

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária

Nágila Rocha Aguilar

Deteccção de RNA do vírus influenza A por RT-qPCR em fezes de amostras de campo de suínos

Belo Horizonte
2022

Nágila Rocha Aguilar

Detecção de RNA do vírus influenza A por RT-qPCR em fezes de amostras de campo de suínos

Versão final

Monografia apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção do título Especialista - Residência em Medicina Veterinária

Área de concentração: Sanidade e Diagnóstico de Doenças Animais e Zoonóticas

Tutor: Erica Azevedo Costa

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG 2022

Aguilar, Nágila Rocha, 1996 -
A283d Detecção de RNA do vírus influenza A por RT-qPCR em fezes de amostras de campo de suínos /Nágila
Rocha Aguilar. – 2022.
44f: il.

Orientadora: Erica Azevedo Costa
Monografia apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial
para obtenção do título Especialista - Residência em Medicina Veterinária.
Área de concentração: Sanidade e Diagnóstico de Doenças Animais e Zoonóticas
Referências bibliográficas: f. 41 – 44.

1. Suíno - Teses - 2. Veterinária - Teses – I. Costa, Erica Azevedo - II. Universidade Federal
de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecário responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

ATA DE DEFESA DE TCR DE Nagila Rocha Aguiar (nome residente)

Às 10 horas do dia 21/11/2022, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão do Curso, para julgar em exame final, a defesa do TCR intitulado:

Deteccão de RNA do vírus Influenza A por RT-qPCR em fezes de amostras de campo de suínos

como requisito final para a obtenção do Título de Especialista em Sauidade e diagnóstico de doenças animais e zoonóticas

Abrindo a sessão, o Presidente da Banca, _____, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa do TCR, 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 Banca se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da TCR, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Prof. <u>Erica Azevedo Costa - 98,0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. <u>Bruna Coelho Lima - 95,00</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. <u>Brenda M.M. Rocha - 98,0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. <u>Barbara Chispin Longo - 98</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado

Reprovado

Nota: 97,25

Para concluir o Programa, o(a) candidato(a) deverá entregar 3 volumes encadernados da versão final do TCR, acatando, se houver as modificações sugeridas pela banca, Para tanto terá o prazo máximo de 30 dias a contar da data da defesa.

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

Belo Horizonte, 21 de novembro de 2022.

Assinatura dos membros da Banca:

Erica Azevedo Costa

Bruna Coelho Lima

Brenda M.M. Rocha

Barbara Chispin Longo

(Este documento não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador e não poderá conter rasuras)

RESUMO

O vírus *Alphainfluenzavirus influenzae*, pertence ao gênero *Alphainfluenzavirus* e à família *Orthomyxoviridae*, contém um RNA fita simples de sentido negativo de genoma segmentado de diferentes tamanhos, cada segmento do genoma viral é responsável por codificar uma proteína específica. Os suínos são infectados pelo contato direto e indireto com secreções, descarga nasal e aerossóis de outros animais infectados, o vírus chega ao trato respiratório e replica nas células epiteliais da mucosa nasal, traqueia e pulmões e causa sinais clínicos típicos de gripe como tosse, secreção nasal e ocular, além de sintomas não específicos como febre, apatia, perda de peso. A presença do vírus da gripe em fezes de algumas espécies já foi detectada. O motivo da presença do vírus no trato intestinal ainda é desconhecido. A confirmação de surtos nas granjas pode ser feita através de isolamento do vírus, detecção do genoma viral por RT-PCR ou RT-qPCR. Análises sorológicas para identificar o subtipo circulante podem ser feitas utilizando técnicas como HI. O objetivo do estudo foi detectar o RNA do vírus influenza A nas fezes de suínos naturalmente infectados em uma granja comercial no estado de Minas Gerais para indicar uma possível nova forma de transmissão fecal-oral entre os animais. Como metodologia, amostras de swab retal, swab nasal e soro de animais que apresentavam sintomas gripais, foram coletadas e foi realizado RT-qPCR como triagem e RT-PCR nested para a subtipagem das amostras positivas. As análises sorológicas foram submetidas ao teste de HI para detectar o título de anticorpos dos animais contra os subtipos H1N1pdm09, H3N2, H1hu (H1N1 e H1N2 sazonal de origem humana). Os resultados do teste de RT-qPCR mostraram que 7,89% (3/38) dos suínos são positivos para Influenza A nas fezes. Na subtipagem, foi observada a presença de H1N1 pandêmico de 2009 e H1 de origem sazonal humana. Os suínos positivos nas fezes para influenza A estavam negativos no swab nasal e com títulos de anticorpos baixos, nos testes de HI, indicando uma infecção tardia. Os animais também apresentaram uma co-infecção com PCV2. Em virtude do exposto acima, este estudo indicou um possível novo modo de transmissão fecal-oral do vírus nos suínos e a presença do vírus no ambiente assim, a necessidade de controle sistemático das granjas uma vez que a Influenza A é de fácil dispersão e afeta diretamente a qualidade do rebanho, causando prejuízos relevantes aos produtores e podendo propagar a doença para os humanos tornando-se assim um importante indicador de controle epidemiológico.

PALAVRAS CHAVE: Influenza Suína; Suínos; Fezes; PCV2

ABSTRACT

The Alphainfluenzavirus influenzae virus, belongs to the Alphainfluenzavirus genus and the Orthomyxoviridae family, contains a single-stranded negative-sense RNA of a segmented genome of different sizes, each segment of the viral genome is responsible for encoding a specific protein. Pigs are infected by direct and indirect contact with secretions, nasal discharge and aerosols from other infected animals, the virus reaches the respiratory tract and replicates in the epithelial cells of the nasal mucosa, trachea and lungs and causes typical clinical signs of flu such as coughing, nasal and ocular discharge, in addition to non-specific symptoms such as fever, apathy, weight loss. The presence of the flu virus in feces of some species has already been detected. The reason for the presence of the virus in the intestinal tract is still unknown. Confirmation of outbreaks on farms can be done through virus isolation, viral genome detection by RT-PCR or RT-qPCR. Serological analyzes to identify the circulating subtype can be performed using techniques such as HI. The objective of the study was to detect influenza A virus RNA in the feces of naturally infected pigs on a commercial farm in the state of Minas Gerais to indicate a possible new form of fecal-oral transmission between animals. As a methodology, rectal swab, nasal swab and serum samples from animals that had flu-like symptoms were collected and RT-qPCR was performed for screening and nested RT-PCR for subtyping positive samples. Serological analyzes were submitted to the HI test to detect the antibody titers of the animals against the subtypes H1N1pdm09, H3N2, H1hu (H1N1 and seasonal H1N2 of human origin). The results of the RT-qPCR test showed that 7.89% (3/38) of the pigs are positive for Influenza A in the faeces. In the subtyping, the presence of pandemic H1N1 of 2009 and H1 of human seasonal origin was observed. Pigs positive in the feces for influenza A were negative in the nasal swab and with low antibody titers in the HI tests, indicating a late infection. The animals also showed a co-infection with PCV2. Due to the above, this study indicated a possible new mode of fecal-oral transmission of the virus in pigs and the presence of the virus in the environment, thus, the need for systematic control of the farms, since Influenza A is easily dispersed and affects directly the quality of the herd, causing significant damage to producers and being able to spread the disease to humans, thus becoming an important indicator of epidemiological control.

KEYWORDS: Swine Influenza; Pigs; Feces; PCV2

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Diagrama do vírus influenza A.; Hemaglutinina (HA); Neuraminidase (NA); Proteína de Matrix (M1); Canal de íon (M2); Ribonucleoproteína (RNP); Polimerase básica 2 (PB2); Polimerase básica 1 (PB1); Polimerase ácida (PA); Nucleoproteína (NP)14
- Figura 02:** Diagrama dos receptores de ácido siálico α 2,3 e α 2,6 presentes nos principais hospedeiros do vírus influenza.....17
- Figura 03:** Ocorrência de Anticorpos contra Subtipos de SIV no Rebanhos Brasileiros em 2021. Percentual de ocorrência de anticorpos contra os subtipos de SIV dos rebanhos Brasileiros de suínos das regiões Sum e Sudeste durante o ano de 202118
- Figura 04:** Fluxograma das amostras de fezes para detecção de Influenza A da primeira e segunda coleta.....25
- Figura 05:** Fluxograma das amostras de soro e fezes para detecção de PCV2 da primeira e segunda coleta.....30
- Figura 06:** Amplificação das amostras de *swab* retal **A:** extraído puro. **B:** extraído diluído 1:1033
- Figura 07:** Ensaio RT-qPCR para triagem de influenza A suíno das amostras de *swab* retal, **A:** Amplificação das amostras 14 e 17 da primeira coleta. **B** Amplificação da amostra 4 da segunda coleta.....34
- Figura 08:** Ensaio *nested* RT-PCR para os três subtipos de influenza A das amostras de *swab* retal positivas na triagem, **A:** amostra 14 e 17 testadas para H1N1 pandêmico de 2009 (P), H1N1 de origem sazonal humana (D) e H3N2 (H3). As amostras amplificadas para H1N1pdm09, H1N1 de origem sazonal humana estão relacionados às bandas de 159bp e 303bp. **B:** amostra 4 testadas para H1N1 pandêmico de 2009 (P), H1N1 de origem sazonal humana (D) e H3N2 (H3). A amostra amplificada para H1N1pdm09 com a banda específica da primeira reação de H1 de 616bp.34
- Figura 09:** Alinhamento das sequências do *subject* correspondente ao gene da hemaglutinina (HA) do segmento 4 do vírus da influenza A (A/suíno/Dinamarca/2014_10_365_3p1_Hu-L/2014(H1N1)) com o *Query* (fragmento do gene da amostra 14) na região 425 a 481. As regiões em vermelho indicam *Gaps* e as regiões em azul indicam *Mismatches*.35
- Figura 10:** Alinhamento das sequências do *subject* correspondente ao gene da hemaglutinina (HA) do segmento 4 do vírus da influenza A (A/suíno/Brasil/259_11-8/2011(H1N1)) com o *Query* (fragmento do gene da amostra 17) na região 250 a 487. As regiões em azul indicam *Gaps* e as regiões em vermelho indicam *Mismatches*35
- Figura 11:** Ensaio RT-qPCR para triagem de influenza A suíno das amostras de *swab* nasal.36
- Figura 12:** Ocorrência de Anticorpos contra SIV nas Amostra da Segunda Coleta.37

Figura 13: Ocorrência de Anticorpos contra Subtipos de SIV nas Amostra da Segunda Coleta. Histograma com resultados da titulação de HI das 18 amostras da segunda coleta38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Volume dos reagentes utilizados para a Reação de RT-qPCR para triagem das amostras de fezes e <i>swab</i> nasal	26
Tabela 2- Ciclos para amplificação da reação de RT-qPCR para triagem das amostras de fezes e <i>swab</i> nasal	26
Tabela 03- Sequência dos pares de primers e sonda para as reações RT-qPCR para triagem das amostras de fezes e <i>swab</i> nasal.....	27
Tabela 04- Volume dos reagentes utilizados para a reação 1 ^a de subtipagem RT-PCR das amostras positivas de fezes	28
Tabela 05- Ciclos para amplificação da reação de RT-PCR para subtipagem das amostras positivas de fezes.	28
Tabela 06- Volume dos reagentes utilizados para a reação 2 ^a de subtipagem PCR das amostras positivas de fezes.	29
Tabela 07- Ciclos para amplificação da 2 ^a reação de PCR para subtipagem das amostras positivas de fezes.	29
Tabela 08- Sequência dos pares de <i>primers</i> para as reações de subtipagem RT-PCR Nested.	30
Tabela 09- Volume dos reagentes utilizados para a Reação de qPCR para PCV2 das amostras de <i>swab</i> retal e soro.	31
Tabela 10- Ciclos para amplificação da reação de qPCR para PCV2 das amostras de <i>swab</i> retal e soro.	31
Tabela 11- Sequência dos pares de <i>primers</i> e sonda para as reações qPCR para PCV2 das amostras de fezes e soro.	31
Tabela 12- Comparação entre os grupos positivos e negativos no <i>swab</i> nasal e retal para IAV utilizando o teste RT-qPCR.	36
Tabela 13- Valores Ct obtidos das amostras de <i>swab</i> nasal, retal e soro para PCV2 utilizando o teste RT-qPCR.	39

LISTA DE ABREVIATURA

ECP - Efeito citopático
Ct- Limite de ciclo
DNA- Ácido Desoxirribonucleico
HA – Hemaglutinina
H1N1pdm09 – vírus H1N1 pandêmico de 2009
HA - Hemaglutinação
HI – Inibição da hemaglutinação
IV – Vírus influenza
LPVA – Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal
M - Proteína de matriz
MDCK - Madin-Darby Canine kidney cells
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
RNA- Ácido ribonucleico
RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa
RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SIV- Influenza suína
SIAV- Vírus influenza A
SN – Soroneutralização
SPF- Livres de patógenos específicos
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. ETIOLOGIA	12
2.2. EPIDEMIOLOGIA	16
2.3. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	19
2.4. DIAGNÓSTICO.....	19
2.5. TRATAMENTO E CONTROLE	21
2.6. CO-INFECÇÃO DO SIAV COM PCV2.....	22
3. MATERIAIS E METODOS	23
3.1. COLETA DE AMOSTRAS	23
3.2. EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL	23
3.3. ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO	31
3.4. ANÁLISE SOROLÓGICA	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o setor suíno brasileiro vem sendo marcado por altos índices de produção, destacando-se no mercado internacional. O Brasil possui cerca de 2 milhões de matrizes alojadas e atualmente ocupa a quarta posição entre os maiores produtores de carne suína com mais de 4.250 toneladas de carne suína produzida em 2021 (ABPA, 2022). Com o aumento da produção e o modo de criação dos animais em confinamento, aumenta a disseminação das doenças infecciosas principalmente as respiratórias levando a grandes perdas econômicas com gastos com medicamentos, redução do desempenho dos animais e mortalidade (FLORES, 2017).

A infecção pelo vírus influenza A (SIAV) causa uma doença respiratória aguda e distribuição mundial, altamente contagiosa que afeta a suinocultura de modo relevante. O SIAV é considerado uma das principais causadoras de pneumonia viral em suínos, podendo também predispor ou estar associada a infecções bacteriana secundária (VINCENT et al., 2014; SAADE et al., 2020).

O primeiro relato da circulação da influenza no rebanho de suínos foi registrado nos anos de 1918 nos Estado Unidos durante a pandemia em humanos denominado gripe espanhola. Em 1930 foi isolado o primeiro subtipo H1N1 nos Estados Unidos, devido ao potencial de mutação do vírus ao longo dos anos novos subtipos foram registrados em outros países. Atualmente é uma enfermidade comum América do Norte e do Sul, Europa e partes da Ásia e África (OIE, 2020).

No Brasil, os primeiros relatos de influenza suína (SIV) foram em 1930, sendo o primeiro isolado no país ocorreu em 1978 no estado de Minas Gerais (Brentano et al., 2002). Durante a pandemia de influenza A H1N1pdm09 em humanos no ano de 2009, algumas análises sorológicas identificaram a presença do vírus influenza pandêmico H1N1 em suínos, indicando o humano como uma possível fonte de infecção para o suíno. Após a pandemia, o vírus H1N1pdm09 se tornou endêmico no rebanho de suíno brasileiro (BRENTANO et al., 2002; ZANELLA et al., 2011; SCHAEFER et al., 2011).

O vírus influenza (IV) responsável por infectar o rebanho de suíno do mundo, pertence à família *Orthomyxoviridae* do gênero *Alphainfluenzavirus*. A espécie *Influenza A* é dividida em subtipos em relação a antigenicidade das moléculas de hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), na suinocultura brasileira os subtipos que estão circulando

são H1N1 pandêmico de 2009, H3N2, H1hu (H1N2 e H1N1 de origem sazonal humana) (CRISCI et al., 2013; DIAS et al., 2015).

A família *Orthomyxoviridae* são vírus que possuem uma molécula de RNA de fita simples de polaridade negativa contendo oito segmentos, facilitando a redistribuição do genoma entre outras cepas virais e dando origem a vírus com genomas mistos. O vírion é revestido por um envelope que apresenta duas glicoproteínas, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). A HA é responsável pela ligação nos receptores de ácido siálico α 2,6 e α 2,3 presentes nas células no trato respiratório de suíno, semelhante ao receptor humano e aviário o que permitiria co-infecções e um possível rearranjo entre os subtipos gerando novos IVs, além de induzir anticorpos neutralizantes. A NA libera o vírus da célula do hospedeiro removendo da superfície celular o receptor ácido siálico (CRISCI et al., 2013; CHEN et al., 2011).

Surtos da doença ocorrem no inverno, onde os suínos são infectados pelo contato direto com outros animais ou pelo contato por aerossóis ou secreções contaminadas pelo vírus. Os suínos apresentam sinais clínicos típicos de gripe como febre, anorexia, prostração, inflamação dos pulmões, tosse, espirros, dispnéia conjuntivite corrimento nasal e perda de peso (FLORES, 2017). A evolução da doença depende da cepa viral, idade e a imunidade do animal. Por ser uma doença altamente contagiosa a morbidade em um rebanho é alta, sendo que, na maioria dos casos a mortalidade é baixa (CRISCI et al., 2013)

Relatos de sintomas gastrointestinais como diarreia e dor abdominal, e a presença do RNA viral nas fezes já foram relatados em alguns surtos com diferentes tipos e subtipos do vírus influenza (IV) em humanos (ARMSTRONG et al., 1991; WANG et al., 2003; LIOU et al., 1987; PINSKY et al., 2010; KAJI et al., 2003; AL KHATIB et al., 2021). Amostras de fezes de pacientes positivos para influenza já foram isoladas em cultivo celular sugerindo a presença de partículas virais viáveis e uma possível replicação do vírus no trato intestinal. O motivo da presença do IV nas fezes ainda é desconhecido, a disseminação do vírus no trato gastrointestinal pode ocorrer pela capacidade de ligar a receptores nas células epiteliais intestinais e multiplicar, ou na deglutição do vírus em infecções respiratórias primária (AL KHATIB et al., 2021). A ave é único animal que foi detectado a presença de RNA viral e replicação do vírus nas células epiteliais intestinais, mostrando o potencial de transmissão fecal-oral (LEVISON, 2016).

Embora a detecção do RNA viral em fezes em humanos e de aves já é bem relatado, através de nossas pesquisas não encontramos relatos de estudos que investigou a presença do IV nas fezes de suíno. Independentemente da capacidade do vírus de replicar no intestino, a descoberta de uma possível liberação do vírus pelas fezes pode significar a presença do vírus no ambiente e uma nova forma de transmissão fecal-oral entre os animais e uma possível disseminação para o humano, com isso, o estabelecimento de um sistema rápido e prático de coleta de fezes para a aplicação de testes diagnósticos rápidos e eficientes nos rebanhos afetados permitindo o monitoramento do vírus. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença do RNA do vírus influenza A nas fezes de 38 suínos que apresentavam sintomas respiratórios como tosse, espirros e perda de peso, as amostras foram coletadas no ano de 2022 em uma granja comercial no estado de Minas Gerais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etiologia

A família *Orthomyxoviridae* contém nove gêneros como *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Isavirus*, *Mykissvirus*, *Quaranjavirus*, *Sardinovirus*, *Thogotovirus*, que podem infectar diversas espécies entre mamíferos e aves (ICTV, 2021).

O Vírus da gripe pertence gênero *Alphainfluenzavirus* e espécie *Influenza A vírus* (ICTV, 2021). Os vírions apresentam um formato esférico, com diâmetro de 80 – 120 nm. O genoma viral contém oito segmentos de RNA fita simples de polaridade negativa envolvido por um envelope lipídico de 10 a 14 nm com espículas. Por ser um vírus segmentado pode ocorrer uma troca entre os genes durante uma coinfeção de subtipos diferentes na célula do hospedeiro, existe cerca de 256 possíveis combinações de rearranjos entre subtipos diferente do vírus influenza A (TAUBENNERGER et al., 2010). Cada segmento do genoma viral é responsável por codificar uma proteína específica, as proteínas PB2 (Polimerase básica 2), PB1 (Polimerase básica 1) e PA (Polimerase ácida) são codificadas pelos segmentos 1,2 e 3, as proteínas HA (Hemaglutinina), NP (Nucleoproteína) e NA (Neuraminidase) são codificadas pelos segmentos 4, 5 e 6, e o

segmento 7 e 8 codificam as proteínas M (Proteína de matriz) e NS (Proteína não estrutural) (FLORES, 2017; CRISCI et al., 2013).

As proteínas PB2, PB1 e PA são importantes para a transcrição, extensão e replicação do RNA viral, a nucleoproteína NP é muito abundante e tem a função de síntese do nucleocapsídeo. A proteína de matriz é dividida em duas, a proteína M1 tem uma função estrutural, já a proteína M2 é responsável pela passagem de íons (CRISCI et al., 2013; TONG, et al 2013; CHEN et al., 2011).

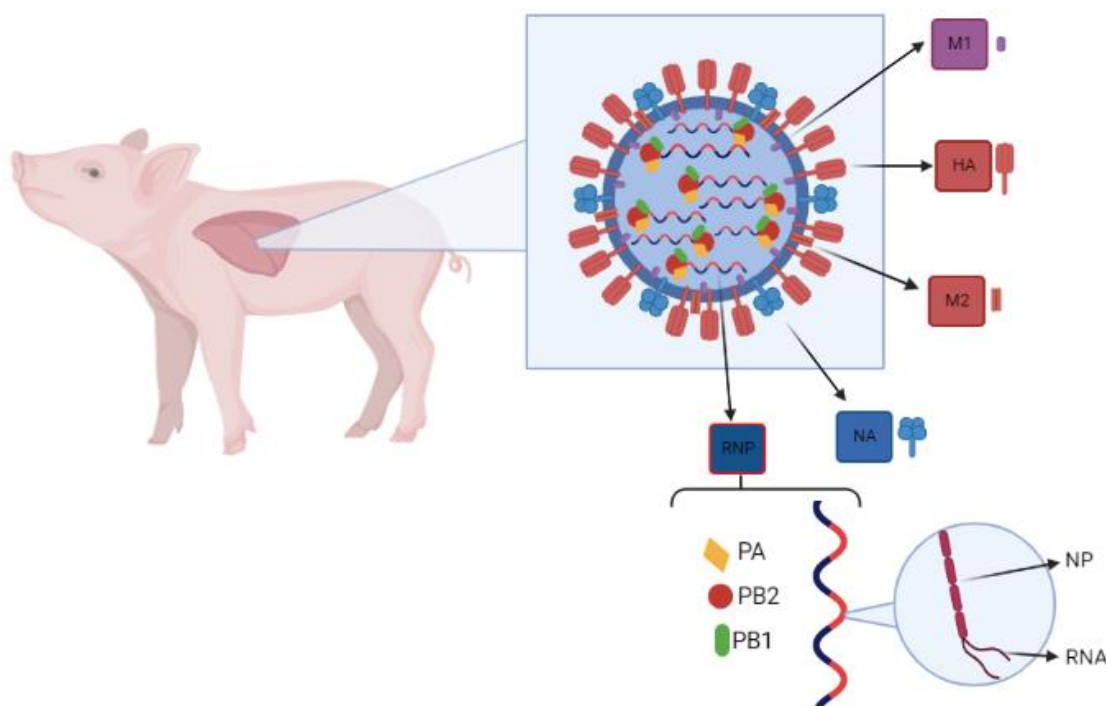


Figura 1: Diagrama do vírus influenza A.; Hemaglutinina (HA); Neuraminidase (NA); Proteína de Matrix (M1); Canal de íon (M2); Ribonucleoproteína (RNP); Polimerase básica 2 (PB2); Polimerase básica 1 (PB1); Polimerase ácida (PA); Nucleoproteína (NP). **Fonte:** Adaptado de Flores, 2017.

A proteínas HA é considerada umas das mais abundantes do vírus influenza, é responsável pela ligação nos receptores de ácido siálico α 2,6 e α 2,3 presentes nas células no trato respiratório do hospedeiro, além de permitir a penetração do vírus no citoplasma celular pela fusão do envelope. A proteína HA também possui atividade hemaglutinante, o vírus através da HÁ é capaz de se ligar em receptores de superfície dos eritrócitos, essa função de hemaglutinação pode ser utilizada em técnicas de diagnósticos para avaliar a capacidade do anticorpo presente no soro do animal de se ligar no vírus referência

impedindo a ligação entre a HA e os receptores dos eritrócitos. A NA está em menor quantidade no envelope viral em relação ao HA, sua principal função é liberar o vírus da célula do hospedeiro removendo da superfície celular o receptor ácido siálico. As glicoproteínas HA e NA são as principais proteínas do envelope do vírus da influenza A. Os subtipos são classificados em relação a antigenicidade das duas moléculas, atualmente são conhecidos 18 subtipos de HA (H1 à H18) e 11 subtipos de NA (N1 à N11) (CRISCI et al., 2013; TONG, et al 2013; CHEN et al., 2011).

O tipo de ligação do ácido siálico vai definir qual hospedeiro e a célula alvo do vírus, alguns HA podem se ligar nos receptores α 2,6 que estão presentes nas células da traqueia humana, já outros podem se ligar nos α 2,3 que estão predominantes nas células intestinais de aves. Os suínos aprestam os dois tipos de receptores no trato respiratório. Após a adsorção na célula alvo o vírus penetra por endocitose, e ocorre a fusão do envelope com a membrana endocítica, em seguida o desnudamento e a liberação do complexo ribonucleoproteico (RNP) no citoplasma celular. Os RNPs são transportados e penetram no núcleo celular onde acontece a transcrição do RNA, cada segmento do genoma é transcrito de forma individual, o vírus influenza tem dois tipos de transcrição, a dependente de oligonucleotídeos que codifica mRNA específicos para serem moldes para a produção de proteínas virais e a transcrição independente que produz RNA antígeno. Depois da morfogênese, o vírus recém-formado é liberado da célula do hospedeiro por brotamento (FLORES, 2017).

2.2. Epidemiologia

O primeiro relato de um surto de uma possível doença respiratória aguda em suínos foi no ano de 1918 durante a pandemia da gripe espanhola em humanos nos EUA. Durante a década de 1920 vários surtos em suínos foram relatados, na época a doença era descrita como uma gripe que causava uma alta morbidade e baixa mortalidade entre os suínos (KOEN, 1919). Na pandemia da gripe asiática em humanos, em 1957, que teve início na China, foi observado que os suínos e equinos que viviam ao redor dos humanos infectados apresentavam a mesma sintomatologia clínica. Para entender qual era o papel epidemiológico desses animais durante a pandemia foram realizados testes sorológicos entre os suínos e equinos, esse estudo relatou que a mesma cepa de influenza que circulava em humanas estava circulando nos animais e alguns não apresentavam sinais clínicos (CHERRY et al., 2011).

Estudos sorológicos feitos entre os anos de 1970 a 1976 em pessoas que tinham contado direto com suínos identificaram uma possível transmissão do IV do suíno para o humano. Em 1976 teve o primeiro relato de isolamento do mesmo vírus no suíno e do trabalhador da fazenda comprovando a transmissão suíno-humano (CHERRY et al., 2011). O vírus H1N1 clássico derivado de 1918 era o subtipo predominante entre os suínos na América do Norte. Depois da década de 1990 outros influenza A foram relatados, como os subtipos triplo-recombinantes TRIG (gene interno de rearranjo triplo) onde ocorreu um rearranjo entre os segmentos gênicos do subtipo H1N1 clássico, e os outros subtipos de origem aviário e humano. O rearranjo do H3N2 TRIG de origem humana com H1N1 clássico, deu origem a novos *clusters* (alfa, beta e gama). Durante os anos 2000 foi detectado no rebanho suíno novos *clusters*, duas novas linhagem onde o HA e NA são de origem humana o $\delta 1$ (H1N2) e $\delta 2$ (H1N1) (CHERRY et al., 2011).

Na pandemia de 2009 um novo subtipo do IV foi detectado em humanos, o H1N1pdm09 é um vírus com rearranjo triplo de origem norte-americana e da linhagem eurásiana da gripe suína, logo após a disseminação mundial casos em suínos foram relatados (VINCENT et al., 2013).

Os suínos são considerados recipientes de mistura para ocorrer rearranjos de subtipos diferentes do SIAV, são suscetíveis à infecção pelo vírus de origem humanos e aviária, pois apresentam receptores de ácido siálico $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$ no trato respiratório (Figura 2) (TAUBENNERGER et al., 2010). A infecção pelo SIAV é considerada endêmica, já foram relatados a presença dos subtipos H3N2, H1hu (H1N2 e H1N1 de origem sazonal humana) e H1N1pdm09 no rebanho de suíno brasileiro (BRENTANO et al., 2002; ZANELLA et al., 2011; SCHAEFER et al., 2011).

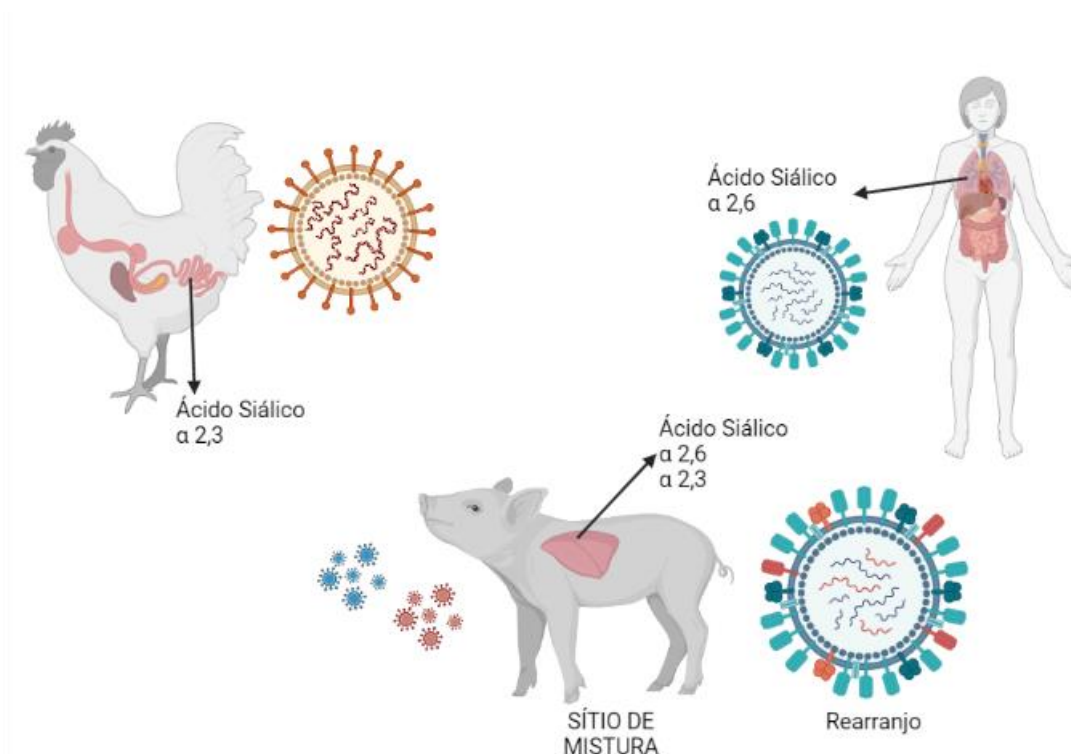


Figura 2: Diagrama dos receptores de ácido siálico α 2,3 e α 2,6 presentes nos principais hospedeiros do vírus influenza A **Fonte:** Adaptado de Taubenberger et al., 2010

No Brasil relatos de suínos com sintomas respiratórios agudos são descritos desde de 1930, a confirmação da presença do vírus no rebanho brasileiro só ocorreu em 1978 com o primeiro isolado do vírus, depois de testes de inibição da hemaglutinação (HI) foi confirmado que o isolado brasileiro estava relacionado com o vírus clássico de suíno norte-americano A/swine/Illinois/1/63/H1N1 (CUNHA et al., 1978; SCHAEFER et al., 2011). Estudos sorológicos entre os anos de 1996 a 1999, em 138 granjas de ciclo completo ou terminação em 8 estados brasileiros indicaram a presença de reação cruzada para os subtipos H1N1/Texas/1/77 (2,2%) e H3N2/New Jersey/76 (16. 7%) (BRENTANO et al., 2002). Durante a pandemia de 2009, com o aumento de casos de infecção pelo novo H1N1pdm09 em suínos no mundo, análises sorológicas foram feitas no rebanho brasileiro para identificar uma possível infecção, estudos demonstraram a presença de anticorpos para H1N1pdm09 (26,23%) e H3N2 (1,57%) (RAJÃO et al. 2013). O primeiro isolado do vírus H1N1pdm09 foi no estado de Santa Catarina durante um surto de uma doença respiratória aguda entre o ano de 2009 e 2010 (SCHAEFER et al., 2011).

Durante o ano de 2021, 1.874 amostras sorológicas de suínos de granjas de diferentes estados brasileiros foram processados no Laboratório de Pesquisa em Virologia

Animal (LPVA) da Escola de Veterinária da UFMG utilizando o teste de inibição da hemaglutinação (HI), os resultados do teste mostraram uma maior ocorrência na circulação do subtipo H1hu, e grandes casos de Co-infecção entre os subtipos H1N1 pdm09 e H1hu (Figura 3). Os dois subtipos de maior prevalência têm grande importância para a saúde pública pelo seu potencial zoonótico, demonstrando a importância da vigilância e de técnicas de diagnósticos rápidos e eficientes (CHAVES et al., 2022). Mesmo com o grande potencial do suíno de ser susceptível a vários subtipos e pelo fato de ter a os receptores α 2,3 e α 2,6 na mucosa epitelial do sistema respiratório, não encontramos nenhum estudo relatando a presença do IV nas fezes de suíno.

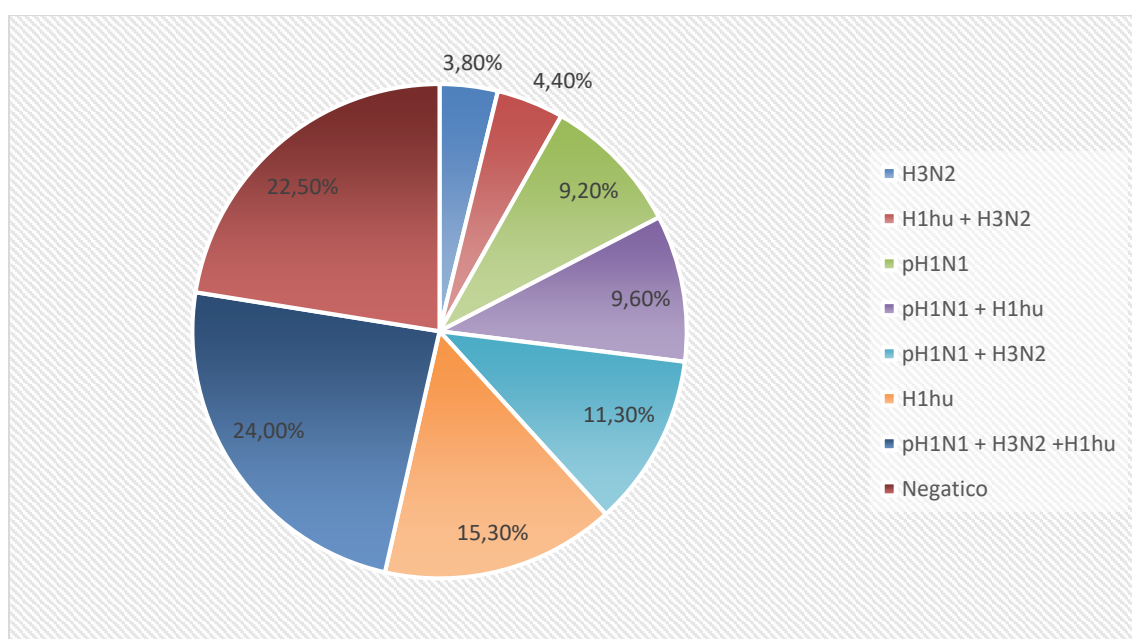


Figura 03: Ocorrência de Anticorpos contra Subtipos de SIV no Rebanhos Brasileiros em 2021. Percentual de ocorrência de anticorpos contra os subtipos de SIV dos rebanhos Brasileiros de suínos das regiões Sul e Sudeste durante o ano de 2021. **Fonte:** Adaptado de Chaves, 2022

O período de incubação do IV em mamíferos é de 1 a 3 dias podendo estender por 4 dias, em aves pode chegar a horas ou até duas semanas em pássaros que vivem em grupo. Em mamíferos é comum a disseminação do vírus antes de aparecer os primeiros sinais clínicos e o período de liberação do vírus é de 7 a 10 dias, dependendo da carga viral do paciente pode levar até semanas. O IV pode ser eliminado através de secreções nasais, como é relatado em humanos e suínos ou através de fezes contaminadas como ocorre em aves, já foram relatados a presença do RNA viral nas fezes em humanos e outros mamíferos, sendo que o subtipo H5N1 (linhagem asiática) já foi detectado nas fezes de

gatos e raposas. Em guaxinins experimentalmente infectados teve uma disseminação fecal com baixa quantidade viral do subtipo humano H3N2 (SPICKLER et al., 2016).

Os hospedeiros naturais do vírus influenza A e B são as aves migratórias em todo mundo, a maioria dos animais infectadas são assintomáticas. A presença de receptores de ácido siálico α 2,3 no trato intestinal das aves permite a ligação da HA e replicação do vírus, por isso é comum a infecção por via fecal-oral. O IV tem um grande potencial de mutação durante a replicação viral, gerando RNA viral com nucleotídeos incorretos. As aves podem ser infectados por diferentes tipos de influenza e devido a adaptação do vírus é comum a troca de hospedeiro entre aves migratórias, humanos, suínos e cavalos (TAUBENNERGER et al., 2010).

Em humanos é comum a doença no trato respiratório, alguns estudos relatos em adultos e crianças hospitalizadas durante as epidemias de influenza tipo A e B nos anos de 1973 e 1988 que apresentavam sintomas gastrointestinais e respiratórios e com a presença de RNA viral nas fezes e no *swab* nasal (KERR et al., 1975; ARMSTRONG et al., 1991). No ano de 2009, pacientes com sintomas respiratórios e gastrointestinais, foram positivos nas fezes para o subtipo H1N1pdm09 (YOO et al., 2010; CHAN et al., 2009). Entre os anos de 2015 e 2018 também foi relatado casos positivos de IV, detectados nas fezes de crianças hospitalizadas com sintomas gastrointestinais (XIE et al., 2020). Em 2018 e 2019 pacientes adultos também foram detectados com o vírus influenza do tipo A e B nas fezes e uma possível replicação do vírus em células intestinais *in vitro* (KHATIB et al., 2021). Um estudo realizado entre os anos de 2014 e 2015 no Japão, relatou um caso de um paciente que apresentou enterite durante a infecção por IV. Durante a colonoscopia, foi identificada a presença de um processo inflamatório na região do cólon e através de uma biopsia foi detectado o RNA viral indicando uma possível infecção no epitélio intestinal (HIROSE et al., 2016). Todos esses estudos demonstraram que pacientes de diversas idades apresentavam sintomas respiratórios e/ou gastrointestinais e a liberação do vírus influenza A ou B viável pelas fezes, mas ainda não se sabe a origem desse vírus, não foi encontrado estudos que identificaram a presença de receptores α 2,6 na mucosa intestinal de humanos e também não se sabe se é possível uma transmissão fecal-oral como ocorre em aves (KHATIB et al., 2021).

2.3. Patogenia e sinais clínicos

A infecção pelo vírus influenza A ocorre pelo contato direto ou indireto com secreção de animais infectados, o vírus replica nas células epiteliais da mucosa do trato respiratório superior nas primeiras 24 a 72 horas pós-infecção. Após a replicação o vírus causa destruição das células por apoptose para liberação de novas partículas virais além de causa descamação e exposição da camada basal em toda mucosa do trato respiratório. A infecção do trato respiratório inferior ocorre de forma tardia de 72 a 96 horas pós-infecção (JANKE, 2013; FLORES, 2017). Em mamíferos o vírus causa inflamação subaguda da mucosa do trato respiratório superior, e no trato respiratório inferior pode causar alterações como pneumonia intersticial, consolidação pulmonar roxa a vermelho-escura, bronquite e edema interlobular (FLORES, 2017; LYOO et al., 2014).

Estudos em humanos mostraram que o RNA viral pode ser detectado em amostras de *sputum* com poucas quantidades de cópias virais em até 10 dias após infecção, e em amostras fecais foi detectado até 2 semanas, no mesmo estudo foi possível identificar uma possível infecção viral no epitélio intestinal, através de biopsia de um paciente que apresentava enterite com um processo inflamatório no cólon com vermelhidão linear e leve erosão da mucosa apresentando um resultado positivo para o vírus influenza A na região do cólon sigmoide (HIROSE et al., 2016)

Em suínos infectados, a infecção é aguda no trato respiratório superior podendo causar sinais clínicos típicos de gripe como tosse, secreção nasal e ocular, além de sintomas não específicos como febre, apatia, perda de peso (FLORES, 2017; KOCER et al., 2013).

2.4. Diagnóstico

Como a SIV é uma doença respiratória que espalha rapidamente para os outros animais e acaba acometendo um grande número de suínos da mesma granja, o diagnóstico precisa ser feito de forma rápida e eficiente para minimizar as perdas de animais (FLORES, 2017).

A seleção correta dos suínos é a primeira etapa para a obter uma boa amostra para o diagnóstico. Os primeiros sete dias pós-contágio é período de maior eliminação do vírus, para aumentar a chance de detecção da influenza preferencialmente a coleta de

material deve ser feita em suínos que estão na fase aguda da doença, que apresentam tosse e febre. Animais que morreram de forma espontânea e que receberam medicação devem ser evitados para a coleta, pois o tecido pode apresentar autólise e animais medicados podem diminuir a chance de isolamento de bactérias de infecções secundárias (SCHAEFER et al 2013).

Para o diagnóstico em suínos vivos, a secreção nasal é a melhor amostra para o isolamento viral ou testes moleculares. Para a coleta do muco nasal deve ser utilizado *swabs* sintéticos com 15cm de comprimento, depois da coleta o *swab* deve ser colocado em um meio de transporte como o PBS (solução salina tamponada com fosfato) suplementado com antibiótico. O material deve ser armazenado a 4°C e enviado ao laboratório no máximo 48 horas após coleta. Outro material que pode ser enviado é o fluido oral, é uma amostra fácil de ser coletado por não ser invasivo e com custo baixo por ser uma amostragem em grupo, é utilizado uma corda de algodão na boca para os animais morderem, o fluido oral dos animais é extraído da corda e enviado a 4°C para o laboratório. Amostras de soro também podem ser coletadas para diagnósticos sorológicos como testes de HI (inibição da hemaglutinação) e ELISA (SCHAEFER et al 2013; FLORES, 2017).

Os tecidos do trato respiratório como pulmão, brônquios, traqueia e cornetos nasais são considerados amostras ideais por serem os locais de replicação do vírus. Exames post-mortem de suínos como histopatológicos são fundamentais para compreender a patogenia do vírus nos animais acometidos. Regiões que apresentam aspectos típicos de pneumonia como áreas vermelhas e consolidadas devem ser coletadas juntamente com fragmentos de brônquios e bronquíolos, as amostras devem ser enviadas refrigeradas para isolamento viral e testes moleculares e fixadas no formol para exames histopatológico e imuno-histoquímicos (DETMER et al 2012; SCHAEFER et al 2013).

O diagnóstico direto que pode ser utilizado é RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) ou RT-qPCR (Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa) para a amplificação do material genético do vírus. O RNA viral pode ser extraído de vários tipos de amostras como os fluidos e de tecidos. É uma técnica específica e sensível que pode identificar o genoma viral em amostras de campo que tem níveis baixos de RNA. Para detectar os diversos subtipos de influenza A os *primers* são projetados para amplificar os genes conservados de matriz M ou de nucleoproteína NP, essa técnica é utilizada como triagem, para identificar os subtipos diferentes de influenza, *primers* específicos de HA e NA podem ser utilizados. Técnicas

de PCR que utilizam sondas fluorescentes podem ser utilizadas para quantificar o genoma viral amplificado durante a reação, dando um resultado da quantidade de ácido nucleico presente da amostra (DETMER et al 2012; SCHAEFER et al 2013).

O isolamento viral é uma técnica muito sensível, considerado o método ouro para o diagnóstico de influenza. As amostras são inoculadas em células susceptíveis a influenza, como MDCK (*Madin-Darby Canine kidney cells*) e são avaliadas durante a replicação do vírus no um período de 24 a 72 horas até o desenvolvimento de lise celular que é o efeito citopático (ECP) que o vírus induz nas células. Amostras de campo normalmente tem pequenas quantidade de carga viral, com isso passagens a cegas devem ser feitas para que ocorra o ECP. Os ovos SPF ainda são utilizados para isolamento viral, por ser um método que permite títulos virais mais elevados que os obtidos no isolamento viral feito em cultivo celular. Para confirmar a presença do vírus é preciso fazer outros testes como RT-PCR e hemaglutinação (HA) (Detmer et al 2013; Flores, 2017).

Testes sorológicos para detecção de anticorpos contra IV podem ser utilizados para identificar possíveis infecções ou vacinação dos animais. Em animais infectados pelo vírus a produção de anticorpos acontece depois do sétimo dia pós infecção, podendo durar até 10 semanas. O teste padrão para identificação de anticorpos neutralizantes é o HI (inibição da hemaglutinação) que avalia a capacidade do anticorpo presente no soro do animal de se ligar no vírus referência impedindo que a HA se ligue nos receptores dos eritrócitos, com isso não ocorre a hemaglutinação, o soro do animal é diluído em forma seriada e o resultado maior que 1:40 indica a presença de anticorpo, quanto maior o título de HI mais recente ocorreu a infecção. O teste ainda permite a identificação de anticorpos para subtipos específicos de influenza A. Outro teste utilizado para detecção de anticorpos neutralizantes no soro do animal é a soroneutralização (SN). O soro do animal é diluído de forma seriada em uma placa e incubada com um vírus de referência, após esse período é adicionado célula MDCK, caso o soro do animal possua anticorpos, vai ocorrer a ligação e neutralização do vírus impedindo sua replicação na célula e a não produção de ECP (DETMER et al 2012; FLORES, 2017).

2.5. Tratamento e Controle

A infecção pelo vírus influenza A em suínos, não tem tratamento específico. O uso de antimicrobianos para tratamento de possíveis infecções bacterianas secundárias pode ser feito. Os animais com sintomas típicos da infecção pelo SIV, devem ser mantidos em

baias limpas e secas, o estresse dos animais deve ser evitado durante a fase aguda da doença (SOBESTIANSKY, 2007; FLORES, 2017).

Para prevenir a introdução do vírus nas granjas, medidas de biosseguridade devem ser adotadas, como impedir a entrada de materiais contaminados, restringir a movimentação dos funcionários entre os galpões de categorias diferentes, vacinação dos funcionários e impedir a entrada de pessoas com sintomas gripais, limpeza e desinfecção das baias antes da introdução de novos animais (FLORES, 2017; TORREMORELL, 2020). A vacinação é recomendada para diminuir os sinais clínicos e pode ajudar a diminuir a eliminação do vírus e a transmissão entre as categorias (TORREMORELL, 2020). Análises sorológicas são importantes para a vigilância da prevalência dos subtipos circulantes (SOBESTIANSKY, 2007).

2.6. Co-infecção do SIAV com PCV2

O circovírus suíno (PVC), é um vírus de genoma DNA circular de fita simples que pertence à família *Circoviridae*. O PCV é dividido em três tipos, circovírus suíno tipo 1 (PCV1), circovírus suíno tipo 2 (PCV2) que possui cinco genótipos PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d e PCV2e e circovírus suíno 3 (PCV3) (OUYANG et al., 2019).

Os animais infectados pelo PCV podem apresentar diversos sintomas, os mais comuns são o emagrecimento rápido de leitões em crescimento conhecida como síndrome de definhamento multissistêmico pós-desmame (PMWS), os animais também apresentam apatia, dispneia, diarreia e sintomas respiratórios como pneumonia, a forma subclínica da doença também é muito comum nos rebanhos, ocorrendo só uma queda no desempenho dos animais (SOBESTIANSKY, 2007; FLORES, 2017).

A infecção por PCV pode levar a imunossupressão dos animais e aumentar a infecção e replicação de outros a gentes virais (OUYANG et al., 2019). Estudos demonstram que a co-infecção de PCV2 e influenza é comum no rebanho e suínos, em análises sorológicas realizada no Butão mostrou que cerca de 49% dos suínos de fazendas do governo apresentam anticorpos contra o subtipo H1N1 e 73% desses animais tinham anticorpos contra PCV2 (MONGER et al., 2014), outro estudo que ocorreu nos EUA entre o ano 2000 e 2001 de 636 casos positivos para influenza 1,9% era co-infecção com PCV2 (CHOI et al., 2003). A co-infecção entre o subtipo H1N1 de influenza A e PCV2 é comum em suínos jovens entre 3 a 16 semanas de idade, e suínos infectados com PCV2 são mais propensos a terem infecção pelo vírus influenza A (DORR et al., 2007). Animais

infectados com PCV2 e SIV apresentam sintoma clínico graves e por mais tempo que animais infectados apenas por PCV2, mostrando que o PCV2 pode aumentar os sinais clínicos do vírus influenza A em suínos (WEI et al., 2010). Ainda não tem estudos que mostram o motivo dessa cooperação entre os dois vírus (WEI et al., 2010; OUYANG et al., 2019).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta de amostras

Durante o mês de abril e agosto do ano de 2022, um total de 38 suínos foram testados, a coleta ocorreu em uma granja no município de Oliveira no estado de Minas Gerais. A granja tem histórico de constantes problemas respiratórios, e os suínos não são vacinados contra SIV. Durante a primeira coleta no mês de abril foram coletadas 20 amostras de *swab* retal para tentar detectar a presença do vírus nas fezes, como duas amostras foram positivas, fizemos uma segunda coleta no mês de agosto, 18 amostras de *swab* retal, soro e *swab* nasal. As amostras foram coletas de animais em crescimento com idade entre 70 a 150 dias, essa categoria foi escolhida por serem mais suscetíveis à infecção pelo SIV por terem uma atividade neutralizante limitada (OZAWA et al., 2015). Os suínos foram escolhidos com base na sintomatologia clínica típica de gripe como tosse, espirros, perda de peso e prostração. Para a coleta de fezes dos animais, foi utilizado *swabs* sintéticos de algodão com 15cm de comprimento, O *swab* foi introduzido suavemente no reto dos animais, seguindo uma direção caudo-cranial acompanhando a região do reto. Após a coleta, os *swabs* foram diluídos em 3 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) suplementado com antibiótico (Penicilina e Estreptomicina) a 1% e armazenados a -80°C.

3.2. Extração e detecção do genoma viral

As amostras de fezes, o RNA viral foi extraído de 140 µl do diluído usando o mini kit de RNA viral *QIAamp* (*Qiagen*), realizado de acordo com as normas do fabricante. No *swab* nasal, 200 µl do diluído foi extraído utilizando o kit de extração mini spin vírus

DNA/RNA Kasvi, conforme instruções do fabricante. Todas as amostras de RNA e DNA/RNA foram armazenadas a -80°C .

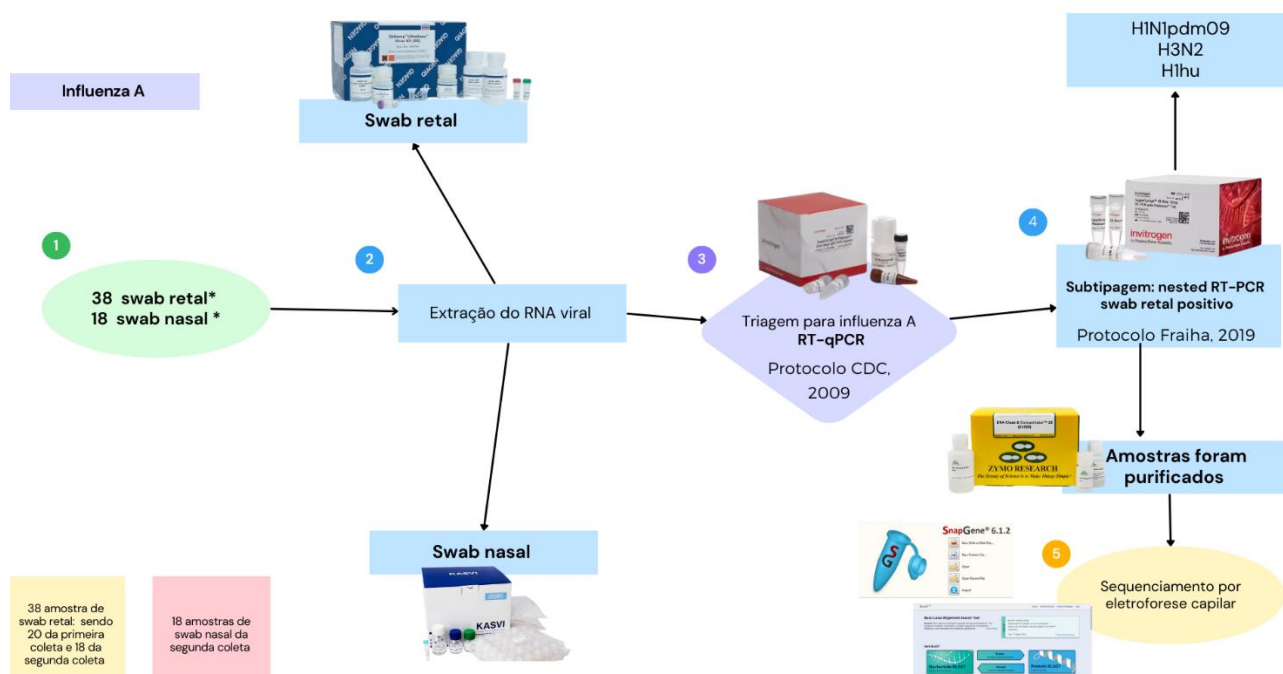


Figura 04: Fluxograma das amostras de fezes para detecção de Influenza A da primeira e segunda coleta. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

Os extraídos foram testados para detectar a proteína M do vírus influenza A por RT-qPCR com o protocolo desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (CDC, 2009), foi utilizado o *SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit w/ROX* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para a transcrição reversa e amplificação do genoma viral, todas as amostras foram submetidas a uma reação de RT-qPCR (Tabela 1) e ciclagem padronizada (Tabela 2). O conjunto de *primer* e sonda utilizado SW InfA foram desenhados para detectar o vírus da influenza A suína (Tabela 3).

Tabela 01: Volume dos reagentes utilizados para a Reação de RT-qPCR para triagem das amostras de fezes e *swab* nasal.

Reagentes	Volume de reagente adicionado por reação
Água sem Nuclease	0,75 µl
Primer SW InfA Forward (10 µM)	1 µl
Primer SW InfA Reverse (10 µM)	1 µl
SW InfA Probe (5 µM)	0,5 µl
ROX (diluído 1:10)	0,25 µl
2X Reaction Mix	6,25 µl
SuperScript™ III/Platinum™ Taq Mix	0,25 µl
Volume Total do Mix	10 µl
RNA extraído	2,5 µl
Volume Total	12,5 µl

Fonte: Adaptado CDC, 2009

Tabela 02: Ciclo utilizado para amplificação da reação de RT-qPCR para triagem das amostras de fezes e *swab* nasal.

Transcrição reversa	50°C	30 minutos
Ativação do inibidor de Taq	95°C	2 minutos
Amplificação por PCR (45 ciclos)	95°C	15 segundos
	55°C	30 segundos

Fonte: Adaptado de CDC, 2009

Tabela 03: Sequência dos pares de *primers* e sonda para as reações RT-qPCR para triagem das amostras de fezes e *swab* nasal.

Reação	Primes e Sonda	Sequência
RT-qPCR	SW InfA <i>Forward</i>	GCACGGTCAGCACTTATYCTRAG
	SW InfA <i>Reverse</i>	GTGRGCTGGGTTTTTCATTTGGTC
	SW InfA <i>Probe</i>	CYACTGCAAGCCCA”T”ACACACAAGCAGGCA

Fonte: Adaptado de CDC, 2009

As amostras de fezes positivas para o vírus influenza A foram subtipadas com o ensaio *nested* RT-PCR (FRAIHA et al., 2021) utilizando na primeira reação *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para a transcrição reversa e amplificação do genoma, todas as amostras foram submetidas a uma reação de PCR (Tabela 4) e ciclagem padronizada (Tabela 5), na segunda reação *Platinum™ Taq DNA Polimerase*, Brasil (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (Tabela 6 e 7). Os amplicons foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 2%, corado por brometo de etídio e submetido a luz ultravioleta (UV) para visualizar o resultado. As informações sobre os *primers* utilizados para a reações de RT-PCR são mostradas na Tabela 8.

Tabela 04: Volume dos reagentes utilizados para a reação 1ª de subtipagem RT-PCR das amostras positivas de fezes.

Reagentes 1ª Reação	Volume de reagente adicionado por reação
Água sem Nuclease	0,58 µl
Primer Forward (10 µM)	0,5 µl
Primer Reverse (10 µM)	0,5 µl
5mM Sulfato de Magnésio	1,87 µl
2X Reaction Mix	6,25 µl
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	0,3 µl
Volume Total do Mix	10 µl
RNA extraído	2,5 µl
Volume Total	12,5 µl

Fonte: Adaptado Fraiha, 2019.

Tabela 05: Ciclo utilizado para amplificação da reação de RT-PCR para subtipagem das amostras positivas de fezes.

Ciclagem 1ª Reação para o subtipo H1			
Transcrição reversa	48°C	30 minutos	
Ativação do inibidor de Taq (Desnaturação inicial)	95°C	2 minutos	
Desnaturação	95°C	30 segundos	40 ciclos
Anelamento	50°C	30 segundos	
Extensão	68°C	1 minutos	
Extensão final	68°C	5 minutos	
Espera	4°C	∞	
Ciclagem 1ª Reação para o subtipo H3N2			
Transcrição reversa	50°C	30 minutos	
Ativação do inibidor de Taq (Desnaturação inicial)	95°C	2 minutos	
Desnaturação	95°C	30 segundos	40 ciclos
Anelamento	52°C	30 segundos	
Extensão	68°C	1 minutos	
Extensão final	68°C	5 minutos	
Espera	4°C	∞	

Fonte: Adaptado Fraiha, 2019.

Tabela 06: Volume dos reagentes utilizados para a reação 2ª de subtipagem PCR das amostras positivas de fezes.

Reagentes 2ª Reação	Volume de reagente adicionado por reação
Água sem Nuclease	17,25 µl
Primer Forward (10 µM)	1,25 µl
Primer Reverse (10 µM)	1,25 µl
MgCl ₂ 50 mM	0,75 µl
dNTP 10 mM	0,5 µl
10X tampão de PCR	2,5 µl
Platinum™ Taq DNA Polimerase	0,5 µl
Volume Total do Mix	24 µl
RNA extraído	1 µl
Volume Final	25 µl

Fonte: Adaptado Fraiha, 2019.

Tabela 07: Ciclos para amplificação da 2ª reação de PCR para subtipagem das amostras positivas de fezes.

Ciclagem 2ª Reação para o subtipo H1N1pdm e H3N2

Ativação do inibidor de Taq (Desnaturação inicial)	95°C	5 minutos	
Desnaturação	95°C	30 segundos	40
Anelamento	52°C	30 segundos	ciclos
Extensão	72°C	1 minutos	
Extensão final	72°C	5 minutos	
Espera	4°C	∞	

Ciclagem 2ª Reação para o subtipo H1hu

Ativação do inibidor de Taq (Desnaturação inicial)	95°C	5 minutos	
Desnaturação	95°C	30 segundos	40
Anelamento	55°C	30 segundos	ciclos
Extensão	72°C	1 minutos	
Extensão final	72°C	5 minutos	
Espera	4°C	∞	

Fonte: Adaptado Fraiha, 2019

Tabela 08: Sequência dos pares de *primers* para as reações de subtipagem RT-PCR Nested.

Reação	Subtipo	primers	Sequência (5'-3')	Tamanho (bp)
RT-PCR	1ªReação/ H1	FW1H1	AGCAAAAGCAGGGGAAAAYA	616bp
		RV1H1	CCCATAGYAYRAGGACTTC	
	2ªReação/ H1N1pdm	FW2H1PDM	CCAATCATGACTCGAACAAC	159bp
		RV2H1PDM	ATAGCACGAGGACTTCTTTCT	
	2ªReação/ H1hu	FW2H1DELTA	GCGTTGCCGGATGGATCTTA	303bp
		RV2H1DELTA	ACAGACCATTCTTCCCCGTCA	
	1ªReação/ H3N2	FW1H3	ATATGTTCAAACGTCAGGGAGA	544bp
		RV1H3	GTCGATTGCTGCTTGAGTGC	
	2ªReação/ H3N2	FW1H3	ATATGTTCAAACGTCAGGGAGA	279bp
		RV2H3	TTCCATTTGGAGTGACGCA	

Fonte: Adaptado de Fraiha, 2019.

Para avaliação de co-infecções, o DNA das amostras de soro e *swab* retal foram extraídos utilizando o kit de extração de DNA mini spin Kasvi, de acordo com as normas do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -80°C até o uso. Os extraídos foram submetidos ao teste de qPCR utilizando o conjunto de primer e sonda desenvolvido por Opriessnig et al (2003) para detecção de PCV2 (Tabela 6 e 7). Para a amplificação do genoma viral foi utilizado o *GoTaq® Probe* qPCR Master Mix (Promega Corporation, EUA).

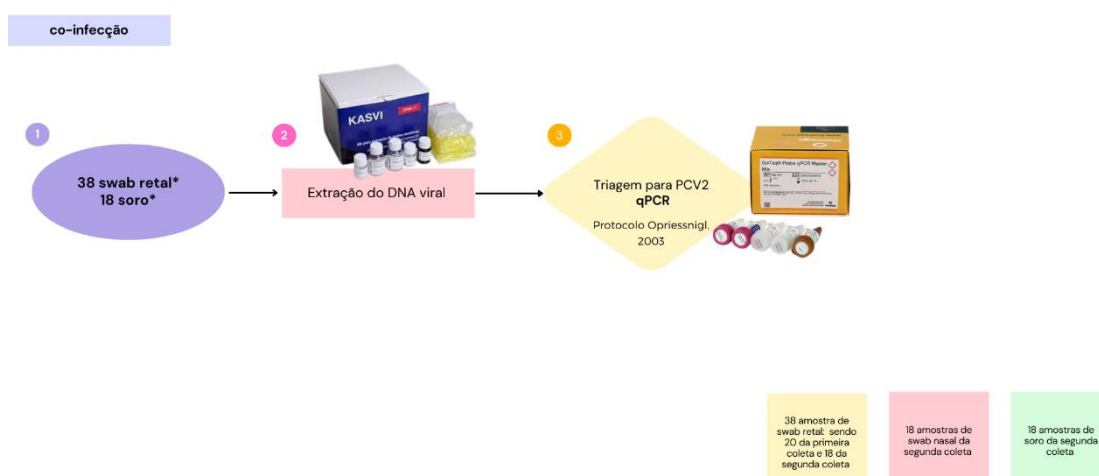


Figura 05: Fluxograma das amostras de soro e fezes para detecção de PCV2 da primeira e segunda coleta. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

Tabela 09: Volume dos reagentes utilizados para a Reação de qPCR para PCV2 das amostras de *swab* retal e soro.

Reagentes	Volume de reagente adicionado por reação
Água sem Nuclease	5,1 µl
Primer P1570 Forward (10 µM)	0,8 µl
Primer P1642 Reverse (10 µM)	0,8 µl
P1591 Probe (5 µM)	0,8 µl
GoTaq® Probe qPCR Master Mix, 2X	10 µl
Volume Total do Mix	17,5 µl
RNA extraído	2,5 µl
Volume Final	25 µl

Fonte: Adaptado de Opriessnig 2003

Tabela 10: Ciclos para amplificação da reação de qPCR para PCV2 das amostras de *swab* retal e soro.

Ativação da DNA Polimerase GoTaq®	95°C	2 minutos
Amplificação por PCR (40 ciclos)	95°C	15 segundos
	60°C	1 minuto

Fonte: Adaptado de Opriessnig 2003

Tabela 11: Sequência dos pares de *primers* e sonda para as reações qPCR para PCV2 das amostras de fezes e soro.

Reação	Primes e Sonda	Sequência
qPCR	P1570 <i>Forward</i>	TGGCCCCGAGTATTCTGATT
	P1642 <i>Reverse</i>	CAGCTGGGACAGCAGTTGAG
	P1591 <i>Probe</i>	CCAGCAATCAGACCCCGTTGGAATG

Fonte: Adaptado de Opriessnig 2003

3.3. Análises do Sequenciamento

Os amplicons de RT-PCR das amostras de fezes subtipadas foram purificados usando o DNA Clean and Kit concentrador (ZYMO Research, EUA), em seguida sequenciados por eletroforese capilar em um equipamento ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA). Os dados da sequência foram analisados com o auxílio da ferramenta *SnapGene 6.1.1* as sequências foram então submetidas ao banco de dados do GenBank/NCBI através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para confirmação do resultado.

3.4. Análise Sorológica

As 18 amostras de soro da segunda coleta do mês de agosto foram analisadas utilizando a técnica de Inibição da Hemaglutinação (HI) para Influenza A dos subtipos H3N2, H1N1pdm09 e H1hu para a detecção de anticorpos. O protocolo utilizado foi desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002).

Para a realização do teste de Hemaglutinação (HA) para quantificar o vírus, foram utilizadas amostras conhecidas dos subtipos H3N2, H1N1pdm09 e H1hu. O título viral é adquirido da maior diluição em que ocorreu a aglutinação das hemácias. O mesmo vírus foi utilizado para a retrotitulação para confirmar o resultado da titulação e para o teste de HI.

Os soros dos animais foram inativados a 56°C por 30 minutos e tratados para diminuir possíveis inibidores da hemaglutinação presentes no soro. Para o teste de HI foram utilizadas hemácias de peru diluída a 1% em PBS. O soro tratado foi diluído em PBS em série na placa de 96 poços com fundo em V, com a primeira diluição 1:20 (considerado amostra negativa) seguida das diluições 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640; 1:1280; 1:2560 que são consideradas positivas. No controle negativo foi aplicado PBS com a hemácia diluída e também foi utilizado um controle de vírus, contendo o vírus diluído na titulação do HA e hemácia, para indicar que o vírus é capaz de hemaglutinar.

4. RESULTADOS

Foram testados dois tipos de protocolos para a realização do teste de RT-qPCR das amostras de *swab* retal. O primeiro protocolo utilizava o extraído puro eluído em 60 μ l de água, as amostras não amplificaram e apresentou ruídos de fundo (*background*) impedindo a validação do resultado, a presença de inibidores de amplificação nas fezes podem induzir a resultados falsos negativos durante o teste de qPCR (FRUEHWIRTH et al., 2020). No segundo teste, 1 μ l do extraído puro foi diluído em 9 μ l de água (1:10), o resultado do segundo teste demonstrou que a diluição 1:10 do extraído garantiu uma amplificação confiável das amostras (Figura 6).

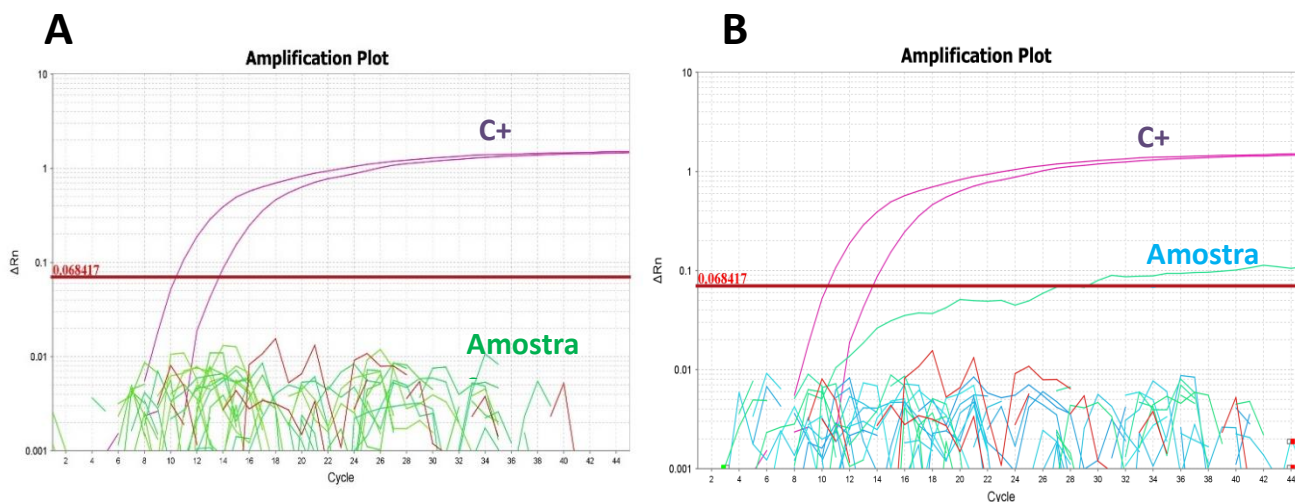


Figura 06: Amplificação das amostras de *swab* retal, **A:** extraído puro, **B:** extraído diluído 1:10.
Fonte: Arquivo Pessoal.

Das 38 amostras de *swab* retal analisadas, 7,89% (3/38) das amostras foram positivas para o vírus influenza A suíno durante o teste de triagem RT-qPCR, sendo 2 suínos de 76 dias da primeira coleta no mês de abril (amostra 14 Ct: 29.47; amostra 17 Ct:25.56) e 1 suíno de 92 dias da segunda coleta de agosto (amostra 4 Ct:28.04). (Figura 07)

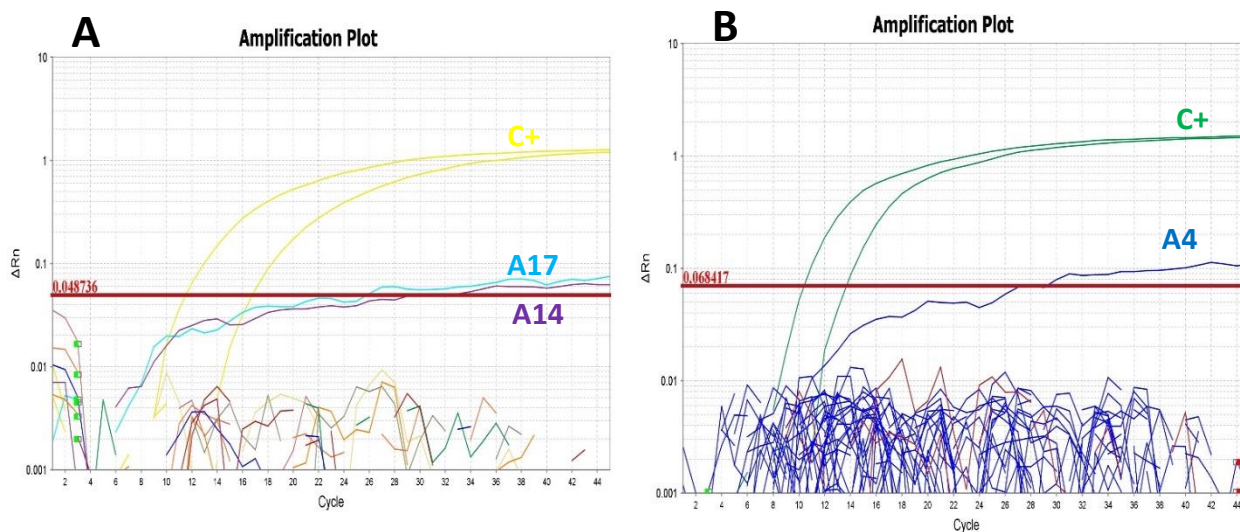


Figura 07: Ensaio RT-qPCR para triagem de influenza A suína das amostras de *swab* retal, **A:** Amplificação das amostras 14 e 17 da primeira coleta. **B** Amplificação da amostra 4 da segunda coleta. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

O PCR específica de subtipagem detectou uma co-infecção vírus H1N1 pdm09 e H1hu na amostra 14 e a presença de H1hu na amostra 17, a amostra 4 apresentou um positivo para H1 com uma banda de 616bp específico do tamanho da primeira reação de H1 (Figura 8).

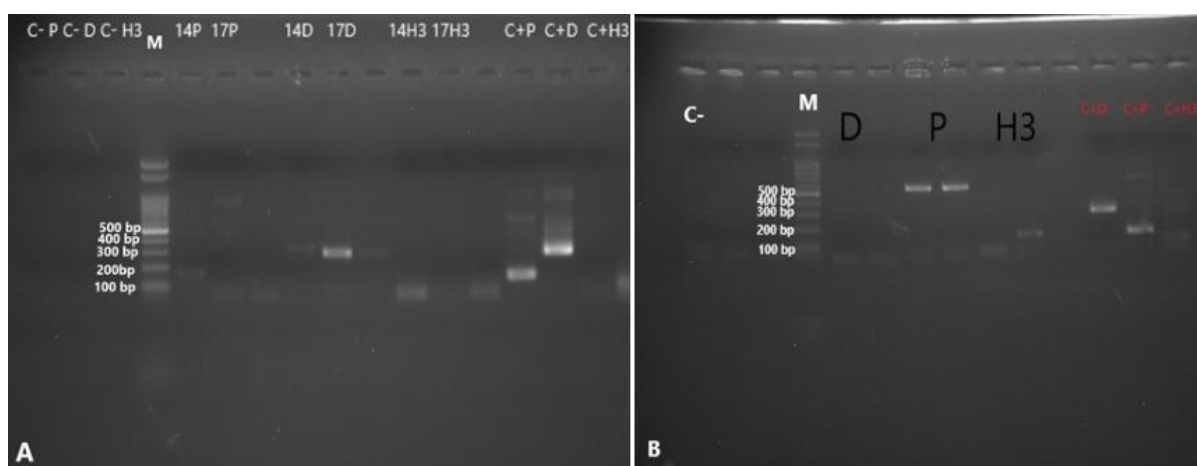


Figura 08: Ensaio *nested* RT-PCR para os três subtipos de influenza A das amostras de *swab* retal positivas na triagem, **A:** amostra 14 e 17 testadas para H1N1 pandêmico de 2009 (P), H1hu (D) e H3N2 (H3). As amostras amplificadas para H1N1pdm09, H1hu estão relacionados às bandas de 159bp e 303bp. **B:** amostra 4 testadas para H1N1 pandêmico de 2009 (P), H1hu (D) e

H3N2 (H3). A amostra amplificada para H1N1pdm09 com a banda específica da primeira reação de H1 de 616bp. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

Para confirmar o resultado obtido da reação *nested* PCR da subtipagem do *swab* retal, os amplicons das amostras positivas foram sequenciados e analisados. O resultado do sequenciamento revelou que a amostra 14 da primeira coleta, era 91,23% idêntica à região 425 a 481 do gene da hemaglutinina (HA) do segmento 4 de um subtipo H1N1 do vírus Influenza A de suíno identificada na Dinamarca em 2014 (número de acesso GenBank MT667159.1) (Figura 9). O sequenciamento da amostra 17 também confirmou a presença do RNA do vírus influenza, dando similaridade de 88,66% com a região 250 a 487 do segmento 4 da hemaglutinina (HA) do subtipo H1N1 do vírus influenza A de suíno identificado no Brasil no ano de 2011 (número de acesso GenBank MH559883.1). (Figura 10)

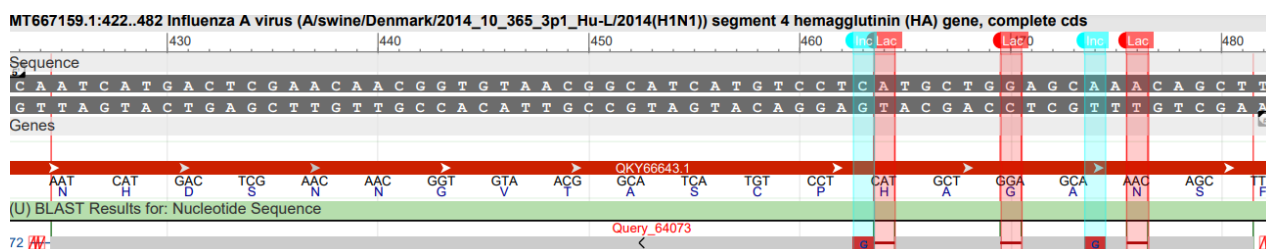


Figura 09: Alinhamento das sequências do *subject* correspondente ao gene da hemaglutinina (HA) do segmento 4 do vírus da influenza A (A/suíno/Dinamarca/2014_10_365_3p1_Hu-L/2014(H1N1)) com o *Query* (fragmento do gene da amostra 14) na região 425 a 481. As regiões em vermelho indicam *Gaps* e as regiões em azul indicam *Mismatches*. **Fonte:** GenBank/NCBI

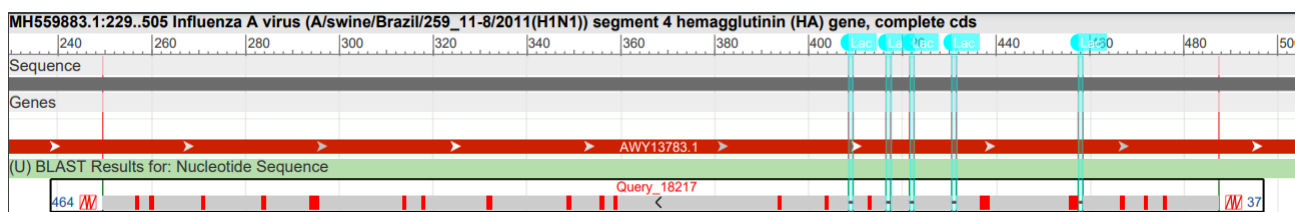


Figura 10: Alinhamento das sequências do *subject* correspondente ao gene da hemaglutinina (HA) do segmento 4 do vírus da influenza A (A/suíno/Brasil/259_11-8/2011(H1N1)) com o *Query* (fragmento do gene da amostra 17) na região 250 a 487. As regiões em azul indicam *Gaps* e as regiões em vermelho indicam *Mismatches*. **Fonte:** GenBank/NCBI

Das 18 amostras de *swab* nasal da segunda coleta, 2 amostras amplificaram. A amostra do animal 2 (Ct: 31.86) e o animal 9 (Ct:26.21) (Figura 11), os suínos positivos

no *swab* retal são negativos no *swab* nasal, indicando que esses animais podem ter sido infectados recentemente e estão liberando o vírus no sistema respiratório. O animal positivo nas fezes foi negativo no *swab* nasal, indicando uma possível liberação do vírus tardia nas fezes (Tabela 12).

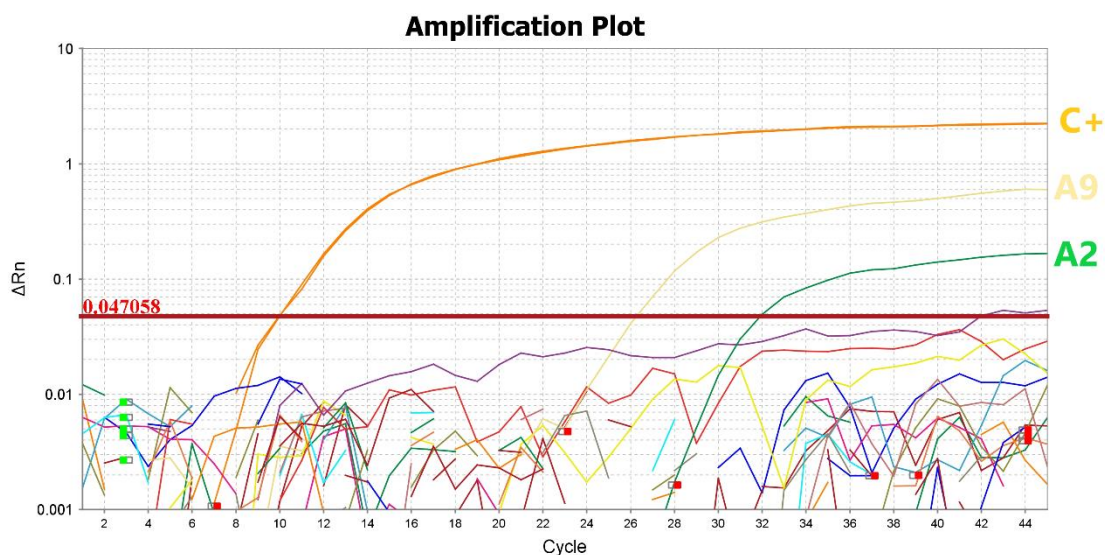


Figura 11: Ensaio RT-qPCR para triagem de influenza A suíno das amostras de *swab* nasal.
Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 12: Comparação entre os grupos positivos e negativos no *swab* nasal e retal para IAV utilizando o teste RT-qPCR.

ID do Animal	RNA viral <i>swab</i>	Subtipo	RNA viral <i>swab</i>
	retal (Ct)		nasal (Ct)
2	Negativo	-	31.86
4	28.04	H1	Negativo
9	Negativo	-	26.21

Fonte: Arquivo Pessoal.

As 18 amostras de soro foram testadas para os subtipos H1N1pdm09, H1hu e H3N2. As titulações de HI foram analisadas utilizando os parâmetros de amostras com título de HI ≤ 20 são consideradas negativas, e as amostras com título de HI de 40 e 80 são consideradas de titulação baixa, amostras com títulos de HI de 160 a 640 são de titulação média, já amostras com títulos de HI de 1280 e 2560 são de titulação alta. Os resultados do teste mostraram que 83,3% (15/18) das amostras foram positivas para a

presença de anticorpos para SIV, indicando que o vírus estava circulando no rebanho no período que coletamos (Figura 12).

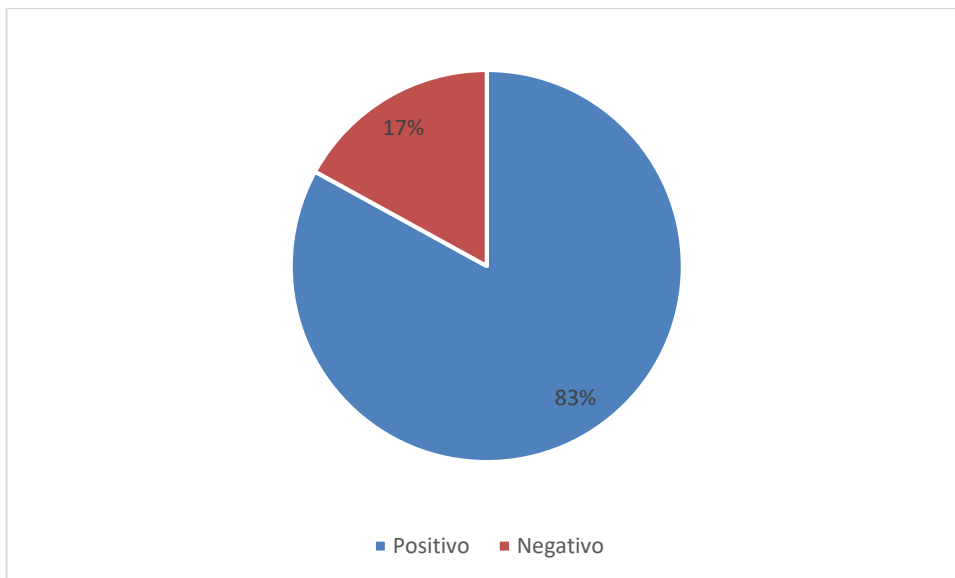


Figura 12: Ocorrência de Anticorpos contra SIV nas Amostra da Segunda Coleta. **Fonte:** Arquivo Pessoal

Grande parte dos animais apresentaram uma titulação baixa para H1N1pdm09 44,4% (8/18) e 44,4% (8/18) foram negativos, o subtipo H1hu apresentou maior número de animais com titulação média 44,4% (8/18) e 38,8% (7/18) com titulação baixa, o subtipo H3N3 teve maior número de animais negativos 50% (9/18) e 50% (9/18) com a titulação baixo. Os casos de co-infecção entre H1N1pdm09+H1hu foi observada em 55,5% das amostras, H1hu+H3N2 em 50% e H1N1pdm09+H3N2 em 38,8%, e os três subtipos em 38,8% das amostras. Os resultados mostram que na granja tem a circulação nos três subtipos e com grandes casos de co-infecção entre os subtipos (Figura 13).

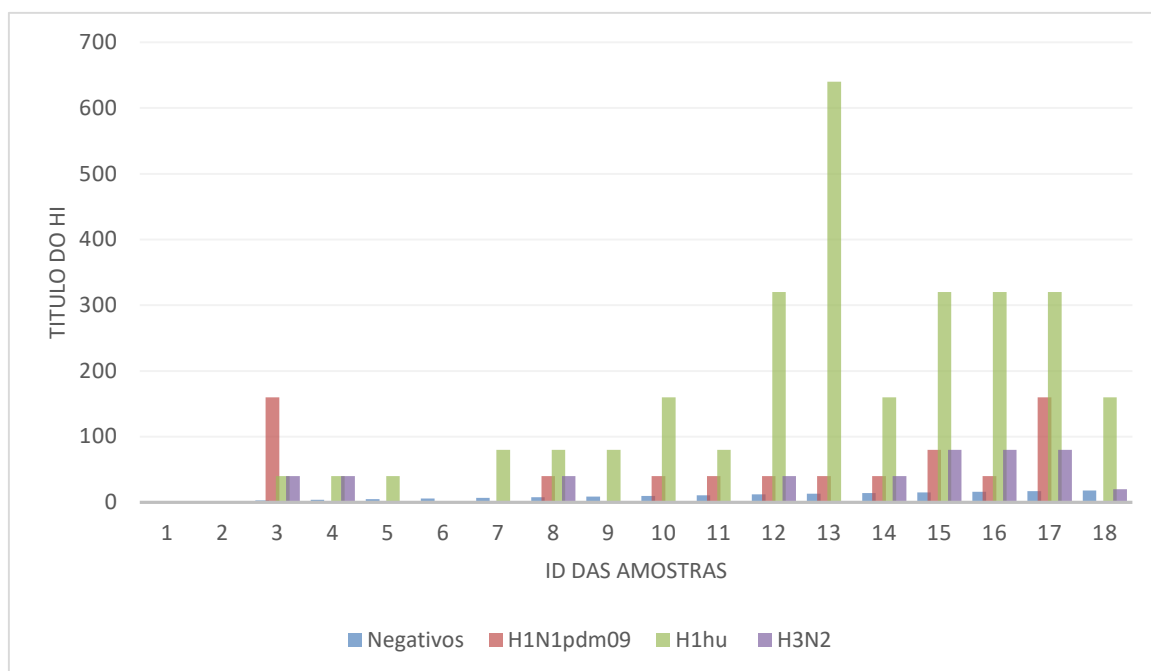


Figura 13: Ocorrência de Anticorpos contra Subtipos de SIV nas Amostra da Segunda Coleta. Histograma com resultados da titulação de HI das 18 amostras da segunda coleta. **Fonte:** Arquivo Pessoal

As 20 amostras de *swab* retal da primeira coleta e as 18 amostras de soro e *swab* retal da segunda coleta foram testadas para PCV2 para uma possível co-infecção. Foram detectados o genoma do vírus PCV2 em 97,3 % (37/38) das as amostras. O DNA viral pode ser facilmente detectado por um período longo após o início da infecção em amostras de *swabs* retais e em soro de suínos (CAPRIOLI et al., 2006). Os suínos positivos nas fezes para influenza A (primeira coleta AN 14, AN 17; segunda coleta AN 4), apresentaram uma concentração relativa de DNA (Ct) entre 29,33 e 23,22 indicando uma carga viral maior (Tabela 13).

Tabela 13: Valores Ct obtidos das amostras de swab retal e soro para PCV2 utilizando o teste RT-qPCR.

ID ANIMAL (coleta de abril)	PCV2 (Valores Ct <i>swab retal</i>)	ID ANIMAL (coleta de agosto)	PCV2 (Valores Ct soro)	PCV2 (Valores Ct <i>swab retal</i>)
1	32,95	1	36,59	27,68
2	38,11	2	33,82	26,30
3	29,72	3	30,87	31,49
4	31,98	4	26,03	29,35
5	33,14	5	22,75	21,36
6	33,15	6	25,28	26,70
7	33,03	7	28,74	26,96
8	32,53	8	29,99	29,22
9	35,03	9	22,72	23,90
10	32,34	10	30,93	30,69
11	35,31	11	32,98	32,54
12	28,54	12	30,34	29,02
13	24,46	13	32,95	30,13
14	27,73	14	25,13	29,74
15	27,63	15	28,69	30,07
16	Negativo	16	30,64	28,92
17	23,22	17	30,79	33,21
18	18,70	18	34,85	31,81
19	33,15			
20	31,54			

Fonte: Arquivo Pessoal.

5. DISCUSSÃO

O Brasil é o quarto maior exportador e produtor de carne suína do mundo (ABPA, 2022). As doenças respiratórias como SIV são consideradas as mais importantes para a suinocultura causando grandes perdas econômicas (VINCENT et al.,2013). SIV é endêmico na maioria dos países produtores de suínos, além de ser uma zoonose que afeta um grande número de animais. O suíno tem um papel importante pois são considerados recipientes de mistura para ocorrer rearranjos de subtipos diferentes do vírus influenza A

(TAUBENNERGER et al., 2010). Para minimizar as perdas, é importante o diagnóstico rápido e correto das doenças respiratórias principalmente de SIV.

Apesar de algumas espécies foram comprovadas a replicação do vírus nos enterócito e detecção do RNA viral nas fezes (ARMSTRONG et al., 1991; WANG et al., 2003; LIOU et al., 1987; PINSKY et al., 2010; KAJI et al., 2003; KHATIB et al., 2021), nenhum estudo relatou a presença do vírus influenza A nas fezes de suíno. O presente estudo detectou o RNA viral dos subtipos H1N1pdm09 e H1hu nas fezes de 3 suínos de recria com idade entre 70 a 90 dias. Os animais apresentavam sintomas respiratórios como tosse, espirros, perda de peso e prostração, nenhum animal apresentava sintomas gastrointestinais como diarreia.

Durante a análise das amostras de *swab* nasal coletadas durante o mês de agosto, não foi detectado a presença o RNA viral no trato respiratório do animal que foi positivo nas fezes (AN 4), e na análise sorológica do mesmo animal apresentou anticorpos contra os subtipos H3N2 e H1hu indicando a circulação do vírus na granja e uma possível infecção tardia. Um estudo em humanos indicou que o RNA do SIV foi detectado no *sputum* de pacientes durante o primeiro dia e foi caindo até o décimo dia de infecção, enquanto as amostras fecais dos mesmos pacientes foram aumentando no sétimo dia de infecção e sendo detectado por mais 2 semanas, indicando uma possível replicação prolongada do vírus no trato intestinal (HIROSE et al., 2016). A liberação do vírus nas fezes pode aumentar a transmissão entre os animais, o vírus pode ficar no ambiente e caso a granja não faça a desinfecção do galpão de forma correta, durante o alojamento de novos animais pode ocorrer infecção e manter o vírus no rebanho, além do risco da transmissão para os trabalhadores da granja. Mais estudos são necessários para explicar uma possível replicação do vírus influenza A nas células intestinais dos suínos, e o motivo da presença do vírus nas fezes.

Os animais positivos nas fezes para influenza A, também foram positivos para PCV2 indicando uma co-infecção. Suínos infectados com PCV e SIV apresentam sintoma clínico graves e por mais tempo mostrando que o PCV2 pode aumentar os sinais clínicos do vírus influenza A (WEI et al., 2010), esse sinergismo entre os dois vírus pode indicar uma possível potencialização do vírus influenza e sua replicação no epitélio intestinal sendo o motivo da presença do vírus nas fezes. Ainda não tem estudos indicando que o PCV2 pode aumentar a replicação do SIV (OUYANG et al., 2019).

6. CONCLUSÕES

O estudo detectou a presença o RNA do vírus influenza A nas fezes de suínos naturalmente infectados de uma granja comercial, indicando um possível potencial de transmissão fecal-oral entre os animais. O trato intestinal dos suínos pode ser considerando uma possível região de infecção viral, novos estudos são necessários para comprovar essa hipótese, já que esse estudo só detectou a presença do RNA viral e não sua origem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Acessado em 11 de outubro de 2022

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

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

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

CAPRIOLI, A. et al. PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. *Research in veterinary science*, v. 81, n. 2, p. 287-292, 2006.

CIACCI-ZANELLA, Janice Reis et al. Influenza A virus infection in Brazilian swine herds following the introduction of pandemic 2009 H1N1. *Veterinary Microbiology*, v. 180, n. 1-2, p. 118-122, 2015.

CHAVES, Maria Vitória. et al. (21-24 de June de 2022). Occurrence of antibodies against Swine Influenza Virus subtypes in the South and. *IPVS2022 26th international pig veterinary society*, p. 711.

CRISCI, Elisa et al. Influenza virus in pigs. *Molecular immunology*, v. 55, n. 3-4, p. 200-211, 2013.

- CHEN, Li-Mei et al. Receptor specificity of subtype H1 influenza A viruses isolated from swine and humans in the United States. *Virology*, v. 412, n. 2, p. 401-410, 2011..
- CHAN, Martin CW et al. Seasonal influenza A virus in feces of hospitalized adults. *Emerging infectious diseases*, v. 17, n. 11, p. 2038, 2011.
- CHOI, Young Ki; GOYAL, Sagar M.; JOO, Han Soo. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *The Canadian veterinary journal*, v. 44, n. 9, p. 735, 2003.
- CUNHA, R. G.; VINHA, V. R.; PASSOS, W. D. Isolation of a strain of Myxovirus influenzae-A suis from swine slaughtered in Rio de Janeiro. *Revista brasileira de biologia*, v. 38, n. 1, p. 13-17, 1978.
- DETMER, Susan et al. Diagnostics and surveillance for swine influenza. *Swine Influenza*, p. 85-112, 2012.
- DIAS, Alessandra S. et al. Distribution of antibodies against influenza virus in pigs from farrow-to-finish farms in Minas Gerais state, Brazil. *Influenza and other respiratory viruses*, v. 9, n. 3, p. 161-167, 2015.
- DORR, Paul M. et al. Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 230, n. 2, p. 244-250, 2007.
- FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, p. 733, 2007.
- FRAIHA, Ana Luiza Soares et al. Swine influenza A virus subtypes circulating in Brazilian commercial pig herds from 2012 to 2019. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 4, p. 2421-2430, 2021.
- FRUEHWIRTH, Marcelo et al. Resultado falso negativo no diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 em amostras com inibidores de amplificação. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 56, 2020.
- HIROSE, R. et al. Long-term detection of seasonal influenza RNA in faeces and intestine. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 22, n. 9, p. 813. e1-813. e7, 2016.
- International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. Disponível em: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202103953. Acessado em 05 de outubro de 2022
- JANKE, B. H. Clinicopathological features of swine influenza. *Swine Influenza*, p. 69-83, 2013.

- KAJI, Masahide; WATANABE, Aya; AIZAWA, Hisamichi. Differences in clinical features between influenza A H1N1, A H3N2, and B in adult patients. *Respirology*, v. 8, n. 2, p. 231-233, 2003.
- KOEN, J. S. A practical method for field diagnosis of swine disease. *Am J Vet Med*, v. 14, p. 468-470, 1919.
- KERR, A. A. et al. Gastric'flu influenza B causing abdominal symptoms in children. *The Lancet*, v. 305, n. 7902, p. 291-295, 1975.
- LEVISON, Matthew E. Diseases transmitted by birds. *Infections of Leisure*, p. 151-170, 2016.
- LYOO, Kwang-Soo et al. Comparative pathology of pigs infected with Korean H1N1, H1N2, or H3N2 swine influenza A viruses. *Virology journal*, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2014.
- LIOU, Y. S. et al. Children hospitalized with influenza B infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 6, n. 6, p. 541-543, 1987.
- MONGER, V. R. et al. Seroprevalence and associated risk factors of important pig viral diseases in Bhutan. *Preventive veterinary medicine*, v. 117, n. 1, p. 222-232, 2014.
- OPRIESSNIG, T. et al. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Veterinary Pathology*, v. 40, n. 5, p. 521-529, 2003.
- OUYANG, Ting et al. Co-infection of swine with porcine circovirus type 2 and other swine viruses. *Viruses*, v. 11, n. 2, p. 185, 2019.
- OZAWA, Makoto et al. Efficient isolation of swine influenza viruses by age-targeted specimen collection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 1331-1338, 2015.
- PINSKY, Benjamin A. et al. Long-term shedding of influenza A virus in stool of immunocompromised child. *Emerging infectious diseases*, v. 16, n. 7, p. 1165, 2010.
- RAJÃO, Daniela S. et al. Serological evidence of swine influenza in Brazil. *Influenza and other respiratory viruses*, v. 7, n. 2, p. 109-112, 2013.
- RAJÃO, Daniela S. et al. Genetic characterization of influenza virus circulating in Brazilian pigs during 2009 and 2010 reveals a high prevalence of the pandemic H1N1 subtype. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 7, n. 5, p. 783-790, 2013.
- SCHAEFER, Rejane et al. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, p. 61-73, 2013.
- SCHAEFER, Rejane et al. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. 2011.
- SCHULTZ-CHERRY, Stacey; OLSEN, Christopher W.; EASTERDAY, Bernard C. History of swine influenza. *Swine Influenza*, p. 21-27, 2011.

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

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

SAADE, Georges et al. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Veterinary research*, v. 51, n. 1, p. 1-19, 2020.

TORREMORELL, M. Influenza suína: como minimizar o impacto desse patógeno? In: *Sanidade e produção suína: atualização, inovação e tecnologia*. Jaboticabal : Funep, 2020, p. 17-22.

TAUBENBERGER, Jeffery K.; KASH, John C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & microbe*, v. 7, n. 6, p. 440-451, 2010.

TONG, Suxiang et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS pathogens*, v. 9, n. 10, p. e1003657, 2013.

VINCENT, Amy et al. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses and public health*, v. 61, n. 1, p. 4-17, 2014.

WANG, Ying Hsiang et al. Clinical characteristics of children with influenza A virus infection requiring hospitalization. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, v. 36, n. 2, p. 111-116, 2003.

WEI, Huiling et al. Infection of cesarean-derived colostrum-deprived pigs with porcine circovirus type 2 and Swine influenza virus. *Comparative medicine*, v. 60, n. 1, p. 45-50, 2010.

World Organization for Animal Health (OIE). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022*. Chapter 3.9.7. - Influenza a virus swine. Disponível em: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>.

XIE, Jianling et al. Influenza virus detection in the stool of children with acute gastroenteritis. *Journal of Clinical Virology*, v. 131, p. 104565, 2020.

YOO, Soo Jin et al. Frequent detection of pandemic (H1N1) 2009 virus in stools of hospitalized patients. *Journal of clinical microbiology*, v. 48, n. 6, p. 2314-2315, 2010.