



Faculdade de Veterinária
Licenciatura em Medicina Veterinária
Departamento Sanidade e Saúde Pública

Trabalho de culminação de estudos

**Prospecção da Influenza - A em suínos criados em sistema extensivo no distrito de
Angónia**

Autora: Silza Karina Cuchera Jorge

Supervisor: Prof. Doutor Abel Chilundo

Co-Supervisora: Dra. Iolanda Anahory

Maputo, Junho de 2025

Declaração de Honra

Eu Silza Karina Cuchera Jorge, estudante finalista do 5º nível da Faculdade de Veterinária, declaro por minha honra, que este trabalho para obtenção de grau de Licenciatura em Medicina Veterinária nunca foi apresentado para obtenção de qualquer grau académico e que constitui resultado da minha pesquisa pessoal, estando indicada na bibliografia as fontes utilizadas para a sua elaboração.

Maputo, Junho de 2025

(Silza Karina Cuchera Jorge)

(Candidata ao grau de licenciatura em Medicina Veterinária)

Dedicatória

Dedico este trabalho as minhas mães Cristina Joaquim Cuchera e Mariana Joaquim Cuchera por todo esforço, dedicação, incentivo e pela força.

Ao meu pai Pita Joaquim Tigo (em memória) por me ter criado com tanto amor, carinho, por ter dado o melhor de si, e por ter garantido a minha formação mesmo não estando entre nós.

Ao meu pai Simão Datizua Jorge, pela vida.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela saúde, pelo dom da vida, por ter permitido com que eu chagasse a esta etapa, por ser a luz dos meus pés iluminando os meus caminhos e pela sabedoria.

Aos meus pais Cristina Joaquim Cuchera, Mariana Joaquim Cuchera, Pita Joaquim Tigo e Simão Datizua Jorge, por toda dedicação, atenção, paciência, sacrifício, ensinamento, sabedoria, amor, que me proporcionaram e tem proporcionado até hoje para que eu pudesse me tornar no que sou, obrigada pela confiança que depositaram em mim e por terem acreditado que eu era capaz de chegar a esta etapa da vida. As minhas queridas tias: Isabel Joaquim Cuchera pela força e motivação, e Nora Joaquim Cuchera. Aos meus irmãos, Henrique Jorge, Gertrudes Tigo, Fernanda Tigo, Joaquim Tigo, José Pita, Frederica Cambula, Ângelo Cambula, e Carlos Pavungo, pela paciência, alegria, motivação, e compreensão. Ao meu esposo Elton Max Massassane Massingue, pela força, dedicação, companheirismo, amizade, ensinamento e cumplicidade, pelo suporte, por acreditar em mim mais do que eu acreditei. Aos meus amigos e colegas: Ilka dos reis Manhiça, Márcia Massango, Kleyd Camela, João João Matsimbe, Hélio Muatareque, Augusto Nhanza, Ercilio Bila, Hagnésio Chiponde, José Néula, Velosa Mathai, Bijorca Nhanala, Arnetta Boene, Paula Xerinda.

Ao Laboratório Central de Veterinária (LCV) e à repartição de virologia pela oportunidade, incentivo e apoio para a realização do trabalho na sua instituição.

Ao Prof. Doutor Abel Gonçalo Chilundo, pela supervisão do trabalho, dedicação, paciência e pressão. A Dra. Iolanda Ivanahory, pela co-supervisão do trabalho, orientação, acompanhamento, aconselhamento, e dedicação. Ao Doutor Lourenço Mapaco, pela escolha do tema, dos supervisores e por todo apoio. Agradeço a todos os professores por todo ensinamento e acompanhamento ao longo da elaboração do trabalho e durante a vida estudantil.

Ao Prof. Doutor Júlio Come e Dra. Ivânia Moiane, pelas sugestões e orientação, que permitiram a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os professores da Faculdade de Veterinária-UEM, pelo conhecimento que me foi transmitido ao longo do curso, em particular aos doutores Alberto Dimande, Otilia Bambo, Cláudio Laísse, José Faifetine pelos conhecimentos transmitidos não só referentes ao curso, mas inerentes ao cotidiano e à vida. Aos funcionários da Faculdade de Veterinária e DCA: Regina, Samito, Augusto (em memória), Pedro, Paulinha, Francelino, Reginaldo, Salda, Papilo, Marcos, Lucrécia, Ngoca, entre outros, pelo apoio, ajuda, conselhos, amizade e dedicação.

Lista de abreviaturas

HE- Hematoxilina-eosina

IS- Influenza suína

SIV- Vírus da influenza suína

SDAE- Serviço distrital de actividades económica

DCA - Direcção de Ciências Animais

LCV- Laboratório Central de Veterinária

IIAM- Instituto de investigação agrária de Moçambique

INE- Instituto nacional de estatística

MASA- Mistério da agricultura e segurança alimentar

MA- Ministério da agricultura

MADER- Ministério da agricultura e desenvolvimento rural

mm- Milímetros

°C- Graus Celcius

%- Percentagem

Km²- Quilometro quadrado

Cat- Catalogo

N°- Número

AIV- Avian Influenza Vírus

Doc- Documento

PI- Percentagem de inibição

Ab- Antibody

µl- Microlitros

Ag- Antígeno

Ac- Anticorpo

PC- Positive control

NC- Negative control

HA- Hemaglutinina

NA- Neuroaminidase

nm- Nanómetro

Obj- objectiva

Lista de figuras e gráficos

Figura 1: Estrutura do vírus da Influenza A;

Figura 2: Transmissão do vírus da influenza nas distintas espécies;

Figura 3: Pulmão de um leitão apresentando áreas multifocais;

Figura 4: Amostras e resultados das principais técnicas laboratoriais;

Figura 5: Relação entre a concentração de anticorpos e o período de permanência no organismo

Figura 6: Pulmão de suíno com lesão microscópica de influenza A;

Figura 7: Distrito de Angónia;

Figura 8: Colheita de amostra de sangue;

Lista de tabelas

Tabela 1- Número de animais por localidade

Índice

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJECTIVOS	3
2.1. Geral:.....	3
2.2. Específicos:.....	3
3. INFLUENZA SUÍNA - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Histórico.....	4
3.2. Impacto económico	4
3.3. Etiologia.....	4
3.4. Transmissão.....	6
3.5. Sinais clínicos.....	6
3.6. Diagnóstico.....	7
3.6.1. Isolamento viral	9
3.6.2. ELISA indireto	10
3.6.3. Inibição de Hemaglutinação (HI)	10
3.6.4. Histopatologia e imuno-histoquímica	10
3.6.5. Testes moleculares	11
3.7. Prevenção e Controlo	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Local de estudo	13
4.2. Desenho do estudo e amostragem.....	14
4.3. Tamanho da amostra	14
4.4. Colheita de amostras	14
4.5 Procedimento laboratorial	15
4.5.1 Análise Serológica	15
4.5.2 Critérios de validação do teste	15
4.5.3 Cálculo de Percentagem de Inibição (PI)	16
4.5.4 Interpretação dos resultados	16

4.6 Análise de dados.....	16
5. RESULTADOS	17
5.1. Detecção do vírus da influenza A, pelo teste sorológico (ELISA).....	17
5.2. Prevalência da Influenza A em suínos em algumas localidades do distrito de Angónia	17
6. DISCUSSÃO	18
6.1. Detecção da presença do vírus da Influenza A.....	18
6.2. Prevalência da Influenza A em Suínos no Distrito de Angónia	19
7. CONCLUSÃO	21
8. RECOMENDAÇÕES	22
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
Anexo	30
Procedimento do teste ELISA.....	30
Interpretação do resultado e validação do teste	31
Cálculo do valor IP	31
Interpretação do resultado	32

RESUMO

A Influenza A é uma das doenças infecciosas com maior impacto na história da humanidade, em virtude das pandemias registadas ao longo dos últimos 100 anos. A vigilância epidemiológica do vírus da Influenza em suínos reveste-se de particular importância, dado que esta espécie é susceptível à infecção por estirpes virais de origem suína, aviária e humana. Nos suínos, a doença manifesta-se como uma síndrome respiratória aguda, frequentemente associada a elevadas perdas económicas, devido à sua alta morbilidade. A transmissão ocorre por contacto directo, aerossóis, tosse, espirros, fómites e pela introdução de animais portadores no efectivo.

O presente estudo teve como objectivo investigar a ocorrência do vírus Influenza A em suínos criados em sistema extensivo por pequenos produtores rurais no distrito de Angónia, província de Tete. Foram colhidas 262 amostras de sangue de suínos provenientes das aldeias de Binga, Cabango, Dziede, Kamphessa, Liranga e Seze. Para cada amostra, registaram-se os dados relativos à aldeia de origem, idade e sexo dos animais. A detecção da presença de anticorpos contra o vírus da Influenza A foi realizada por meio do teste serológico ELISA.

Os resultados obtidos indicam a ausência de circulação do vírus da Influenza A na população suína das localidades abrangidas pelo estudo.

Palavras-chave: Influenza A, Suínos, ELISA, Angónia – Tete.

1. INTRODUÇÃO

A influenza suína, e ou “gripe suína”, é uma doença infecto-contagiosa causada por um vírus, de distribuição cosmopolita, apresentando uma elevada morbidade (100%), porém uma baixa mortalidade (1%), que afecta suínos, aves e humanos, responsável pelo desenvolvimento de distúrbios respiratórios agudos nas espécies afectadas (Brown, 2000; Olsen *et al.*, 2006 e Schaefer *et al.*, 2013).

A transmissão do vírus, ocorre pelo contacto direto com animais infectados e suas secreções, associada aos factores ambientais e climáticos, a introdução de novos animais na vara, a idade (maior suscetibilidade dos animais jovens), o estado imune dos animais, a estirpe envolvida, a ocorrência de infecções bacterianas e virais podem estar directamente relacionados com a ocorrência desta patologia em suínos (Easterday e Van Reeth, 1999; Brown, 2000; Embrapa, 2005).

O diagnóstico da influenza, baseia-se na avaliação da sintomatologia clínica e lesões observadas nos animais afectados, o diagnóstico diferencial, associado ao diagnóstico laboratorial por meio do isolamento viral, serologia para a detecção de anticorpos específicos, detecção do RNA e ou proteínas virais, (Easterday e Van Reeth, 1999, Clavijo *et al.*, 2002). Os suínos são reservatório do vírus da influenza A (Webster, 1992), e, em África foi reportada a ocorrência em aves, num estudo realizado no Kenya (Munyua *et al.*, 2018), sendo que em Moçambique foi reportada evidências serológicas do subtipo H7N6 em aves (Monjane *et al.*, 2024). No entanto existem evidências serológicas dos subtipos H1N1 e H3N2 (Santos, 2014) reportados em suínos no Brasil, alguns subtipos distintos do vírus da influenza A foram isolados em alguns países asiáticos como China, Taiwan e foram identificados os subtipos, H5N1, H3N2 (suínos) e H9N2, H5N2 (galinhas) respectivamente (Webster, 1992; Lee, *et al.*, 2014).

Em Moçambique, um estudo realizado por Laisse (2017) referente a detecção do vírus influenza A e circovírus suíno tipo 2 em suínos abatidos, no sul de Moçambique detectou 32 casos de influenza A em suínos, sendo os animais positivos provenientes dos distritos de Namaacha (21/32), Matutuíne (5/32), Moamba (2/32), Boane (3/32) e Cidade da Matola (1/32).

O presente trabalho tem como objectivo estudar a ocorrência da influenza A em suínos criados em sistema extensivo por pequenos criadores rurais do distrito de Angónia, província de Tete.

2. OBJECTIVOS

2.1. Geral:

- Avaliar a ocorrência da influenza A em suínos criados em sistema extensivo por pequenos criadores rurais do distrito de Angónia, província de Tete.

2.2. Específicos:

- Detectar a presença do vírus da influenza A por meio de testes serológicos, utilizando o método ELISA.
- Determinar a prevalência da influenza A em suínos de algumas localidades do distrito de Angónia.

3. INFLUENZA SUÍNA - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Histórico

O termo Influenza tem origem na Itália durante a Idade Média, quando na região de Florença foi utilizado para descrever sinais clínicos de tosse, febre e calafrios que estariam relacionados à “influência” (em italiano= influenza) (Santos *et al.*, 2015).

De acordo com a literatura, a primeira pandemia oficial de gripe ocorreu no ano de 1580, tendo esta pandemia originado no continente Asiático, e a posterior se disseminado para a África e Europa e posteriormente para a América, contudo, o vírus foi isolado pela primeira vez somente no ano de 1930, sendo classificado como vírus Influenza A. No ano de 1940 foi descoberto o vírus Influenza B e em 1950 foi isolado o vírus Influenza C (Pyle, 1986; Potter, 2001; Santos *et al.*, 2015).

No verão de 1918, em alguns países do continente Americano (Estados Unidos), Europeu (Hungria) e Asiático (China), o vírus da influenza suína, foi pela primeira vez detectado e descritos de forma minuciosa, a quando do levantamento epidemiológico e clínico desta patologia (Koen, 1919).

Durante a década de 50, foi demonstrado a forte capacidade infectante do subtipo H2N2 no estabelecimento desta patologia em suínos (OMS,1957), tendo se a posterior, na década de 70, confirmado a característica zoonótica da influenza suína, na transmissão para humanos que trabalhavam com suínos (Smith, *et al.*, 1976 e Olsen *et al.*, 2006). O Vírus de influência suína (VIS) H1N1 que predomina na Europa é inteiramente de origem aviária e foram introduzidos por patos selvagens em suínos em 1979 (Van Reeth 2007).

3.2. Impacto económico

A nível económico não existe informação quantitativa das perdas provocados pelo vírus influenza, mas as doenças respiratórias são responsáveis pelos maiores prejuízos económicos para a indústria suína, destacando-se (Deu, 2004 e Olsen *et al.*, 2006):

- Os prejuízos provenientes dos tratamentos,
- Atrasos no crescimento,
- Diminuição do índice de conversão alimentar,
- Diminuição da qualidade da carcaça.

3.3. Etiologia

O vírus da influenza suína (SIV) pertence a família Orthomyxoviridae e possui cinco gêneros sendo eles Influenza A, influenza B, influenza C, o gênero Thogotovírus, Quaranjavírus e Isavírus. O vírus tipo A é patogénico para mamíferos como baleias, equinos, suínos, homem

e as aves, o tipo B infecta apenas humanos causando doença respiratória leve. O vírus tipo C acomete humanos e suínos (Lamb e Krug, 2001; Caron e Klein, 2010; Ictv, 2014 e Dutra, 2017).

Este vírus caracteriza-se por ser ARN de sentido negativo, segmentado, de fita simples, contém envelope e é pleomórfico, o seu tamanho varia de 80 á 120 nm de diâmetro ao microscópio eletrônico (Caron e Klein, 2010). Os vírus influenza A são classificados em subtipos com base na antigenicidade de suas moléculas de superfície: hemaglutininas (16 subtipos, de H1 a H16) e neuraminidasas (9 subtipos, de N1 a N9) (Mujoriya *et al.*, 2011). Actualmente existem 18 subtipos de hemaglutinina (HA) e 11 subtipos de neuraminidase (NA), sendo três subtipos associados a doença em suínos nomeadamente H1N1, H1N2, H3N2 (Sreta *et al.*, 2009; Rajão, 2012; Tong *et al.*, 2013)

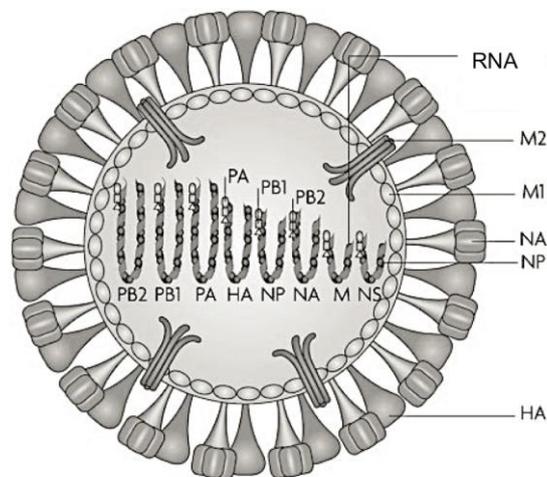


Figura 1: Estrutura do vírus da Influenza A, apresentando as moléculas de hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA), nucleoproteína (NP), matriz (M₁, M₂), polimerase ácida (PA) e a polimerase básica (PB₁, PB₂) (Horimoto *et al.*, 2005, Rajão, 2012).

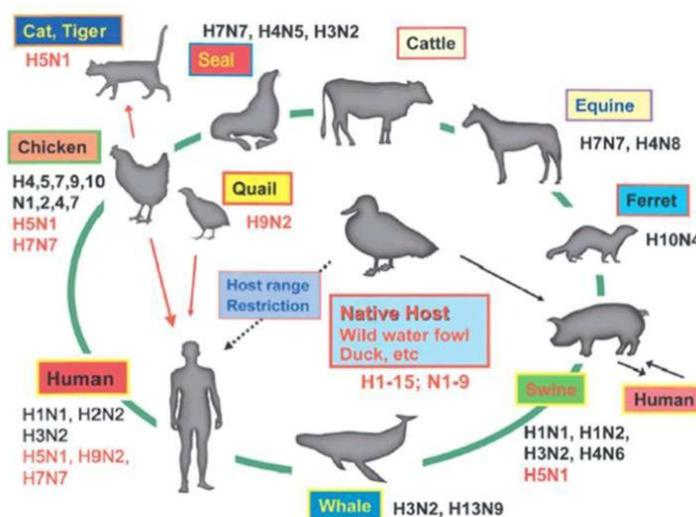
O vírus da IS tem uma grande afinidade pelas moléculas do ácido siálico (AS), usando-os como receptores visto que estes estão presentes nas moléculas das glicoproteínas e glicolípidos. Os suínos possuem ao longo do seu sistema respiratório moléculas do ácido siálico, de ligação α 2,3 e α 2,6 o que lhes confere a capacidade potencial de se infectarem pelas estirpes pertencentes a outras espécies, bem como a recombinação do vírus que propicia o surgimento de novas estirpes (Santos, 2014).

Os humanos e as aves possuem apenas os receptores α 2,6 e α 2,3 respectivamente (Santos, 2014). Quando observado ao microscópio electrónico (Fig.1), o vírus apresenta espículas à sua superfície que correspondem às proteínas externas: HA e NA. Nas regiões

distais das proteínas externas encontra-se o domínio proteico da HA que interage com os resíduos de ácido siálico da membrana celular, permitindo a infecção da célula hospedeira. Esta ligação ao ácido siálico é também inibição de hemaglutinação (Carrasco e Río, 2006).

3.4. Transmissão

A transmissão da influenza suína ocorre por contato directo, aerossóis, tosse, espirro, fómites e pela introdução de animais portadores na vara (Romagosa *et al.*, 2011; Van Reeth; Brown; Olsen, 2012; Janke, 2014). A facilidade da disseminação aérea do vírus se dá pelo tempo de permanência das partículas suspensas no ar, que pode chegar a 20 dias, com pico entre 7 e 11 dias, este vírus pode ser transmitido entre as diferentes espécies animais e humanos (Fig.2) (Neira *et al.*, 2016).



CDC (2005)

Figura 2: Transmissão do vírus da influenza nas distintas espécies (Fonte: <http://www.cdc.gov/>)

3.5. Sinais clínicos

Esta patologia caracteriza-se por ser de curso rápido, com um período de incubação de 1 a 3 dias, contudo, dependendo de alguns factores tais como a idade do animal, o seu estado sanitário e imunológico, a estirpe do vírus e a ocorrência de infecções secundárias de origem viral e ou bacteriana, podem comprometer a recuperação dos animais, entre 5 a 7 dias após o surgimento dos sintomas (Olsen *et al.*, 2006).

Vários são os sinais clínicos, sintomatologia e achados da necrópsia (Fig. 3) observados em suínos acometidos por esta patologia, destacando-se (Alexander e Brown, 2000; Richt *et al.*, 2003; Olsen *et al.*, 2006; Van Reeth 2007 e Rajão, 2012):

- Febre (40,5 a 41,7°C);
- Inapetência;
- Apatia; Anorexia; Perda de peso;
- Tosse, espirros, dispneia, Conjuntivite e rinite;
- Abortos, nados mortos, infertilidade, ninhadas pequenas e fracas;
- Em casos graves, a morte.

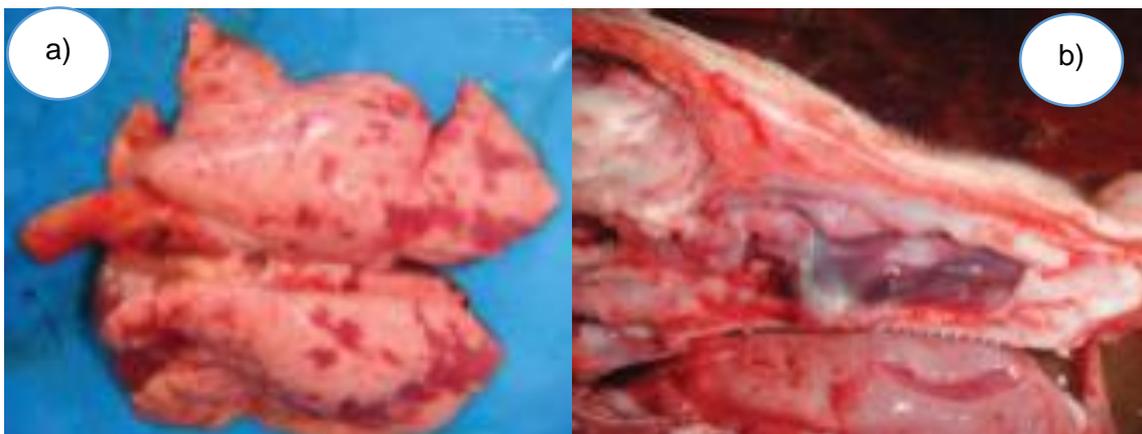


Figura 3: a) Pulmão de um leitão apresentando áreas multifocais avermelhadas com demarcação nítida entre a área afectada e a normal; b) corte longitudinal das narinas – presença de congestão das conchas nasais e exsudado muco-purulento na parte caudo-ventral da cavidade nasal. **Fonte:** (Andrade *et al.*, 2011).

3.6. Diagnóstico

A inexistência de sinais clínicos patognomónicos desta patologia associada a ocorrência de infecções secundárias, conduz a um diagnóstico presuntivo da IS, sendo o diagnóstico definitivo alcançado por meio da detecção *in vivo* do vírus em amostras de secreções nasais e ou faríngeas, e achados *post-mortem* no tecido pulmonar (Brown, 2002).

O diagnóstico da influenza, baseia-se na avaliação da sintomatologia clínica e lesões observadas nos animais afectados, o diagnóstico diferencial, associada ao diagnóstico laboratorial, permitindo deste modo, a obtenção de resultados satisfatórios, em curto espaço de tempo, visto que outras afecções respiratórias apresentam sinais clínicos semelhantes, por tanto, a confirmação da doença pode ser feito por métodos directos (detectam o

antígeno) e indirectos (detectam os anticorpos), destacando-se (Julkunen *et al.*, 1985; Wood *et al.*, 1994; Vincent *et al.*, 1997; Easterday e Van Reeth, 1999, Clavijo *et al.*, 2002; Ciacci Zanela *et al.*, 2010; Wang e Taubenberg, 2010):

- ✓ O isolamento viral (IV) em ovos embrionados;
- ✓ Testes serológicos
 - Inibição de hemaglutinação (IH),
 - Imunofluorescência Directa (IFD) e indirecta (FI),
 - Soro-neutralização (SN)
 - Imunodifusão em Agar gel
 - Teste de imuno-absorção ligada a enzima (ELISA);
- ✓ Histopatologia e Imuno-histoquímica;
- ✓ Testes moleculares
 - Reacção em cadeia de polimerase – Transcrição reversa (RT-PCR).

Para o sucesso do diagnóstico é necessário ter conhecimento de que amostras usar para cada teste laboratorial, como ilustra o esquema a baixo:

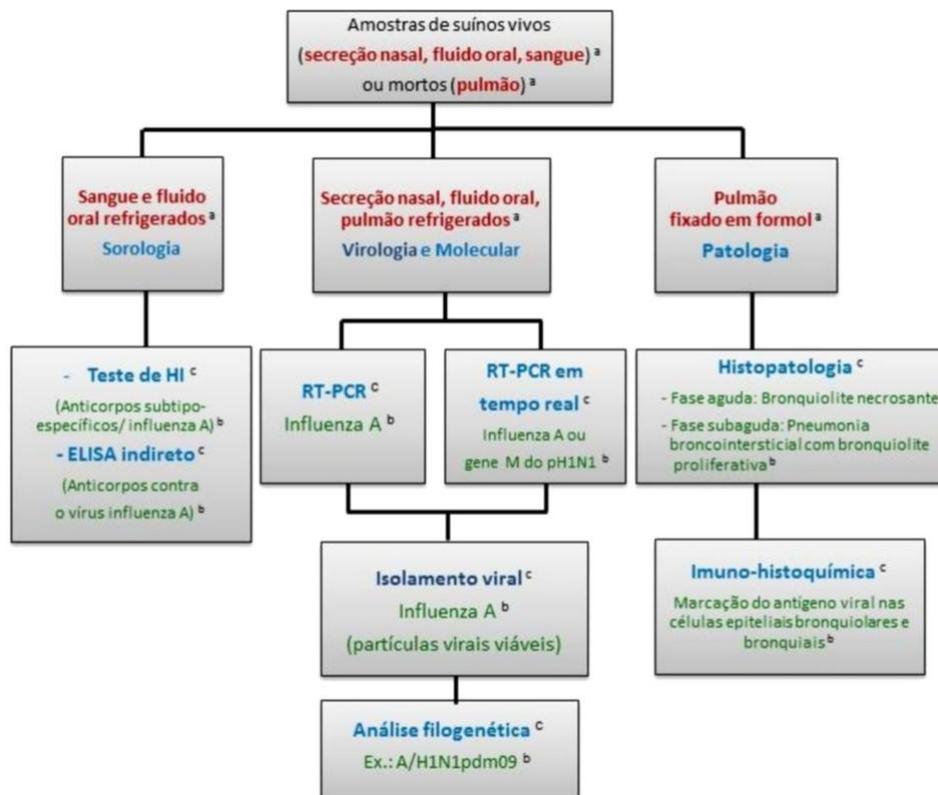


Figura 4: Amostras (a) e resultados (b) das principais técnicas laboratoriais (c) para o diagnóstico de influenza em suínos. **Fonte:** (Schaefer *et al.*, 2013).

O conhecimento da dinâmica de produção de anticorpos pelo organismo animal é de extrema importância para o sucesso do diagnóstico, pois permite decidir o tipo de teste a usar em relação ao período pós exposição da doença (Fig.5).

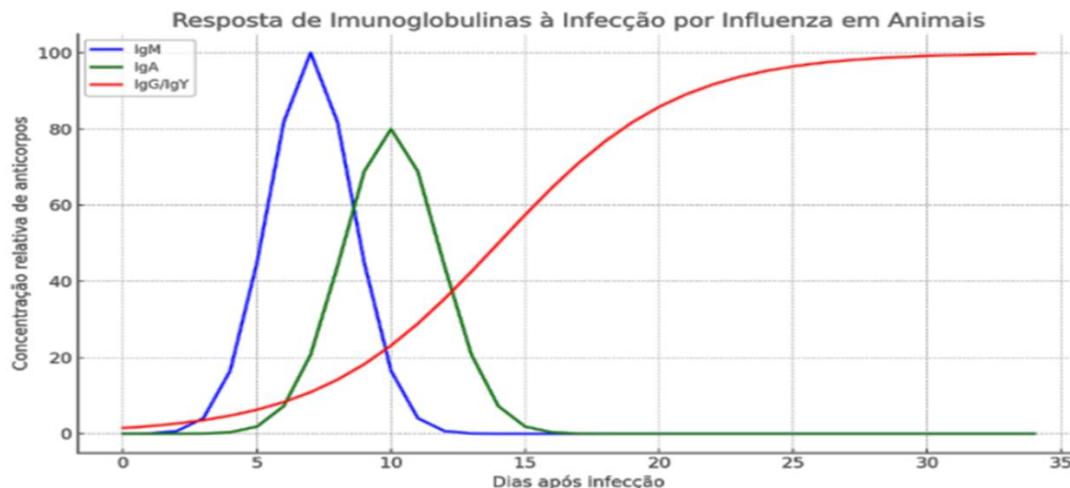


Figura 5: Relação entre a concentração de anticorpos e o período de permanência no organismo, linha azul (IgM), linha verde (IgA), linha vermelha (IgG). Fonte(Shaefer, 2019).

Após a exposição do vírus ocorre um pico de febre 24 horas após a infecção e inicia a multiplicação do vírus. A excreção viral atinge o seu pico máximo 48 horas depois da infecção, e em torno do 6-8 dia a excreção viral diminui, sendo que recomenda-se a realização de testes moleculares até 11 dias. No entanto, a partir do 7 dia inicia a soroconversão, a IgM é o primeiro anticorpo produzido após infecção juntamente com a IgA. A IgM atinge o seu pico máximo em torno do 7 e é indicativa de infecção recente enquanto a IgA o pico máximo é ao 10 dia. Ambas as imunoglobulinas (A e M) regridem e desaparecem. Entre os 14-21 dias a IgG atinge o pico máximo e regride ligeiramente entre a 8-10 semana, depois mantém-se constante, por longos meses ou até anos, a IgG é indicativa de infecção passada ou de longa duração (Shaefer, 2019).

3.6.1. Isolamento viral

O isolamento viral, é uma técnica padrão utilizada para a multiplicação e identificação do vírus a partir da secreção nasal, fluido oral e ou pulmonar, e a posterior inoculação do vírus na cavidade de ovos embrionados de galinhas *Specific Pathogen Free* ou *livres de patógenos específicos* (SPF) com 10 a 11 dias de incubação (Christopher-Hennings *et al.*, 2012 e Dias, 2015).

Na fase aguda desta enfermidade, o vírus pode ser isolado em animais vivos, por meio de secreções nasofaríngeas dos animais infectados, e de tecidos pulmonares de animais

eutanasiados, sendo as amostras mantidas conservadas a temperatura de 4°C em caso de utilização nas primeiras 48 horas e a -80°C por longos períodos (OIE, 2010).

Para a realização do isolamento viral, as amostras devem ser coletadas durante a fase aguda da doença (5 a 7 dias), período na qual ocorre a replicação do vírus (Biondo, 2016 e Schaefer *et al.*, 2013)

3.6.2. ELISA indireto

O princípio do teste baseia-se na visualização da reacção Antígeno-Anticorpo através de um segundo Anticorpo conjugado a uma enzima, que promoverá a reacção com seu substrato, desenvolvendo uma cor. Este teste identifica anticorpos contra a nucleoproteína viral (NP) do vírus, tanto em amostras de soro como em amostras de fluido oral, ou seja, apresenta uma de alta sensibilidade (Ciacci-Zanella *et al.*, 2010), sendo útil para determinar o estado imune da vara. O resultado positivo no teste de ELISA indica que os suínos estiveram em contacto com vírus da influenza A, porém o teste não diferencia os subtipos virais.

3.6.3. Inibição de Hemaglutinação (HI)

Este teste baseia-se na capacidade do vírus Influenza (hemaglutinina-HA viral) de ligar-se a receptores existentes na superfície dos eritrócitos, provocando a hemaglutinação. Desta forma, o anticorpo (presente no soro do suíno a ser testado) liga-se ao vírus de referência do teste inibindo a capacidade da proteína HA em aglutinar eritrócitos, resultando na inibição da hemaglutinação. Para a realização do teste são utilizadas diluições seriadas do soro a ser testado, uma quantidade padrão do vírus de referência (4-8 unidades hemaglutinantes) e eritrócitos de galinha ou peru. Utilizam-se como vírus de referência os subtipos virais mais prevalentes em determinada região ou País. O resultado com títulos de hemaglutinação iguais ou maiores que 1:40 indica que há protecção contra o subtipo viral testado (Detmer *et al.* 2012; Schaefer *et al.*, 2013).

3.6.4. Histopatologia e imuno-histoquímica

O exame histopatológico é realizado em amostras de pulmão fixadas em formalina e em blocadas em parafina. Após a inalação do vírus (1-3 dias pós-infecção) a lesão típica de influenza da fase aguda é bronquiolite e bronquite necrosante (Fig.6A) (Schaefer *et al.*, 2013). A medida que a lesão progride, as células epiteliais necróticas descamam para o lúmen e atraem células inflamatórias, especialmente neutrófilos (bronquite e bronquiolite neutrofílica). A obliteração dos bronquíolos causa atelectasia (colapso) das porções distais do parênquima pulmonar daquele bronquíolo, que corresponde às áreas vermelhas e

deprimidas na microscopia. Em casos subagudos, o epitélio bronquiolar necrosado é substituído por camadas de células epiteliais novas (bronquite e bronquiolite epitelial proliferativa) indicando regeneração (Fig.6B). Como as lesões observadas na histopatologia são características, mas não confirmatórias da infecção pelo vírus da Influenza, faz-se uso da IHQ para demonstrar antígenos específicos (proteínas virais) associados com as lesões características do pulmão. Como o vírus se replica no epitélio respiratório, usando anticorpos específicos (por exemplo, contra a nucleoproteína viral - NP), detecta-se o antígeno viral nas células epiteliais dos bronquíolos e brônquios (Fig.6C)

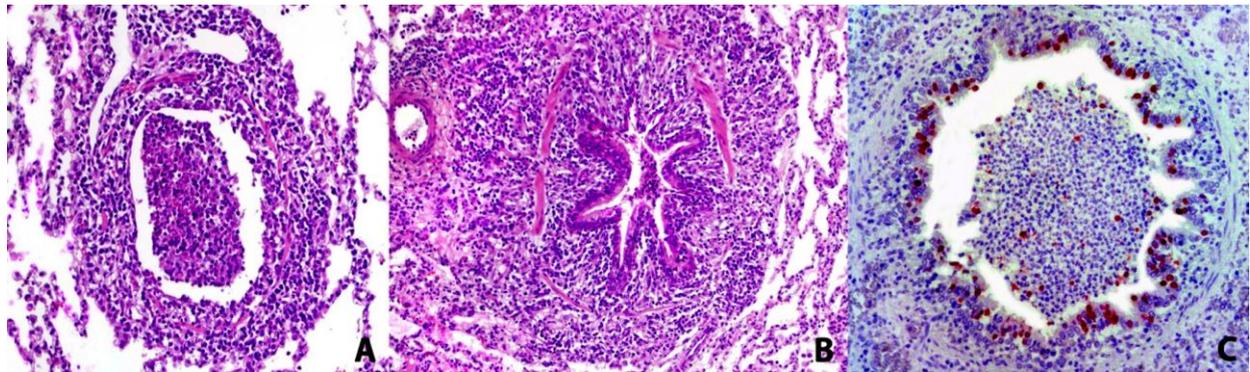


Figura 6: Pulmão suíno com lesão microscópica de Influenza A. (A) Bronquiolite necrosante. HE, obj.10x (B) Pneumonia bronco intersticial. HE, obj.10x. (C) Marcação do antígeno viral (nucleoproteína) no núcleo das células epiteliais bronquiolares íntegras e descamadas dentro do lúmen. O lúmen do bronquíolo está parcialmente obliterado por neutrófilos degenerados. Imuno-histoquímica, obj.20x. **Fonte:** (Schaefer *et al.*, 2013).

3.6.5. Testes moleculares

Os testes moleculares mais utilizados para o diagnóstico de Influenza A são a PCR convencional e em tempo real (RT-PCR). Estas técnicas detectam o ácido nucleico viral em amostras de secreção nasal, fluido oral ou pulmão, indicando infecção recente pelo vírus Influenza A. Em suínos experimentalmente infectados pelo vírus da Influenza, a detecção do ácido nucleico viral por RT-PCR pode ser feita até 11 dias pós-infecção (Lange *et al.*, 2009). A PCR convencional para o diagnóstico de Influenza A é uma técnica qualitativa, a qual permite amplificar fragmentos específicos de ácido nucleico viral na amostra testada. Geralmente o gene-alvo para este teste é o gene que codifica a proteína da matriz (M) do vírus Influenza A, devido ao nível de conservação deste gene entre diferentes amostras de vírus.

3.7. Prevenção e Controle

Por se tratar de uma doença negligenciada, e associada à sua endemicidade, a mesma não é definida como sendo prioritária nos programas epidemiológicos sanitários de vários países (Ciacci-Zanella *et al.*, 2011).

Segundo Flores, (2007) e Torremorell, (2012), a vacinação contra VIS é a prática profilática que pode reduzir o impacto desta patologia, existindo vacinas inativadas comercializadas em alguns países europeus e nos Estados Unidos da América.

Vários autores descrevem resultados satisfatórios na administração terapêutica baseada em antibioterapia (para o combate de infecções secundárias) e anti-inflamatórios, associada aplicação de fortes medidas de biossegurança (limpeza das pocilgas – solventes de gorduras, sabão, detergentes e luz UV ou cloro), contudo, não existe mundialmente um tratamento específico para esta doença (Quinn *et al.*, 2005; Flores, 2007; Zanella 2007; Gramer, 2008; Embrapa, 2009 e Ciacci-Zanella *et al.*, 2011).

sul pelo distrito de Matutuíne, a Oeste pela cidade da Matola e pelo distrito de Boane, e a Este pelo Oceano Índico.

4.2. Desenho do estudo e amostragem

A pesquisa foi feita no distrito de Angónia, usando um desenho transversal e as amostras foram colhidas entre Maio e Junho de 2014, como parte da implementação do projecto *Securing Rural Livelihood through Improved Pig Production in Mozambique and Tanzania (SLIPP)*. Os critérios de selecção das aldeias foram: a presença de um efectivo de 50 ou mais suínos na aldeia, requisito que foi preenchido por 10 aldeias e por fim a vontade das aldeias em participar no estudo, critério que foi preenchido por 6 aldeias (Chilundo, *et al.*, 2016).

4.3. Tamanho da amostra

O cálculo do tamanho amostra foi realizado usando a fórmula $n = (1,96^2 \cdot P_{esp} (1-P_{esp.}) / d^2)$ (Thrusfield, 2007), considerando uma prevalência esperada ($P_{esp.}$) de 84,3% para Influenza A (Laisse, 2017), uma precisão de 5% e intervalo de confiança de 95%.

Com base nesta fórmula e na população de suínos do distrito, determinou-se a necessidade de amostrar 203 suínos. No entanto, para o estudo, foram testadas 262 amostras, pois estas amostras encontravam-se disponíveis e havia meios para testar todas. Assim, no total, foram amostrados 262 suínos de 6 aldeias, com a seguinte distribuição:

Tabela 1-Número de animais por localidade

Nome da localidade	Número de animais
Binga	14
Cabango	47
Dziede	36
Kamphessa	77
Liranga	33
Seze	55

Fonte: (Chilundo *et al.*, 2016).

4.4. Colheita de amostras

No presente estudo, foram colhidas um total de 262 amostras de sangue de suínos nas aldeias de Binga, Cabango, Dziede, Kamphessa, Liranga e Seze, do distrito de Angónia, província de Tete.

Os suínos foram contidos usando um laço colocado atrás dos dentes caninos e em torno do focinho, segurados por um auxiliar ou posicionados fisicamente em decúbito lateral para a colheita de sangue. Procedeu-se com a colheita de 5 ml de sangue pela veia jugular, em tubos *vacutainer*, sem anticoagulante para obtenção do soro; a posterior as amostras foram acondicionadas e transportadas em uma caixa isotérmica, mantidos em posição inclinada à temperatura ambiente (cerca de 25°C) por 30 min até que o soro se separasse e depois centrifugados a 5,862G por 10 min. Os soros foram a posterior distribuídos em alíquotas de 2 ml e armazenados em frascos a -20 °C, enviadas ao laboratório central de veterinária para detecção de anticorpos pelo teste serológico ELISA comercial (kit BIONOTE Avian Influenza Virus Antibody ELISA, seguindo as instruções do fabricante (anexo 1).



Figura 8: Colheita de amostra de sangue na veia jugular em leitões de 3 e 15 semanas respectivamente. **Fonte:** (Antão, 2009).

4.5 Procedimento laboratorial

4.5.1 Análise Serológica

Para a detecção de anticorpos contra a nucleoproteína (NP) do vírus da influenza suína foi usado o kit ELISA comercial **BIONOTE Avian Influenza Virus Antibody ELISA**, seguindo as instruções do fabricante (anexo I). O kit era provido de placas pré-revestidas com antígenos virais inativos do VIA.

4.5.2 Critérios de validação do teste

O teste foi validado considerando a média das densidades ópticas onde:

- 1) A média de OD₄₅₀ do controlo negativo (OD_{450NCx}) é superior a 1, 0.
- 2) A média de densidade óptica do controlo positivo (OD_{PC}) superior a - 0,005 e inferior a 0,5000.

- 3) Se qualquer destes valores estiver fora dos parâmetros, o teste é considerado inválido e as amostras devem ser novamente testadas.

4.5.3 Cálculo de Percentagem de Inibição (PI):

- $PI = [1 - (OD_{450} \text{ da amostra} / OD_{450NCx})] \times 100$
- Se o valor PI é menos (-), é considerado como 0.

4.5.4 Interpretação dos resultados:

Valores de $PI \geq 50$ – Positivo

Valores de $PI < 50$ – Negativo.

4.6 Análise de dados

Os resultados obtidos a partir do teste serológico foram inseridos numa planilha do MS Excel (Microsoft Corporation). Esses dados foram utilizados para calcular a prevalência das amostras positivas em cada uma das aldeias. Para o cálculo da prevalência foi utilizando a fórmula descrita por Thrusfield (2007): $P = \text{número de amostras positivas} / \text{número da população em estudo nesse período}$.

Posteriormente, os dados foram exportados para o STATA versão 12.1® (Stata IC 12.1 for Windows), onde foram realizadas as estatísticas descritivas, incluindo frequência, média, desvio padrão e erro com nível de significância de 5%. A análise foi estratificada por aldeia de origem e, quando possível, por idade e sexo dos animais.

5. RESULTADOS

5.1. Detecção do vírus da influenza A, pelo teste sorológico (ELISA)

Com base no teste serológico (ELISA) efectuado neste estudo, do total de 262 amostras testadas, provenientes do distrito de Angónia província de Tete, das localidades de Liranga (33), Kamphessa (77), Binga (14), Dziede (36), Cabango (47) e Seze (55), todas foram negativas. Estes resultados sugerem a não ocorrência da doença nas referidas localidades. De acordo com os resultados obtidos, não foi possível fazer nenhuma inferência estatística sobre a média, desvio padrão, incluindo frequência e o erro.

5.2. Prevalência da Influenza A em suínos em algumas localidades do distrito de Angónia

A prevalência do vírus da Influenza A em suínos nas localidades avaliadas do distrito de Angónia não pôde ser determinada, uma vez que todas as amostras analisadas através do teste serológico ELISA apresentaram resultados negativos para a presença de anticorpos contra o vírus. Estes resultados indicam que, à data da colheita das amostras, não existiam evidências sorológicas de circulação do vírus da Influenza A na população suína estudada.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objectivo detectar a presença do vírus da Influenza A em suínos em algumas localidades do distrito de Angónia, utilizando o método serológico ELISA, e determinar sua prevalência na população estudada. Os resultados obtidos indicaram a ausência de positividade nas amostras analisadas, o que contrasta com estudos anteriores realizados em outras regiões de Moçambique, nos quais a circulação do vírus foi confirmada.

Diversos factores podem ter influenciado a não detecção, incluindo características do sistema de criação na região, o estágio da infecção dos animais testados, a sensibilidade do método diagnóstico empregado e a possível baixa circulação do vírus no momento da colheita. Assim, para uma melhor compreensão dos resultados, a discussão será estruturada em dois subpontos: **detecção da presença do vírus da Influenza A e prevalência da doença na população suína estudada.**

6.1. Detecção da presença do vírus da Influenza A

Os resultados obtidos neste estudo indicaram a ausência de anticorpos contra o vírus da Influenza A em todas as amostras testadas. Esse achado diverge do estudo de Laisse (2017), que detectou o vírus em 84,2% das amostras analisadas em suínos abatidos no sul de Moçambique, com positividade concentrada em sistemas de criação intensivos e semi-intensivos. Essa discrepância pode estar relacionada ao tipo de criação predominante na região estudada, uma vez que, no presente estudo, os suínos eram provenientes de sistemas extensivos, onde a menor densidade animal pode ter limitado a disseminação do patógeno.

No que diz referência ao método diagnóstico utilizado, o teste ELISA, é amplamente empregado para a detecção de anticorpos contra o vírus da Influenza A. Segundo Zanella (2012), sua metodologia baseia-se na reação antígeno-anticorpo, cuja intensidade da coloração é proporcional à quantidade de anticorpos na amostra. No entanto, embora seja um teste comercialmente acessível e de fácil aplicação, apresenta limitações na detecção precoce da infecção.

Estudos comparativos, como o de Yoon *et al.*, (2004), demonstraram que o ELISA pode apresentar sensibilidade reduzida (58%) na identificação de anticorpos contra H1N1, enquanto o teste de Inibição da Hemaglutinação (HI), considerado o Gold-standard (padrão-ouro) para o diagnóstico sorológico da Influenza A, detecta anticorpos mais precocemente. Em condições experimentais, o ELISA apresentou 0% de detecção ao 7º dia de infecção, iniciando a soro conversão apenas a partir do 14º dia (75%) e atingindo 100% no 28º dia. Dessa forma, a ausência de positividade nos testes do presente estudo pode estar

associada a um período de infecção muito recente ou ao facto de que os animais nunca tiverem sido expostos ao vírus.

Além disso, Skibbe *et al.*, (2004) relatou uma concordância de 82,8% a 86,7% entre os testes ELISA e HI, sugerindo que as diferenças nos resultados podem estar relacionadas ao tipo de anticorpo detectado por cada método. Enquanto o ELISA identifica predominantemente IgG, o HI pode detectar tanto IgM quanto IgG, permitindo uma melhor distinção entre infecção recente e infecção passada.

Outro factor relevante é a presença de coinfeções, que podem influenciar a manifestação clínica da Influenza A em suínos. Radostits *et al.*, (2007) destaca que a gravidade da doença pode ser exacerbada quando associada a infecções concomitantes, como pneumonia enzoótica e infecção por ***Ascaris suum***. No entanto, no presente estudo, embora Chilundo *et al.*, (2019) tenha relatado uma prevalência de 12,2% de ***Ascaris suum*** nas mesmas amostras analisadas, não foi observada positividade para Influenza A, sugerindo que a coinfeção não foi um factor determinante para a circulação do vírus na região estudada.

Diante dessas considerações, a ausência de positividade observada pode estar relacionada a diversos factores epidemiológicos e laboratoriais. Para complementar a análise, recomenda-se o uso de técnicas moleculares, como a RT-PCR, que poderiam detectar directamente o material genético viral, fornecendo uma avaliação mais precisa da circulação do vírus na população suína da região.

6.2. Prevalência da Influenza A em Suínos no Distrito de Angónia

A ausência de positividade para Influenza A no presente estudo levanta questionamentos sobre a real prevalência da doença na população suína do distrito de Angónia. A Influenza A é uma infecção de carácter epizootico, podendo apresentar padrões de circulação sazonal ou esporádica, dependendo da dinâmica de transmissão do vírus e das condições epidemiológicas locais.

Estudos prévios realizados em outras regiões indicam que a prevalência da Influenza A pode variar significativamente em função de factores como a densidade animal, o tipo de manejo adoptado e a introdução de novos suínos na vara. Mancini *et al.* (2006) reportou uma taxa de positividade de 85.3% em suínos no Brasil utilizando o teste HI, o que pode estar associado a sistemas de produção mais intensivos, onde a transmissão do vírus ocorre com maior facilidade devido ao contato próximo entre os animais.

No distrito de Angónia, a suinocultura é predominantemente extensiva, caracterizada por uma menor densidade animal e um menor fluxo de movimentação dos suínos. Esse factor pode ter contribuído para a baixa circulação viral observada. Além disso, a ausência de casos clínicos notificados na região durante o período do estudo sugere que a Influenza A pode não estar amplamente disseminada na área ou que surtos anteriores não tenham sido devidamente detectados e reportados.

Outro aspecto importante a considerar é o impacto da metodologia diagnóstica na determinação da prevalência. Como discutido anteriormente, o teste ELISA apresenta limitações na detecção precoce da resposta imunológica e pode não identificar infecções recentes. Assim, a prevalência real da Influenza A na região pode ter sido subestimada, tornando necessário o uso de métodos complementares, como RT-PCR para detecção directa do vírus e inquéritos sorológicos adicionais utilizando o teste HI.

Em suma, os resultados do presente estudo sugerem uma baixa circulação do vírus da Influenza A na população suína do distrito de Angónia. No entanto, essa conclusão deve ser interpretada com cautela, considerando possíveis limitações metodológicas e epidemiológicas. Para uma avaliação mais robusta, recomenda-se a realização de estudos adicionais que incluam testes moleculares, monitoramento contínuo e análise de factores de risco associados à introdução e disseminação do vírus na região.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a prevalência da Influenza A no distrito de Angónia não foi evidenciada no presente estudo. A ausência de positividade nas amostras analisadas sugere que, no momento da colheita, não havia circulação detectável do vírus na população suína estudada.

A Influenza A é um agente de grande importância sanitária e econômica, sendo um dos principais causadores de doenças respiratórias na suinocultura global. Os suínos desempenham um papel fundamental na transmissão interespecie do vírus, pois possuem receptores tanto para estirpes virais humanas quanto aviárias em seu trato respiratório, facilitando a ocorrência de recombinações genéticas que podem originar novas variantes. Dessa forma, o monitoramento contínuo do vírus e a caracterização das estirpes virais circulantes são essenciais para a implementação de estratégias eficazes de prevenção e controle da doença.

A relação entre a epidemiologia do vírus e os sistemas de produção suinícola reforça a necessidade de vigilância epidemiológica estruturada. Métodos de detecção precoce, aliados a uma abordagem integrada de biossegurança, permitem uma resposta rápida a possíveis surtos e auxiliam na compreensão da distribuição espaço-temporal da Influenza A. Essa abordagem não apenas minimiza os impactos econômicos na produção suinícola, mas também contribui para a prevenção de pandemias associadas ao vírus.

8. RECOMENDAÇÕES

Com base nos achados do presente estudo, recomenda-se:

- **Fortalecimento da vigilância epidemiológica:** manter e reforçar a vigilância da Influenza A em suínos na província de Tete e em outras regiões de Moçambique, a fim de compreender melhor a dinâmica da doença no país e estabelecer medidas eficazes de prevenção e controlo, especialmente considerando que o vírus já foi reportado na região sul do país.
- **Realização de estudos adicionais:** conduzir pesquisas complementares que combinem diferentes metodologias diagnósticas, incluindo testes sorológicos (ELISA, HI) e moleculares (RT-PCR), para uma avaliação mais precisa da prevalência da doença e a caracterização das estirpes virais envolvidas.
- **Aprofundamento da análise epidemiológica:** implementar inquéritos epidemiológicos mais abrangentes para avaliar os factores de risco associados à Influenza A na suinocultura local, considerando variáveis como sistemas de produção, movimentação de animais e coinfeções que possam influenciar a disseminação do vírus.
- **Adopção de estratégias integradas de prevenção e controlo:** desenvolver e implementar medidas de biossegurança adaptadas aos diferentes sistemas de criação, visando minimizar os riscos de introdução e propagação do vírus da Influenza A nas varas.
- **Monitoramento contínuo e colaboração interinstitucional:** estabelecer parcerias entre instituições de saúde animal e pública, órgãos reguladores e produtores suínolas para aprimorar o monitoramento da Influenza A e garantir uma resposta rápida e coordenada diante de possíveis surtos.

A adopção dessas medidas contribuirá para uma melhor compreensão da circulação do vírus no país e para o desenvolvimento de estratégias eficazes na mitigação dos impactos sanitários e económicos da Influenza A, tanto na produção suinícola quanto na saúde pública.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander, D.J.; Brown, I.H. (2000). **Recent Zoonoses Caused by Influenza A Viruses**. *Revue Scientifique et Technique*, 19. p. 197-225. <http://doi.org/10.20506/rst.19.1.1220>
2. Andrade, M. R.; Sato, J. P. H.; Takeuti, K. L.; Ciaccizanella, J.; Barcellos, D. E. S. N. (2011). **Influenza em suínos: revisão sobre a doença e seu controle**. *A Hora Veterinária – Ano 31, nº 182*.
3. Antão, C. A. (2009). **Gripe Suína: Estudo-de-caso em quatro suiniculturas intensivas da Comunidade Autónoma da Catalunha, Espanha**. Lisboa. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/277066377> acesso em: 27 de Junho 2019.
4. Biondo, N. (2016). **Etiopatologia do complexo de doenças respiratórias em suínos vacinados para vírus Influenza A**. Lages, Universidade de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação: III. p.139.
5. Brown, I. H. (2000). **The epidemiology and evolution of Influenza viruses in pigs**. *Veterinary Microbiology*, v. 74, p. 29-46.
6. Brown, I.H. (2002). **Los virus A de la Influenza en los cerdos de Europa**. In Morilla, A., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J. (eds.) *Enfermedades víricas emergentes del cerdo*. pp: 37-46, Iowa: Blackwell Publishing.
7. Brooks, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S., Morse, S.A., Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A. (2014). **Microbiologia Médica**. 26ª Ed., ARTMED.
8. Caron, L.; Klein C. (2010). **Recomendações para o controle da Gripe A na suinocultura**. *Acta Scientiae Veterinariae*. Brasil. ISSN 1679-9216, p.53-59.
9. Carrasco, L.; Río, J.M.A. (2006). **Virus Patógenos. Orthomyxoviridae**. Madrid: Editorial Hélice, pp:377-392.
10. Ciacci-zanella, J.R.C.; Vincent, A.L.; Schaefer, R.; Caron, L. (2011). **Influenza em suínos no Brasil: O problema e o que pode ser feito para manter a infecção controlada nas granjas afetadas**. In: VI SINSUI - Simpósio Internacional de Suinocultura. Anais. p. 85-94.
11. Christopher-Hennings J., Erickson G.A., Hesse R.A., Nelson E.A.; Oliveira S. (2012). **Diagnostic tests, test performance, and considerations for interpretation**. p.77-93. In: Zimmerman J.J.; Karriker L.A.; Ramirez A.; Schwartz K.J. & Stevenson G.W. (Eds), *Diseases of Swine*. 10th ed. Iowa State University Press, Ames

12. Chilundo, A. G., Mukaratirwa S.; Pondja, A.; Afonso, S.; Alfredo, Z.; Chato, E.; Johansen, M. V. (2016). **Prevalence and risk factors of endo and ectoparasitic infections in Angónia district.** Mozambique.
13. Chilundo, A. G.; Mukaratirwa S.; Pondja, A.; Afonso, S.; Alfredo, Z.; Chato, E.; Johansen, M. V. (2019). **Smallholder pig farming education improved community knowledge and pig management in Angónia district.** Mozambique, p.1-8.
14. Chu, D. K.W.; Perera, R. A.P.M.; Ali, A.; Oladipo, J. O.; Mamo, G.; So, R. T.Y.; Zhou, Z.; Chor, Y. Y.; Chan, C. K.; Belay, D.; Tayachew, A.; Mengesha M.; Regassa, F.; Lam, N. T.; Poon, L. L.M.; Peiris, M. (2020). **Influenza A Virus Infections in Dromedary Camels, Nigeria and Ethiopia.** 2015-2017. Research Letters. v. 26, p. 4.
15. Clavijo A; Tresnan DB; Jolie, R.; Zhou E.M. (2002). **Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus.** Canadian J Vet Res:66. p.117–121.
16. DIAS, A.S.; (2015). **Influenza A: detecção de anticorpos e subtipos virais em suínos do brasil e estados unidos.** Tese de doutorado em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.
17. Deu, S.B.; (2004). **Avances en tecnologia porcina.** Vol: 1, p. 53-61.
18. Dohoo, I.;Martin, W.; Stryhn, H. (2003). **Veterinary Epidemiology Research.** AVC Inc., Prince Edward Island.
19. Dutra, A. G. S. (2017). **Influenza A e sua importância no contexto Brasileiro e mundial. Pós-graduação em Microbiologia aplicada.** Belo Horizonte. Universidade federal de minas gerais.
20. Detmer S., Gramer M.; Goyal S., Torremorell M.; & Torrison J. (2012). **Diagnostics and surveillance for swine influenza.** Curr. Topics Microbiol. Immunol. DOI: 10.1007/82. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 28.
21. Easterday, B. C.; Van Reeth, K. Swine Influenza. In:Straw, B. E.; D’Allaire, S.; Mengeling, W.L.; Taylor, D.J. E.D. (1999). **Diseases of swine.** 8ª Ed. Ames: Iowa State University Press. p. 277-290.
22. Embrapa (2005). **Influenza Suína: o papel epidemiológico dos suínos nas infecções causadas pelo vírus Influenza.** Rejane Schaefer. Concórdia, SC. ISSN 0101-6245.

23. Embrapa. **Gripe A, recomendações para a prevenção na suinocultura.** Disponível em: <http://www.cnpesa.embrapa.br/influenza/cartilhagripev1.pdf>. Acesso em: 29 de out. 2009.
24. Flores, E. F. (2007). **Virologia Veterinária.** Santa Maria: UFSM, p. 888.
25. Forrest, H.L.; Webster, R.G. (2010). **Perspectives on Influenza evolution and the role of research.** Animal Health Research Reviews 11(1), p. 3-18.
26. Girard, M.P.; TAMB, J.S.; ASSOSSOU, O.M.; KIENY, M.P. (2010). **The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: a review.** Vaccine. V. 28, p. 4895-4902.
27. Gauger P.C.; Vincent A.L.; Loving C.L.; Henningson J.N.; Lager K.M.; Janke B.H.; Kehrl Jr M.E.; Roth J.A. (2012). **Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 Influenza virus.** Vet. Pathol., publicado em Março 28 de 2012.
28. Gramer, M. (2008). **An update on swine Influenza ecology and diagnostics.** In: **39th Annual Meeting of American Association of Swine Veterinarians.** Proceedings. p. 543.
29. Horimoto, T.; Kawaoka, Y. (2005). **Influenza: Lessons from past pandemics, warnings from current incidents.** Nature reviews, microbiology, vol.3, p. 591-600.
30. Homwong, N. (2016). **Bayesian Modeling of Within-Herd Transmission Dynamics of Swine Influenza Virus.** A dissertation submitted to the faculty of the University of Minnesota, p. 229.
31. ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), (2014). **Virus Taxonomy.** Disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acessado em 09 de março de 2020.
32. Instituto Nacional de Estatística (2011). **Censo Agro-Pecuário CAP 2009-2010: Resultados Definitivos.** Disponível em: <http://www.ine.gov.mz/estatisticas>
33. Instituto Nacional de Estatística (2012). **Distrito de Angónia.** Disponível em: <http://www.ine.gov.mz/estatisticas/tete/novembro-de-2012/distrito-de-angonia>. Acesso em 11/10/2019 (20:30).
34. Instituto Nacional de Estatística (2019). **Distrito de Angónia.** Disponível em: <http://www.ine.gov.mz/estatisticas/publicacoes/folheto-distrital/tete/folheto-distrital-angonia-2018.pdf/at-download/file>. Acesso em 14/10/2019 (15:30).
35. Janke, B. H. (2014). **Influenza A virus infections in swine: pathogenesis and diagnosis.** Veterinary Pathology, Vol. 51, n. 2, p. 410-426.

36. Julkunen, I.; Pyhala, R.; Hovi, T. (1985). **Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B virus infections. Purified hemagglutinin in subtype-specific diagnosis.** Journal of virological Methods. Volume: 10. Issue:1. p. 75-84.
37. Kalthoff, D.; Globig, A.; Beer, M. (2010). **Highly pathogenic avian Influenza as a zoonotic agent.** Veterinary Microbiology, V. 140, p.237–245.
38. Koen, J.S. (1919). **A practical method for field diagnoses of swine diseases.** Am J Vet Med: 14, p. 468-470.
39. Kuiken, T.; Riteau, B.; Fouchier, R.; Rimmelzwaan, G.F. (2012). **Pathogenesis of Influenza virus infections: the good, the bad and the ugly.** Current Opinion in Virology: 2, p. 276 – 286.
40. Laisse, C. J. M. (2017). **Detecção do vírus Influenza A e Circovírus suíno tipo 2 de abate no sul de Moçambique.** Programa de pós-graduação em ciências veterinárias Porto alegre. Universidade federal rio grande do sul. p.15-33.
41. Lee, D. C. C.; Zhu, H.; Huang, P. Y.; Peng, L.; Chang, Y. C.; Yip, C, H.; Li, Y. T.; Cheung, C. L.; Compans, R.; Yang, C.; Smith, D. K.; Lam, T. T. Y.; King, C. C.; Guan, Y. (2014). **Emergence and Evolution of Avian H5N2 Influenza Viruses in Chickens in Taiwan.** Journal OF virology. DOI: 10.1128/JVI.00139-14.
42. Lamb R, Krug R. (2001). **Orthomyxoviridae: the viroses and their replication.** Fields virol V.1, p.1487-1531.
43. Lange E.; Kalthoff D.; Blohm U.; Teifke J.; Breithaupt A.; Maresch C.; Starick E.; Fereidouni S.; Hoffmann B, Mettenleiter T. (2009). **Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs.** J Gen Virol; 90:2119-2123.
44. Mancini D.A.P.; Cunha, E.M.S.; Mendonça R.M.Z.; Dias A.L.F.; Castro A.F.; Pinto J.R. & Mendonça R.Z. (2006). **Evidence of swine respiratory infection by influenza viruses in Brazil.** Virus Rev. Res. V.11. p. 39-43.
45. Ministério da administração estatal- **Perfil ambiental distrital de Angónia** (2015).
46. Ministério da agricultura e segurança alimentar. **Anuário de estatísticas e agrárias** (2015). Disponível em: www.masa.gov.mz e E-mail: iaj_masa@yahoo.com.br. p. 53-58.
47. Ministério da agricultura e desenvolvimento rural-**Boletim de estatísticas pecuárias** (2023).
48. Monjane, I. V. A.; Djedje, H; Tamele, E.; Nhabomba, V.; Tivane, R. A.; Massicame, Z. E.; Arone, M. D.; Pastori, A.; Bortolami, A.; Monne, I.; Woma, T.; Lamien, E. C & Dundon, G. W. (2024). **H7N6 highly pathogenic avian influenza in Mozambique,**

- 2023, Emerging Microbes & Infections.** V.13:1, 2321993, DOI: 10.1080/22221751.2024.2321993.
49. Mujoriya, Z. R.; Kishore, D.; Bodla, R. B. (2011). **A review on study of swine flu.** Indo-Global Research Journal of Pharmaceutical Sciences. v. 1, ISSN: 2249-4189, p. 47-48.
50. Munyua, P.; Onyango, C.; Mwasi, L.; Waiboci, W. L.; Arunga, G.; Fields, B.; Mott, J. A.; Cardona, C. J.; Kitale, P.; Nyaga, P. N.; Njenga, K. M. (2018). **Identification and characterization of Influenza A viruses in selected domestic animals in Kenya, 2010-2012.** <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192721>.
51. Neira, V.; Rabinowitz, P.; Rendah, A.; Paccha, B.; Gibbs, S. G.; Torremorell, M. (2016). **Characterization of Viral Load, Viability and Persistence of Influenza A Virus in Air and on Surfaces of Swine Production Facilities.** PLoS One, Vol. 11, n. 1.
52. Olsen, C.W.; Brown, I.H.; Easterday, B.C. & Van Reeth, K. (2006). **Swine Influenza.** In B.E.
53. Pyle, G.F. (1986). **The Diffusion of Influenza: Patterns and Paradigms.** New Jersey: Rowan & Littlefield.
54. Potter, C.W. (2001). **A history of Influenza.** The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology, 91, 572–579.
55. Pondja, A.; Neves, L.; Mlangwa, J.E.; Afonso, S.M.S.; Fafetine, J.; Willingham, A.L.; Thamsborg, S.M.; Johansen, M.V. (2010). **Prevalence and risk factors of porcine cysticercosis in Angónia District, Mozambique.** PLoS. Negl. Trop. Dis. 4, e 594.
56. Quinn, P. J.; Markey, B. K.; Carter, M. E.; Donnelly, W. J.; Leonard, F. C. (2005). **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas.** Porto Alegre: Artmed. p.512.
57. Radostits, O. M.; Gay, C. C.; Hinchcliff K. W. & Constable, P. D. (2007). **Veterinary Medicine A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.** (Ed. 10) Saunders – Elsevie.
58. Rajão, D. D. S. (2012). **Detecção e caracterização de isolados do Vírus da Influenza em suínos no Brasil.** Belo Horizonte, p. 92.
59. Richt, J. A.; Lager, K. M.; Janke, B. H. (2003). **Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States.** J. Clin. Microbiol., v. 41, p. 3198-3205.
60. Romagosa, A.; Allerson, M.; GRAMER, M. (2011). **Vaccination of influenza a virus decreases transmission rates in pigs.** Vet. Res, 42:120.
61. Santos, F. C. D.; Pereira, A. D.; Gatto, I. R. H.; Almeida, H. M. D. S.; Santos, A. C. R. D.; Oliveira, M. E. F.; Oliveira, L. G. D. (2014). **Influenza suína – aspectos**

- actuais no controle e tratamento desta doença emergente.** Revista Científica De Medicina Veterinária-ISSN:1679-7353.
62. Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.V.; WIGG, M.D. (2015). *Virologia Humana*, 3ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. Sobestiansky, J. (2012). **Doenças dos suínos.** 2 ed., Goiania: Cãnone Editorial, p. 355-362.
63. Silvestre, S., Shaefer, R.; Schiochet, M. F.; Silvio, V. S., Caron, L., Ciacci-Zanela, J. R. (2010). **Detecção de anticorpos contra o vírus da Influenza suína em rebanhos suínos.** 4ª Jornada de iniciação científica Embrapa/Unc.
64. Schaefer, R.; Rech R. R.; Silva m. C.; Gava D.; Zanella J. R. C. (2013). **Orientação para diagnóstico de Influenza em suínos.** Pesquisa Veterinária Brasileira, p:61-73.
65. Schaefer, R.; Gava D.; Zanella J. R. C. (2019). **Como identificar e controlar a Influenza em suínos.** Embrapa suínos e aves. ISSN: 0101-6245, p. 36.
66. Skibbe, D.; Zhou E.; Janke, B. (2004). **Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with hemagglutination inhibition assay for serodiagnosis of swine Influenza virus (H1N1) infection.** J Vet Invest 16:86-89.
67. SDAE- Serviço distrital de actividades económica. 2019.
68. Straw, J.J. Zimmerman; S. D'Allaire, D.J. Taylor. (2006). **Diseases of Swine.** 9th Ed. p. 469-479. Iowa, USA: Blackwell Publishing.
69. Smith, T.F.; Burgert, E.O.; Jr, Dowdle, W.R.; Noble, G.R.; Campbell, R.J. & Van Scoy, R.E., (1976). **Isolation of swine influenza virus from autopsy lung tissue of man.** The New England journal of medicine, vol: 294(13), p.708-10.
70. Sreta, D.; Kedkovid, R.; Tuamsang, S.; Kitikoon, P. & Thanawongnuwech, R., (2009). **Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial.** Virology journal, Vol: 25:6(1), p.34.
71. Taubenberger, J., Reid A., Fanning T. (2000). **The 1918 influenza virus: A killer comes into view.** Virology 274:241-245.
72. Torremorell, M.; Allerson, M.; Corzo, C.; Diaz, A. and Gramer, M. (2012). **Transmission of Influenza A Virus in Pigs.** Transboundary and Emerging Diseases, 59: p.68-84. doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01300
73. Tong, S.; Zhu, X.; LI, Y. (2013). **New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses.** PLoS Pathog, V. 9(10): e1003657. doi:10.1371/journal.ppat.1003657.
74. Thrusfield, M. (2004). **Epidemiologia Veterinária.** São Paulo, 2ª edição. Editora Roca. p. 224-247.

75. Van Reeth, K.; Brown, I.; Essen, S., Pensaert, M. (2004). **Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs**, *Virus. Research*, Vol: 103(1-2), p. 115-24.
76. Van-Reeth K. (2007). **Avian and Swine Influenza viruses: our current understanding of zoonotic risk**. *Vet Res*; 38:243-260.
77. Van Reeth, K.; Brown I.H. & Olsen C.W. (2012). **Influenza virus**. In: Zimmerman J.J., Karriker L.A.; Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. (Eds), *Diseases of Swine*. 10th ed. Iowa State University Press, Ames. p. 557-571
78. WANG, R.; Taubenberger, J.K. (2010). **Methods for molecular surveillance of influenza**. *Expert Rev Anti Infect Ther*. v. 8 (5), p. 517–527.
79. Webster, R. G.; Bean, W. J.; Gorman, O. T.; Chambers, T. M., KAWAOKA, Y. (1992). **Evolution and Ecology of Influenza A Viruses**. *Microbiological reviews*, Vol. 56, p. 152-179.
80. Wood, G.W.; Banks, J.; McCauley, J.W.; Alexander, D.J. (1994). **Deduced amino acid sequences of the haemagglutinin of H5N1 avian influenza virus isolates from an outbreak in turkeys in Norfolk, England**. *Archives of virology*, 134, p. 185-194.
81. WHO, World Health Organization. FluNet Summary, **Real-time Influenza virus circulation** (GISRS-FluNet). Disponível em: <http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/updates/summaryreport/en/>. Acesso em: 7 de dezembro de 2020.
82. WHO, World Health Organization. **Influenza (Seasonal) Fact sheet**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>> Acesso em: 20 de novembro de 2019.
83. WHO, World Health Organization. **Programmes and projects. Immunization, vaccines and biologicals: Influenza**. 2008. Disponível em:<<http://www.who.int/immunization/topics/influenza/en/index.html>>. Acesso em: 13 novembro de 2019.
84. WHO, World Health Organization. **WHO recommendations on the composition of Influenza virus vaccines**. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/>> Acesso em: 27 de outubro de 2016.

85. WHO. (2011). **Global Influenza Surveillance Network - Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of Influenza**. World Health Organization.
86. Yoon, K.J; Janke B.H.; Swalla, R.W.; Erickson, G. (2004). **Comparison of a commercial H1N1 enzymelinked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses**. J Vet Diagn Invest 16:197–201.
87. Zanella, J. R. C. (2007). **Gripe suína**. In: Sobestiansky, J.; Barcello, D.E.S.N. (Eds). Doenças dos suínos. 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial. p. 268-270.
88. Zanella, J. R. C. (2012). **Influenza em suínos: situação brasileira e mundial**. V simpósio Brasil Sul de Suinocultura – Chapecó, SC – Brasil.

Anexo

O AIV BIONOTE (vírus da gripe aviária) Ab ELISA é um teste de imuno absorção enzimática competitivo para a detecção qualitativa do anticorpo do vírus da Influenza A mais comum e prevalente em galinha, pato, peru, codorniz, ganso, pintada, perdiz cinzenta, perdiz vermelha, faisão, cisne, cavalo ou suíno.

Princípio do teste

O princípio do teste baseia-se na visualização da reação Ag-Ac através de um segundo Ac conjugado a uma enzima, que promoverá a reação com seu substrato, desenvolvendo cor. A intensidade da coloração está directamente relacionada com a quantidade de anticorpos presentes, que será quantificada pela determinação da densidade óptica da amostra em leitura na microplaca por meio de um espectrofotómetro.

Procedimento do teste ELISA

- 1) Preparar os poços da microplaca para o controlo negativo 3 poços, o controlo positivo 2 poços e cada uma das amostras para cada orifício.
- 2) Adicionar 50 µl de controlo positivo (PC), controlo negativo (NC) e amostras em cada poço.
- 3) Adicionar 50 µl de solução conjugada (pronta a usar) em cada poço contendo PC, NC e amostra.

Nota: Se o número de amostras for superior a 100, adicionar 55 µl da amostra e 55 µl do conjugado na placa de diluição da amostra (não fornecida). Depois disso, adicionar 100 µl da mistura da amostra à microplaca (fornecida).

- 4) Misturar bem num misturador de vibração e cobrir a microplaca com uma folha de placa adesiva.
- 5) Incubar os poços a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 minutos.
- 6) Lavar os poços 6 vezes com 350 µl de solução de lavagem diluída e aspirar todo o líquido dos poços.
- 7) Adicionar 100 µl de substrato (pronto a usar) a cada poço.
- 8) Incubar os poços durante 10 minutos à temperatura ambiente ($18\sim 25^\circ\text{C}$).
- 9) Adicionar 100 µl de solução de paragem a cada poço.
- 10) Ler a absorvência dos poços com um espectrofotómetro a 450 nm com comprimento de onda de referência a 620 nm. A leitura deve ser concluída num intervalo de 30 minutos a partir do final do teste.

Interpretação do resultado e validação do teste

- 1) A média de OD450 do controlo negativo (OD450NCx) é superior a 1, 0.
- 2) A média de OD450 do controlo positivo (OD450PCx) é superior a - 0, 005 e inferior a 0, 5000.
- 3) Se qualquer destes valores estiver fora da gama, o ensaio é considerado inválido e as amostras devem ser novamente ensaiadas.

Cálculo do valor IP

- 1) Calcular o valor de IP (inibição percentual) por cada amostra, usando a fórmula de inibição percentual

$$\text{Valor PI} = [1 - (\text{OD}_{450} \text{ da amostra} / \text{OD}_{450}\text{NCx})] \times 100$$

Por exemplo:

- OD₄₅₀NCx: 2, 040, OD₄₅₀PCx: 0,059,

- OD₄₅₀sample: 1,950

- Valor PI = $[1 - (1.950/2.040)] \times 100 = 4.4 \rightarrow$ esta amostra é considerada negativa

* Se o valor PI é menos (-), é considerado como 0.

Interpretação do resultado

1) Com base no valor PI e nas espécies animais, as amostras são classificadas do seguinte modo:

* Interpretação de amostras de gema de ovo é também o mesmo critério.

Espécie	Galinha	Pato	Perú	Codorniz	Ganso	Ave Guineense	Perdiz Cinza	Perdiz Vermelha	Faisão	Cisne	Cavalo	Suíno
Valor Positivo de PI	≥ 50	≥ 50	≥ 85	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 50
Valor Negativo de PI	<50	<50	<85	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50

2) Utilizar as seguintes diretrizes para estabelecer o estatuto do bando de anticorpos da gripe. Por favor, note que o teste ELISA é um teste de bando e as decisões relativas ao bando não devem ser tomadas em amostras individuais ou em amostras de bando muito pequenas (ou seja, menos de 10 amostras/bando).

Resultado ELISA	Estatuto Presumido Do Bando	Ação Recomendada
Todas as amostras negativas	Sem anticorpos ao AIV	Nenhum. Monitorização contínua (por exemplo, cada 4 a 6 semanas)
Pelo menos 1 amostra positiva	Anticorpos contra o AIV presentes	O estatuto de AIV do bando deve ser confirmado com testes serológicos e isolamento do vírus.

