 161-181, 2011.

2025

2026 EISFELD, Amie J.; NEUMANN, Gabriele; KAWAOKA, Yoshihiro. Influenza A virus  
2027 isolation, culture and identification. *Nature protocols*, v. 9, n. 11, p. 2663-2681, 2014.

2028

2029 FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, p. 733, 2007.

2030

2031 FRAIHA, Ana Luiza Soares et al. Swine influenza A virus subtypes circulating in Brazilian  
2032 commercial pig herds from 2012 to 2019. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 4, p.  
2033 2421-2430, 2021.

2034

2035 FRUEHWIRTH, Marcelo et al. Resultado falso negativo no diagnóstico molecular de  
2036 SARS-CoV-2 em amostras com inibidores de amplificação. *Jornal Brasileiro de Patologia e*  
2037 *Medicina Laboratorial*, v. 56, 2020.

2038

- 2039 GUNDY, Patricia M.; GERBA, Charles P.; PEPPER, Ian L. Survival of coronaviruses in  
2040 water and wastewater. *Food and environmental virology*, v. 1, p. 10-14, 2009.  
2041
- 2042 GARRIDO-MANTILLA, Jorge et al. Comparison of individual, group and environmental  
2043 sampling strategies to conduct influenza surveillance in pigs. *BMC veterinary research*, v.  
2044 15, n. 1, p. 1-10, 2019.  
2045
- 2046 GARCÍA, M.; FERNANDEZ-BARREDO, S.; PEREZ-GRACIA, M. T. Detection of  
2047 hepatitis E virus (HEV) through the different stages of pig manure composting plants.  
2048 *Microbial Biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 26-31, 2014.  
2049
- 2050 HIROSE, R. et al. Long-term detection of seasonal influenza RNA in faeces and intestine.  
2051 *Clinical Microbiology and Infection*, v. 22, n. 9, p. 813. e1-813. e7, 2016.  
2052
- 2053 HIROSE, Ryohei et al. Mechanism of human influenza virus RNA persistence and virion  
2054 survival in feces: mucus protects virions from acid and digestive juices. *The Journal of*  
2055 *infectious diseases*, v. 216, n. 1, p. 105-109, 2017.  
2056
- 2057 HUTCHINSON, Edward C. Influenza virus. *Trends in microbiology*, v. 26, n. 9, p. 809-810,  
2058 2018.  
2059
- 2060 HINSHAW VS, Webster RG, Turner B. 1980. A perpetuação de ortomixovírus e  
2061 paramixovírus em aves aquáticas canadenses . *Pode. J. Microbiol.* 26 : 622–629  
2062
- 2063 HOFFMANN, E. et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza  
2064 A viruses. *Archives of virology*, v. 146, p. 2275-2289, 2001.  
2065
- 2066 HOEVE, Marieke A. et al. Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage  
2067 subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation. *PloS one*,  
2068 v. 7, n. 1, p. e29443, 2012.  
2069
- 2070 International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. Disponível em:  
2071 [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202103953](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202103953). Acessado em 12 de  
2072 novembro de 2023

2073

2074 IRWIN, Christa K. et al. Using the systematic review methodology to evaluate factors that  
2075 influence the persistence of influenza virus in environmental matrices. *Applied and*  
2076 *environmental microbiology*, v. 77, n. 3, p. 1049-1060, 2011.

2077

2078 JANKE, B. H. Clinicopathological features of swine influenza. *Swine Influenza*, p. 69-83,  
2079 2013.

2080

2081 JUNQUEIRA, Dennis Maletich et al. Human-to-swine introductions and onward  
2082 transmission of 2009 H1N1 pandemic influenza viruses in Brazil. *Frontiers in Microbiology*,  
2083 v. 14, p. 1243567, 2023.

2084

2085 KOEN, J. S. A practical method for field diagnosis of swine disease. *Am J Vet Med*, v. 14,  
2086 p. 468-470, 1919.

2087

2088 KERR, A. A. et al. Gastric'flu influenza B causing abdominal symptoms in children. *The*  
2089 *Lancet*, v. 305, n. 7902, p. 291-295, 1975.

2090

2091 KRAUSS, Scott; WALKER, David; WEBSTER, Robert G. Isolamento do vírus influenza.  
2092 *Vírus Influenza: Métodos e Protocolos* , p. 11-24, 2012.

2093

2094 KAWAOKA, Y.; BORDWELL, Elizabeth; WEBSTER, R. G. Intestinal replication of  
2095 influenza A viruses in two mammalian species. *Archives of virology*, v. 93, p. 303-308,  
2096 1987.

2097

2098 KALE, Sandeep D.; MISHRA, Akhilesh C.; PAWAR, Shailesh D. Suitability of specimen  
2099 types for isolation of avian influenza viruses from poultry. *Indian Journal of Virology*, v. 24,  
2100 p. 391-393, 2013.

2101

2102 KIDA, Hiroshi et al. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *Journal of*  
2103 *general virology*, v. 75, n. 9, p. 2183-2188, 1994.

2104

- 2105 KURMI, Baleshwari et al. Survivability of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in  
2106 poultry faeces at different temperatures. *Indian Journal of Virology*, v. 24, n. 2, p. 272-277,  
2107 2013.
- 2108
- 2109 LYOO, Kwang-Soo et al. Comparative pathology of pigs infected with Korean H1N1,  
2110 H1N2, or H3N2 swine influenza A viruses. *Virology journal*, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2014.
- 2111
- 2112 LIU, YingFang et al. Structure-function studies of the influenza virus RNA polymerase PA  
2113 subunit. *Science in China Series C: Life Sciences*, v. 52, n. 5, p. 450-458, 2009.
- 2114 LANGE, Elke et al. Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus  
2115 A/H1N1 after experimental infection of pigs. *Journal of General Virology*, v. 90, n. 9, p.  
2116 2119-2123, 2009.
- 2117
- 2118 LIU, Lin-lin et al. Strengthened monitoring of H5 avian influenza viruses in external  
2119 environment in Hubei, 2018. *Current Medical Science*, v. 40, p. 63-68, 2020.
- 2120
- 2121 LOPES, BRUNA COELHO; ESPINOSA, MARIA FERNANDA ; VERBYLA,  
2122 MATTHEW ERIC ; MOTA, CÉSAR ROSSAS . Protocols for analysis and determinations  
2123 in sewage samples Protocol 6 - Quantification of human adenovirus by qPCR. *Cadernos*  
2124 *Técnicos Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, p. 41-47, 2022.
- 2125
- 2126 LONDRIGAN, Sarah L. et al. Infection of mouse macrophages by seasonal influenza viruses  
2127 can be restricted at the level of virus entry and at a late stage in the virus life cycle. *Journal*  
2128 *of virology*, v. 89, n. 24, p. 12319-12329, 2015.
- 2129
- 2130 LIMA, Sandovânio Ferreira. Tratamento de esgoto sanitário através do uso de lagoas  
2131 aeradas. *Caderno de Graduação-Ciências Exatas e Tecnológicas-UNIT-ALAGOAS*, v. 3, n.  
2132 1, p. 165-176, 2015.
- 2133
- 2134 MACHADO, Alexandre V. et al. Preparar e reforçar a imunização com influenza e  
2135 adenovírus que codificam o antígeno de superfície 2 do *Toxoplasma gondii* (SAG2) induz  
2136 forte imunidade protetora. *Vacina* , v. 28, n. 18, pág. 3247-3256, 2010.
- 2137
- 2138

- 2139 MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. Análise da expressão gênica pela técnica de PCR  
2140 quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos. 2016.  
2141
- 2142 MARTINS, Terezinha Domiciano Dantas et al. Produção e composição do leite de porcas  
2143 híbridas mantidas em ambiente quente. *Ciência Rural*, v. 37, p. 1079-1083, 2007.  
2144
- 2145 MERCIER, Elisabeth et al. Municipal and neighbourhood level wastewater surveillance and  
2146 subtyping of an influenza virus outbreak. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 15777, 2022.  
2147
- 2148 MAINES, Taronna R. et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A (H1N1)  
2149 influenza viruses in ferrets and mice. *Science*, v. 325, n. 5939, p. 484-487, 2009.  
2150
- 2151 NASCIMENTO, Mariana de Almeida do et al. Cinética de desinfecção viral em água de  
2152 consumo humano mediante exposição ao cloro, utilizando como modelo o adenovírus  
2153 recombinante. 2014.  
2154
- 2155 NUVOLARI, A. Esgoto sanitário coleta e transporte, tratamento e reúso Agrícola. 2.ed.  
2156 Revista Ltda. 2011.  
2157
- 2158 NELLI, Rahul K. et al. Comparative distribution of human and avian type sialic acid  
2159 influenza receptors in the pig. *BMC veterinary research*, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2010.  
2160
- 2161 NAZIR, Jawad et al. Persistence of avian influenza viruses in lake sediment, duck feces, and  
2162 duck meat. *Applied and environmental microbiology*, v. 77, n. 14, p. 4981-4985, 2011.  
2163
- 2164 NEIRA, Victor et al. Characterization of viral load, viability and persistence of influenza A  
2165 virus in air and on surfaces of swine production facilities. *PloS one*, v. 11, n. 1, p. e0146616,  
2166 2016.  
2167
- 2168 NELSON, Martha I. et al. Influenza A viruses of human origin in swine, Brazil. *Emerging  
2169 Infectious Diseases*, v. 21, n. 8, p. 1339, 2015.
- 2170 NICOL, Marlynne Q.; DUTIA, Bernadette M. The role of macrophages in influenza A virus  
2171 infection. *Future Virology*, v. 9, n. 9, p. 847-862, 2014.  
2172

- 2173 OLIVEIRA, Roberto Alves de; DUDA, Rose Maria. Tratamento de águas residuárias de  
2174 suinocultura em reator anaeróbio operado em batelada sequencial. *Engenharia Sanitaria e*  
2175 *Ambiental*, v. 14, p. 533-542, 2009.
- 2176
- 2177 PAWAR, Shailesh D. et al. A virus precipitation method for concentration & detection of  
2178 avian influenza viruses from environmental water resources & its possible application in  
2179 outbreak investigations. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 150, n. 6, p. 612, 2019.
- 2180
- 2181 PAQUETTE, Stéphane G. et al. Influenza transmission in the mother-infant dyad leads to  
2182 severe disease, mammary gland infection, and pathogenesis by regulating host responses.  
2183 *PLoS pathogens*, v. 11, n. 10, p. e1005173, 2015.
- 2184
- 2185 PRADO, Tatiana et al. Performance of wastewater reclamation systems in enteric virus  
2186 removal. *Science of the Total Environment*, v. 678, p. 33-42, 2019.
- 2187
- 2188 PESARO, Friederike; SORG, Ingrid; METZLER, Alfred. In situ inactivation of animal  
2189 viruses and a coliphage in nonaerated liquid and semiliquid animal wastes. *Applied and*  
2190 *Environmental Microbiology*, v. 61, n. 1, p. 92-97, 1995.
- 2191
- 2192 PEDROSO, K.; TAVARES, C. R. G.; JANEIRO, V.; SILVA, T. L.; DIAS, P. Z. Avaliação  
2193 do tratamento do lixiviado do aterro sanitário de Maringá, Paraná, por processo de  
2194 coagulação/floculação com Tanfloc SG® . *Revista de Engenharia e Tecnologia*, v. 4, n.2, p.  
2195 87-98, 2012.
- 2196
- 2197 PERRONE, Lucy A. et al. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in  
2198 early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS*  
2199 *pathogens*, v. 4, n. 8, p. e1000115, 2008.
- 2200
- 2201 RAJÃO, Daniela S. et al. Serological evidence of swine influenza in Brazil. *Influenza and*  
2202 *other respiratory viruses*, v. 7, n. 2, p. 109-112, 2013.
- 2203
- 2204 RAJÃO, Daniela S. et al. Genetic characterization of influenza virus circulating in Brazilian  
2205 pigs during 2009 and 2010 reveals a high prevalence of the pandemic H1N1 subtype.  
2206 *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 7, n. 5, p. 783-790, 2013.

2207

2208 RIMOLDI, Sara Giordana et al. Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in  
2209 wastewaters and rivers. *Science of the Total Environment*, v. 744, p. 140911, 2020.

2210

2211 ROSE, Nicolas et al. Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pig  
2212 farms: evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and  
2213 reassortment events. *Veterinary research*, v. 44, p. 1-14, 2013.

2214

2215 RAMEY, Andrew M. et al. Influenza A viruses remain infectious for more than seven  
2216 months in northern wetlands of North America. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 287,  
2217 n. 1934, p. 20201680, 2020.

2218

2219

2220

2221 SCHAEFER, Rejane et al. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. *Pesquisa  
2222 Veterinária Brasileira*, v. 33, p. 61-73, 2013.

2223

2224 SCHAEFER, Rejane et al. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza  
2225 virus in pigs in Brazil. 2011.

2226

2227 SCHULTZ-CHERRY, Stacey; OLSEN, Christopher W.; EASTERDAY, Bernard C. History  
2228 of swine influenza. *Swine Influenza*, p. 21-27, 2011.

2229

2230 SPICKLER, Anna Rovid. Flu, Grippe, Avian Influenza, Grippe Aviaire, Fowl Plague, Swine  
2231 Influenza, Hog Flu, Pig Flu, Equine Influenza, Canine Influenza. 2016.

2232

2233 SOBESTIANSKY, Jury; BARCELLOS, David. Doenças dos Suínos. Goiânia: Cãnone  
2234 Editorial, p. 213-268, 2007

2235

2236 SOUZA, Jean Carlos PVB et al. Gestão da água na suinocultura. 2017.

2237

2238 SAKABE, Saori et al. Cytokine production by primary human macrophages infected with  
2239 highly pathogenic H5N1 or pandemic H1N1 2009 influenza viruses. 2011.

2240

- 2241 TORREMORELL, M. Influenza suína: como minimizar o impacto desse patógeno? In:  
2242 Sanidade e produção suína: atualização, inovação e tecnologia. Jaboticabal : Funep, 2020, p.  
2243 17-22.  
2244
- 2245 TAUBENBERGER, Jeffery K.; KASH, John C. Influenza virus evolution, host adaptation,  
2246 and pandemic formation. *Cell host & microbe*, v. 7, n. 6, p. 440-451, 2010.  
2247
- 2248 TONG, Suxiang et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS pathogens*,  
2249 v. 9, n. 10, p. e1003657, 2013.  
2250
- 2251 TERRIER, Olivier et al. Cellular transcriptional profiling in human lung epithelial cells  
2252 infected by different subtypes of influenza A viruses reveals an overall down-regulation of  
2253 the host p53 pathway. *Virology journal*, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2011.  
2254
- 2255 TE VELTHUIS, Aartjan JW; FODOR, Ervin. Influenza virus RNA polymerase: insights  
2256 into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 8, p.  
2257 479-493, 2016.  
2258
- 2259 UTTERBACK, W. Update on avian influenza through February 21, 1984 in Pennsylvania  
2260 and Virginia. In: *Proceedings-Western Poultry Disease Conference (USA)*. 1984.  
2261
- 2262 VINCENT, Amy et al. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased  
2263 surveillance and research. *Zoonoses and public health*, v. 61, n. 1, p. 4-17, 2014.  
2264
- 2265 VANOTTI, Matias B. et al. Removal of pathogen and indicator microorganisms from liquid  
2266 swine manure in multi-step biological and chemical treatment. *Bioresource technology*, v.  
2267 96, n. 2, p. 209-214, 2005.  
2268
- 2269 VIANCELLI, A. et al. Performance of two swine manure treatment systems on chemical  
2270 composition and on the reduction of pathogens. *Chemosphere*, v. 90, n. 4, p. 1539-1544,  
2271 2013.  
2272

- 2273 VIANCELLI, A. et al. Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples  
2274 collected from swine manure treatment systems. *Research in veterinary science*, v. 93, n. 1,  
2275 p. 538-543, 2012.
- 2276
- 2277 VAN REETH, Kristien; MA, Wenjun. Swine influenza virus vaccines: to change or not to  
2278 change—that’s the question. *Swine Influenza*, p. 173-200, 2013.
- 2279
- 2280 WANG, Ying Hsiang et al. Clinical characteristics of children with influenza A virus  
2281 infection requiring hospitalization. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, v.  
2282 36, n. 2, p. 111-116, 2003.
- 2283
- 2284 WEI, Huiling et al. Infection of cesarean-derived colostrum-deprived pigs with porcine  
2285 circovirus type 2 and Swine influenza virus. *Comparative medicine*, v. 60, n. 1, p. 45-50,  
2286 2010.
- 2287
- 2288 Webster RG, Yakhno M., Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG 1978. Influenza intestinal:  
2289 replicação e caracterização de vírus influenza em patos . *Virology* 84 : 268–278
- 2290
- 2291 WOLFE, Marlene K. et al. Wastewater-based detection of two influenza outbreaks.  
2292 *Environmental Science & Technology Letters*, v. 9, n. 8, p. 687-692, 2022.
- 2293
- 2294 World Organization for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for  
2295 Terrestrial Animals 2022. Chapter 3.9.7. - Influenza a virus swine. Disponível em:  
2296 [https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-](https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/)  
2297 [online-access/](https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/).
- 2298
- 2299 XIE, Jianling et al. Influenza virus detection in the stool of children with acute  
2300 gastroenteritis. *Journal of Clinical Virology*, v. 131, p. 104565, 2020.
- 2301
- 2302 YOO, Soo Jin et al. Frequent detection of pandemic (H1N1) 2009 virus in stools of  
2303 hospitalized patients. *Journal of clinical microbiology*, v. 48, n. 6, p. 2314-2315, 2010.
- 2304
- 2305
- 2306

2307

2308 **10. INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES**

2309

2310 **Tabela Suplementar. 1.** Resultados Positivos para Influenza A na Primeira Coleta de Fevereiro de 2023

CATEGORIA	ID ANIMAIS	VALOR DE Ct SUABE RETAL	VALOR DE Ct SUABE NASAL	
<b>GESTAÇÃO 90 DIAS</b>	G90 3	NEGATIVO	34.43	
	G90 4	NEGATIVO	36.68	
	G90 5	37.595	38.9	
	G90 7	NEGATIVO	36.9	
	G90 9	NEGATIVO	38.4	
	G90 10	36	NEGATIVO	
<b>GESTAÇÃO 45 DIAS</b>	G45 3	NEGATIVO	35.68	
	G45 5	NEGATIVO	38.55	
	G45 6	NEGATIVO	37.82	
	G45 7	NEGATIVO	37.92	
	G45 8	NEGATIVO	38.48	
	G45 9	NEGATIVO	36.44	
	G45 10	NEGATIVO	34.13	
	<b>GESTAÇÃO 114 DIAS</b>	G114 4	NEGATIVO	36.91
		G114 5	NEGATIVO	36.79
		G114 6	40.45	35.76
G114 7		NEGATIVO	29.65	
G114 8		35.345	NEGATIVO	
<b>MATRIZES COM 20 DIAS DE LACTAÇÃO</b>	MT 1	NEGATIVO	37.19	
	MT 2	NEGATIVO	35.47	
	MT 3	NEGATIVO	34.95	
	MT 4	NEGATIVO	34.64	
	MT 5	NEGATIVO	33.87	
	MT 6	NEGATIVO	31.47	
	MT 9	NEGATIVO	36.65	
<b>LEITOAS DE CHEGADA</b>	LC 1	40.055	NEGATIVO	
	LC 3	39.193	35.14	
	LC 4	40.58	39.29	
	LC 6	NEGATIVO	29.62	
<b>LEITOAS FLUSHING</b>	LF 1	40.808	NEGATIVO	

	LF 8	38.68	NEGATIVO
	LF 10	39.901	NEGATIVO
<b>LEITÃO DE 23 DIAS</b>	L 23 1	37.292	NEGATIVO
	L 23 2	33.738	26
	L 23 3	NEGATIVO	20.8
	L 23 4	36.986	NEGATIVO
	L 23 7	40.488	30.75
	L 23 8	NEGATIVO	23.73
	L 23 9	39.407	23.58
	L 23 10	40.15	NEGATIVO
<b>LEITÃO DE 35 DIAS</b>	L35 1	38.624	23.56
	L35 6	39.779	NEGATIVO
	L35 7	38.64	22.84
	L35 8	NEGATIVO	29.6
	L35 9	39.814	31.63
<b>LEITÃO 45 DIAS</b>	L 45 1	38.617	25.94
	L 45 4	39.048	25.64
	L 45 8	NEGATIVO	24.05
	L 45 13	33.722	NEGATIVO
	L 45 14	38.357	NEGATIVO
	L 45 15	NEGATIVO	28.4
<b>ANIMAL DE 60 DIAS</b>	AN 60 4	36.055	NEGATIVO
	AN 60 6	NEGATIVO	23.9
	AN 60 7	35.779	NEGATIVO
	AN 60 9	38.688	NEGATIVO
	AN 60 10	31.114	21.58
	AN 60 11	35.942	NEGATIVO
	AN 60 15	40.52	NEGATIVO
<b>ANIMAL DE 100 DIAS</b>	AN 100 1	40.81	NEGATIVO
	AN 100 5	35.88	NEGATIVO
	AN 100 9	32.891	NEGATIVO
	AN 100 10	39.496	NEGATIVO
<b>ANIMAL DE 130 DIAS</b>	AN 130 1	37.653	NEGATIVO
	AN 130 3	38.674	NEGATIVO
	AN 130 5	36.996	NEGATIVO
	AN 130 7	38.912	NEGATIVO
<b>ANIMAL DE 150 DIAS</b>	AN 150 1	37.198	NEGATIVO

AN 150 7	37.419	NEGATIVO
AN 150 9	38.719	NEGATIVO
AN 150 11	32.655	NEGATIVO
AN 150 12	39.046	NEGATIVO
AN 150 14	33.606	NEGATIVO
AN 150 15	39.34	NEGATIVO

2311

2312 **Tabela suplementar 2.** Confirmação Positiva para Influenza A na Segunda Coleta de Agosto de 2023 em  
 2313 Leitões da Maternidade

MATERNIDADE	IDADE	ID ANIMAL	VALOR Ct SUABE NASAL	VALOR Ct SUABE RETAL
<b>MATERNIDADE 2</b>	LEITÃO 20 DIAS	6	NEGATIVO	37.795
<b>MATERNIDADE 3</b>	LEITÃO 1 DIA	2	39.252	38.002
		4	40.095	NEGATIVO
		5	39.953	NEGATIVO
		9	NEGATIVO	39.935
	LEITÃO 10 DIAS	1	NEGATIVO	37.898
		4	NEGATIVO	38.772
		6	25.489	NEGATIVO
		7	40.998	NEGATIVO
		9	38.825	NEGATIVO
		11	40.786	NEGATIVO
	LEITÃO 20 DIAS	1	21.451	43.904
		3	18.106	39.182
		4	27.49	40.24
		5	38.675	36.899
		6	23.466	36.133
		7	18.678	NEGATIVO
		8	26.116	NEGATIVO
		9	21.344	41.113
		10	22.19	NEGATIVO
		11	17.886	NEGATIVO

MATERNIDADE 4	LEITÃO 10 DIAS	6	40.396	NEGATIVO
		7	NEGATIVO	NEGATIVO
		8	21.139	NEGATIVO
		11	39.323	NEGATIVO
	LEITÃO 20 DIAS	1	22.243	NEGATIVO
		2	25.155	NEGATIVO
		3	28.721	NEGATIVO
		8	19.354	NEGATIVO
		10	39.842	NEGATIVO
		11	24.738	NEGATIVO

2314

2315

2316 **Tabela suplementar 3.** Confirmação Positiva para Influenza A nas Amostras de Leite e Colostro.

2317

TIPO DE AMOSTRA	ID DA AMOSTRA	VALOR DO Ct
COLOSTRO	1	40.201
	3	40.507
	4	40.363
LEITE	1	39.635
	2	37.259
	3	37.879
	4	39.023
	6	39.312
	7	40.136
	8	38.805
	19	40.103
	25	38.782

2318

2319