

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA INFLUENZA A EM
MATRIZES SUÍNAS COMERCIAIS E SUA RELAÇÃO COM PRÁTICAS DE
BIOSSEGURIDADE**

ANA PAULA SERAFINI POETA SILVA

Porto Alegre

2018

ANA PAULA SERAFINI POETA SILVA

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA INFLUENZA A EM
MATRIZES SUÍNAS COMERCIAIS E SUA RELAÇÃO COM PRÁTICAS DE
BIOSSEGURIDADE**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo Corbellini

Porto Alegre

2018

ANA PAULA SERAFINI POETA SILVA

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA INFLUENZA A EM
MATRIZES SUÍNAS COMERCIAIS E SUA RELAÇÃO COM PRÁTICAS DE
BIOSSEGURIDADE**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovada em 27 de abril de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Gustavo Corbellini (UFRGS – Orientador)

Prof. Dra. Vanessa Bielefeldt Leotti Torman (UFRGS)

Prof. Dr. David Emílio Santos Neves de Barcellos (UFRGS)

Prof. Dr. Claudio Wageck Canal (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Ana Paula Serafini Poeta
PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA
INFUENZA A EM MATRIZES SUÍNAS COMERCIAIS E SUA
RELAÇÃO COM PRÁTICAS DE BIOSSEGURIDADE / Ana Paula
Serafini Poeta Silva. -- 2018.
48 f.
Orientador: Luís Gustavo Corbellini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Influenza suína. 2. Epidemiologia. 3.
Soroprevalência. 4. Modelo multivariável. 5.
Biosseguridade. I. Corbellini, Luís Gustavo, orient.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Dedico este trabalho à minha mãe Angela Maria Serafini, por todo amor e coragem que depositou sobre mim.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e organizações de apoio pelo constante investimento e capacitação dos seus alunos.

A todos os integrantes do Laboratório de Epidemiologia Veterinária, com especial aos colegas Eduardo Costa, Gustavo Silva e Waldemir Santiago, por toda a ajuda e prontidão em compartilhar conhecimentos.

Ao meu orientador, professor Luís Gustavo Corbellini, por toda a confiança e orientação durante a graduação e pós-graduação. Que a epidemiologia sempre tenha grandes entusiastas e inovadores.

Agradecimento especial, para Paulo Poeta e Miria Nascimento, pela base sólida que sempre me proporcionaram ao longo desses dois anos de estudos.

“Não deixe as vozes das opiniões dos outros afogarem sua voz interior. E, mais importante, tenha coragem de seguir seu coração e sua intuição. De alguma forma, eles já sabem o que você realmente quer se tornar.”

Steve Jobs

RESUMO

O vírus da influenza tipo A (VIA) é um importante agente em rebanhos suínos ao redor do mundo. Alguns subtipos do vírus podem ser transmitidos entre espécies diferentes, como aves, homem e suínos, proporcionando o aumento de mutações genômicas e de novas cepas circulantes. Os suínos são considerados hospedeiros de "mixagem", uma vez que possuem receptores para cepas de aves, de humanos e suínos. A doença clínica em suínos é caracterizada por quadro respiratório agudo e brando, com duração de 5 a 7 dias. Em rebanhos de reprodutores – como as Unidade Produtoras de Leitões (UPL) – um surto epidêmico de influenza pode levar o estabelecimento de uma infecção endêmica com duração de semanas a meses, sem produção de sinais clínicos evidentes. Protocolos de biosseguridade vêm sendo incorporados e padronizados pelas agroindústrias, visando prevenir a introdução de doenças infecciosas em rebanhos. Entretanto, existem lacunas no conhecimento dos fatores associados à biosseguridade em rebanhos de matrizes suínas brasileiras e sua relação com doenças infecciosas. Por essa razão, um estudo transversal foi realizado para estimar a soroprevalência do VIA em matrizes de UPL e explorar práticas de biosseguridade associadas à presença de anticorpos contra o vírus da influenza. Ao todo, foram amostradas 404 matrizes em 21 granjas. O diagnóstico sorológico foi realizado pelo ELISA (protocolo *in house*). Todas as amostras positivas pelo ELISA foram testadas usando a inibição de hemaglutinação (IH) para diagnosticar a presença de H1N1pdm2009, H1N2 e H3N2 como subtipos de vírus influenza. As informações sobre práticas de biosseguridade foram obtidas através da aplicação de um questionário. A associação entre o resultado do diagnóstico do ELISA de cada uma das matrizes amostradas e as práticas de biosseguridade da propriedade foi feita através de um modelo de Regressão de Poisson Robusta, estimando a Razão de Prevalência (RP) como medida da associação. A prevalência estimada de anticorpos anti-VIA nas matrizes foi de 63,9% (IC 95%: 55% - 72%), sendo que todas as granjas tiveram resultados positivos. A frequência dos subtipos nas matrizes usando IH foi 51,9% para H1N1, 27,8% H1N2 e 0,6% H3N2. Coinfecções entre H1N1 e H1N2 foram observadas em 19 granjas. As práticas de biosseguridade associadas significativamente com a presença de anticorpos (p -valor $<0,05$) foram a "presença de tela anti-pássaros" (RP = 0,75) e "local de aclimação para leitões" (RP = 0,57) como fatores protetivos e "reposição externa de leitões" (RP = 1,38) como associada a uma maior prevalência do vírus da influenza suína. Foi possível verificar que a soroprevalência do VIA nas matrizes comerciais da população estudada é alta, indicando que os animais são frequentemente expostos ao patógeno, e que algumas medidas de biosseguridade estão associadas com a ocorrência da doença, fornecendo subsídios técnicos sobre a importância dos protocolos de biosseguridade para a promoção da saúde do plantel.

Palavras-chave: Influenza suína, epidemiologia, soroprevalência, modelo multivariável, biosseguridade.

ABSTRACT

Influenza A virus (IAV) is an important infectious agent in pig herds across the globe. Some subtypes of this virus can be transmitted between different species, such as birds, human and pig, increasing genomic mutations and evolving of new circulating strains. Pigs are considered "mixed vessel" for influenza A, since they have cell receptors for birds, humans and pigs strains. The clinical disease in pigs is characterized by an acute and mild respiratory disease, lasting from 5 to 7 days. In breeding herds such as sow farms, an epidemic outbreak of influenza can lead to the establishment of an endemic infection lasting weeks to months without clinical signs. Biosecurity procedures were incorporated and standardized by the agroindustry in order to prevent both the introduction and dissemination of infectious diseases. However, there are gaps in the knowledge about what biosecurity factors are associated with infectious diseases in Brazilian herds. For this reason, a cross-sectional study was carried out to estimate IAV seroprevalence in sows and assess which biosecurity practices are associated with the prevalence of influenza virus antibodies. Four hundred forty-four sows were sampled from 21 farms. Serological assays were performed using an ELISA test (in-house protocol). All ELISA positive samples were tested using the hemagglutination inhibition test (HI) to identify the presence of H1N1pdm2009, H1N2 and H3N2 subtypes. Information of biosecurity practices was obtained through the application of a questionnaire. Association between ELISA diagnostic result of each sampled sow and biosecurity practices was assessed using a robust Poisson regression and the Prevalence Ratio (PR) was used as the measure of association. The estimated prevalence of anti-IAV antibodies in sows was 63.9% (95% CI: 55% - 72%), and all farms had at least one seropositive sow s. The frequency of subtypes using HI was 51.9% for H1N1, 27.8% for H1N2 and 0.6% for H3N2. Co-infections with H1N1 and H1N2 were observed in 19 farms. Biosecurity practices such as "presence of bird-proof" (PR = 0.75), and "presence of an acclimatization unit" (PR = 0.57), protective ones, and "external replacement of gilts" (PR = 1.38), which was positively associated with the IAV prevalence, were statistically significant in the final model (p-value <0.05). It was possible to verify that IAV seroprevalence is high and some biosecurity procedures were associated with the serologic status, offering technical subsidies about the importance of the biosecurity for the herd health.

Key-words: *Swine influenza, epidemiology, seroprevalence, multivariable model, biosecurity.*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados sorológicos de influenza suína encontrados em estudos conduzidos no Brasil.	22
TABELA 1 (ARTIGO) - Summary of population data and sampling design to estimate sow seroprevalence and the effects of biosecurity practices on influenza A prevalence in commercial breeding herds.....	45
TABELA 2 (ARTIGO) – Summary description of variables gathered in the checklist and the questionnaire.	46
TABELA 3 (ARTIGO) – Descriptive statistics of biosecurity practices evaluated by the univariable model.	47
TABELA 4 (ARTIGO) – Robust Poisson Regression using sampling weights containing statistically significant variables associated with the seroprevalence of influenza A virus in breeding farms adjusted by number of sows and parity order.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AIAO – “all in and all out” system

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HI - Hemagglutination inhibition test

IH – Inibição da hemaglutinação

IAV – Influenza A virus

PCR - Polymerase Chain Reaction

PR – Prevalence Ratio

rNP - Recombinant nucleoprotein

RP – Razão de Prevalência

RS – Rio Grande do Sul

UPL – Unidade Produtora de Leitões

VIA – Vírus da influenza A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Influenza suína	15
3 ARTIGO - Biosecurity practices associated with influenza A virus seroprevalence in sows from southern Brazilian breeding herds	24
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

O vírus da influenza A em suínos é uma das três principais doenças que afetam estes animais em todas as fases da produção (VINCENT et al., 2008). Devido a transmissão interespécies e a alta capacidade de mutação do vírus da influenza, alinhadas à constante introdução de suínos susceptíveis em um rebanho como consequência da intensificação no processo de produção da suinocultura, sua prevenção e o controle são um grande desafio para os suinocultores.

O primeiro reconhecimento dos sinais clínicos em suínos como doença respiratória causada pelo vírus da influenza A (VIA) foi no centro-oeste dos Estados Unidos em 1918, embora o isolamento viral ocorreu somente no ano de 1930, o qual é denominado de H1N1 (do Inglês, *classical H1N1*) (SHOPE, 1931).

Considerando a alta capacidade de transmissão entre espécies diferentes e a ocorrência de compartilhamentos de material genético entre suínos, aves e humanos, é eminente o surgimento de subtipos e cepas circulantes entre os rebanhos suínos. No final de 1990, um vírus H3N2 contendo segmentos gênicos de origem suína, aviária e humana, emergiu nos rebanhos suínos dos Estados Unidos e modificou a epidemiologia do VIA (DAWOOD et al., 2009). O estabelecimento de novos subtipos e novas variantes genéticas em suínos dificulta a confecção de vacinas eficazes empregadas no controle da influenza nos rebanhos (VAN REETH & MA, 2013).

O controle da influenza pela vacinação é uma prática comum utilizada nos rebanhos suínos norte-americanos (BEAUDOIN et al., 2012). O impacto do uso de vacinas nos rebanhos pode variar desde o controle dos sinais clínicos, como o quadro respiratório associados a doença, porém, não impede completamente a transmissão e a ocorrência de novas infecções (TORREMORELL et al., 2012). Mesmo que a vacinação seja apontada como principal forma de controle do VIA nos rebanhos, a melhor compreensão sobre as rotas de transmissão e fatores associados à infecção são necessárias e podem contribuir com a prevenção e o controle da influenza. Alternativamente à vacinação, medidas de biossegurança são incorporadas pelas agroindústrias como barreiras sanitárias contra as doenças infecciosas.

Medidas de biossegurança são definidas como ações e conjunto de procedimentos padronizados que visam impedir a entrada e disseminação de patógenos nos rebanhos

suínos (AMASS & CLARK, 1999). A importância e a presença de práticas específicas de biossegurança diferem de acordo com a densidade populacional e o tipo de produção (BEAUDOIN et al., 2012).

A suinocultura possui um importante papel na economia do Brasil. Atualmente, o país ocupa o quarto lugar no ranking de produção e exportação de carne suína, com aproximadamente 36 milhões de animais abatidos anualmente. Em 2016, foram exportadas 555 mil toneladas (ABPA, 2017). O estado do Rio Grande do Sul (RS) detém aproximadamente 21% da produção nacional e 33% do volume exportado, atrás somente do estado de Santa Catarina (ABPA, 2017).

Os agentes patogênicos são a principal causa de instabilidade na produção agropecuária, uma vez que ocasionam grandes perdas econômicas em consequência das quedas de produtividade e embargos comerciais decorrentes da perda de status sanitário da população. A influenza suína é um agente muito estudado nos principais países exportadores e importadores de carne suína. No entanto, no Brasil, existem poucos dados publicados sobre o VIA nos suínos antes de 2009. Com a ocorrência da pandemia em 2009 (H1N1pdm2009), diversos surtos de doença respiratória aguda foram relatados nas principais regiões produtoras de suínos (região sul, sudeste e centro-oeste). Contudo, ainda não é possível determinar a magnitude da ocorrência da influenza nas principais regiões produtoras de suínos e nem comparar os resultados, visto que os estudos diferem na categoria animal estudada. Desta maneira, é importante realizar estudos para determinação da situação epidemiológica da influenza suína nos rebanhos suínos do Brasil.

Os objetivos desse estudo são 1) estimar a soroprevalência do vírus da influenza em matrizes suínas de Unidades Produtoras de Leitões e 2) identificar práticas de biossegurança associadas a sua ocorrência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Influenza Suína

2.1.1 Vírus Influenza

Os vírus da influenza são classificados em quatro tipos – A, B, C e D. Os vírus tipo B, C e D estão associados a infecções ocasionais e brandas em humanos, enquanto o vírus da influenza A (VIA) é identificado em diversas espécies de aves e mamíferos.

Os VIA são envelopados e pertencem à família *Orthomyxoviridae*, do gênero *Influenzavirus A*. O genoma viral é composto por uma fita-simples de RNA e seus segmentos são interligados e protegidos por uma proteína denominada nucleoproteína (NP) (BROWN, 2000). Ainda, são classificados em subtipos de acordo com outras duas proteínas de superfície, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA). Essas proteínas são caracterizadas por números, por exemplo, um vírus possui uma HA tipo 1 e uma NA tipo 2, portanto, denomina-se H1N2. Existem pelo menos 16 tipos de HA e 9 tipos de NA que foram isolados a partir de hospedeiros naturais, como as aves aquáticas silvestres, entretanto, recentemente, novos subtipos foram identificados em morcegos, o que sugere que novos hospedeiros naturais podem existir (FOUCHIER et al., 2005; YOON et al., 2014).

Os subtipos podem possuir diferentes hospedeiros específicos devido à afinidade da HA a receptores da célula hospedeira (NEUMANN & KAWAOKA, 2006). Os suínos possuem receptores de cepas aviárias, humanas e suínas (KIDA et al., 1994), portanto, são susceptíveis à infecção por subtipos dessas espécies. Adicionalmente, o suíno é considerado um hospedeiro de “mixagem” para a formação de novas linhagens dos VIA. O vírus consegue modificar segmentos do seu genoma por um processo denominado rearranjo (do Inglês, “*reassortment*”) (NELSON & VINCENT, 2015). O rearranjo é um processo de recombinação genética em que dois vírus infectam a mesma célula e trocam segmentos de RNA e, assim, formam novos vírus geneticamente distintos dos originais (NELSON & VINCENT, 2015). Esse mecanismo permite que os vírus escapem das estratégias de controle existentes e levem à complexa epidemiologia dos vírus da gripe. Esse processo originou o H1N1 pandêmico de 2009 (H1N1pdm09), causado por um rearranjo triplo, entre segmentos de influenza da América do Norte, Ásia e Europa.

2.1.2 Vírus da influenza nos suínos

Os sinais clínicos da infecção pelo VIA nos suínos são característicos de doença respiratória aguda, como febre, tosse, espirros, dispneia e redução no consumo alimentar. A infecção é branda, com média de 5 a 7 dias de duração (BROWN, 2000). Adicionalmente, a severidade da doença está associada a múltiplos fatores, como infecções concomitantes, imunidade e idade do suíno, além das condições de manejo (BROWN, 2000). A mortalidade é tipicamente baixa, menos que 1%, no entanto, a morbidade é elevada, podendo atingir até 100% do rebanho (VAN REETH et al., 2012). A transmissão ocorre principalmente pelo contato direto entre os animais, fômites contaminados e pela via aérea (TORREMORELL et al., 2012). O contato direto é a via mais eficaz de transmissão. No entanto, estudos demonstram que a transmissão pelo ar e fômites contribui para a propagação e manutenção dos VIA nos rebanhos suínos (ALLERSON et al., 2013).

Nos suínos, a doença é causada pelos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 (VINCENT et al., 2009) atualmente. Os subtipos que circulam nos suínos em cada continente são os mesmos. Entretanto, os VIAs são geneticamente diferentes entre países da América do Norte e Europa, juntamente com Ásia, devido a distintas formas de introdução e manutenção de linhagens aviárias, humanas e suínas (BROWN, 2000). Contudo, em virtude da capacidade de mutações e rearranjos genéticos, existem diferentes linhagens de vírus dentro de cada subtipo.

2.1.3 Distribuição dos subtipos da influenza na América do Norte, Europa e Brasil

Na América do Norte, o H1N1 clássico foi o principal agente da influenza suína por 70 anos, até a introdução do H3N2 em 1998 (DAWOOD et al., 2009). O H3N2 é uma recombinação tripla, contém HAs e NAs derivadas do vírus da gripe humana, alguns segmentos de proteínas do vírus da gripe aviária e proteínas internas do H1N1 clássico (KARASIN et al., 2000). Essa combinação particular de genes é conhecida como “gene interno de rearranjo triplo” (do Inglês, “*triple reassortant internal gene cassette*”) (TRIG). Em consequência desse aumento das recombinações genéticas dos VIA isolados, foram formados diferentes “clusters” ou agrupamentos genéticos e antigênicos dentre os subtipos de H3N2 (VINCENT et al., 2008). As linhagens dos vírus H3N2 surgem a partir de pelo menos três introduções independentes de H3 humano nos suínos e são divididas em I, II,

III e IV (VINCENT et al., 2008). Rearranjos de HA da linhagem do H1N1 clássico com segmentos de VIA humana resultaram em outros quatro clusters filogenéticos diferentes: alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ). (VINCENT et al., 2008). Nos quatro clusters podem ser encontrados NA dos subtipos N1 e N2. O cluster α corresponde a linhagens do H1N1 clássico. O β corresponde aos H1N1 recombinantes (“*reassortant*” H1N1-*like*), como o H1N1pdm09. O γ corresponde ao H1N2 (H1N2-*like*). Já o cluster δ possui H1 derivado do vírus humano e também são pareados com N1 e N2 humanos. O cluster δ possui uma subclassificação em $\delta 1$ e $\delta 2$, que corresponde ao H1N2 e H1N1, respectivamente (VINCENT et. al, 2009). Nos Estados Unidos e Canadá, os clusters recombinantes H1 e o H3N2 são endêmicos e, independente do subtipo, uma grande parte desses vírus contém o TRIG.

No Continente Europeu estão presentes os três subtipos de influenza suína. O H1N1 clássico circulou durante muito tempo na Europa e Ásia, mas ele foi substituído completamente por uma nova linhagem, o H1N1 aviário (*avian-like*), que entrou nos rebanhos suínos em 1979 (VICENT et al., 2013). Na mesma época, emergiu o vírus H3N2 humano (*human-like*), originado da pandemia humana em Hong Kong, que, posteriormente, se recombinou com H1N1 aviário (CASTRUCCI et al., 1993). Ainda, um vírus H1N2 recombinante de humano surgiu nos suínos da Grã-Bretanha em 1994 (BROWN et al., 2000). Essas três linhagens de vírus são semelhantes em relação a proteínas internas, mas se diferenciam na HAS. Um estudo de vigilância relatou a circulação do H1N1 aviário, H3N2 e H1N2 recombinantes de humanos em suínos de terminação nos anos de 2006 a 2008 (KYRIAKIS et al. 2011). Todos os três subtipos foram detectados na Bélgica, Itália e Espanha. Já no Reino Unido e na França, somente foram encontrados o H1N1 aviário e H1N2 recombinante. Diferente da América do Norte, a diversidade da influenza não era tão acentuada na Europa. No entanto, estudos demonstraram que esse quadro mudou em consequência da introdução do H1N1pdm09 e de novos rearranjos. Segundo Simon et al. (2014), aproximadamente 14% dos vírus analisados durante uma vigilância passiva entre os anos de 2010 a 2013 eram rearranjos entre H1N1pdm09 e as outras linhagens de influenza suína. O estudo de 2006 a 2008 constatou que apenas 3% dos vírus eram recombinados (KYRIAKIS et al., 2011).

No Brasil, dados sobre a situação do VIA nos suínos são escassos antes da pandemia de 2009. Em 2009, foi detectado o primeiro surto de influenza altamente transmissível em um rebanho suíno no estado de Santa Catarina. A EMBRAPA Suínos e

Aves (CNPSA) identificou o H1N1pdm09 como causa desse surto por meio do isolamento viral em pulmões de leitões (SCHAEFER e. al., 2011). A partir desse momento, uma série de monitoramentos passivos para a detecção de VIA nos suínos foi conduzida. Durante um monitoramento em 2010 e 2011, o H1N2 foi detectado em leitões de creche com problemas respiratórios (SCHAEFER et al., 2014). A partir do sequenciamento do H1N2, foi constatado a presença de genes humanos (H1 e N2) do cluster $\delta 1$ norte-americano e genes internos do H1N1pdm09. Em 2011, um estudo realizado em 48 granjas demonstrou que os subtipos H1N1pdm09, H1N2 e H3N2 estão disseminados em sete Estados brasileiros (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) (CIACCI-ZANELLA et al., 2015).

2.1.4 Dinâmica populacional e indicadores de risco para Influenza suína

A influenza nos suínos é reconhecida pela sua complexidade e onipresença em uma população. No indivíduo, a infecção do VIA é curta, com 5 a 7 dias de duração, contudo, em nível de rebanho, a infecção pode permanecer de semana a meses (ROMAGOSA et al., 2011).

Atualmente, a ocorrência do VIA é considerada endêmica nos rebanhos suínos de todo o mundo (RICHT & WEBBY, 2013). Estimativas em rebanhos suínos indicam que os anticorpos contra o vírus influenza A são comuns, com prevalência de 83% em rebanhos de matrizes suínas em Ontário, Canadá, e 90% em rebanhos na Bélgica, Alemanha e Espanha (POLJAK et al., 2008; VAN REETH et al., 2008).

A ocorrência endêmica da influenza pode ser atribuída a alguns aspectos provocados pelo modelo de produção intensiva. Aspectos como proximidade entre granjas, taxas elevadas de reposição de reprodutores, alta densidade e número de animais no rebanho são considerados os mais comuns indicadores de risco da infecção pelo VIA em nível de rebanho (TORREMOREL et al., 2012; POLJAK et al., 2008). Características físicas dos estabelecimentos, por exemplo, divisórias abertas entre as baias que permitem o contato focinho-focinho entre suínos de diferentes lotes e o acesso não controlado que permite a entrada de pessoas externas, também foram associadas com a infecção do rebanho (SIMON-GRIFE et al., 2011).

Os rebanhos reprodutores de suínos são uma população muito dinâmica, pois existe uma variação de idade, nível de imunidade, reposição de plantel, movimentação

dentro da fazenda e exposição prévia a certos patógenos. A manutenção do VIA no rebanho é atribuída a essa contínua introdução suínos susceptíveis, como as os leitões e leitoas de reposição (BROWN, 2000). Essa premissa pode ser reforçada por um estudo realizado na Dinamarca, onde ocorreu o isolamento do vírus em leitões filhos de matrizes negativas para o isolamento (LARSEN et al., 2010). Ainda, a estrutura de criação também é fator significativo para a dinâmica de infecção do VIA. A incidência da influenza foi maior nos suínos de creche pertencentes a rebanhos de ciclo completo do que nos sistemas múltiplos sítios (LOEFFEN et al., 2009). Já na análise realizadas nos rebanhos de múltiplos sítios, a incidência de VIA foi maior no final da terminação (LOEFFEN et al., 2009). Com isso, as estratégias de controle e prevenção devem ser elaboradas levando em consideração a influência dessa dinâmica populacional.

2.1.5 Controle e prevenção

O controle e prevenção da influenza suína nos rebanhos ocorrem principalmente por meio da vacinação e práticas de biossegurança. Vacinas comerciais contra os três subtipos (H1N1, H1N2, H3N2) são amplamente utilizadas na América do Norte e Europa. Entretanto, no Brasil, as vacinas não demonstraram boa efetividade (REFERENCIA REJANE). Nos Estados Unidos, estima-se que 80% das matrizes comerciais são vacinadas (BEAUDOIN et al. 2012). Vacinas autógenas, em que os subtipos virais incluídos são de acordo com o histórico do rebanho e da região geográfica, também são utilizadas nos Estados Unidos. Um problema apontado pelo uso das vacinas é que os vírus em circulação não são constantes devido à ocorrência dos rearranjos e mutações. Com isso, é recorrente a preocupação em relação à evolução dos vírus ser mais rápida do que o desenvolvimento de uma vacina, o que acarreta na necessidade de elaborar vacinas ou outras tecnologias de imunização que forneça ampla proteção cruzada contra os múltiplos subtipos circulantes (VICENT et. al., 2008).

As medidas de biossegurança externa e interna têm como objetivo reduzir o risco de entrada e de propagação do agente infeccioso dentro da população, respectivamente (AMASS & CLARK, 1999). Em relação ao VIA, a relevância de cada medida pode diferir em relação ao tipo de exploração, por exemplo, rebanhos de reprodutores são considerados de maior biossegurança do que rebanhos de suínos comerciais. Práticas de manejo, tais quais como o vazio sanitário entre lotes de animais, isolamento e quarentena de animais de

reposição, isolamento de animais doentes, rotinas de higiene e sanitização, controle da qualidade do ar, são exemplos de medidas de biossegurança que ajudam a prevenir a entrada e disseminação dos VIA (TORREMORELL et. al., 2012; CFIA, 2016).

2.1.6 Influenza suína e fatores de ocorrência

Fatores associados para infecção pelo VIA em nível de rebanho são estudados mundialmente. No Canadá, tamanho do rebanho, a densidade de suínos, o tipo de fazenda e o status de infecção do rebanho de origem foram fatores associados com soroprevalência do VIA (POLJAK et. al., 2008). A densidade de suínos também foi um fator de risco significativo para a infecção do VIA em rebanhos na Bélgica (Maes et al., 1999). A soropositividade de manada na Malásia estava associada ao tamanho da propriedade, à importação de porcos, à proximidade da fazenda a outras fazendas de suínos e à presença de animais domésticos de mamíferos na fazenda (Suriya et al., 2008). Três fatores de risco para a soropositividade do vírus influenza foram identificados na Espanha, incluindo taxa de reposição, partições abertas entre currais e entrada descontrolada em fazendas (Simon-Grife et al., 2011). Mais recentemente, um estudo de vigilância virológica ativa nos Estados Unidos identificou a estação do ano como um preditor da positividade do vírus influenza em nível de grupo e observou um alto nível de infecções subclínicas pelo vírus da influenza (Corzo et al., 2013).

2.1.7 Influenza suína e saúde pública

A transmissão dos VIA entre suíno e homem vem sendo documentada no mundo todo. Segundo o Centro de Controle de Doenças (CDC – “*Center for Disease Control and Prevention*”), existem 19 casos humanos reportados com influenza de origem suína nos Estados Unidos durante o ano de 2005 a 2010 (CDC, 2010). Tanto os sintomas causados por influenza suína, quanto por humana, são clinicamente indistinguíveis nos humanos (MYERS et al., 2007). A maioria desses casos é associada à interface homem-suíno, o que ocorre nas criações de suínos, abatedouros, feiras agrícolas e mercados de animais (CHOI et al., 2014). A ocorrência dessa via zoonótica é uma iminente ameaça à saúde pública, especialmente quando a imunidade da população humana adquirida da vacinação ou da infecção natural pelo vírus sazonal humano carece de proteção cruzada com os vírus suínos (VINCENT et al., 2014). O vírus H1N1pdm09 substituiu o H1N1 humano sazonal

anteriormente em circulação, sendo agora o único vírus H1N1 que circula na população humana. Portanto, tornou-se o componente H1N1 na vacina contra a gripe humana sazonal trivalente desde 2010.

Contudo, a via zoonótica reversa, no caso, a transmissão do VIA humano para os suínos é motivo de maior preocupação dos produtores de suínos atualmente (BEAUDOIN et al. 2012), em virtude do risco de recombinações dos vírus humanos nos suínos e sua possível disseminação à população humana novamente. O maior exemplo de zoonose reversa é o isolamento do vírus pandêmico H1N1 de 2009 em suínos doentes no Canadá (HOWDEN et al., 2009). Logo, é de extrema importância o monitoramento das linhagens do VIA que estão circulando nos suínos, com a finalidade de prevenir futuras epidemias na população humana.

2.1.7 Influenza suína no Brasil

No Brasil estudos soropidemiológicos para determinar a situação epidemiológica da influenza em suínos ainda são escassos. A Tabela 1 apresenta uma compilação dos resultados de monitoramentos publicados no Brasil. Os estudos demonstram a presença de anticorpos contra os principais subtipos nos rebanhos.

Tabela 1. Resultados sorológicos de subtipos de influenza A suína encontrados em estudos observacionais conduzidos no Brasil.

Subtipo	Soroprevalência animal*	Soroprevalência rebanho*	Categoria suína estudada	Ano do estudo	Estado	Referência
H1N1	44,5%	64,7%	Leitoas e matrizes	2009 (antes da pandemia de 2009)	MG	Rajão et al. (2012)
	(158/355)	(11/17)				
H1N1	2%	6,25%	Leitões de Terminação	2011	MG, MS, MT,	Ciacci-Zanella et al. (2015)
	(3/144)	(3/48)			PR, RS, SC, SP	
H1N1pdm09	38%	58,8%	Leitoas e matrizes	2009 (antes da pandemia de 2009)	MG	Rajão et al. (2012)
	(136/355)	(10/17)				
H1N1pdm09	26%	96%	Diferentes categorias	2012	MG	Dias et al. (2015)
	(780/3000)	(28/30)				
H1N1pdm09	10%	23%	Leitões de Terminação	2011	MG, MS, MT,	Ciacci-Zanella et al. (2015)
	(14/144)	(11/48)			PR, RS, SC, SP	
H3N2	10%	23,5%	Leitoas e matrizes	2009 (antes da pandemia de 2009)	MG	Rajão et al. (2012)
	(36/355)	(4/17)				
H3N2	1,5%	13%	Diferentes categorias	2012	MG	Dias et al. (2015)
	(45/3000)	(4/30)				
H3N2	7%	19%	Leitões de Terminação	2011	MG, MS, MT,	Ciacci-Zanella et al. (2015)
	(11/144)	(9/48)			PR, RS, SC, SP	
H1N2	10%	14%	Leitões de Terminação	2011	MG, MS, MT,	Ciacci-Zanella et al. (2015)
	(14/144)	(10/48)			PR, RS, SC, SP	

46%	20%	Várias categorias	Não especificado	PR	Caron et al. (2010)
(222/482)	(15/74)				

3 ARTIGO - Biosecurity practices associated with influenza A virus seroprevalence in sows from southern Brazilian breeding herds

Artigo a ser submetido para a revista científica *Preventive Veterinary Medicine*. A formatação do artigo segue as normas da revista em que ele será submetido. Esse estudo estimou a prevalência de anticorpos contra o vírus da influenza tipo A em matrizes suínas e utilizou um modelo multivariável com objetivo de acessar práticas de biossegurança empregadas por Unidades Produtoras de Leitões e sua relação com a presença de anticorpos contra o vírus da influenza.

Biosecurity practices associated with influenza A virus seroprevalence in sows from southern Brazilian breeding herds

Ana Paula Serafini Poeta^{1*}, Eduardo Freitas da Costa¹, Gustavo de Sousa e Silva¹, Carine K. Souza², Rejane Schaefer³, Itabajara da Silva Vaz Jr⁴, Luís Gustavo Corbellini¹

¹Laboratório de Epidemiologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

⁴Faculdade de Veterinária e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Corresponding author: Email: luis.corbellini@ufrgs.br

Abstract

Influenza A virus (IAV) infection is a recognized cause of acute respiratory disease in pigs that can culminate in the decline of performance due to increasing feed conversion and costs of antimicrobial drugs to control secondary infections. Biosecurity practices are the key to prevent transmission of highly contagious agents with complex epidemiologies. The aim of this study was to investigate the effect of applying biosecurity practices on IAV seroprevalence in breeding herds. Through a cross-sectional study carried out in 404 sows from 21 herds, an indirect ELISA that detects antibodies against a nucleoprotein of IAV was used to assess prevalence in sows. To evaluate IAV subtypes (H1N1pdm09, H1N2 and H3N2), all samples positive by ELISA were tested using the hemagglutination inhibition assay (HI). A multivariable model using the prevalence ratio (PR) as the measure of association between IAV seroprevalence and biosecurity practices was estimated by Robust Poisson Regression. The estimated influenza seroprevalence was 63.9% (95% CI: 55% - 72%) at the sow-level, and all farms were seropositive. The frequency of IAV subtypes found in sows was 51.9% for H1N1pdm09, 27.8% for H1N2 and 0.6% for H3N2, and 19 herds presented coinfection of H1N1 and H1N2. Two biosecurity practices had the positive effect of decreasing ($p < 0.05$) IAV seroprevalence: presence of a bird-proof net (PR= 0.75; CI 95%: 0.65 – 0.86) and presence of a gilt acclimatization unit (PR= 0.57; CI 95%: 0.50 – 0.66). In contrast, external replacement of gilts (PR= 1.38; CI 95%: 1.17 – 1.64) contributed to increased IAV seroprevalence. This study suggests that preventing contact among wild species and swine and using an adaptation area for animals before entry into the herd can be strategies to control the influenza virus in breeding herds.

Keywords: Influenza, sow, biosecurity, epidemiology, multivariable analysis.

1. Introduction

Controlling and reducing the transmission of pathogens and preventing diseases are goals routinely set in the modern swine industry, as well as the maintenance of productivity parameters. Biosecurity encompasses sets of practices which are standardized to reduce the risk of pathogen introduction into farms and prevent the spread of endemic agents within or even among production sites (Amass and Clark 1999; Lambert et al., 2012). Overall, the expected consequences of applying biosecurity practices may be greater profits, better animal welfare and efficient responses to medicines and vaccines (Brennan and Christley, 2012). Outbreaks of emerging diseases such as porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) (Dee et al., 2002) and porcine epidemic diarrhea (PED) (Scott et al., 2016) exemplify the consequences due to deficient implementation of biosecurity practices. The application of biosecurity practices yielded positive impacts with respect to decreasing antibiotic usage in the swine chain in Europe (Laanen et al., 2013).

Influenza A virus (IAV) infection is a recognized cause of acute respiratory disease in pigs that can culminate in the decline of performance due to increasing feed conversion and costs of antimicrobial drugs to control secondary infections (Alvarez et al., 2015). Considered a short-cycle pathogen (Van Reeth et al., 2012), influenza virus has a short incubation period (1 to 3 days) and spreads rapidly in a swine population. Direct contact among infected and susceptible pigs is the primary transmission route of influenza virus (Van Reeth et al., 2012). However, indirect routes, such as fomites and aerosols, have an important role in influenza virus spreading into swine herds (Allerson et al., 2013; Van Reeth et al., 2012). Herd immunity in highly dense populations may vary due to differences in pig age, origin of replacement animals, previous virus exposure or vaccine application, and, especially, due to the intensive replacement rate, which contributes to a constant introduction of susceptible pigs into the herd (Torremorell et al., 2012).

Additionally, the role of virus transmission from sows to piglets and endemic occurrence of influenza in breeding herds has been discussed extensively (Cador et al., 2016). As a result, IAV infection dynamics in swine production sites are complex and an established endemic condition in a herd may arise from previously outbreaks.

The segmented genome of influenza viruses allows for reassortment among gene segments from two different IAVs during mixed infections, along with a complex multihost ecology that contributes to IAV diversity and emergence of novel viruses (Nelson and Vincent, 2015). Since the emergence of pandemic H1N1 (H1N1pdm09) virus in 2009, multiple incursions from humans into swine have been reported worldwide and have led to substantial IAV genetic and antigenic diversity in swine populations (Nelson et al., 2012; Lewis et al., 2016). Thereafter, control of IAV in swine herds and development of a cross-protective IAV vaccine is an important challenge (Dawood et al., 2009; Lewis et al., 2016; Van Reeth and Ma, 2013; Smith et al., 2009). Currently, H1N1, H1N2 and H3N2 subtypes are endemic to swine populations worldwide (Torremorell et al., 2012).

In Brazil, reassortment events with H1N1pdm09 and human origin H1N2 and H3N2 viruses were found to be circulating undetected in swine (Nelson et al 2015). Recently, a human variant (H1N2v) infection was reported causing influenza illness in humans, and it was found that this variant was genetically similar to H1N2 viruses that circulate in pigs in Brazil, suggesting a swine to human transmission (Resende et al., 2017). This case highlights the importance of surveillance in the swine population, since the risks these IAV may pose to public health is not well understood.

As the fourth largest swine producer and exporter in the world, Brazil produces approximately 2 million sows and exports more than 730 thousand tons of pork (ABPA, 2017). The main production method used by the Brazilian swine industry is multisite production, where multiple farms are coordinated and each one is responsible for one stage

of the production phase. The production sites are generally divided into nucleus sites, breeding herds, nursery sites, and finishing sites. Previous studies reported that IAV seroprevalence varies throughout different production sites. In 2011, a study conducted in seven Brazilian states detected anti-IAV antibodies in 78.1% of pigs from 48 finishing herds (Ciacci-Zanella et al., 2015). In contrast, lower IAV seropositivity (26% and 24%) was found in farrow-to-finish herds in the southeastern Brazilian states of Minas Gerais and São Paulo, respectively (Almeida et al., 2017; Dias et al., 2015).

Biosecurity practices and vaccination are well-known strategies applied by producers to minimize the incidence of influenza in herds (Torremorell et al., 2012). Contrary to the other major swine producers, such as the United States and Canada, where vaccination is used to reduce clinical signs and virus transmission (Van Reeth and Ma, 2013), standardized protocols of influenza vaccination have not been described in Brazil. Therefore, biosecurity practices may contribute to the current control and prevention of IAV infections in Brazilian swine herds. The objective of this study was to evaluate the effect of biosecurity practices on IAV seroprevalence in sows from breeding farms.

2. Material and Methods

2.1 Study area and population

A cross-sectional study was conducted on pig herds located in swine farms from the state of Rio Grande do Sul (RS), southern Brazil. RS is the second largest swine producer in the country, responsible for 33% of Brazilian pork exports and contains approximately 340,000 sows distributed across 640 commercial breeding herds (ABPA, 2017).

2.2 Sampling design

The target population was composed of 40 herds and 35,000 sows from commercial breeding herds operated by a single company. A stratified two-level cluster sampling design was used; first, farms were stratified using the number of sows per farm in three categories: 1) 10 farms with 220 to 415 sows, 'small size'; 2) 17 farms with 416 to 1,200 sows, 'medium size' and 3) 13 farms with more than 1,200 sows, 'large size'. A list containing these farms was obtained from the database of the participating agroindustry firm.

In the first level of sampling 21 farms (~50%), i.e., clusters, were sampled. The number of clusters collected in each stratum corresponded to 50% of the total number of farms in each stratum. The farms were drawn independently within each stratum using probabilities (P1) that were determined by the number of sows in the farm divided by the total number of sows of each stratum. In the second level of sampling, 403 sows were sampled. The number of sows was determined assuming an expected prevalence for IAV in sows of 50% (i.e., maximizing the animal sample size), a confidence level of 95%, and an absolute precision of 5% (WINPEPI for Windows). The number of sows sampled in each stratum took into account the percentage frequency distribution of sows in each stratum of the target population. The probability of a sow (P2) being sampled in each farm was determined by the number of the sows sampled in each farm divided by the total number of sows in each stratum. The target population data and a summary of the sampling design are shown in Table 1.

2.3 Biosecurity practices survey

All information was collected using a structured questionnaire and a checklist developed for this study. Farm managers were interviewed only by the first author in all farms. The questionnaire was previously validated in 3 different herds, where some

questions were excluded, included or modified. Completed questionnaires and checklists are available upon request. The questions were grouped into two parts (details in Table 2): 1) ‘General data about the farm’, and 2) ‘Biosecurity practices related to farm management and facilities’ comprising risk factors for swine influenza found in the literature and the most common biosecurity practices applied by Brazilian producers (Silva et al. 2018).

2.4 Sample collection and test diagnostic

Blood samples were collected from sows through jugular puncture using disposable syringes and needles. The study was carried in compliance with the Committee on Animal Research and Ethics of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (#31958). Samples were transported to the laboratory within 24 to 48 hours, and sera were then separated by centrifugation and properly stored. Sow serum samples were screened using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) protocol based on a recombinant nucleoprotein (rNP-ELISA). According to Souza et al. (2018), the estimated test sensitivity (SE) and specificity (SP) are 84.5% (95% CI: 76.4%-91.2%) and 92.8% (95% CI: 83.1% - 99.4%), respectively. All rNP-ELISA positive samples were submitted to hemagglutination inhibition (HI) assay to assess the IAV subtype. For the HI test, three IAVs isolated from field cases of influenza in pigs in Brazil were used as antigens: A/swine/Brazil/31-11-1/2011 (H1N2) (Schaefer et al., 2015), A/swine/Brazil/12A/2010 (H1N1pdm09) (Schaefer et al., 2011) and H3N2/2015 (H3N2) (Nelson et al., 2015). The HI assay was conducted as previously described (Kitikoon et al., 2014).

2.5 Data analysis

Given the sampling design, survey weights were incorporated in all analysis using the *survey* package of R software 3.4 version (Dohoo, 2008; Lumley, 2004). IAV

seroprevalence and its confidence interval were estimated using the *logit* method. As a first step, a descriptive analysis focused on understanding the relationships between IAV seroprevalence and biosecurity practices was carried out. Variables with less than 10% of variability were immediately excluded.

The multivariable analysis was used to assess the effects of biosecurity practices on IAV seroprevalence status. The crude prevalence ratio (PR) was estimated to measure the impact of each factor on the binary outcome of ELISA (positive or negative) of each sow (subject). Robust Poisson Regression through generalized linear models incorporating sampling weights was done using the *survey* package of R version 3.4. Univariable analyses were conducted, and multicollinearity was evaluated by variance inflation factor (VIF) among the factors using a linear regression model. Biosecurity practices and management practices can be measured indirectly by a substantial number of different variables, some of which can be strongly correlated. To avoid multicollinearity and highlight variables that best illustrate their association with influenza, we included only variables with low VIF ($VIF < 2$). For variables showing moderate VIF (≥ 2), the more plausible biosecurity practice related to IAV was selected for the multivariable model.

Selection of the variables for the multivariable model was performed independently of the p value found in univariable analysis. Model building was made by a backward process, and statistically significant variables ($p \leq 0.05$) were retained in the final model. The variables 'number of sows' and 'parity order' were maintained as adjustments for herd size and age of the sow, respectively. Due to a lack in linear relationship between the outcome and some exploratory variables as presumed by generalized linear models (Lumley, 2010), the variable 'parity order' was categorized into 'parity order above 3' =1, otherwise =0, and 'all-in all-out in maternity days (AIAO)' was categorized in 'AIAO below 4 days' =1, otherwise =0. The variable 'number of sows' was represented by the same

classification used in the sampling procedure ('small', 'medium' and 'large' strata). In addition, the effects of other potentially confounding variables were evaluated during the model building process through the observation of variations in the estimates of significant variables (20% or higher).

3. Results

3.1 IAV Seroprevalence

IAV seroprevalence estimated from the 404 sows sampled was 63.9% (CI 95%: 54% - 73%), with a design effect of 3.6. All farms were positive in the rNP-ELISA (at least one positive animal) and within-herd, the seroprevalence ranged from 27% to 100%. At the time of sampling, it was reported that sows were not vaccinated against IAV and did not present any respiratory clinical signs.

Ninety percent (233/261) of seropositive sows were also positive in the HI assay. Overall, H1N1pdm09 was the most frequent IAV subtype (51.5%; 120/233) found in sow sera. The HI test detected antibodies against both H1N1pdm09 and H1N2 in 39.1% (91/233) of sera samples. The H1N2 subtype was detected in 8.6% (20/233) of sera, and HI codetection of H3N2 and H1N1pdm09 were found in 0.9% (2/233) of sera. Regarding virus subtypes at the herd-level, cocirculation of H1N1pdm09 and H1N2 was detected in 19 of 21 herds, and cocirculation among H1N1pdm09 and H3N2 was detected in the other two herds.

3.2 Biosecurity practices description and the multivariable model

Since the farms belonged to the same agroindustry firm, the management practices and farm facilities were very similar among the 21 sampled herds. A description of the biosecurity practices along with the results of univariable analysis is shown in Table 3.

Two multiplier breeding farms underwent annual certification and monitoring by the official veterinary service (BRASIL, 2012).

As illustrated in Table 4, variables significantly associated with IAV seroprevalence found in the final model were: ‘Bird-proof net’ (PR=0.75) and ‘gilt acclimatization unit’ (PR=0.57), showing a protective effect against IAV seroprevalence, and ‘external replacement’, which had a positive effect on IAV seroprevalence (PR=1.38).

4. Discussion

A high IAV seroprevalence (approximately 64%) was found in commercial sows from breeding herds in southern Brazil. All of the studied farms had at least one seropositive animal, and IAV antibodies were produced from natural exposure to IAV since the sows were not vaccinated against influenza. The HI test revealed the circulation of H1N1pdm09, H1N2 and H3N2 viruses in the pig farms. The most prevalent IAV subtype detected in sows was H1N1pdm09, and coinfection with H1N2 virus was observed in 90.5% of the studied herds. This result is consistent with other studies in Brazil indicating the predominance of H1N1pdm09 in cases of influenza virus infection in swine (Rajão et al., 2013; Rech et al., 2018). However, since the emergence of H1N1pdm09, outbreaks of respiratory disease caused by human-origin reassortant H1N2 and H3N2 viruses have also been reported in pigs (Schaefer et al., 2015, Nelson et al., 2015), and coinfection of pigs with two or more virus subtypes is commonly detected in pig farms (Ciacci-Zanella et al., 2015, Rech et al., 2018).

Two biosecurity practices, ‘presence of a bird-proof net’ and ‘gilt acclimatization unit’ and one farm management (‘external replacement of gilts’) were associated with IAV seroprevalence in the final model. The effect of the presence of bird-proof nets was implicated in a lower IAV seroprevalence, when compared to farms without bird-proof nets (prevalence ratio 0.75, or 25% lower). The most plausible explanation for this is

protection against indirect transmission of influenza virus (Allerson et al. 2013) from mechanical carrying by birds and others wild species. A similar result was found by Simon-Grifé et al. (2011), where an association between a lack of bird-proof nets and the presence of IAV antibodies in pigs was observed. Birds and bats are animal species that are present in pig farms, as reported by producers interviewed (data not shown). Wild birds, especially waterfowl, are reservoirs for influenza A viruses (Alexander, 2007). Swine can be experimentally infected with avian influenza strains (Kida 1994), and naturally acquired infections have been documented in many parts of the world (Abente et al., 2017; Brown, 2000; Karasin et al., 2000). Furthermore, emergence of novel viruses in pigs due to reassortment events among IAVs of swine, human and avian origin is well documented (Vincent et al. 2008, Neumann et al., 2009). This result suggests that the use of bird-proof net should be encouraged; besides the protection against IAVs found in this study, bird-proof nets can prevent infections of other diseases since birds can reservoirs of many others pathogens, such as *Streptococcus suis* (Messier et al., 1994), *Bordetella bronchiseptica* (Farrington and Jorgenson, 1976) and PRRS (Zimmerman et al., 1997).

The main source of pathogens is infected pigs introduced to the recipient population. In the case of influenza virus, depending on the frequency in which new animals are introduced into pig herds, infections and reinfections with different strains can arise (Van Reeth et al., 2012). Introduction of infected gilts were tightly associated with higher IAV seroprevalence (Culhane et al., 2014; Simon-Grifé et al., 2011). In our study, external gilt replacement was a common management practice in breeding herds, and IAV seroprevalence was 38% higher in these farms (prevalence ratio 1.38) when compared to farms with internal production of gilts. External replacement was reported in all farms (two per month, data not shown), with the exception of the two certified multiplier breeding herds, which presents a strong opportunity for introduction of a new IAV strains and other

pathogens. In this case, the cost-benefit of introducing biosecurity practices that focus on limiting the spread or introducing contagious disease by replacement animals should be evaluated.

In farms where an acclimatization unit for gilts was used, the IAV seroprevalence was, on average, 34% lower than in farms with no acclimatization unit (prevalence ratio 0.56). Acclimatization units are places in barns separated from the gestation and maternity zone. In this unit, the gilts have an opportunity to adapt to the microorganisms and pathogens circulating in the farm and prepare for breeding (40 days on average was reported by producers, data not shown). Similarly, gilts that have been infected by IAV before or during the acclimatization period will have time to recover from the infection before transfer to the barn. Such practices have been pointed out as an efficient controlling measure for PRRS (Dee et al., 1995) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (Garza-Moreno et al., 2018; Nathues et al., 2014). Failure to apply the acclimatization practice, enhanced by a high frequency of introduction of animals from different origins, seems to be an important opportunity for influenza virus to enter into the studied herds. Therefore, the application of an adequate quarantine in a separate building from the gestation and maternity units is considered a positive measure for the prevention of influenza virus entrance by replacement animals.

Since our estimations and conclusions focused mainly on biosecurity practices, two variables were subjected to a multivariable model to adjust the estimates with regard to the herd size and age of sows, given the impact of them on influenza virus infections. Farm size was associated with higher scores of biosecurity, as the larger herds had higher biosecurity scores, making adjustment of the model estimates by herd size important (Bottoms et al., 2013; Postma et al., 2015; Simon-Grifé et al., 2013). Although influenza prevalence can be correlated with large herds that have high pig density (Groontvedt et al.,

2013; Poljak et al., 2008; Simon-Grifé et al., 2011), the number of sows in a herd was not statistically significant in our final multivariable model. IAV seroprevalence also became significantly higher with an increase in the age of sows (parity order). This result can be explained by the longer exposure time of older sows when compared to gilts, for instance. Poljak et al., (2008) have reported that seropositivity for H3N2 virus increased in higher-parity sows. Simon-Grifé et al., (2011) reported that sows had higher influenza seroprevalence than fattening pigs, which confirms the hypothesis that the odds of exposure to an endemic pathogen increase with time.

This study provides a first evaluation of the effect followed by applications of biosecurity practices on IAV. However, some caution is required in the interpretation of the results, even though the results were plausible and were related to influenza virus epidemiology; like any cross-sectional study, the outcome and factors of interest were measured at one particular time-point, and it was not possible to determine a cause-effect relationship. On the other hand, some methods were used to overcome such limitations and generate reliable results. Beginning with data collection, the questionnaire used herein was based on a previous large study that reported which biosecurity practices are commonly applied to breeding herds in RS (Silva et al. 2018). Additionally, both questionnaires and check-lists were applied *in loco* and by the same researcher, which contributed to overcoming subjectivity and biases in data collection. In sum, we believe the cross-sectional study was well suited and raised new hypotheses related to influenza control in swine breeding herds.

Conclusions

There is a high frequency of IAV in sows as well as cocirculation of subtypes (H1N1pdm09 and H1N2). Certain practices showed positive effects on the prevalence of influenza virus, which makes the adoption of biosecurity practices for highly contagious endemic diseases an important aspect to be considered by farms and agroindustry firms.

Acknowledgements

The authors acknowledge Marisete F. Schiochet for laboratory assistance. This study was funded by the Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA (project no. 02.16.05.004.00.07), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of interest

None of the authors have any financial or personal relationships with other people or organizations that could have inappropriately influenced this work.

References

- Abente, E.J., Gauger, P.C., Walia, R.R., Rajao, D.S., Zhang, J., Harmon, K.M., Killian, M.L., Vincent, A.L., 2017. Detection and characterization of an H4N6 avian-lineage influenza A virus in pigs in the Midwestern United States. *Virology*.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.08.021>
- ABPA, 2017. 2017 Annual Report - Brazilian Association of Animal Protein (ABPA).
- Alexander, D.J., 2007. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 25, 5637–5644. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.051>
- Allerson, M.W., Cardona, C.J., Torremorell, M., 2013. Indirect Transmission of Influenza A Virus between Pig Populations under Two Different Biosecurity Settings. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067293>
- Almeida, H.M. de S., Storino, G.Y., Pereira, D.A., Gatto, I.R.H., Mathias, L.A., Montassier, H.J., de Oliveira, L.G., 2017. A cross-sectional study of swine influenza in intensive and extensive farms in the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 49, 25–30. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1153-z>
- Alvarez, J., Sarradell, J., Kerkaert, B., Bandyopadhyay, D., Torremorell, M., Morrison, R., Perez, A., 2015. Association of the presence of influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sow farms with post-weaning mortality. *Prev. Vet. Med.* 121, 240–245.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.07.003>
- Bottoms, K., Poljak, Z., Dewey, C., Deardon, R., Holtkamp, D., Friendship, R., 2013. Evaluation of external biosecurity practices on southern Ontario sow farms. *Prev. Vet. Med.* 109, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.08.013>
- BRAZIL, 2012. Instrução normativa n. 19. Brazilian law published on 15/02/2002. Brazil.
- Brennan, M.L., Christley, R.M., 2012. Biosecurity on cattle farms: A study in north-west England. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028139>
- Brown, I.H., 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs, in: *Veterinary Microbiology*. pp. 29–46. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00164-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00164-4)
- Cador, C., Rose, N., Willem, L., Andraud, M., 2016. Maternally derived immunity extends swine influenza A virus persistence within farrow-to-finish pig farms: Insights from a stochastic event-driven metapopulation model. *PLoS One* 11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163672>
- Ciacci-Zanella, J.R., Schaefer, R., Gava, D., Haach, V., Cantão, M.E., Coldebella, A., 2015. Influenza A virus infection in Brazilian swine herds following the introduction of pandemic 2009 H1N1. *Vet. Microbiol.* 180, 118–122.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.021>
- Culhane, M.R., Corzo, C.A., Morrison, R.B., Fitzpatrick, A.M., 2014. Risk factors for detecting influenza A virus in growing pigs. *J Swine Heal. Prod.*
- Dawood, F.S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M.W., Lindstrom, S., Garten, R.J., Gubareva, L.

- V, Xu, X., Bridges, C.B., Uyeki, T.M., Real-Time, R., 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 2605–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903810>
- Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Wiese, C., Otake, S., Joo, H.S., Pijoan, C., 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during cold weather. *Can. J. Vet. Res.*
- Dee, S., Joo, H.S., Pijoan, C., 1995. Controlling the spread of PRRS virus in the breeding herd through management of the gilt pool. *Swine Heal. Prod.*
- Dias, A.S., Costa, É.A., Rajão, D.S., Guedes, R.M.C., Ciacci Zanella, J.R., Lobato, Z.I.P., 2015. Distribution of antibodies against influenza virus in pigs from farrow-to-finish farms in Minas Gerais state, Brazil. *Influenza Other Respi. Viruses* 9, 161–167. <https://doi.org/10.1111/irv.12304>
- Dohoo, I.R., 2008. Quantitative epidemiology: Progress and challenges. *Prev. Vet. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.02.012>
- Farrington, D.O., Jorgenson, R.D., 1976. PREVALENCE OF *Bordetella bronchiseptica* IN CERTAIN WILD MAMMALS AND BIRDS IN CENTRAL IOWA. *J. Wildl. Dis.* <https://doi.org/10.7589/0090-3558-12.4.523>
- Garza-Moreno, L., Segalés, J., Pieters, M., Romagosa, A., Sibila, M., 2018. Acclimation strategies in gilts to control *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.005>
- Groontvedt, C.A., Er, C., Gjerset, B., Hauge, A.G., Brun, E., Joergensen, A., Lium, B., Framstad, T., 2013. Influenza A(H1N1)pdm09 virus infection in Norwegian swine herds 2009/10: The risk of human to swine transmission. *Prev. Vet. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.02.016>
- Howden, K.J., Brockhoff, E.J., Caya, F.D., Mcleod, L.J., Lavoie, M., Ing, J.D., Bystrom, J.M., Alexandersen, S., Pasick, J.M., Berhane, Y., Morrison, M.E., Keenliside, J.M., Laurendeau, S., Rohonczy, E.B., 2009. An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. *Can. Vet. J.*
- Karasin, A.I., Brown, I.H., Carman, S., Olsen, C.W., 2000. Isolation and Characterization of H4N6 Avian Influenza Viruses from Pigs with Pneumonia in Canada. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/JVI.74.19.9322-9327.2000>
- Kitikoon, P., Gauger, P.C., Vincent, A.L., 2014. Hemagglutinin inhibition assay with swine sera. *Methods Mol. Biol.* 1161, 295–301. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_24
- Lambert, M.È., Poljak, Z., Arsenault, J., D'Allaire, S., 2012. Epidemiological investigations in regard to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Quebec, Canada. Part 1: Biosecurity practices and their geographical distribution in two areas of different swine density. *Prev. Vet. Med.* 104, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.12.004>

- Lewis, N.S., Russell, C.A., Langat, P., Anderson, T.K., Berger, K., Bielejec, F., Burke, D.F., Dudas, G., Fonville, J.M., Fouchier, R.A.M., Kellam, P., Koel, B.F., Lemey, P., Nguyen, T., Nuansrichy, B., Malik Peiris, J.S., Saito, T., Simon, G., Skepner, E., Takemae, N., Webby, R.J., Van Reeth, K., Brookes, S.M., Larsen, L., Watson, S.J., Brown, I.H., Vincent, A.L., Reid, S., Garcia, M.A., Harder, T., Foni, E., Markowska-Daniel, I., 2016. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.12217>
- Lumley, T., 2010. Chapter 5 Ratios and linear regression. *Complex Surv. A Guid. to Anal. Using R*. 83–107.
- Lumley, T., 2004. Analysis of Complex Survey Samples. *J. Stat. Softw.* 9, 1–19. <https://doi.org/10.18637/jss.v009.i08>
- Messier, S., Higgins, R., De Herdt, P., Dom, P., Ducatelle, R., Desmidt, M., 1994. *Streptococcus suis* infections in birds. *Avian Pathol.* <https://doi.org/10.1080/03079459408419040>
- Nathues, H., Chang, Y.M., Wieland, B., Rechter, G., Spargser, J., Rosengarten, R., Kreienbrock, L., grosse Beilage, E., 2014. Herd-Level risk factors for the seropositivity to mycoplasma hyopneumoniae and the occurrence of enzootic pneumonia among fattening pigs in areas of endemic infection and high pig density. *Transbound. Emerg. Dis.* <https://doi.org/10.1111/tbed.12033>
- Nelson, M.I., Gramer, M.R., Vincent, A.L., Holmes, E.C., 2012. Global transmission of influenza viruses from humans to swine. *J. Gen. Virol.* <https://doi.org/10.1099/vir.0.044974-0>
- Nelson, M.I., Schaefer, R., Gava, D., Cantão, M.E., Ciacci-Zanella, J.R., 2015. Influenza a viruses of human origin in swine, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1339–1347. <https://doi.org/10.3201/eid2108.141891>
- Nelson, M.I., Vincent, A.L., 2015. Reverse zoonosis of influenza to swine: New perspectives on the human-animal interface. *Trends Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.002>
- Poljak, Z., Dewey, C.E., Martin, S.W., Christensen, J., Carman, S., Friendship, R.M., 2008. Prevalence of and risk factors for influenza in southern Ontario swine herds in 2001 and 2003. *Can. J. Vet. Res.* 72, 7–17.
- Postma, M., Backhans, A., Collineau, L., Loesken, S., Sjolund, M., Belloc, C., Emanuelson, U., Grosse Beilage, E., Stark, K.D.C., Dewulf, J., 2015. The biosecurity status and its associations with production and management characteristics in farrow-to-finish pig herds. *Animal* 1–12. <https://doi.org/10.1017/S1751731115002487>
- Rajão, D.S., Costa, A.T.R., Brasil, B.S.A.F., Del Puerto, H.L., Oliveira, F.G., Alves, F., Braz, G.F., Reis, J.K.P., Guedes, R.M.C., Lobato, Z.I.P., Leite, R.C., 2013. Genetic characterization of influenza virus circulating in Brazilian pigs during 2009 and 2010 reveals a high prevalence of the pandemic H1N1 subtype. *Influenza Other Respi. Viruses* 7, 783–790. <https://doi.org/10.1111/irv.12072>
- Rech, R.R., Gava, D., Silva, M.C., Fernandes, L.T., Haach, V., Ciacci-Zanella, J.R., Schaefer, R., 2018. Porcine respiratory disease complex after the introduction of

- H1N1/2009 influenza virus in Brazil. *Zoonoses Public Health* 65, e155–e161. <https://doi.org/10.1111/zph.12424>
- Reeth, K. Van, Ma, W., 2013. Swine influenza virus vaccines: To change or not to change—that's the question. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 370, 173–200. <https://doi.org/10.1007/82-2012-266>
- Schaefer, R., Rech, R.R., Gava, D., Cantão, M.E., da Silva, M.C., Silveira, S., Zanella, J.R.C., 2015. A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. *Arch. Virol.* <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2223-z>
- Schaefer, R., Zanella, J.R.C., Brentano, L., Vincent, A.L., Ritterbusch, G. a., Silveira, S., Caron, L., Mores, N., 2011. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. *Pesqui. Veterinária Bras.* 31, 761–767. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000900007>
- Scott, A., McCluskey, B., Brown-Reid, M., Gear, D., Pitcher, P., Ramos, G., Spencer, D., Singrey, A., 2016. Porcine epidemic diarrhea virus introduction into the United States: Root cause investigation. *Prev. Vet. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.013> [doi]
- Silva, G., Leotti, V., Corbellini, L. Assessment of biosecurity practices and development of a scoring system in swine farms using item response theory. In: *Proceedings of the 3rd National Meeting of Veterinary Epidemiology*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, August 1 - 3, 2018.
- Simon-Grifé, M., Martín-Valls, G.E., Vilar, M.J., García-Bocanegra, I., Martín, M., Mateu, E., Casal, J., 2013. Biosecurity practices in Spanish pig herds: Perceptions of farmers and veterinarians of the most important biosecurity measures. *Prev. Vet. Med.* 110, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.11.028>
- Simon-Grifé, M., Martín-Valls, G.E., Vilar, M.J., García-Bocanegra, I., Mora, M., Martín, M., Mateu, E., Casal, J., 2011. Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. *Vet. Microbiol.* 149, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.015>
- Smith, G.J.D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, C.L., Raghwani, J., Bhatt, S., Peiris, J.S.M., Guan, Y., Rambaut, A., 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza a epidemic. *Nature* 459, 1122–1125. <https://doi.org/10.1038/nature08182>
- Souza, C., Poeta, A., Schaefer, R., Gava, D., Junior, I., Canal, C., Corbellini, L. Serological surveillance and factors associated with influenza A virus in backyard pigs in Southern Brazil. In: *Proceedings of the 3rd National Meeting of Veterinary Epidemiology*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, August 1 - 3, 2018.
- Torremorell, M., Allerson, M., Corzo, C., Diaz, A., Gramer, M., 2012. Transmission of Influenza A Virus in Pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01300.x>
- Van Reeth, K., Brown, I.H., Olsen, C.W., 2012. Influenza virus, in: *Diseases of Swine*. pp. 557–571.

Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Pirtle, E.C., Wills, R.W., Sanderson, T.J., McGinley, M.J., 1997. Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species, in: *Veterinary Microbiology*.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01320-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01320-X)

Tables

Table 1. Summary of population data and sampling design to estimate sow seroprevalence and the effects of biosecurity practices on influenza A prevalence in commercial breeding herds.

<i>Population data</i>				<i>Sampling data</i>						
Stratum ¹	N. Farms	N. Sows	Freq. of sows per stratum	Sampled clusters per stratum	N. of sampled sows per stratum (n=403)	N. of sampled sows per farm	Total sampled sows	Mean of W1 ²	Mean of W2 ²	Mean of W1*W2 ³
1	10	3190	9.20%	5	37 (9.2%*403)	8 (37/5)	40	10.9	38.0	398.8
2	17	11530	33.40%	9	135 (33.4%*403)	15 (134/9)	135	17.9	46.6	768.7
3	13	19850	57.40%	7	231 (57.4*403)	33 (231/7)	231	12.8	50.4	607.1
Total	40	34570	100%	21			406			

¹ 1. 'Small size' - 220 to 415 sows; 2. 'Medium size' - 416 to 1,200 sows; and 3. 'Large size' - more than 1,200 sows.

² Weights (W1 and W2) are equal to the inverse of the probability of a farm and a sow in a farm being sampled.

³ Sampling weight (W1*W2) of a sow in each stratum. For example: in stratum 1, a sampled farm represents on average ~ 11 farms and a sampled sow represents ~ 38 sows.

Table 2. Summary description of variables gathered in the checklist and the questionnaire.

Variables	Description
<i>General data on the farm</i>	
Property size	Size of farm in hectares
Number of barns	Number of both barns, gestation and maternity
Number of pigs in each category	Number of sows, hogs, nursery piglets, weaning piglets
Number of employees	Quantity of employees who have contact with pigs
Presence of other domestic animals	Presence of dogs, cats, poultry, cattle
Farm age	Age of farm in years
Veterinarian visiting	Frequency of veterinarian technical assistance
Surrounding area	Distance of neighbors raising swine
<i>Biosecurity practices related to farm management and facilities</i>	
Bird-proof net	Presence of bird-proof nets in the barns.
Prohibition signs	Presence of a sign (plate) forbidding entrance.
Perimeter Fences	Presence of a perimeter fence around the farm and barn.
Parking outside the farm	Presence of a delimited area for visitor and staff parking
Dressing room	Presence of a dressing room with a bathroom (shower-in) near the main entrance
Unique access	Farm has a single access with delimited clean and dirty zones.
Feed bin location	Feed bin outside of the barn limit for external feed loading by truckers
Disinfection gates	Truck and vehicles are cleaned / disinfected before entry into the farm area.
Truck and other pigs	Trucks already transporting pigs had access to farm area.
Feeding truck	Feeding truck has access to farm area.
Truck driver	Driver of trucks (feed or transporting pigs) had access to the barn.
Disinfection of materials	Materials are cleaned before entry to the farm
Visitor clothing	Visitors use clothes and boots provided by the farm
Staff clothing	Staff use clothes and boots provided by the farm
Mice and flies control programs	Periodic control against mice and flies in the buildings
Separation of sick animals	Separation of sick animals in a pen (sick pen)
Clinic signs of flu in pigs	Presence of swine influenza-like signs in pigs
Flu outbreak occurrence	Report of swine influenza-like outbreak in last 3 months
Origin of gilt (external replacement)	Replacement gilts are raised in other farms (external) or in farm (internal).
Gilt acclimatization unit	Gilts are separated upon entrance to the farm in a separate barn from the rest of the herd.
Separate of gestation and maternity	Gestation and maternity were localized in different building.
Exclusive equipment per building	Gestation and maternity have individual equipment
AIAO maternity (days)	Number of days which was used all in/ all out system in maternity building.
Parity order	Number of births on each sampled sow (individual-level variable).

Table 3. Descriptive statistics of biosecurity practices evaluated by the univariable model.

Variables	Descriptive statistics	Prevalence Ratio	<i>p</i> -value
Bird-proof net - yes	69.0%	0.81	0.09
no	33.0%	1	
Unique access – yes	71.3%	0.95	0.69
no	28.7%	1	
Feed bin location (outside of farm area) - yes	85.4%	0.95	0.64
no	14.6%	1	
Truck loading other pigs - yes	34.4%	1.12	0.37
no	65.6%	1	
Truck driver had access to the barn - yes	13.4%	0.93	0.47
no	86.6%	1	
External replacement - yes	84.7%	1.18	0.59
no	15.3%	1	
Gilt acclimatization unit - yes	80.2%	0.70	0.00
no	19.8%	1	
AIAO maternity (<4) - yes	88.6%	0.87	0.34
no	11.4%	1	
Number of sows - 'small stratum'	6.2%	1	
Number of sows - 'medium stratum'	40.1%	0.88	0.56
Number of sows - 'large stratum'	53.7%	1.06	0.79
Parity Order (>3) - yes	41.9%	1.31	0.00
no	58.1%	1	

Table 4. Robust Poisson Regression using sampling weights containing statistically significant variables associated with the seroprevalence of influenza A virus in breeding farms adjusted by number of sows and parity order.

Variables	Prevalence Ratio (CI 95%)	<i>p</i> -value
Bird-proof net	0.75 (0.65 – 0.86)	<0.001
External replacement	1.38 (1.17 – 1.64)	<0.001
Gilt acclimatization unit	0.57 (0.50 – 0.66)	<0.001
Parity Order (>3)	1.22 (1.04 – 1.44)	0.03
Number of sows – small stratum	1	
Number of sows – medium stratum	0.81 (0.55 – 1.19)	0.30
Number of sows – large stratum	0.88 (0.62 – 1.25)	0.49

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou os altos níveis de exposição ao vírus da influenza das matrizes suínas, resultados que concordam com diversos estudos internacionais de prevalência. Ainda, a circulação de mais de um subtipo de influenza é bastante comum, o que deve ser levado em consideração em ordem de implementar futuras vacinas, como forma de controle da doença em granjas de matrizes no RS. Adicionalmente, futuras pesquisas com emprego de técnicas de diagnóstico complementares que demonstrem a circulação do vírus da influenza, como o uso do isolamento viral e detecção de ácidos nucléicos por protocolos de PCR, também são necessárias.

Conforme o resultado sobre o papel exercido pelas medidas de biossegurança praticadas, em uma visão geral, foi possível evidenciar nessa população que o manejo conjunto de introdução de novas leitoas (origem e frequência) e o tempo de aclimação em um lugar apropriado são maneiras significativas de controlar a entrada e disseminação viral nos rebanhos. Juntamente com a presença de barreiras físicas nos galpões com objetivo de proteger os rebanhos do contato com as aves silvestres, que podem estar carreando o vírus e proporcionando seu espalhamento no plantel.

Referências

- ALLERSON, M. W. *et al.* Infection Dynamics of Pandemic 2009 H1N1 Influenza Virus in a Two-Site Swine Herd. **Transboundary and Emerging Disease**. v. 61(6), p. 490–499, 2013.
- AMASS, S.F., CLARK, L.K. Biosecurity considerations for pork production units. **Swine Health Production**. v. 7, p. 217–228, 1999.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). 2017. **Relatório Anual**. Disponível em: http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2017_portugues_web1.pdf Acesso em: 07 de março de 2018.
- BEAUDOIN, A. *et al.* Characterization of influenza A outbreaks in Minnesota swine herds and measures taken to reduce the risk of zoonotic transmission. **Zoonoses Public Health**. v. 59, p. 96–106, 2012.
- BROWN, I. H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **Veterinary Microbiology**. v. 74, p. 29-46, 2000.
- Canadian Food Inspection Agency (CFIA). **H1N1 flu virus - advice for veterinarians and swine producers**. CFIA; Aug 2016. Available at: <http://www.inspection.gc.ca/animals/terrestrial-animals/diseases/other-diseases/h1n1-flu-virus/advice/eng/1344123804133/1344123976857>. Acesso em 22 de agosto de 2016.
- CASTRUCCI, M. R. *et al.* Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. **Virology**. v. 193, p. 503–506, 1993.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2010: CDC – seasonal influenza (Flu) – key facts about swine influenza (Swine Flu) in humans. Disponível em: http://www.cdc.gov/flu/swineflu/keyfacts_humans.htm. Acesso em 24 de Agosto de 2016.
- CHOI, M. J. *et al.* Variant influenza associated with live animal markets, Minnesota. **Zoonoses Public Health**. v. 62, p. 326–330, 2014.
- CIACCI-ZANELLA, J. *et al.* Influenza A virus infection in Brazilian swine herds following the introduction of pandemic 2009 H1N1. **Veterinary Microbiology**. v. 180, p. 118–122, 2015.
- DAWOOD, F. *et al.* Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. **New England Journal of Medicine**. v. 360, p. 2605-2615, 2009.

DIAS, A. 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, p. 161–167, 2015.

FOUCHIER, R. A. *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. **Journal of Virology**. v.79, p. 2814–2822, 2005.

HOWDEN, K. J. *et al.* An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. **Canadian Veterinary Journal**. v. 50, p. 153–1161, 2009.

IBGE, 2012. Instituto Brasileiro de Estatística IBGE. **Censo Agropecuário 2012**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp>. Acesso em: 6 de agosto de 2016.

KARASIN, A. I. *et al.* Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. **Virus Research**. v. 68(1), p. 71-85, 2000.

KIDA, H. *et al.* Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. **Journal General Virology**. v. 75, p.2183–2188, 1994.

KYRIAKIS, C. S. *et al.* Virological surveillance and preliminary antigenic characterization of influenza viruses in pigs in five European countries from 2006 to 2008. **Zoonoses Public Health**. v. 58, p. 93-101. 2011.

LARSEN, L. E. *et al.* In: Proceedings of the 21st IPVS Congress 2010: Dynamics of swine influenza infections in the farrowing unit of a Danish sow herd. p. 80.

LEWIS, N. S. *et al.* The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. *Elife* 5. 2016

LOEFFEN, W. L. *et al.* Population dynamics of swine influenza virus in farrow-to-finish and specialized finishing herds in the Netherlands. **Veterinary Microbiology**. v. 137, p. 45–50. 2009

MYERS, K. P.; OLSEN, C. W. & GRAY, G. C. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. **Clinical Infectious Disease**. v. 44, p. 1084–1088, 2007.

NELSON, M. I. & VINCENT, A. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human–animal interface. **Trends in Microbiology**. v. 3, p. 142-153. 2015.

NEUMANN, G. & KAWAOKA, Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. **Emerging Infectious Diseases**. v. 12, p. 881–886. 2006.

POLJAK, Z. *et al.* Prevalence of and risk factors for influenza in southern Ontario swine herds in 2001 and 2003. *Canadian Journal Veterinary Research*. v. 72, p. 7–17, 2008.

RAJÃO, D. S. *et al.* Serological evidence of swine influenza in Brazil. **Influenza and Other Respiratory Viruses**. v. 7, p. 109–112, 2013.

RICHT, J. A. & WEBBY, R. J. **Swine Influenza. Current Topics in Microbiology and Immunology**. Berlin: Springer-Verlag Berlin; 2013. 370p.

ROMAGOSA A. *et al.* Vaccination of influenza A virus decreases transmission rates in pigs. **Veterinary Research**. v. 42, p. 120. 2011

SCHAEFER, R. *et al.* A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. **Archives Virology**. v. 160, p. 29–38, 2015.

SCHAEFER, R. *et al.* Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, p. 761–767, 2011.

SHOPE, R. E. Swine Influenza. III. Filtration experiments and etiology. **Journal Experimental Medicine**. v. 54, p. 373–385, 1931.

SIMON, G. *et al.* European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. **PLoS One**. v. 9, p. 115815, 2014.

SIMON-GRIFE, M. *et al.* Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. **Veterinary Microbiology**. v. 149, p. 56–63. 2011.

TORREMOREL, M. *et al.* Transmission of Influenza A Virus in Pigs. **Transboundary and Emerging Diseases**. v. 59, p. 68–84. 2012.

VAN REETH, K. *et al.* Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. **Veterinary Research**. v. 38, p. 243–260. 2007

VAN REETH, K. *et al.* Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002–2003. **Influenza Other Respiratory Viruses**. v. 2, p. 99–105. 2008

VAN REETH, K. & NICOLL, A. 2009: A human case of swine influenza virus infection in Europe—implications for human health and research. **Europe Surveillance**. v. 14, p. 2–4, 2009.

VAN REETH K. *et al.* 2012. Influenza virus. In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames.

VAN REETH, K. & MA. Swine influenza virus vaccines: To change or not to change—that's the question. **Currents Topics Microbiology and Immunology** v. 370, p. 173–200. 2013

VINCENT, A. L. *et al.* Swine influenza viruses a North American perspective. **Advances Virus Research**. v. 72, p. 127–154, 2008.

VINCENT, A. L. *et al.* Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. **Virus Genes**. v. 39, p. 176–185. 2009.

VINCENT, A. *et al.* Review of Influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. **Zoonoses Public Health**. v. 61, p. 4-14, 2013.

YOON, S. W.; WEBBY, R. J. & WEBSTER R. G. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Currents Top Microbiology Immunology**. v. 385, p. 359–375, 2014.