

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

**ANÁLISE DO VIROMA DE SORO DE MATRIZES SUÍNAS COM PARTOS
NORMAIS E COM NATIMORTALIDADE**

Mestranda: Caroline Tochetto

Porto Alegre

2017

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

**ANÁLISE DO VIROMA DE SOROS DE MATRIZES SUÍNAS COM PARTOS
NORMAIS E COM NATIMORTALIDADE**

Mestranda: Caroline Tochetto

**Dissertação de mestrado apresentada
como requisito parcial ao grau de Mestre
em Ciências Veterinárias, área de
Microbiologia Veterinária – Virologia.**

Orientador: Paulo Michel Roehle

Co-orientadora: Fabiana Quoos Mayer

Porto Alegre

2017

CAROLINE TOCHETTO

**ANÁLISE DO VIROMA DE SOROS DE MATRIZES SUÍNAS COM PARTOS
NORMAIS E COM NATIMORTALIDADE**

Aprovada em 17/03/2017

Pela comissão examinadora

Prof. Dr. Paulo Michel Roehe

Orientador e Presidente da Comissão

Prof.^a Dra. Fabiana Quoos Mayer

Coorientadora e Membro da Comissão

Prof. Dr. Diogenes Dezen

Membro da Comissão

Prof.^a Dra. Franciele Maboni Siqueira

Membro da Comissão

Prof. Dr. Samuel Paulo Cibuslki

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde, pelos desafios impostos e pelo maior presente que é a minha tão amada família.

Aos meus pais, Edson e Rosane, pelo amor incondicional, por terem me mostrado que os desafios são colocados em nossas vidas para nos tornar mais fortes e melhores. Obrigada por acreditarem no meu potencial e confiarem em mim. À minha irmã Maria Isabel, pelo amor e apoio.

Aos meus avós, fonte de amor incondicional, inspiração e pilares da nossa família. Obrigada por todo incentivo, fé e sabedoria.

Ao meu namorado, Luiz, pelo incentivo, amor e compreensão.

Aos meus tios, primos e amigos pelo amor e torcida.

Ao meu orientador, Prof. Paulo, agradeço pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela confiança depositada e por todo aprendizado.

À minha co-orientadora Fabiana por ter aceitado o convite para fazer parte deste trabalho, pela confiança depositada, paciência, parceria e por todo aprendizado.

Aos membros da banca Diogenes, Franciele e Samuel por aceitarem o convite e participarem desse processo.

Aos meus colegas e amigos Ana Paula, Camila, Diane, Márcia, Willian, Cris e Ju H. por estarem sempre dispostos a ajudar, mesmo nas situações mais adversas. Agradeço também pelas risadas, paciência e aprendizado. À antiga colega Candice, por toda ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Virologia do ICBS, obrigada por tudo.

À Prof.^a Sidia, por nos receber e compartilhar seu conhecimento e carisma.

Ao César, pela amizade, aprendizado e por estar sempre pronto para ajudar.

À Lucia e a Ana Cláudia pela amizade e apoio.

À Juliana Comerlato, uma das pessoas responsáveis por despertar meu interesse em virologia, agradeço primeiramente pela incrível amiga que se tornou. Obrigada por sempre estar por perto, pelas risadas e pelo carinho. E também pelo Marcos, que veio de brinde, e se tornou um amigo muito especial.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada!

“Sempre faço o que não consigo fazer, para aprender o que não sei”.

Pablo Picasso.

ANÁLISE DO VIROMA DE SOROS DE MATRIZES SUÍNAS COM PARTOS NORMAIS E COM NATIMORTALIDADE

RESUMO

Falhas reprodutivas são importante causa de prejuízos econômicos na suinocultura. Elas implicam na diminuição do número de leitões nascidos vivos e aumentam o descarte de animais e as taxas de reposição de matrizes, levando à redução da produtividade do rebanho. Embora a maioria dos casos de natimortalidade sejam associados a fatores não infecciosos, os agentes infecciosos possuem um papel importante e ainda pouco conhecido na etiologia deste quadro. Até o presente, nenhum trabalho foi realizado visando o estudo do conjunto de vírus que possam estar presentes em matrizes com eventos de natimortalidade por ocasião do parto. Em função disso, o presente trabalho teve por objetivo examinar o viroma do soro de matrizes suínas com e sem casos de natimortalidade. Foram coletadas 94 amostras de soro de matrizes de seis granjas distribuídas em cinco municípios do Rio Grande do Sul. Em cada granja foram formados dois *pools* de soros: um composto por matrizes que pariram (um ou mais) natimortos e outro por matrizes que pariram leitegadas sem natimortos. Os *pools* foram submetidos à extração de ácido nucleico viral, enriquecimento e sequenciamento de alto desempenho, buscando a identificação de agentes que possam representar um fator de risco à natimortalidade em suínos. Não foi possível identificar diferenças significativas nos viromas de matrizes correlacionadas à ocorrência de natimortalidade. Não obstante, foi possível identificar uma ampla variedade de genomas virais, a maioria deles correspondendo a vírus das famílias *Anelloviridae*. Este estudo permitiu ainda identificar 20 genomas completos de três espécies de vírus: torque teno vírus suíno 1a e 1b, circovírus suíno tipo 3 (PCV3) e vírus circulares DNA fita simples codificantes de replicase (CRESS), seis dos quais até o presente ainda não reportados em suínos. Em duas granjas, em matrizes que apresentaram natimortalidade, foram identificados genomas de PCV3, cuja participação como potencial causador de problemas reprodutivos precisa ser futuramente investigada. Não foram identificados vírus com genoma de RNA. Este estudo traz uma contribuição ao conhecimento do viroma em soros de matrizes suínas e, paralelamente, busca contribuir para o esclarecimento das possíveis causas de natimortalidade de origem infecciosa em suínos.

Palavras chave: Suíno. Problemas reprodutivos. Metagenômica. Sequenciamento de alto desempenho.

VIROME ANALYSIS ON SERA OF SOWS WITH AND WITHOUT CASES OF NATIMORTALITY

ABSTRACT

Reproductive failure in swine herds is an important cause of economic losses. It leads to a decrease in the number of piglets reared per sow and may imply in the need for replacement of sows, reducing the productivity in a herd. Although the majority of cases of stillbirths have been attributed to non-infectious causes, several infectious agents have been implicated in the etiology of such condition. Nevertheless, other as yet unknown agents may be involved in the pathogenesis of stillbirths. The aim of this work was to investigate the virome in sera of sows without and with one or more cases of stillbirth in the litter. Sera were collected from 94 sows of six commercial farms in five municipalities in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Two pools of sera were collected from each farm: one representative of sows that had at least one stillbirth in the last litter and another composed by sera of sows that had litters with no stillbirths. The pools were subjected to nucleic acid extraction, enrichment and high throughput sequencing. No significant differences were detected in the serum viromes of sows with or without stillbirth. Nevertheless, it was possible to identify a wide variety of viral genomes, most of these representing viruses of Anelloviridae family. In addition, the present work allowed the identification of 20 complete genome sequences including torquetoena virus 1a and 1b, porcine circovirus 3 (PCV3) and circular rep-encoding ssDNA viruses (CRESS), including six species not previously reported in swine. In two farms, PCV3 genomes were identified in the serum pools of sows which had cases of stillbirth. The role for this virus as a potential cause of reproductive failure needs additional investigations. No genomes of viruses with RNA genomes were identified. This study provides a contribution to the knowledge on the serum virome of pregnant sows. In addition, it is expected to aid in the identification of possible causes of stillbirth in swine.

Keywords: Pig. Reproductive failure. Metagenomic. NGS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração gráfica do número de publicações de estudos sobre metagenômica viral.	20
Figura 2. Mapa político do Estado do Rio Grande do Sul com a localização dos municípios onde as coletas foram realizadas.....	25
Figura 3. Esquema ilustrando a sequência de procedimentos realizados no preparo das amostras	26
Figura 4. Fluxograma exemplificando a metodologia utilizada nesse estudo a partir das reads obtidas no sequenciamento.....	29
Figura 5. Representação gráfica das sequências virais detectadas nos pools de matrizes sem (a) e com (b) casos de natimortalidade	33
Figura 6. Representação gráfica da análise de componentes principais (ACP).....	36
Figura 7. Representação gráfica 12 genomas de TTSuV identificados por metagenômica nesse estudo.	41
Figura 8. Análise filogenética baseada no método de Maximum Likelihood com bootstrap de 1000 réplicas dos genomas do TTSuV 1a e TTSuV 1b	444
Figura 9. Representação gráfica dos genomas de PCV3 identificados por metagenômica no soro de matrizes com casos de natimortalidade.	46
Figura 10. Análise filogenética dos genomas do PCV3 identificados no soro de matrizes suínas (losango vermelho) baseada no método de Maximum Likelihood e no modelo TN93+G com bootstrap de 1.000 réplicas..	47
Figura 11. Representação gráfica dos seis novos genomas de vírus CRESS-DNA identificados nesse estudo.	50
Figura 12. Análise filogenética dos vírus CRESS-DNA baseada na sequência de aminoácidos da Rep.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de amostragem	25
Tabela 2. Número de <i>reads</i> sequenciadas por <i>pool</i>	31
Tabela 3. Número total de <i>contigs</i> montados e apresentando similaridade com sequências de aminoácidos virais depositadas no GenBank.....	31
Tabela 4. Sequências virais identificadas com maior frequência no soro de matrizes com parto normal e com eventos de natimortalidade.....	37
Tabela 5. Informações sobre os genomas virais completos identificados por metagenômica no soro de matrizes com natimortalidade (G_N) e sem natimortalidade (G_S)	40
Tabela 6. Genomas de CRESS-DNA identificados nesse estudo no soro de matrizes com e sem casos de natimortalidade.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa: aminoácido

ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal

ACP: análise de componentes principais

ADV: vírus da doença de Aujeszky (*Aujeszky's disease virus*)

BSA: albumina do soro bovino (*bovine serum albumin*)

Cap: proteína do capsídeo

cDNA: DNA complementar

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CRESS-DNA: *circular Rep-encoding ssDNA*

CSFV: vírus da peste suína clássica (*classical swine fever virus*)

DNA: ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados (*deoxynucleotide triphosphates*)

DP: desvio padrão

DTT: *dithiothreitol*

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético (*ethylenediamine tetraacetic acid*)

EMCV: vírus da encéfalomiocardite (*encephalomyocarditis virus*)

GRSC: Granjas de Reprodutores Suínos Certificada

HTS: sequenciamento de alto desempenho (*high throughput sequencing*)

ICTV: Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*International Committee on
Taxonomy of Viruses*)

kb: mil pares de base

MDA: amplificação de deslocamento múltiplo (*multiple displacement amplification*)

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro (*messenger RNA*)

NaCl: cloreto de sódio

NCBI: Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*Nacional Center for
Biotechnology Information*)

ng: nanograma

NJ: *neighbor-joining*

nm: nanômetro

nmol: nanomol

Nº: número

nt: nucleotídeo

ORF: fase aberta de leitura (*open reading frame*)

PCA: principal components analysis

PCR: reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)

PCV2: Circovírus suíno tipo 2 (*porcine circovirus type 2*)

PCV3: Circovírus suíno tipo 3 (*porcine circovirus type 3*)

PDNS: Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (*Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*)

PEV: enterovírus suíno

pH: potencial hidrogeniônico

PoSCV: *porcine serum-associated virus*

PPV: parvovírus suíno

PRRSV: Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*)

PSC: peste suína clássica

Rep: proteína da replicase

RNA: (ácido ribonucleico) (*ribonucleic acid*)

rpm: rotações por minuto

SPF: Livre de Patógenos Específicos (*specific pathogens free*)

ssDNA: *single strand DNA* (DNA de fita simples)

TE: Tris-EDTA

TEN: Tris-EDTA Cloreto de sódio

TTV: torque teno vírus

TTSuV: torque teno vírus suíno (*torque teno sus virus*)

U: Unidade

UPLs: unidades produtoras de leitão

UPV1: *ungulate protoparvovirus 1*

UTR: região não traduzida

μL: microlitro

μm: micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Problemas reprodutivos em suínos	14
2.2 Desafio no diagnóstico de agentes virais potencialmente patogênicos	18
2.3 Metagenômica	19
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Amostragem	24
4.2 Preparo das amostras para o sequenciamento	27
4.3 Sequenciamento	28
4.4 Análise do sequenciamento	28
4.5 Análise filogenética	29
4.6 Análise estatística	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Visão geral do viroma de soros de matrizes	31
5.2 Análise dos viromas em matrizes com e sem natimortos	35
5.3 Genomas virais completos	39
6. CONCLUSÕES	54
7. PERSPECTIVAS	55
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo e representa quase metade do consumo e da produção de carnes. Essa cadeia produtiva representa um dos melhores desempenhos econômicos do Brasil no cenário internacional (MIELE; WAQUI, 2007), já que o país é o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína. Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), a produção nacional em 2014 foi da ordem de 3,3 milhões de toneladas (3,02% do total da produção mundial), ficando atrás apenas da China, União Europeia e Estados Unidos da América (ABPA, 2016). De 2008 a 2014, houve um aumento de 14,7% na produção de suínos em nível nacional, com cerca de 505 mil toneladas exportadas em 2014 para 14 países. A região sul é responsável por quase 70% do total de suínos abatidos por ano, sendo o Rio Grande do Sul o segundo maior produtor nacional (ABPA, 2016).

A expansão da indústria suinícola e a intensificação da atividade levaram ao agravamento nos problemas sanitários dos rebanhos e as falhas reprodutivas ganharam destaque tornando-se a maior causa de prejuízo econômico no setor (MORÉS *et al.*, 2011). Problemas reprodutivos reduzem a produtividade do rebanho, principalmente pela diminuição do número de leitões nascidos vivos e pelo aumento do descarte de animais e das taxas de reposição de matrizes (PESCADOR, 2008). Acredita-se que 60% a 70% dos problemas reprodutivos são de origem não infecciosa e 30% a 40% dos casos de origem infecciosa. Muitos vírus têm sido associados a esses problemas em diversas partes do mundo, porém até o momento, somente agentes específicos foram pesquisados.

Com o advento do sequenciamento de alto desempenho e a facilidade de acesso a essa tecnologia, tornou-se possível a realização de uma pesquisa mais abrangente acerca da diversidade viral que compõe determinada amostra e, desde então, vários novos vírus têm sido descobertos (MOKILI *et al.*, 2012; ROSARIO; BREITBART, 2011). O objetivo desse trabalho foi caracterizar o viroma do soro de matrizes suínas com e sem casos de natimortalidade através da aplicação do sequenciamento de alto desempenho (plataforma Miseq – Illumina®), buscando a identificação de novos ou inesperados agentes que possam representar um fator de risco para a natimortalidade em suínos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Problemas reprodutivos em suínos

Falhas reprodutivas na fêmea suína podem ser manifestadas por retorno irregular ao estro, abortamento e aumento no número de leitões inviáveis ao nascimento (GIVENS; MARLEY, 2008). As taxas de natimortalidade reportadas em criações suinícolas comerciais variam de 3% a 8% (ZALESKI; HACKER, 1993; LUCIA JR. *et al.*, 2002; BORGES *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2015) e frequentemente estão associadas à hipóxia grave durante o parto (VAN DIJK *et al.*, 2005). No entanto, muitas vezes a causa é multifatorial (VANDERHAEGHE *et al.*, 2013) visto que muitos desses problemas estão correlacionados (ZALESKI; HACKER, 1993) o que torna o diagnóstico difícil.

O período fetal inicia ao redor dos 35 dias de gestação quando o tecido ósseo começa a ser formado. A mumificação fetal ocorre quando fetos mortos entre o 35º e o 100º dia de gestação ficam retidos dentro do útero e desidratam (SOBESTIANSKY *et al.*, 2012). Os natimortos são leitões que morreram e foram expulsos após os 100 dias de gestação, idade na qual teriam condições de viver normalmente, e apresentam a aparência de um feto saudável. A morte pode ocorrer antes do fim do parto (morte pré-parto) ou durante o parto (morte intraparto) (ALMOND *et al.*, 2006).

Duas principais classes de falhas reprodutivas são reconhecidas em suínos (ALMOND *et al.*, 2006). A primeira categoria é representada pelas causas não-infecciosas – responsáveis por 60% a 70% dos problemas reprodutivos – e incluem vários procedimentos de manejo que podem influenciar no desempenho reprodutivo do plantel, assim como características genéticas dos animais. O segundo grupo é representado por agentes infecciosos que causam infecção primária no trato reprodutivo ou infecção sistêmica, e são responsáveis por 30% a 40% dos casos de aborto, mumificação e natimortalidade (SOBESTIANSKY *et al.*, 2012).

2.1.1 *Causas não infecciosas de natimortalidade*

As causas não infecciosas de natimortalidade são frequentemente multifatoriais e de difícil diagnóstico, além de contabilizarem a maior parte das perdas econômicas na maioria das granjas suinícolas (HOLLER, 1994). Fatores ambientais, genéticos, maternos, nutricionais, de manejo e toxinas compõem essa categoria.

Dentre os fatores genéticos associados à natimortalidade, foi evidenciado que a raça das fêmeas possui influência na taxa de natimortos. Algumas raças com duração de parto menor, como Dutch Landrace, e mestiços Large White x Meishan, apresentaram taxas de natimortalidade mais baixas (VAN DIJK *et al.*, 2005). A associação positiva entre a duração do parto e a natimortalidade evidenciada em alguns trabalhos (BORGES *et al.*, 2005; VAN DIJK *et al.*, 2005) pode se dar devido ao maior risco de hipóxia para os leitões, desprendimento da placenta e ruptura do cordão umbilical (HERPIN *et al.*, 1996; HERPIN *et al.*, 2001).

Fatores maternos envolvem a condição corporal da fêmea, número de partos, duração da gestação, duração do parto e tamanho da leitegada. Fêmeas com nível elevado de gordura corporal e com leitegadas maiores têm maior predisposição ao aumento da duração do parto (LE COZLER *et al.*, 2002; VAN RENS; VAN DER LENDE, 2004), o que aumenta o risco de natimortalidade (HERPIN *et al.*, 1996). A ordem crescente de partos também está associada com maior taxa de natimortos (CANARIO *et al.*, 2006; LE COZLER *et al.*, 2002), embora fêmeas nulíparas possam ter alta porcentagem leitões natimortos (LEENHOUWERS *et al.*, 1999; BORGES *et al.*, 2005). O intervalo prolongado entre nascimentos, e o baixo peso dos leitões ao nascimento, também foram considerados fatores de risco para o nascimento de natimortos (ZALESKI; HACKER, 1993).

Os fatores ambientais envolvem a supervisão e assistência durante o parto, estresse ambiental e indução de parto. O aumento da temperatura ambiente eleva a concentração sérica de cortisol e induz maior estresse nas fêmeas (MACHADO-NETO *et al.*, 1987); assim temperaturas maiores do que 22 °C aumentam o risco de natimortalidade (VANDERHAEGHE *et al.*, 2010). Outro fator associado é a insuficiência de ventilação, que promove o acúmulo de gases tóxicos, como o monóxido de carbono, podendo levar as fêmeas a desenvolverem hipóxia (CARSON *et al.*, 2006). Problemas reprodutivos por deficiências nutricionais agudas são raros na suinocultura moderna; por outro lado, as contaminações com micotoxinas são cada vez mais frequentes. As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos. Uma das principais micotoxinas, a zearalenona (ZEA), é sintetizada por fungos do gênero *Fusarium*. Trata-se de uma micotoxina estrogênica de frequente ocorrência no Sul do Brasil (SALAY; MERCADANTE 2002). Os sinais clínicos clássicos da intoxicação por ZEA são edema e hiperemia de vulva, podendo também ocorrer prolapso retal ou vaginal decorrente do relaxamento dos esfíncteres (MOSTROM

et al., 2007). De acordo com registros diagnósticos de laboratórios especializados, a aflatoxina B1 (produzida por algumas espécies do gênero *Aspergillus*), tem sido relatada com certa frequência em casos de aflatoxicose em suínos. Os animais apresentam queda no consumo de ração e redução de crescimento (NÄÄS *et al.*, 2014)

2.1.2 Causas infecciosas de natimortalidade

Por muito tempo, as perdas reprodutivas em criações suínolas comerciais foram associadas a fatores ambientais, genéticos, nutricionais e agentes tóxicos (RASBECH, 1969). Ao final dos anos 1960, com o avanço das pesquisas em virologia, a correlação de problemas reprodutivos com agentes infecciosos passou a ser mais compreendida e descrita (DUNNE, 1970). A maioria dos patógenos envolvidos com problemas reprodutivos em suínos são vírus (GIVENS; MARLEY 2008) capazes de causar doença clínica na fêmea suína adulta ou atravessar a barreira transplacentária e infectar o feto (PESCADOR, 2008).

Vários agentes infecciosos têm sido associados a casos de falhas reprodutivas em suínos em todo mundo. Dentre eles o *ungulate parvovirus 1* (UPV1) (anteriormente denominado parvovírus suíno, PPV) (WALDVOGEL *et al.*, 1995; MORÉS *et al.*, 2011), o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV, *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*) (ROSSOW *et al.*, 1996; SCRUGGS; SORDEN, 2001, MALDONADO *et al.*, 2005), enterovírus suíno (PEV, *porcine enterovirus*) (KIRKBRIDE; MCADARAGH, 1978), vírus da doença de Aujeszky (ADV, *Aujeszky's disease virus*) (SOBESTIANSKY *et al.*, 2012), vírus da encéfalo miocardite (EMCV, *encephalomyocarditis virus*) (ROEHE *et al.*, 1985), vírus da peste suína clássica (CSFV, *classical swine fever virus*), vírus da Influenza (VANNIER, 1999) e o circovírus suíno tipo 2 (PCV2, *porcine circovirus type 2*) (MORÉS *et al.*, 2011; HOLLER, 1994; PENSAERT *et al.*, 2004, ALMOND *et al.*, 2006; SOBESTIANSKY *et al.*, 2012). No fim do ano de 2016, foi sugerido que um novo circovírus, denominado circovírus suíno tipo 3, poderia estar relacionado com casos de aborto em suínos, porém mais estudos são necessários para esclarecer seu papel no desenvolvimento desses quadros (PALINSKI *et al.*, 2016)

Além dos vírus supracitados, outros patógenos podem infectar o trato reprodutivo das fêmeas, como *Chlamidia sp.*, *Leptospira spp.*, *Brucella suis* e *Toxoplasma gondii*. Agentes infecciosos relatados com menor frequência incluem o citomegalovírus,

rubulavírus, menangle vírus, vírus da encefalite japonesa, vírus da peste suína africana, *Mycoplasma suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Streptococcus suis* (MARLEY; GIVENS, 2008). A peste suína africana, a síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS) e a encefalite japonesa são doenças exóticas no Brasil (SOBESTIANSKY *et al.*, 2012).

A maior parte do território brasileiro é considerada livre de peste suína clássica (PSC), sendo as regiões norte e nordeste as que registraram surtos mais recentes (FREITAS *et al.*, 2012, OLIVEIRA *et al.*, 2014). O último foco de PSC registrado no Brasil ocorreu no ano de 2009 (BRASIL, 2016). Por outro lado, a peste suína africana foi registrada no Brasil na década de 1980, onde somente um caso ocorrido no município de Paracambi (RJ) foi confirmado. Desde então, não houve mais casos da doença (TOKARNIA *et al.*, 2004). A doença de Aujeszky tem sido relatada no rebanho brasileiro desde 1912, e, em determinadas regiões ocorre de forma esporádica (SCHAEFER *et al.*, 2006; CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2008). No Brasil, o uso da vacina contra essa doença é controlado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). No sul do País, não há relatos da doença desde 2004 (CIACCI-ZANELLA, 2008).

Na Espanha, o PRRSV foi o principal agente envolvido em casos de aborto tardio, enquanto que o ADV, UPV1 e PCV2 tiveram um impacto menor (MALDONADO *et al.*, 2005). Embora o PRRSV esteja presente em rebanhos suínos de todo o mundo, inclusive na América do Sul (RAMIREZ *et al.*, 2008), e existam estudos epidemiológicos em vários planteis de granjas, este vírus nunca foi relatado no Brasil (CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2004; MASSA *et al.*, 2014).

No Brasil, um estudo retrospectivo associou a co-infecção por PCV2 e UPV1 a lesões cardíacas mais graves em fetos natimortos, o que indica uma possível ação conjunta destes agentes (PESCADOR *et al.*, 2008). Morés e colaboradores (2011) verificaram maior frequência de fetos natimortos positivos para PCV2 e menor frequência para UPV1. No mesmo estudo, o exame sorológico realizado nas porcas foi negativo para PRRSV, doença de Aujeszky, peste suína clássica, brucelose, leptospirose e toxoplasmose.

Embora alguns estudos tenham constatado baixa frequência de agentes infecciosos em casos de natimortalidade (BORGES *et al.*, 2005; MALDONADO *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2015), os mesmos pesquisaram agentes conhecidos específicos por meio de técnicas de diagnóstico convencionais. Todavia, até o presente momento, nenhum trabalho foi realizado visando a investigação molecular de

todos os agentes infecciosos que possam estar envolvidos em casos de natimortalidade. Além disso, nos últimos anos, novos vírus têm sido identificados em suínos, inclusive em tecidos de fetos abortados (HIJIKATA *et al.*, 2001; XIAO *et al.*, 2013; NI *et al.*, 2014, PALINSKI *et al.*, 2017). Isso leva ao questionamento se esses agentes estariam envolvidos em problemas reprodutivos e que tipo de relação poderia haver entre eles. Nesse contexto, a caracterização do viroma do soro de matrizes suínas com e sem casos de natimortalidade e identificação de possíveis vírus associados a este desfecho se torna importante.

2.2 Desafio no diagnóstico de agentes virais potencialmente patogênicos

Os micro-organismos representam a maior parte da biodiversidade do planeta. Estima-se que somente as bactérias chegam ao número de 5×10^{30} células (WHITMAN *et al.*, 1998), enquanto o número de partículas virais chega a 10^{31} (MOKILI *et al.*, 2012). No entanto, apesar do número significativamente elevado, menos de 1% dos agentes virais (KENNEDY *et al.*, 2010) e bacterianos (PHAM; KIM, 2012) podem ser cultivados.

Os vírus podem ser identificados por uma ampla variedade de técnicas as quais se baseiam principalmente na comparação com vírus já conhecidos. Historicamente, as técnicas clássicas de detecção viral se baseavam no isolamento do agente em cultivos celulares e observação do efeito citopático, microscopia eletrônica, e na inoculação intracerebral de camundongos lactentes. Mais tarde, métodos imunológicos como a soroneutralização e a hemaglutinação, passaram a ser usados para detectar antígenos virais relacionados em diferentes tipos de amostra (TEMMAM *et al.*, 2014). Embora muitos vírus conhecidos atualmente tenham sido identificados primeiramente por essas técnicas, esses métodos possuem limitações, uma vez que a maioria dos vírus não pode ser cultivada em laboratório por métodos convencionais (AMANN *et al.*, 1995; BEXFIELD; KELLAM, 2011).

O avanço da biologia molecular trouxe novas técnicas que permitiram a identificação de vírus não cultiváveis. Dentre essas técnicas, a PCR e alguns métodos de hibridização tornaram-se as principais ferramentas para o descobrimento de novos vírus (BEXFIELD; KELLAM, 2011). Ainda assim, elas apresentam como desvantagem a necessidade de conhecimento prévio do genoma de vírus similares (DELWART, 2007; TEMMAM *et al.*, 2014). Tendo em vista estas limitações, outras abordagens tornaram-se

necessárias para a identificação de novos ou insuspeitos agentes infecciosos, tais como a metagenômica, que será comentada a seguir (SVRAKA *et al.*, 2010).

2.3 Metagenômica

Em 1998, Handelsman e colaboradores usaram pela primeira vez o termo “metagenoma” para descrever o conjunto de informações genômicas de todos os microorganismos (microbioma) presentes em uma amostra de solo, incluindo que aqueles não puderam ser isolados (HANDELSMAN *et al.*, 1998). A partir disso, a palavra metagenômica tem sido usada para caracterizar a análise molecular do conjunto de microorganismos que compõem amostras biológicas ou ambientais (DELWART, 2007). Por sua vez, o termo viroma corresponde a parte do microbioma relacionada a todo material genético viral presente em determinada amostra (VIRGIN, 2014).

Os vírus representam a entidade biológica mais abundante e o maior reservatório da diversidade genética da Terra (STANO *et al.* 2016). Estima-se que o viroma de mamíferos compreenda em torno de 330.000 espécies de vírus eucarióticos; como a maior parte do viroma consiste em vírus procarióticos (fagos) o número total de vírus existentes é ainda maior (ANTHONY *et al.*, 2013; REYES *et al.*, 2012).

Inicialmente, os metagenomas eram estudados por meio da clonagem dos fragmentos de DNA e sequenciamento pelo método de Sanger (SANGER *et al.*, 1977). Depois, com os avanços das técnicas de sequenciamento, isso passou a ser feito de forma mais rápida através do sequenciamento do DNA sem a necessidade de clonagem (DESAI *et al.*, 2012; SCHOLZ *et al.*, 2012), o que permitiu uma investigação mais profunda e em maior resolução dos viromas (DELWART, 2007; EDWARDS; ROHWER, 2005). O sequenciamento de alto desempenho (HTS, *high throughput sequencing*) permite a exploração de comunidades virais por meio da geração de uma grande quantidade de dados (SCHOLZ *et al.*, 2012, MOROZOVA; MARRA, 2008). Essa tecnologia tem se mostrado uma poderosa ferramenta para a investigação de agentes de etiologia desconhecida e identificação de novas espécies virais (MOKILI *et al.*, 2012; ROSARIO; BREITBART, 2011). O sequenciamento de alto desempenho tornou possível acessar virtualmente todos os genomas virais presentes em determinada amostra, seja de origem ambiental ou biológica. Os fragmentos de ácidos nucleicos extraídos são amplificados, sequenciados e analisados com ferramentas de bioinformática, sendo então comparados com as sequências já disponíveis nos bancos de dados genômicos (MEYER *et al.*, 2008).

A técnica consiste basicamente em quatro passos: (1) concentração e purificação das partículas virais da amostra, (2) extração e enriquecimento dos ácidos nucleicos, (3) sequenciamento de alto desempenho, e (4) análise computacional (ZHANG *et al.*, 2014).

Nos últimos anos houve um crescimento significativo de estudos na área de metagenômica viral (Figura 1). Desde a primeira aplicação da técnica em amostras marinhas em 2002 (BREITBART *et al.* 2002), estudos nessa área têm sido aplicados em uma ampla variedade de amostras (HAYES *et al.* 2017).

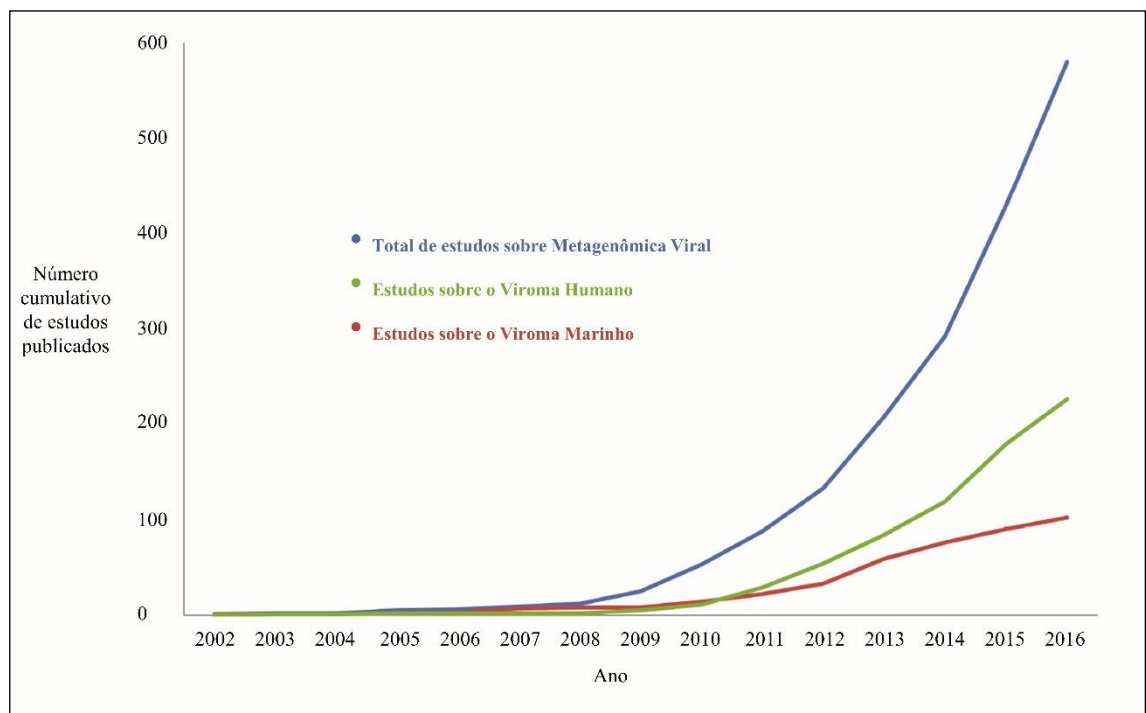


Figura 1. Ilustração gráfica do número de publicações de estudos sobre metagenômica viral a partir do ano de 2002 até o final de 2016. O número total cumulativo de estudos está representado em azul. O número de estudos sobre o viroma humano está representado em verde, e estudos sobre o viroma marinho em vermelho. O número de estudos foi determinado através de uma pesquisa realizada no PubMed. Adaptado de Hayes *et al* (2017).

O número de estudos publicados sobre metagenômica aumentou de 11, em 2002, para mais de 10.000 em 2017 (HAYES *et al.* 2017). Hoje, existem milhares de sequências genômicas virais conhecidas. O banco de dados de sequências de genomas de vírus do NCBI (*National Center for Biotechnology Information - Viral Genome Resources*) contém mais de 5.600 genomas virais de referência (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid%410239>) (STANO *et al.*, 2016). Mais de 2 milhões de sequências virais estão depositadas no banco de dados de nucleotídeos do NCBI

([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=txid10239\[Organism:exp\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=txid10239[Organism:exp])). Muito mais do que a produção massiva de dados de sequenciamento, esses estudos fornecem continuamente informações importantes que ajudam na compreensão da relação genômica existente entre o perfil funcional, filogenético e evolutivo de comunidades microbiológicas, além de facilitar o descobrimento de novos genes e enzimas (THOMAS *et al.* 2012).

A metagenômica viral tem sido usada frequentemente para o descobrimento e caracterização genética de novos e numerosos vírus (ALLANDER *et al.*, 2007; DELWART, 2012; GRARD *et al.*, 2012; WYLIE *et al.*, 2012, TEMMAM *et al.*, 2014). Em suínos, foram realizados estudos descrevendo o viroma de fezes de animais aparentemente saudáveis (AMIMO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016; HAUSE *et al.*, 2016; PALINSKI *et al.*, 2016), de suabe nasal (HAUSE *et al.*, 2016), de linfonodos de animais saudáveis e com síndrome multissistêmica do definhamento (BLOMSTRÖM *et al.*, 2016), e ainda de fezes de suínos saudáveis em comparação com o viroma de fezes de animais com diarreia (SHAN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014). Em amostras de soro de suínos, até o momento apenas um estudo foi realizado, como parte de um programa de vigilância epidemiológica na África (MASEMBE *et al.*, 2012).

Novos genomas virais foram identificados, dentre eles o PCV3 (PHAN *et al.*, 2016; PALINSKI *et al.*, 2017), o parvovírus suíno tipo 7 (PALINKSKI *et al.*, 2016), além de vários vírus circulares DNA fita simples codificadores de replicase (CRESS-DNA, *circular Rep-encoding ssDNA*) (CHEUNG *et al.*, 2013; CHEUNG *et al.*, 2014; CHEUNG *et al.*, 2015). Até o momento, a identificação e caracterização destes vírus foram realizadas exclusivamente através de seus genomas. Consequentemente, ainda pouco se sabe sobre a patogenicidade dos mesmos; igualmente, dados epidemiológicos sobre a ocorrência dessas infecções são escassos ou inexistentes.

Nenhum estudo envolvendo metagenômica havia sido conduzido em soro de matrizes suínas até o momento deste trabalho; além disso, esta abordagem ainda não havia sido aplicada na busca de vírus com potencial para causar natimortalidade. Por isso, o objetivo desse estudo foi aplicar a análise metagenômica em soros de matrizes suínas sem e com apresentação de natimortalidade, visando caracterizar o viroma presente nessas amostras e encontrar possíveis associações com o desfecho observado.

Na presente dissertação, primeiramente será abordado o resultado geral do sequenciamento e a relação entre o viroma de matrizes com e sem casos de

natimortalidade; num segundo momento serão descritos os genomas completos identificados nesse estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento do viroma de matrizes suínas, com e sem casos de natimortalidade.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Aplicar análise metagenômica em amostras de soro de matrizes com e sem casos de natimortalidade;

3.2.2 Caracterizar o viroma presente nestas amostras;

3.2.3 Comparar o viroma de matrizes suínas com e sem parição de natimortos;

3.2.4 Analisar os genomas virais obtidos e compará-los com outros agentes previamente reportados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram previamente consentidos pelos proprietários das granjas através de um termo de colaboração. Esse trabalho foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (CEUA-IPVDF) – nº 16/2015.

Foram coletadas amostras de soro de matrizes suínas em seis unidades produtoras de leitão (UPLs) comerciais localizadas em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 2). Através da venopunção na veia auricular foram coletados cerca de 3mL de sangue em tubos sem anticoagulante. As UPLs foram selecionadas pela empresa integradora. Os animais do rebanho eram provenientes de Granjas de Reprodutores Suínos Certificada (GRSC) livres de brucelose, tuberculose, doença de Aujeszky, peste suína clássica, sarna, e controladas para leptospirose. Além disso, os animais eram vacinados contra parvovírus suíno, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira* sp., colibacilose, circovírus suíno tipo 2 e *Haemophilus parasuis*. A taxa de natimortalidade registrada nas granjas no semestre anterior às coletas variou de 4,1% a 7,5%, sendo considerado aceitável pelas granjas uma taxa de até 5%. As coletas foram realizadas com equipes envolvendo os pesquisadores do laboratório. As visitas às granjas tiveram duração de até 26 horas para o acompanhamento dos partos, de forma que as matrizes eram marcadas de acordo com o quadro exibido naquele evento (com ou sem natimortos) para, em seguida, ser realizada a coleta do soro. Os leitões foram considerados natimortos quando aparentavam idade gestacional avançada, ou seja, boa formação física e sem sinais de decomposição. Além disso, foi realizado o teste de flutuação dos pulmões sendo deixados fora do estudo os leitões cujo pulmão flutuasse (ALMOND *et al.*, 2006)

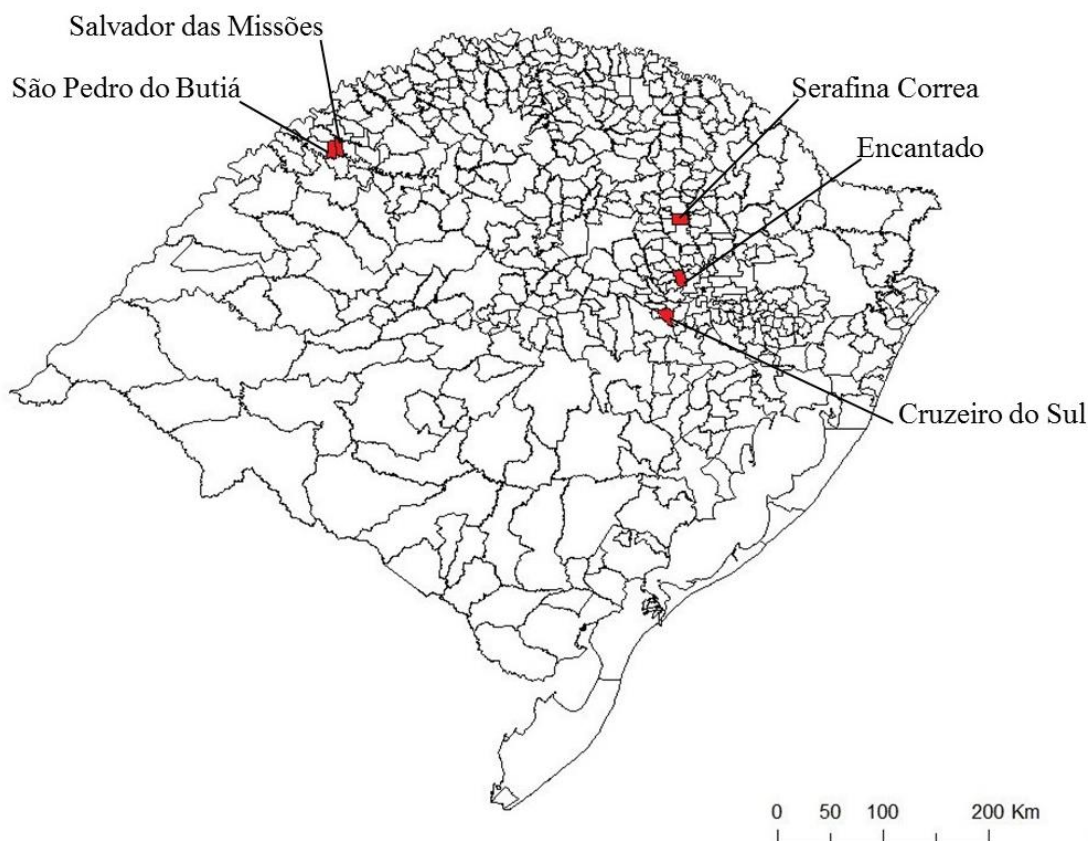


Figura 2. Mapa político do Estado do Rio Grande do Sul com a localização dos municípios onde as coletas foram realizadas.

O número de granjas e de amostras foi determinado com base em achados de literatura (MASEMBE *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014). Para a obtenção das amostras foram selecionadas matrizes divididas em dois grupos: um representado por aquelas que pariram natimortos naquela ocasião (G_N), e outro representado por aquelas que não pariram natimortos, mumificados e não tiveram fetos abortados (G_S). O número de amostras coletadas por granja está descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Grupos de amostragem.

Granja	Município	Total de matrizes	Matrizes do lote de estudo	Matrizes com natimortos	Matrizes sem natimortos	Taxa de natimortalidade (último semestre)
G1	Salvador das Missões	3533	160	8	5	5,9
G2	Encantado	2030	97	5	8	7,0
G3	São Pedro do Butiá	2900	110	6	10	7,5
G4	Cruzeiro do Sul	1800	88	6	8	6,7
G5	São Pedro do Butiá	1900	58	3	12	5,4
G6	Serafina Correa	800	73	11	12	4,1

Os dados se referem ao número absoluto de matrizes.

O número de amostras coletadas variou entre as granjas em função de fatores que não puderam ser controlados, como o tempo de coleta estabelecido e o número de matrizes que pariram natimortos na ocasião. Foram consideradas matrizes “com natimortos” aquelas que tiveram pelo menos um leitão natimorto na leitegada.

Os soros foram processados em *pools*, sendo que para cada granja foram formados dois *pools*: um composto por matrizes que não pariram natimortos (G_S) e outro composto por matrizes que pariram um ou mais natimortos (G_N) naquele evento, totalizando 12 *pools* de amostra, preparados e sequenciados. Os *pools* foram formados a partir de 500 µL de soro de cada amostra. Após centrifugação a 2.500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,22 µm com o auxílio de uma seringa. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até a próxima etapa de processamento. O passo a passo da preparação das amostras para sequenciamento está exemplificado na Figura 3.

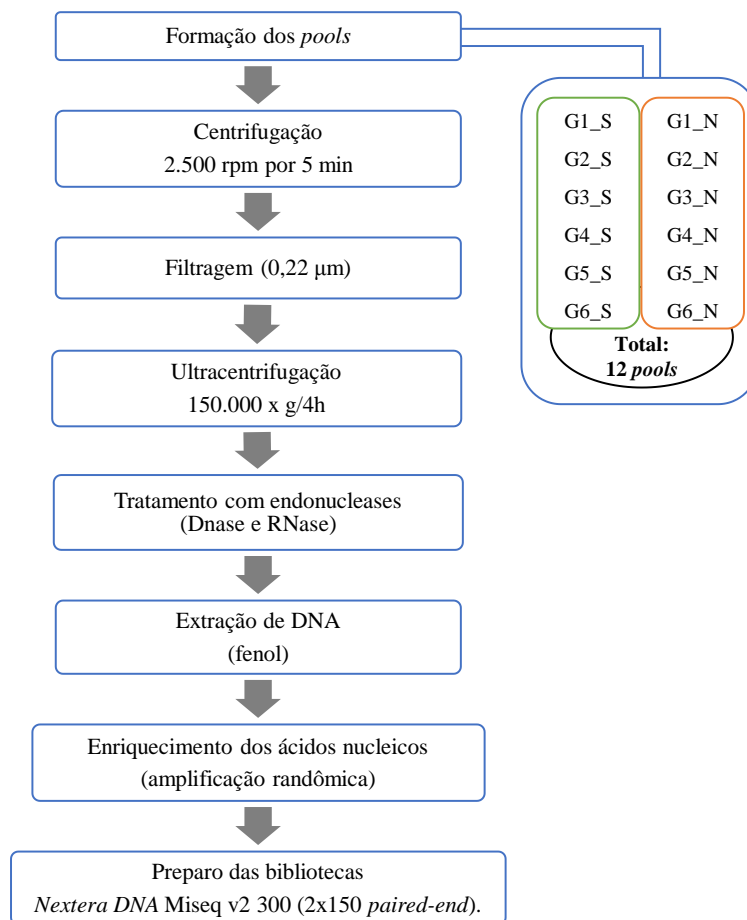


Figura 3. Esquema ilustrando a seqüência de procedimentos realizados no preparo das amostras para posterior sequenciamento realizado na plataforma Illumina® Miseq. Dois pools por granja

foram formados: um de matrizes com natimortos e outro de matrizes sem natimortos. Ao total, 12 *pools* foram obtidos.

4.2 Preparo das amostras para o sequenciamento

Para a purificação e concentração das partículas virais, as amostras foram submetidas a uma etapa de ultracentrifugação em colchão de sacarose 25% (25 g de sacarose ultrapura em 100 mL de TEN – Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 140 mM, pH 8,0) a ~150.000 x g por 4 h a 4 °C (ultracentrífuga Sorvall ODT Combi, rotor AH-629). Os *pellets* foram ressuspensos em 400 µL de H₂O milli-Q e homogeneizados com auxílio de ponteiras sem ponta. As amostras foram congeladas a -80 °C até a próxima etapa de processamento.

Antes da extração dos ácidos nucleicos, as amostras foram tratadas com 2,5 µL de DNase (2 U/µL, Turbo DNase, Ambion) e 5 µL de RNase A (20 mg/mL, Invitrogen) para degradação dos ácidos nucleicos não protegidos por capsídeo (SHAN *et al.*, 2011). Após breve homogeneização, as amostras foram incubadas por 2 h a 37 °C. A seguir, o DNA viral foi extraído pelo método fenol (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), quantificado por espectrofotometria de microvolumes (L-quant, Loccus Biotecnologia, Brasil) e fluorimetria (Qubit, Invitrogen, USA) e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio para verificação da qualidade do DNA

Após a extração, o DNA foi submetido a uma etapa de enriquecimento por amplificação de deslocamento múltiplo (*MDA, multiple displacement amplification*) (DEAN *et al.*, 2002). Para isso, o DNA total (0,05 ng a 0,1 ng) foi transferido para tubos de 0,2 mL, desnaturado a 95 °C por 5 min e resfriado a 4 °C. Em seguida, foi adicionada solução contendo tampão (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM dithiothreitol), 1 mM de dNTP (Fermentas Life Science), 15 µM de *primers* randômicos exo-resistentes (Fermentas Life Sciences), 2 mM de DTT (Sigma Aldrich), 2 µg de BSA (New England Biolabs) e 20 U de DNA polimerase phi29 (New England Biolabs). A reação foi incubada em termociclador (Veriti®, Applied Biosystems™) por 18 h a 30 °C, seguida por etapa final de inativação da enzima a 65 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se *beads* magnéticos (Agencourt. AMPure XP). A qualidade e a quantidade do DNA enriquecido foram avaliadas por espectrofotometria de microvolumes (Nanodrop, ThermoScientific, USA)

e por fluorimetria (Qubit, Invitrogen, USA), respectivamente, e utilizados conforme recomendações do fabricante da plataforma de sequenciamento (Illumina®).

4.3 Sequenciamento

Para o sequenciamento dos genomas virais foi utilizada a plataforma Miseq (Illumina®, USA). O preparo das bibliotecas de DNA foi feito com o kit *Nextera DNA preparation kit* de acordo com instruções do fabricante, e o sequenciamento foi realizado com o kit Miseq v2 300 (2x150 *paired-end*).

4.4 Análise do sequenciamento

A qualidade das *reads* obtidas foi analisada com o programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e as sequências trimadas por qualidade (phred <20) e tamanho (<35 nucleotídeos) utilizando o programa PRINSEQ (<http://prinseq.sourceforge.net>). Após a trimagem, as *reads* foram montadas *de novo* através do programa SPAdes v.3.9.0 utilizando o parâmetro *metaSPAdes* (NURK *et al.*, 2016), com o apoio do Centro Nacional de Supercomputação (CESUP), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os *contigs* resultantes das montagens, bem como as próprias *reads*, foram submetidos ao BLASTx para a pesquisa de sequências similares depositadas em banco de dados público. O ponto de corte escolhido para o *E-value* foi de 10^{-3} e as sequências foram classificadas em vírus eucarióticos, fagos e desconhecidos, com base na sequência taxonômica com o melhor valor de *E-value*. Posteriormente, esses *contigs* foram analisados e mapeados por referência no software Geneious v. 8.1.3. A metodologia utilizada para análise das *reads* está exemplificada na figura 4.

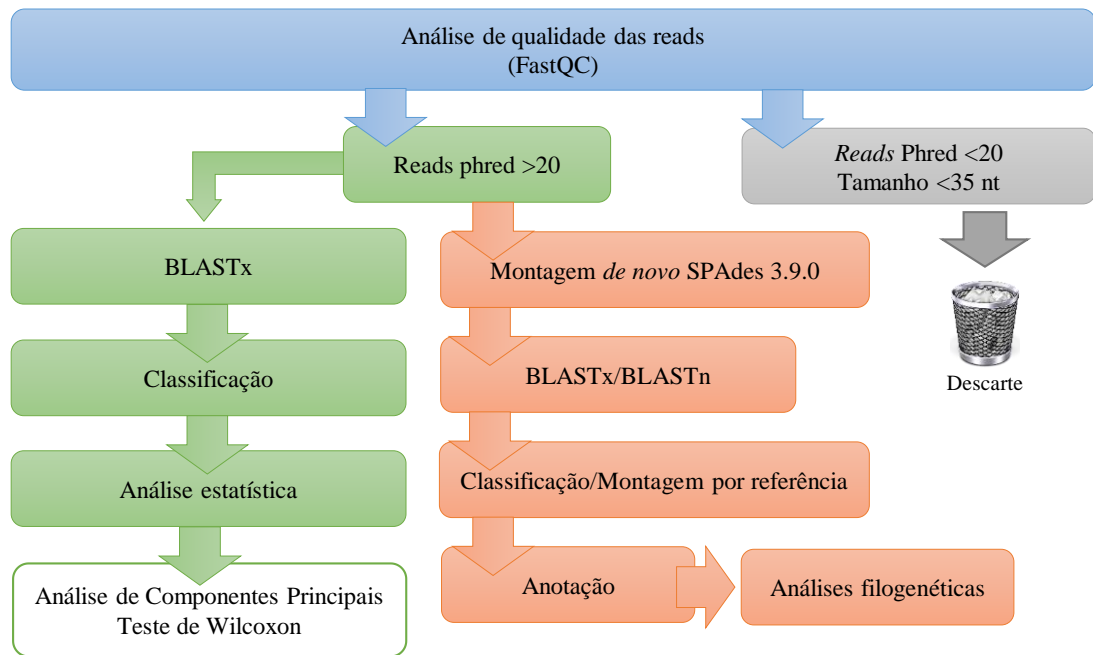


Figura 4. Fluxograma exemplificando a metodologia utilizada nesse estudo a partir das reads obtidas no sequenciamento até as análises estatísticas e filogenéticas.

4.5 Análise filogenética

As sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos dos genomas obtidos foram alinhadas com sequências homólogas depositadas no GenBank utilizando o software MUSCLE *version* 3.5. As árvores filogenéticas foram construídas pelo método de Maximum Likelihood (ML) com *bootstrap* de 1000 réplicas, utilizando o melhor modelo para cada alinhamento, através do MEGA7 (www.megasoftware.net/).

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas a partir do resultado do BLASTx das *reads*. Os vírus foram classificados de acordo com a média de *reads* mapeadas e 10% das espécies virais com a maior média foram selecionadas para as análises. As análises foram realizadas utilizando o software IBM® SPSS® *Statistics version* 22.

A comparação entre os viromas detectados em cada grupo foi realizada através da Análise de Componentes Principais (ACP) visando avaliar se existe diferença qualitativa (presença/ausência) e quantitativa entre os *pools* em relação aos genomas virais

detectados. O teste de Wilcoxon foi usado para comparar as médias de *reads* virais identificadas entre os grupos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Visão geral do viroma de soros de matrizes

O número de *reads* virais sequenciadas por *pool* de soro de matrizes suínas variou de 356.000 a 2.109.788, com tamanho médio de 231 nucleotídeos (Tabela 2). Após trimagem por tamanho e qualidade, realizada no programa *Prinseq*, 95,8% a 99,8% das *reads* permaneceram. O resultado da montagem *de novo* a partir das *reads* trimadas variou de 681 a 25.014 *contigs* entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 2 – Número de *reads* sequenciadas por *pool*.

Granja	<i>Reads</i> sequenciadas	<i>Reads</i> pós-trimagem	<i>Reads</i> virais (%)	<i>Reads</i> de genomas de vírus eucarióticos (%)
G1_S	550.300	549.020	147.286 (26,8)	144.762 (98,3)
G2_S	709.508	692.062	17.549 (2,5)	17.505 (99,7)
G3_S	459.154	453.738	26.453 (5,8)	26.348 (99,6)
G4_S	437.636	429.362	80.344 (18,7)	79.638 (99,1)
G5_S	567.848	562.406	26.644 (4,7)	25.509 (95,7)
G6_S	543.392	537.688	9.377 (1,7)	5.079 (54,2)
G1_N	357.306	354.870	66.951 (18,9)	65.310 (97,5)
G2_N	356.708	353.796	26.006 (7,3)	25.494 (98,0)
G3_N	459.648	455.804	7.995 (1,7)	7.995 (100,0)
G4_N	2.109.788	2.049.608	2.322 (0,1)	2.241 (96,5)
G5_N	753.334	721.992	21.717 (3,0)	21.477 (98,9)
G6_N	613.632	599.286	413.233 (68,9)	413.195 (99,9)

S = grupo de matrizes que não pariram natimortos; N = grupo de matrizes que pariram natimortos.

Tabela 3 – Número total de *contigs* montados e apresentando similaridade com sequências de aminoácidos virais depositadas no GenBank.

<i>Pools</i>	Nº de <i>contigs</i>	Total de <i>contigs</i> com similaridade (%)
G1_S	1631	159 (9,7)
G2_S	1518	240 (15,8)
G3_S	2534	107 (4,2)
G4_S	2210	138 (6,2)
G5_S	4042	111 (2,7)
G6_S	685	50 (7,3)
G1_N	2130	480 (22,5)
G2_N	1291	53 (4,1)
G3_N	681	73 (10,7)
G4_N	25014	243 (1,0)
G5_N	1710	48 (2,8)
G6_N	1902	189 (9,9)

Nesse estudo, não foi possível obter o material genético de vírus RNA em quantidade e qualidade suficientes para o sequenciamento de alto desempenho, embora tenham sido empregados métodos de extração de RNA viral, síntese e enriquecimento de cDNA reconhecidas e já experimentadas em nosso grupo em diversas ocasiões (SCHMIDT *et al.*, 2016; LIMA *et al.* 2017). Não obstante, apesar das precauções adotadas à extração de ácidos nucleicos, é possível que falhas no método empregado, ou a baixa concentração de material genético viral, tenham levado a esse resultado. Além disso, é possível que, de fato, não houvesse vírus com genomas de RNA nos soros dos animais amostrados. Por essa razão, neste estudo são apresentados unicamente genomas de vírus cujo material genético é DNA.

As *reads* de cada *pool* foram comparadas ao banco de dados de sequências virais em nível de proteína, usando o BLASTx. Em média, 12% das *reads* apresentaram similaridade com sequências virais depositadas no GenBank, percentual maior que aquele reportado em estudos de metagenômica em soros e fezes de suínos (MASEMBE *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014). A relação das principais sequências virais identificadas está representada na Figura 5.

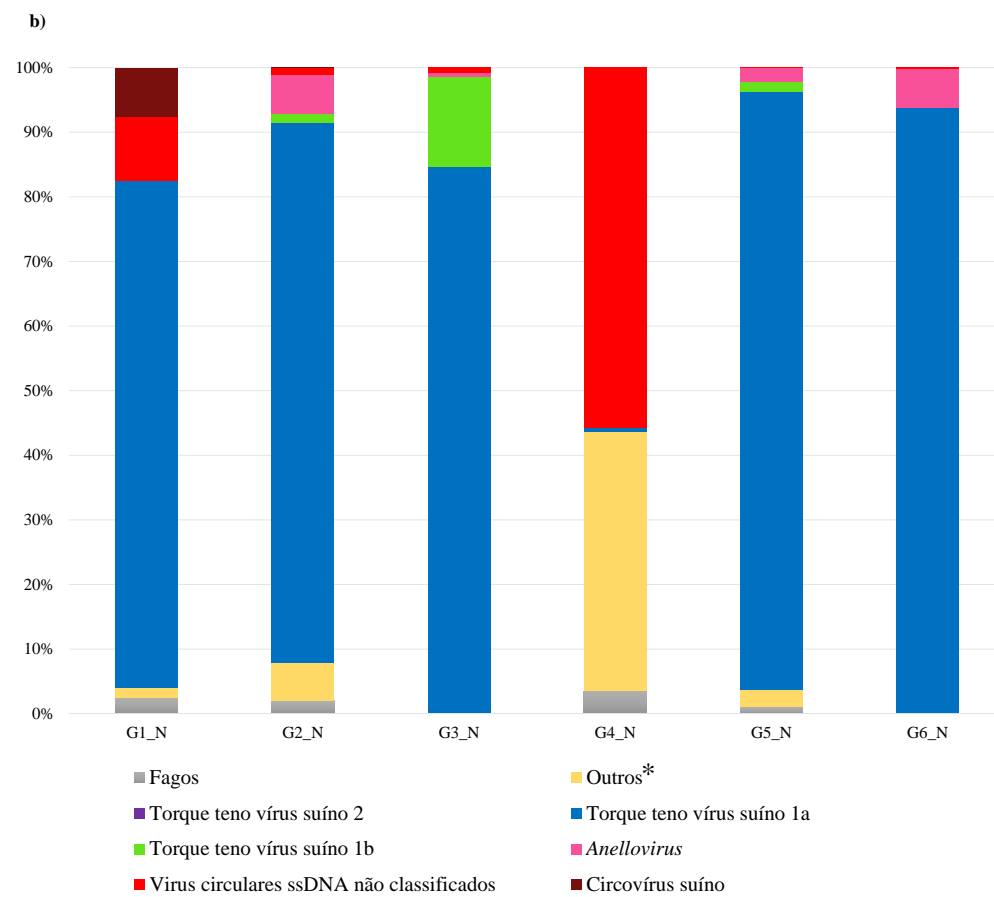
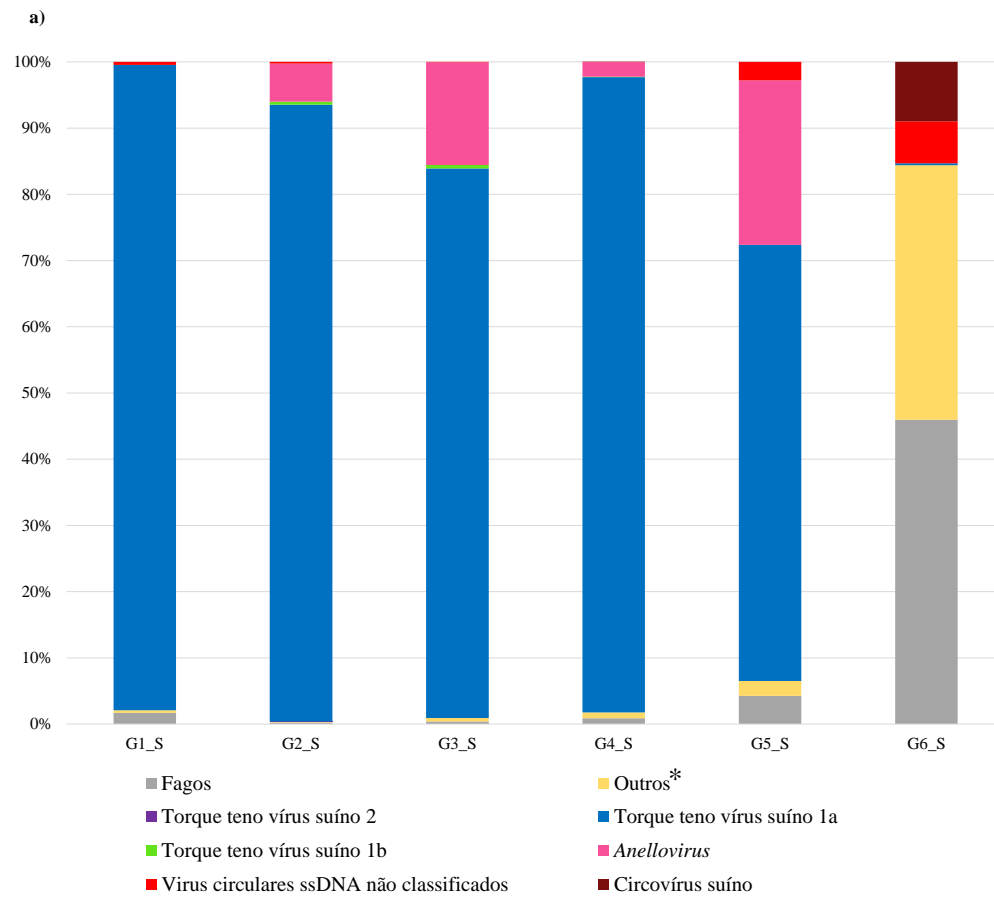


Figura 5. Representação gráfica das sequências virais detectadas nos *pools* de matrizes sem (a) e com (b) casos de natimortalidade nas seis granjas estudadas. Cada barra representa o viroma de uma granja. *Outros = vírus de insetos, algas, plantas e protozoários.

Dentre as *reads* virais, 94% (média geral) apresentaram similaridade com sequências de genomas de vírus eucarióticos, a maioria deles pertencente à família *Anelloviridae* (Figura 5). O mesmo resultado foi observado em relação aos *contigs*, além de uma variedade de sequências referentes a novos vírus circulares com genoma DNA fita simples. A partir desses resultados, os genomas completos obtidos foram selecionados para análises mais detalhadas, conforme discutido adiante.

Dentre as sequências com similaridade a membros da família *Anelloviridae*, foram identificados principalmente os vírus torque teno suíno 1a (TTSuV 1a) e 1b (TTSuV 1b). Vírus com genoma circular de DNA fita simples não classificados, denominados *CRESS-DNA* (*circular Rep-encoding single-strand DNA*) também foram observados. Em relação às sequências de membros da família *Circoviridae*, sequências correspondentes ao genoma do circovírus suíno destacaram-se no *pool* G1_N.

Em um estudo de metagenômica realizado na África em amostras de soro de suíno, foram identificados principalmente sequências de genomas de vírus pertencentes às famílias *Asfarviridae* e *Anelloviridae* (MASEMBE *et al.*, 2012). Por outro lado, estudos realizados em amostras de fezes (ZHANG *et al.*, 2014; KARLSSON *et al.*, 2016) e linfonodos (BLOMSTRÖM *et al.*, 2016) encontraram uma diversidade maior de genomas que puderam ser relacionados a um maior número de famílias virais, o que pode ser justificado pelo tipo de amostra analisada.

Em geral, foi observado um perfil semelhante em relação ao viroma detectado tanto em matrizes que tiveram partos normais como em matrizes que tiveram pelo menos um natimorto por ocasião do parto amostrado. Genomas de TTSuV 1a foram os mais abundantes em todos os grupos (Figura 2). Por outro lado, os *pools* G6_S e G4_N apresentaram um perfil diferente. No grupo G6_S, foi identificado maior número de *reads* correspondentes a sequências de fagos, vírus de insetos, algas, plantas e protozoários (outros), membros da família *Circoviridae*, sequências de *CRESS-DNA* não classificados, e, em menor quantidade, torque teno vírus suíno 1a. Em relação ao grupo G4_N, foi observado maior número de *reads* correspondentes a sequências de *CRESS-DNA* não classificados, outros, fagos e poucas sequências com similaridade para o torque teno vírus suínos 1a (Figura 5).

Genomas referentes a vírus de insetos, algas, plantas e protozoários foram identificados nos soros dos animais amostrados. Sequências nucleotídicas correspondentes a vírus de plantas e insetos foram identificadas em fezes de morcegos, indicando a capacidade de sobrevivência desses vírus no trato digestivo (DONALDSON *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010). Outro trabalho que pesquisou a diversidade viral em fezes de humanos identificou ácido nucleico de vírus de plantas (ZHANG *et al.*, 2006; VICTORIA *et al.*, 2009). Isso poderia estar relacionado a alimentação ou ingestão de água, embora outros estudos não tenham reportado esse achado em soro (MASEMBE *et al.*, 2012). Por outro lado, diversas são as fontes de DNA contaminante e mesmo o uso de controle negativo durante a preparação da amostra não garante que eles sejam reconhecidos (LUSK 2014). DNA livre já foi detectado em diferentes reagentes de PCR (EHRICHT *et al.*, 2007, GLASSING *et al.*, 2016). Além disso, estudos mostraram que mesmo a adoção de medidas de precaução extremas (como tratamento com luz ultravioleta, sistema de ventilação de pressão positiva, entre outros) reduzem o DNA contaminante, mas não garantem sua eliminação (CORLESS *et al.*, 2000; CHAMPLOT *et al.*, 2010). Nesse estudo, não foi possível determinar se essas sequências estão realmente presentes na amostragem, ou se correspondem a uma contaminação que pode ter ocorrido em alguma etapa do processamento, podendo ainda refletir uma contaminação por vírus presentes na pele dos animais ou no ambiente no momento da coleta.

5.2 Análise dos viomas em matrizes com e sem natimortos

Para a análise comparativa dos viomas nos grupos (matrizes com ou sem eventos de natimortalidade), foi realizada inicialmente uma análise de componentes principais (ACP), que foi feita para avaliar se existe diferença qualitativa (presença/ausência) e quantitativa em relação aos genomas virais detectados nos *pools*. Os dois primeiros componentes explicam 52,6% da variância total (32,8% PCA1 e 19,8% PCA2). A ACP não mostrou uma separação clara entre os genomas detectados em grupos de matrizes com e sem natimortos, sugerindo que não houve nessa amostragem associação entre a detecção de genomas virais e a ocorrência de natimortalidade (Figura 6).

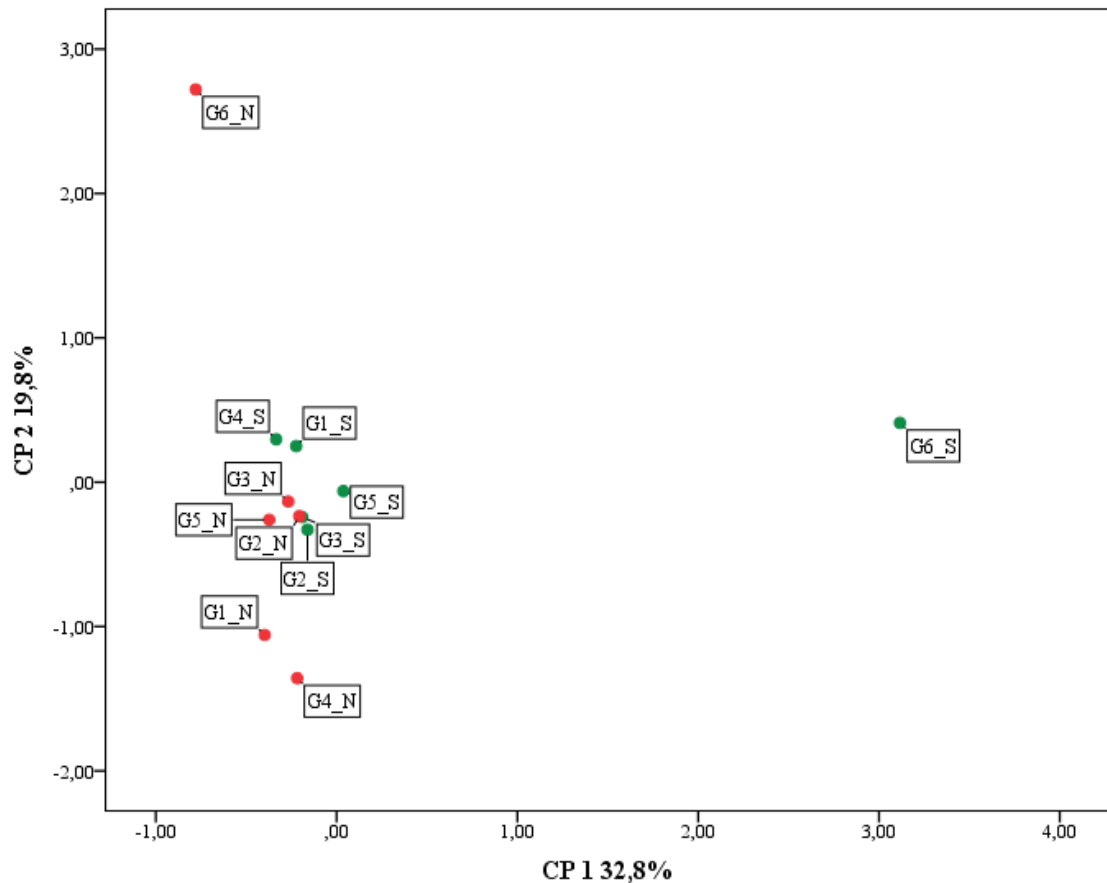


Figura 6. Representação gráfica da análise de componentes principais (ACP). Os dois primeiros componentes (CP1 e CP2) resumem 52,6% da variação relativa aos 12 *pools*. Os pontos em vermelho representam os *pools* de matrizes que pararam ao menos um natimorto, e os pontos verdes os *pools* de matrizes que não pararam natimortos.

Na aplicação da ACP foi observado que não houve uma separação clara entre os grupos, sugerindo a existência de homogeneidade entre as amostras. Sendo assim, uma comparação entre as médias de *reads* virais identificadas nos grupos de matrizes sem (G_S) e com (G_N) natimortos foi feita para 10% dos vírus com maior número de *reads* (Tabela 4). Uma grande variabilidade entre os *pools* no que se refere aos tipos e cargas virais pode ser evidenciada através das médias e desvio padrão do número de *reads*. Nesta análise também não houve diferença estatística significativa entre os grupos, o que corrobora com o resultado da ACP.

Tabela 4 – Sequências virais identificadas com maior frequência no soro de matrizes com parto normal e com eventos de natimortalidade. São apresentadas as dez espécies virais com maior número de *reads*.

Vírus	Parto com ausência de natimortos			Parto com presença de natimortos			p*
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
Torque teno sus virus 1a	44102	51805	19740	79028	145897	20895	0,753
Porcine torque teno virus 1	1973	2872	264	2331	4979	237	0,917
Anellovirus fur seal/ATROP72/BR/2012	2001	2736	652	4141	9166	216	0,893
Porcine circovirus	45	110	0	841	2057	1	0,588
Circoviridae SFBeef	0	0	0	824	2015	0	0,180
Torque teno sus virus SH0822/2008	251	596	4	329	761	9	0,686
Torque teno sus virus 1b	47	57	30	400	420	340	0,116
Po-Circo-likevirus 41	174	225	57	69	78	47	0,753
CircoviridaePorkNW2/USA/2009	0	0	0	191	468	0	0,317
Rat stool-associated circular ssDNA virus	128	173	67	32	47	17	0,225

*Teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas.

A ausência de associação entre a presença de determinado vírus (ou mais de um vírus) na ACP não exclui inteiramente a possibilidade de que exista um agente viral associado à ocorrência de natimortalidade. Acredita-se que o sequenciamento de alto desempenho, quando aplicado à metagenômica viral acesse virtualmente todos os genomas presentes em determinada amostra (HANDELSMAN *et al.*, 2004). Contudo, a metagenômica ainda não apresenta tanta sensibilidade quanto à PCR e, portanto, pode subestimar os genomas presentes em baixa concentração na amostra (LI *et al.*, 2010). Ainda, a avaliação das amostras em *pools* pode levar também à diluição de genomas que estejam presentes em menor concentração, fazendo com que eles não sejam detectados. Sendo assim, vírus não necessariamente envolvidos no quadro patológico, podem ter sido detectados com maior frequência (por estarem presentes em maior abundância) do que outros que poderiam estar relacionados à natimortalidade em suínos.

Alguns autores defendem que o tratamento realizado com nucleases pode destruir parte do viroma presente nas amostras e conseqüentemente introduzir um viés na identificação da diversidade genômica (LI *et al.*, 2015; ROSSEEL *et al.*, 2015; HALL *et al.*, 2014). No entanto, os dados não são conclusivos e o tratamento com nucleases tem sido utilizado para digerir ácidos nucleicos não protegidos (abundantes em amostras biológicas), diminuindo assim a complexidade das amostras e, conseqüentemente, o tempo de análise computacional. (LI; DELWART 2011; LINDSJÖ, 2016). Além disso, é importante ressaltar que esta análise representa apenas o momento do parto (quando a coleta de soro foi realizada) e isso pode ter sido um viés, uma vez que as fêmeas poderiam não estar em estado virêmico, já que a viremia precede a infecção transplacentária (PENSAERT *et al.*, 2004). Assim, a infecção por um vírus candidato pode ter ocorrido, porém o mesmo não pode ser detectado nos soros durante o parto. Outra possibilidade é a de que o vírus candidato seja associado a células, impedindo a detecção do genoma no soro. Já foi demonstrado que matrizes vacinadas com vacina inativada podem apresentar infecção transplacentária por vírus que circulam associados às células, uma vez que são capazes de evadir o sistema imune humoral do hospedeiro (PENSAERT *et al.*, 2004). Por outro lado, fêmeas vacinadas com vacinas vivas atenuadas têm uma taxa de infecção transplacentária muito baixa ou inexistente (PENSAERT *et al.*, 2004). Isso sugere que vírus que circulam associados às células, conseguem evadir o sistema imune humoral do hospedeiro. Em vista disso, pode-se esperar que o genoma desses agentes não seja detectado no soro dos animais examinados.

Até o presente momento, esse é o primeiro estudo que explora o viroma do soro de matrizes suínas, e também o primeiro estudo que compara o viroma sérico de matrizes com e sem casos de natimortalidade. Com base nos resultados obtidos, não foi possível identificar um agente viral relacionado à ocorrência desse quadro. Estudos prévios têm descrito outros agentes infecciosos envolvidos na etiologia do problema em suínos, como por exemplo, o PRRSV, PCV2 e o UPV1 (MALDONADO *et al.*, 2005; MORÉS *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015). Por outro lado, causas não infecciosas como fatores genéticos, maternos e ambientais também têm sido reportadas (VANDERHAEGHE *et al.*, 2013). Entretanto, tais fatores não foram testados nesse trabalho, e, portanto, não podem ser descartados como causas de natimortalidade nas propriedades estudadas. Além disso, a exposição e a suscetibilidade viral podem variar amplamente em função da idade e localização geográfica (DELWART; LI 2012). Futuros estudos agregando informações sobre outros fatores que influenciam nessa condição poderão contribuir para o conhecimento sobre a diversidade viral do soro de matrizes com e sem casos de natimortalidade.

5.3 Genomas virais completos

No presente estudo, foram identificados 12 genomas completos de TTSuV (*torque teno sus vírus*) 1a e 1b, 2 genomas de circovírus suíno tipo 3 (PCV3) e 6 novos genomas CRESS-DNA não classificados. Os genomas de TTSuV e CRESS-DNA foram identificados nos *pools* de matrizes com e sem natimortos. Por outro lado, o PCV3 foi identificado somente em dois *pools* de matrizes com natimortos, em duas granjas diferentes (Tabela 5).

Tabela 5. Informações sobre os genomas virais completos identificados por metagenômica no soro de matrizes com natimortalidade (G_N) e sem natimortalidade (G_S).

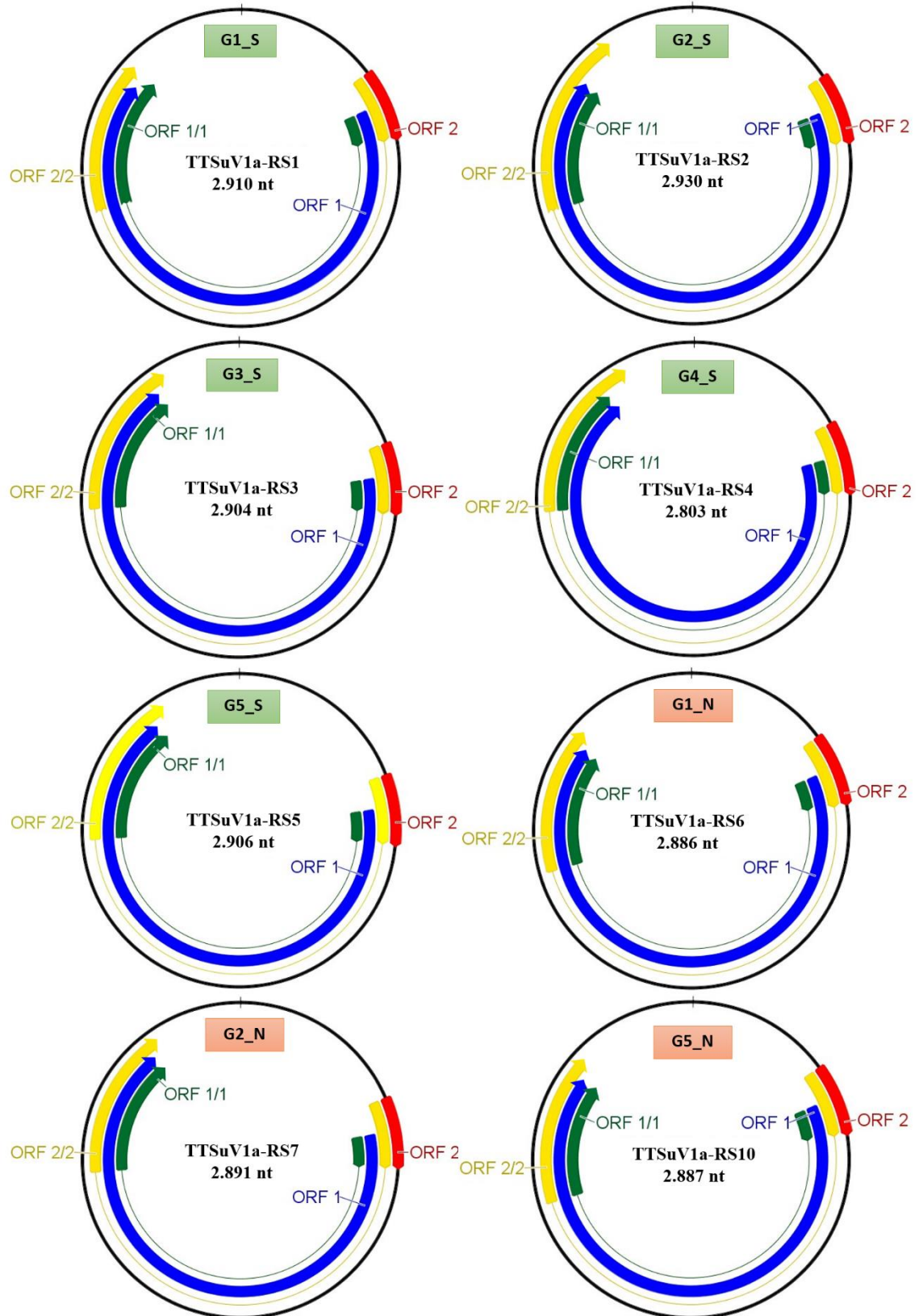
Genomas	Tamanho (nt)	Cobertura média (nt)	Pool de origem
PCV3 - BR/RS/6	2000	954	G1_N
PCV3 - BR/RS/8	2000	5	G3_N
PoSCV 2A RS/BR	1846	10	G2_S
PoSCV 2B RS/BR	1900	43	G2_S
PoSCV 7A RS/BR	1849	131	G2_N
PoSCV 7B RS/BR	2568	28	G2_N
PoSCV 8 RS/BR	2540	145	G3_N
PoSCV 12 RS/BR	2518	38	G6_N
TTSuV1a- RS1	2910	7609	G1_S
TTSuV1a - RS2	2930	8494	G2_S
TTSuV1a - RS3	2904	3899	G3_S
TTSuV1a - RS4	2803	2445	G4_S
TTSuV1a - RS5	2906	1448	G5_S
TTSuV1a - RS6	2886	3214,8	G1_N
TTSuV1a - RS7	2891	1456,2	G2_N
TTSuV1a - RS10	2887	1229,2	G5_N
TTSuV1a - RS12A	2868	7634,4	G6_N
TTSuV1a - RS12B	2910	8030,5	G6_N
TTSuV1b - RS2	2640	33,9	G2_S
TTSuV1b - RS8	2826	2330,3	G3_N

PoSCV = *porcine serum-associated virus* (vírus *CRESS-DNA* identificados nesse estudo).

5.3.1 *Torque teno sus virus*

O torque teno virus suíno (TTSuV) é um vírus não envelopado, esférico, com cerca de 30-32 nm de diâmetro (ITOH *et al.*, 2000). Possui o genoma fita simples (*ssDNA*, *single-strand DNA*) circular de polaridade negativa com cerca de 2,8 kb (OKAMOTO *et al.*, 2002). Os TTSuV fazem parte da família *Anelloviridae* e atualmente são classificados em quatro espécies. O gênero *Iotatorquevirus* compreende as espécies torque teno vírus suíno 1a (TTSuV1a) e 1b (TTSuV 1b), e o gênero *Kappatorquevirus* é formado pelas espécies TTSuV k2a e TTVSuV k2b (ICTV, 2011).

Neste estudo, 12 genomas completos de TTSuV foram identificados, sendo dez da espécie TTSuV 1a e dois TTSuV 1b (Figura 7). O tamanho dos genomas detectados variou de 2,6 a 2,9 kb. Em todos eles, foram identificadas quatro fases abertas de leitura (ORF, *open reading frame*): ORF1, ORF2, ORF 1/1 e ORF 2/2.



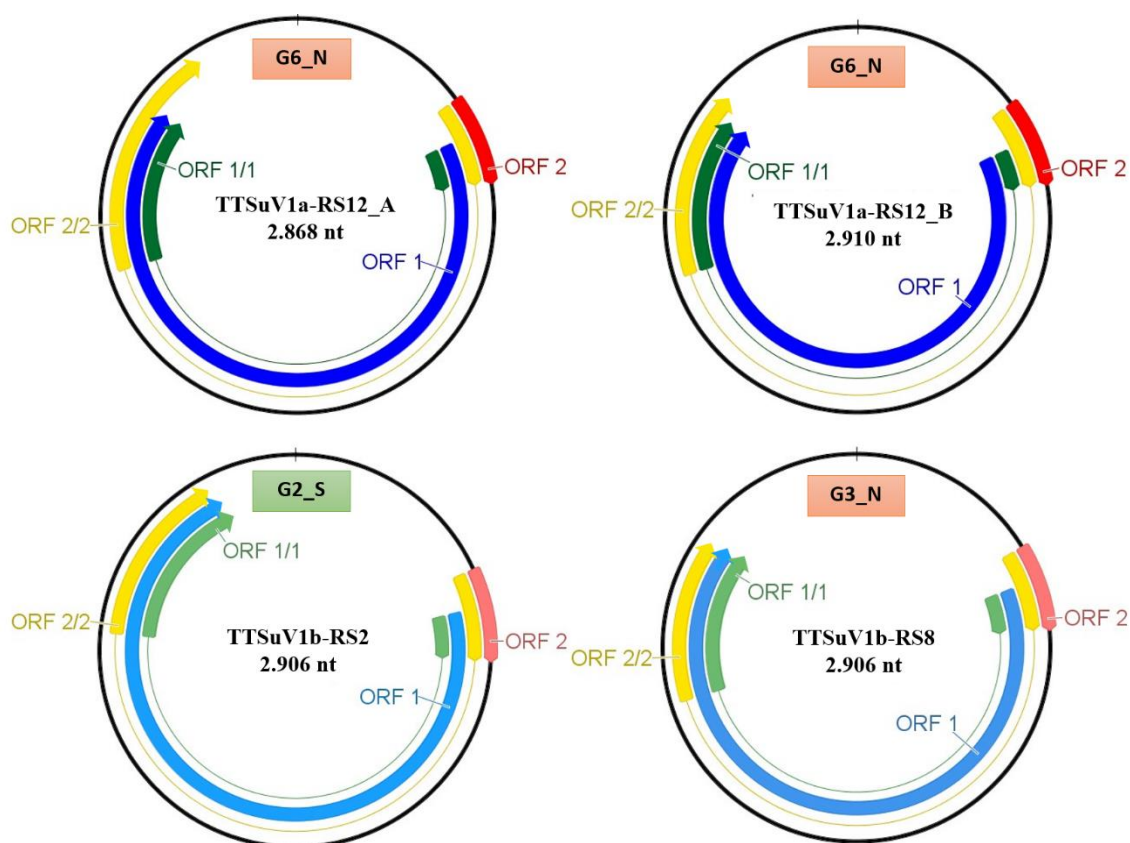


Figura 7. Representação gráfica 12 genomas de TTSuV identificados por metagenômica nesse estudo. Cada ORF está identificada por uma cor diferente e a direção delas é indicada pela ponta da seta. Genomas de TTSuV 1a foram identificados em cinco *pools* de soro de matrizes sem natimortos (G1_S, G2_S, G3_S, G4_S, G5_S), e em quatro *pools* de matrizes com natimortos (G1_N, G2_N, G5_N e G6_N), totalizando dez genomas de TTSuV 1a. Os genomas de TTSuV 1b foram identificados em dois *pools*: um sem natimortos (G2_S) e outro com natimortos (G_N).

A organização genômica do TTSuV foi sugerida recentemente por Huang *et al.* (2010), após comparação com genomas de TTVs de humanos. A ORF 1/1 e 2/2 são transcritas em mRNA que sofre *splicing*. A ORF 1/1 compartilha N- e C-terminal idênticos à ORF 1, enquanto que a ORF 2/2 compartilha o mesmo códon de iniciação da ORF 2 e permanece na mesma fase de leitura após *splicing* (HUANG *et al.*, 2010). Acredita-se que ORF 1 codifica uma proteína de capsídeo putativa e replicase associada. A ORF 2 codifica uma proteína com característica de tirosina fosfatase e a ORF 2/2, conhecida anteriormente como ORF 3, codifica uma proteína não estrutural de 224 aminoácidos cuja função ainda precisa ser determinada (BIAGINI *et al.*, 2001; KEKARAINEN; SEGALÉS 2012). A região não traduzida (UTR) é altamente conservada entre todos os genomas de TTV e contém uma região rica em GC que forma estruturas do tipo *stem-loop* (OKAMOTO *et al.*, 2002, MONINI *et al.*, 2016), além de

domínios típicos como o TATA box (ATATAA), os quais são importantes sequências reguladoras da replicação e da transcrição (MANKERTZ *et al.*, 2004).

Os genomas de TTSuV 1a desse estudo revelaram similaridade de nucleotídeos de 65% a 87,3% entre si. Porém, com relação a outras sequências do GenBank, a identidade variou de 62% a 98%. Em relação ao TTSuV 1b, a identidade entre os dois genomas identificados foi de 75,6% e com outras sequências do mesmo tipo a identidade variou de 68,9% a 97,8%. A variação na identidade observada entre os genomas de TTSuV desse estudo, foi semelhante a outros trabalhos, cuja identidade variou de 65% a 80% para o TTSuV1 (CORTEY *et al.*, 2011).

A árvore filogenética foi construída com base nos genomas de TTSuV usados na última classificação dos TTSuV no ICTV (2011). Foi observada uma distribuição variada dos genomas entre os *clusters* (Figura 5). Tanto os genomas de TTSuV 1a quanto os 1b agruparam-se com sequências dos dois tipos propostos atualmente. O genoma de TTSuV 1b-RS8 ficou próximo a uma sequência da China (HM6332226), enquanto que o TTSuV 1b-RS2 formou um *cluster* separado, próximo a um grupo de sequências também da China (HM6332236, HM633234, HM633241) (Figura 5). Seis sequências de TTSuV 1a (RS2, 3, 5, 7, 10 e 12A) formaram um *cluster* individual, o que poderia sugerir a existência de alguma diferença genômica geográfica, como já foi sugerido por Cortey e colaboradores (2011). Embora outras sequências de TTSuV 1a (RS1, 6 e 12B) identificadas nesse estudo tenham se agrupado de forma diferente, análises mais profundas poderão resultar em uma melhor conclusão.

O TTSuV 1a-RS4 separou-se de todas as outras sequências e exibiu uma identidade de nucleotídeos que variou de 65,3% a 73,5% em relação às outras sequências. TTSuV 1a-RS1 e 12B agruparam com sequências da China e Espanha (HM633256, JF694116, HM633251, GU570198, GU570200). TTSuV 1a-RS6 ficou próximo a um *cluster* formado por sequências do Japão e EUA (AB076001, GU456383) (Figura 8).

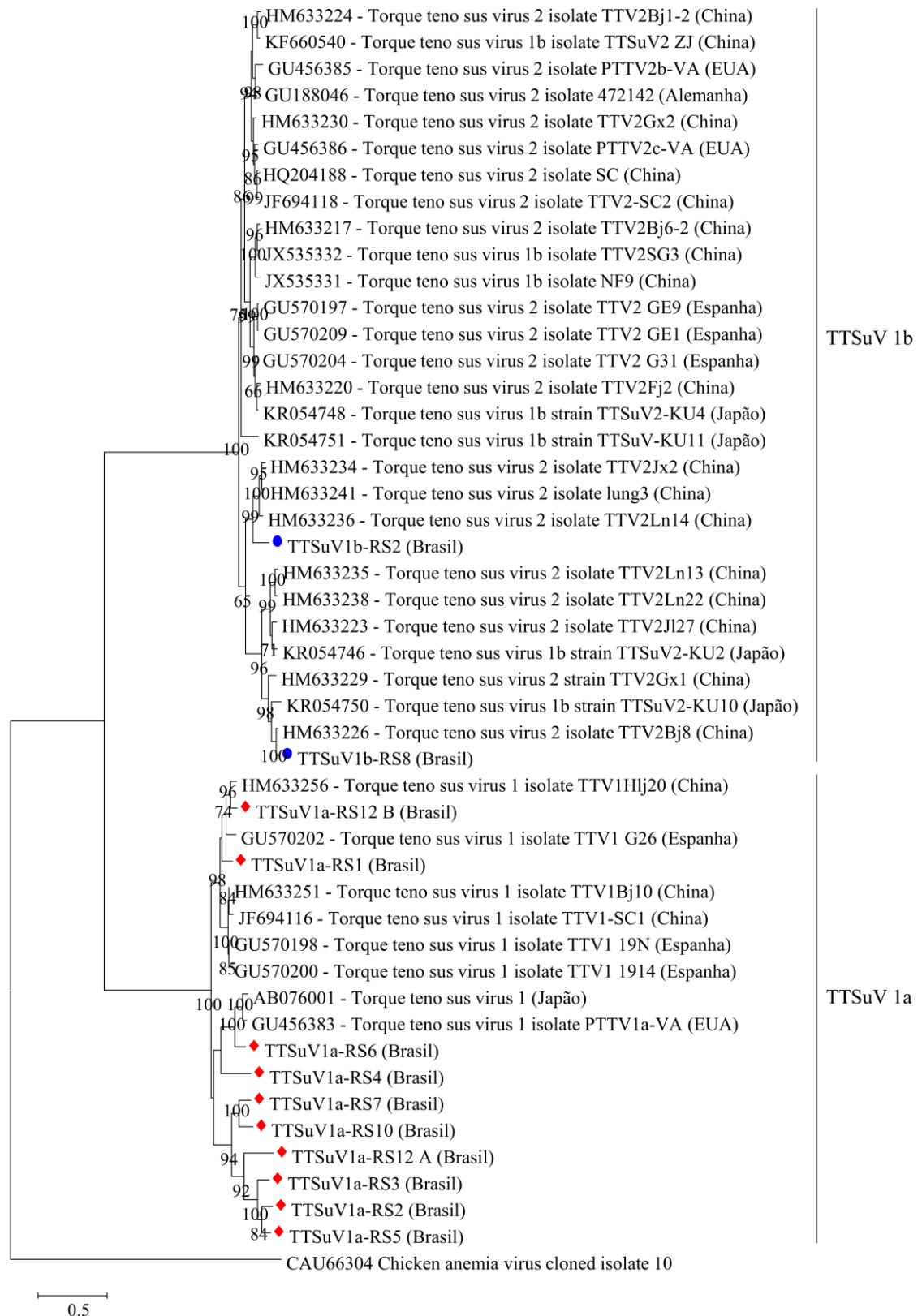


Figura 8. Análise filogenética baseada no método de *Maximum Likelihood* com *bootstrap* de 1000 réplicas dos genomas do TTSuV 1a e TTSuV 1b. Os dois genomas de TTSuV 1b identificados estão destacados por um ponto azul; os dez genomas de TTSuV 1a estão destacados por um losango vermelho. O triângulo indica a sequência usada como raiz (CAU66304, chicken anemia virus).

O torque teno vírus (TTV) foi identificado pela primeira vez em 1997 em um paciente humano com hepatite pós-transfusão de etiologia desconhecida, sendo nomeado com as iniciais do nome do paciente (NISHIZAWA *et al.*, 1997). Desde sua descoberta, o TTV foi identificado em suínos, bovinos, ovelhas, gatos, cães e morcegos (LEARY *et al.*, 1999; OKAMOTO *et al.*, 2002; CIBULSKI *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2015). O TTSuV tem sido identificado em soro de suínos em todo o mundo, com taxas de prevalência que variam de 24% a 100% (MCKEOWN *et al.*, 2004; BIGARRÉ *et al.*, 2005; KEKARAINEN *et al.*, 2006; TAIRA *et al.*, 2009; GALLEI *et al.*, 2010).

Nesse estudo foi observado um grande número de *reads* com similaridade para TTSuV tanto nos *pools* de matrizes com natimortalidade como nos *pools* de matrizes sem natimortalidade, indicando que o TTSuV provavelmente não é um fator determinante para essa condição. Não há evidências de que a infecção por TTSuV (MARTÍNEZ-GUINÓ *et al.*, 2010), ou sua co-infecção com outros agentes, esteja associada com problemas reprodutivos (RITTERBUSCH *et al.*, 2012). Animais aparentemente saudáveis podem ter uma taxa de infecção relativamente alta (SIBILA *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2015) e, portanto, a infecção somente por TTSuV pode não ser suficiente para causar doença.

Embora o TTSuV ainda não tenha se mostrado patogênico, já foi demonstrado que ele possui um papel importante na co-infecção com outros patógenos, podendo por exemplo, promover a síndrome multissistêmica do definhamento suíno em suínos infectados por PCV2 (ELLIS *et al.*, 2008) e facilitar o desenvolvimento da síndrome da dermatite e nefropatia suína em suínos infectados com PRRSV (KRAKOWKA *et al.*, 2008). Além disso, o TTSuV pode suprimir o sistema imunológico de seu hospedeiro e desencadear o surgimento de outras doenças (ARAMOUNI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2012). Infecções por diferentes espécies de TTV são eventos bem documentados em humanos (NIEL *et al.*, 2000; OKAMOTO *et al.*, 2009) e suínos (HUANG *et al.*, 2010; BLOIS *et al.*, 2014). Em um estudo realizado na Itália, a taxa de co-infecções por diferentes espécies de TTSuV foi significativamente maior que a taxa de infecções singulares.

5.3.2 *Circovírus suíno tipo 3 (PCV3)*

Recentemente, um novo circovírus, denominado circovírus suíno tipo 3 (PCV3, *porcine circovirus type 3*), foi identificado nos Estados Unidos (PHAN *et al.*, 2016;

PALINSKI *et al.*, 2017). O PCV3 foi relatado em suínos jovens (2 a 3 semanas, e 9 a 10 semanas de idade) com lesões cardíacas e inflamação multissistêmica (PHAN *et al.*, 2016), em porcas que apresentavam sinais clínicos de síndrome de dermatite e nefropatia porcina (PDNS, *porcine dermatitis and nephropathy syndrome*) e problemas reprodutivos crônicos (PALINSKI *et al.*, 2017), e também em fetos abortados mumificados (PALINSKI *et al.*, 2017).

No presente estudo, foram identificados dois genomas completos de PCV3 provisoriamente denominados de PCV3-BR/RS/6 e o PCV3-BR/RS/8. Essa é a primeira identificação de PCV3 em suínos da América do Sul. O genoma circular ssDNA contém 2.000 nt e duas ORFs em orientação oposta, que codificam proteínas com mais de 200 aminoácidos e apresentam similaridade para Cap (capsídeo) e Rep (replicase) (Figura 9).

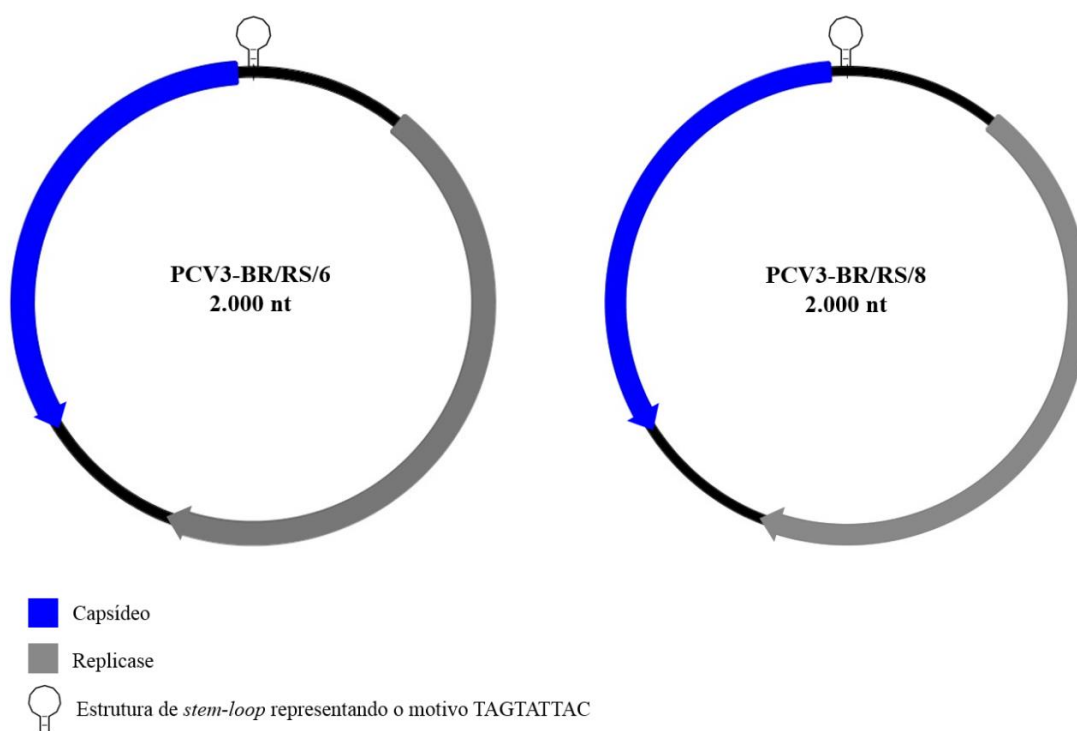


Figura 9. Representação gráfica dos genomas de PCV3 identificados por metagenômica no soro de matrizes com casos de natimortalidade. O PCV3-BR/RS/6 foi identificado no *pool* G1_N e o PCV3-BR/RS/8 no *pool* G3_N.

A região intergênica entre Cap e Rep contém 235 nt e possui um *stem-loop* de 9 nucleotídeos (TAGTATTAC) idêntico ao PCV1 e outros PCV3 descritos (PALINSKI *et al.*, 2017). A maior ORF codifica 296 aa e mostrou uma identidade maior que 99% com a replicase putativa do PCV3 (APC65713, 296 aa; APC65715, 296 aa). Essa ORF possui o códon GTC (valina) na porção 5' semelhante a outras sequências de PCV3 depositadas

até o momento desse estudo. O códon de iniciação alternativo tem sido proposto para vários circovírus aviários (BASSAMI *et al.*, 2001; PHENIX, *et al.*, 2001) e para outros vírus recentes identificados em suínos, como o PorkNW2/USA/2009 (ADU77001, 221 aa) (LI *et al.*, 2011). A ORF putativa de *cap* está em orientação oposta à *rep* e codifica uma proteína de 214 aa, com mais de 99% de identidade com outras sequências de *cap* do PCV3 (APA21932, AOO87130, APC65714).

Sete sequências de genoma completo de PCV3 disponíveis em bancos de dados públicos foram utilizadas para a reconstrução da árvore filogenética (Figura 10). Os dois genomas de PCV3 identificados nesse estudo agruparam em *clusters* separados. O PCV3-BR/RS/6 formou um *cluster* com o PCV3 strain 2960 (NC_031753, EUA), enquanto o PCV3-BR/RS/8 agrupou com o PCV3-US/SD2016 (KX_966193, EUA).

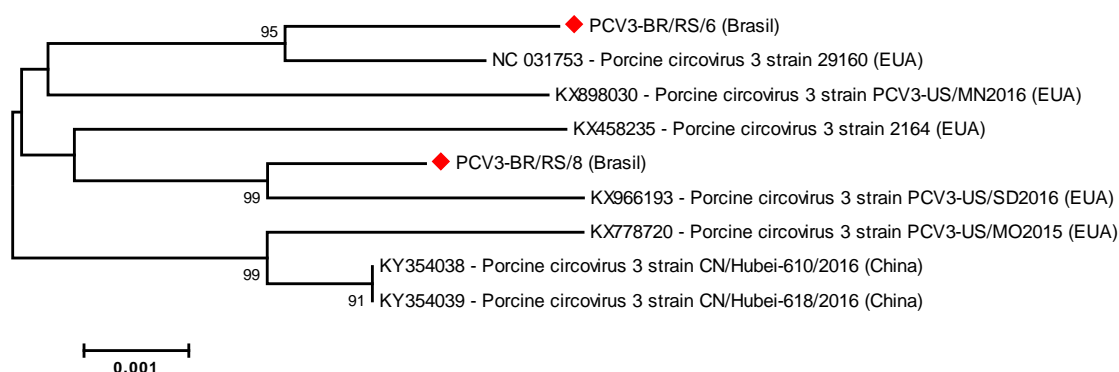


Figura 10. Análise filogenética dos genomas do PCV3 identificados no soro de matrizes suínas (losango vermelho) baseada no método de *Maximum Likelihood* e no modelo TN93+G com *bootstrap* de 1.000 réplicas. Ambas as sequências são provenientes de *pools* de soro de matrizes com natimortos no parto. Os genomas PCV3-BR/RS/6 e PCV3-BR/RS/8 foram identificados nos *pools* G1_N e G3_N, respectivamente.

Os genomas descritos nesse estudo foram detectados em *pools* de matrizes de municípios vizinhos: o PCV3-BR/RS/6 foi identificado no *pool* G1_N (Salvador das Missões, RS), e o PCV3-BR/RS/8 no *pool* G3_N (São Pedro do Butiá, RS), ambos no noroeste do Estado.

Um estudo retrospectivo mostrou uma prevalência de 93,8% de PCV3 entre amostras de tecido (com lesões consistentes com PDNS, negativas para PCV2) e exames sorológicos (anticorpos anti-PCV3). Em suínos com doença respiratória, a prevalência de PCV3 foi de 12,6% por *qPCR*. No mesmo estudo, 83 amostras de soro, provenientes de diferentes estados dos Estados Unidos e México, foram analisadas por ELISA e 47 apresentaram anticorpos anti-PCV3 (PALINSKI *et al.*, 2017). O fato de essas amostras

serem de diferentes regiões sugere que o vírus esteja bem distribuído na população de suínos. No entanto, estudos epidemiológicos na população geral de suínos são necessários para confirmar essa hipótese. Além disso, mais estudos também são necessários para avaliar se a infecção por PCV3 pode contribuir para o desenvolvimento de lesões semelhantes às de PDNS e problemas reprodutivos. A detecção do vírus em animais jovens sugere que a infecção ocorra ainda nas primeiras semanas de vida (PHAN *et al.*, 2016) e a detecção do vírus em fetos abortados mumificados pode indicar o resultado de transmissão vertical (PALINSKI *et al.*, 2017).

Além disso, o fato desse vírus ter sido identificado somente em *pools* de matrizes que pariram natimortos torna-o um candidato a ser estudado por sua potencial associação à natimortalidade. Uma análise individual das amostras pode trazer uma resposta neste sentido, já que o trabalho em *pool* oferece vieses como a diminuição da sensibilidade de detecção de um agente que esteja presente em baixas concentrações. Tendo em vista dados da literatura e a presença de PCV3 apenas em matrizes com natimortos, este vírus é um potencial candidato a ser estudado com maior profundidade.

5.3.3 CRESS

Os vírus com genoma circular de DNA fita simples (*ssDNA*) representam os elementos virais “mínimos”, geralmente com menos de 6 kb e codificantes de no máximo seis proteínas (DELWART; LI, 2012). A maioria dos vírus *ssDNA* são altamente dependentes da maquinaria de replicação do hospedeiro e possuem um iniciador de replicação conservado (Rep) (ROSARIO *et al.*, 2012). Estudos de metagenômica têm revelado uma grande diversidade de vírus com genomas circulares de DNA fita simples codificadores de replicase-associada, chamados de CRESS-DNA (*circular Rep-encoding ssDNA*). Atualmente o ICTV reconhece três famílias de vírus CRESS-DNA, *Geminiviridae*, *Nanoviridae* e *Circoviridae*, sendo a proteína Rep mais conservada entre essas famílias (STEEL *et al.*, 2016). Nos últimos anos, vírus eucarióticos CRESS-DNA têm sido identificados em amostras ambientais (KIM *et al.*, 2008; BREITBART *et al.*, 2015;), insetos (GARIGLIANY *et al.*, 2015), plantas (BASSO *et al.*, 2015) e em amostras de fezes de várias espécies, como bovinos (KIM *et al.*, 2012), morcegos (LIMA *et al.*, 2015), chimpanzés (BLINKOVA *et al.*, 2010), humanos (PHAN *et al.*, 2016), aves (LIMA *et al.*, 2017) e suínos (CHEUNG *et al.*, 2013, 2015).

Nesse estudo, seis genomas completos de novos vírus CRESS-DNA foram identificados (Tabela 6). Para facilitar a descrição, esses genomas foram provisoriamente denominados “*porcine serum-associated circular virus*” (PoSCV). Similarmente aos CRESS-DNA descritos na literatura, os genomas encontrados variaram entre 1.846 a 2.568 nucleotídeos em tamanho e apresentaram 35% de similaridade em nível de nucleotídeos entre si. Com exceção do PoSCV 8 RS/BR, cujas ORFs apresentaram a mesma orientação, duas ORFs de orientação oposta foram identificadas, as quais apresentaram similaridade para duas proteínas hipotéticas: a replicase (269 a 352 aminoácidos) e a proteína do capsídeo (171 a 352 aa) (Figura 9). Cinco, dos seis genomas descritos aqui, possuem uma região palindrômica que forma um *stem-loop*, sugerindo que a síntese do genoma ocorra pelo mecanismo de círculo-rolante (CHEUNG *et al.*, 2013). Essa região é caracterizada pela presença de nanômeros conservados (NANTATTAC) localizados no centro da estrutura de *stem-loop*. A identidade de cada um dos CRESS-DNA identificados nesse estudo está descrita na Tabela 6.

Em nível de aminoácidos, a identidade entre os genomas de CRESS-DNA identificados nesse estudo variou de 8,5% a 85,7% e de 6,5 a 51,7% entre as sequências de Rep e Cap, respectivamente. A maior identidade nas sequências de aminoácidos foi observada entre o PoSCV 7A RS/BR e o PoSCV 2B RS/BR para a Rep e entre o PoSCV 7A RS/BR e o PoSCV 2A RS/BR para Cap. Esses três genomas foram identificados na mesma granja, porém em *pools* distintos. O PoSCV 7A RS/BR foi detectado no *pool* formado por matrizes com casos de natimortalidade, enquanto que o PoSCV 2A RS/BR e o PoSCV 2B RS/BR foram detectados em matrizes sem casos de natimortalidade.

Adicionalmente, um total de 31 sequências de vírus CRESS-DNA foram filogeneticamente analisadas, sendo 25 delas obtidas no GenBank. A árvore filogenética foi construída com base na sequência de aminoácidos da replicase, utilizando o método *Maximum Likelihood* e o modelo LG+G com *bootstrap* de 1.000 réplicas (Figura 12).

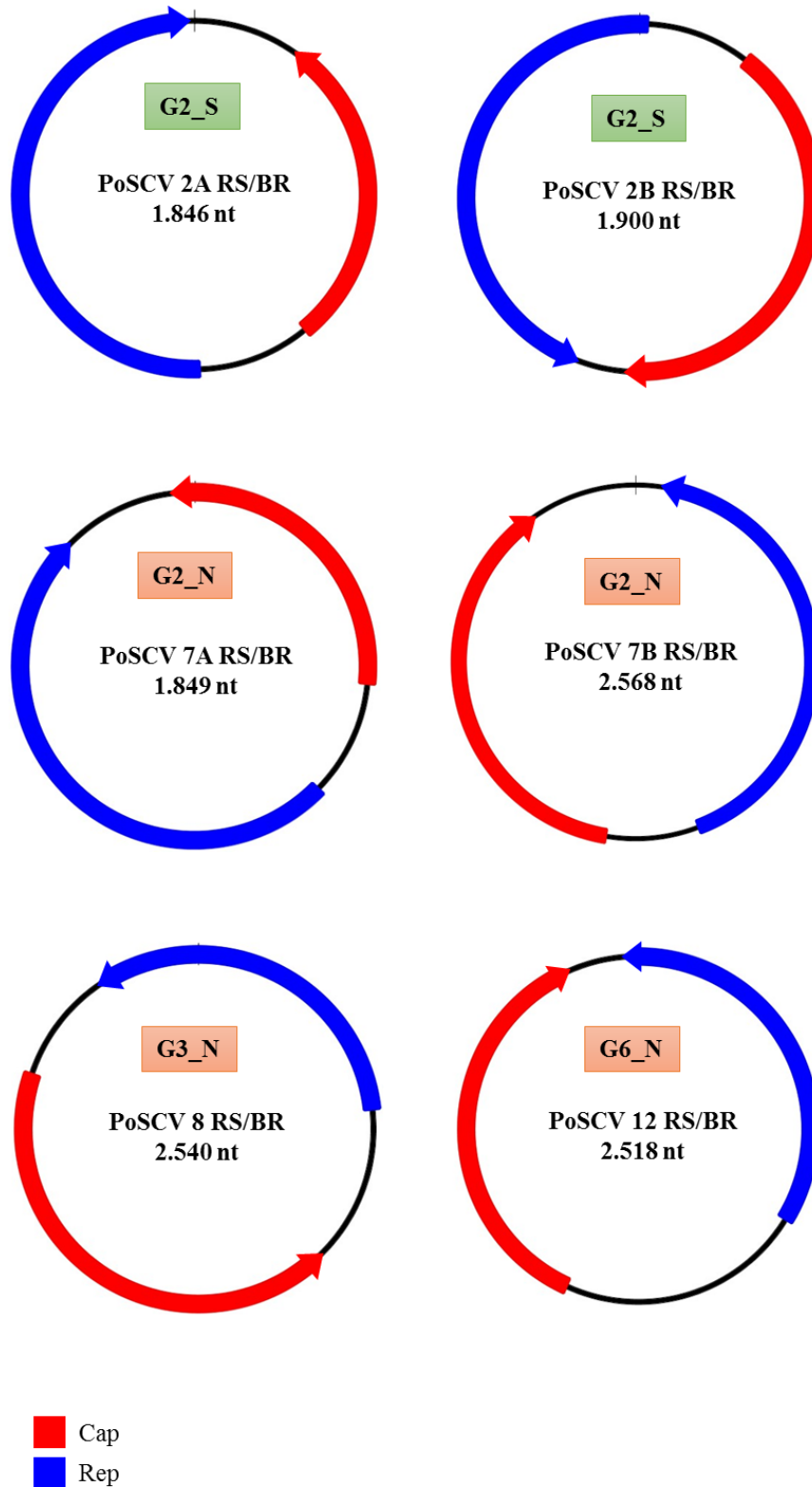


Figura 11. Representação gráfica dos seis novos genomas de vírus CRESS-DNA identificados nesse estudo. Dois genomas foram identificados em um *pool* de matrizes sem natimortos (PoSCV 2A RS/BR e PoSCV 2B RS/BR), e quatro em *pools* de matrizes com natimortos (PoSCV 7A RS/BR, PoSCV 7B RS/BR, PoSCV 8 RS/BR, PoSCV 12 RS/BR). Todos os genomas possuem duas ORFs cuja direção é indicada pela seta. O quadrado dentro de cada genoma indica o *pool* onde cada um foi identificado: G_S (sem caso de natimortalidade) e G_N (com caso de natimortalidade).

Tabela 6 – Genomas de CRESS-DNA identificados nesse estudo no soro de matrizes com e sem casos de natimortalidade.

Genoma	Pool	Nº de acesso (GenBank)*	Tamanho (nt)	Cobertura média	Descrição do melhor hit (BLASTx)	Identidade de aminoácidos (%)
PoSCV 2A RS/BR	G2_S	X	1.846	10	Duck faeces associated circular DNA virus	86 (Rep)
PoSCV 2B RS/BR	G2_S	X	1.900	43	Odonata-associated circular virus	63 (Rep)
PoSCV 7A RS/BR	G2_N	X	1.849	131	Duck faeces associated circular DNA virus	86 (Rep)
PoSCV 7B RS/BR	G2_N	X	2.568	28	Dromedary stool-associated circular ssDNA virus	52 (Rep)
PoSCV 8 RS/BR	G3_N	X	2.540	146	Porcine stool-associated circular virus	57 (Cap)
PoSCV 12 RS/BR	G6_N	X	2.518	38	Porcine stool-associated circular virus	93 (Cap)

*As sequências ainda não foram submetidas ao GenBank.

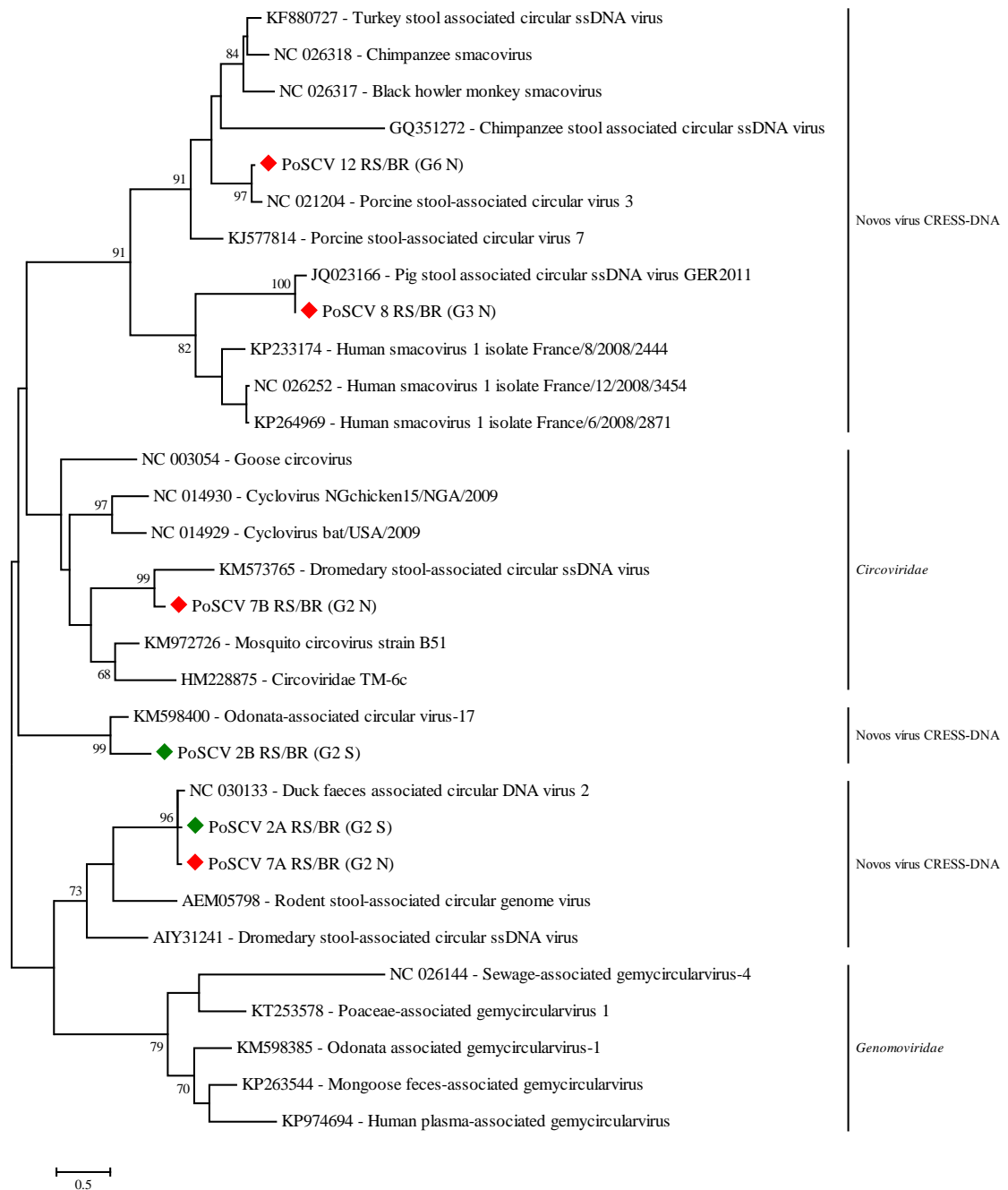


Figura 12. Análise filogenética dos vírus CRESS-DNA baseada na sequência de aminoácidos da Rep. Método de *Maximum Likelihood* com modelo LG+G utilizando bootstrap de 1.000 réplicas. As sequências identificadas nesse estudo estão destacadas por um losango verde (*pool* de matrizes sem natimortos ao parto) e vermelho (*pool* de matrizes com natimortos ao parto).

A árvore filogenética mostrou um agrupamento do PoSCV 7B RS/BR com o *dromedary stool-associated circular ssDNA virus* (KM573765) identificado em fezes camelo na Arábia Saudita (WOO *et al.*, 2014). Adicionalmente, essa sequência apresentou maior proximidade com o grupo formado por sequências da família

Circoviridae (gêneros *Circovirus* e *Cyclovirus*), cuja identidade de aminoácidos (Rep) entre essas sequências foi de 48,2%.

Em relação ao PoSCV 2B RS/BR, este formou um *cluster* com *odonata-associated circular virus* (KM598400) descrito em libélulas, nos Estados Unidos (não publicado), e apresentou identidade de 52,3%. No entanto, o PoSCV 7A RS/BR e o PoSCV 2A RS/BR agruparam com o *duck faeces associated circular DNA virus* (NC_030133), identificado em fezes de pato na Nova Zelândia (STEEL *et al.*, 2016).

O PoSCV 8 RS/BR agrupou com o *pig stool-associated circular ssDNA virus* (JQ023166), descrito em fezes de suínos aparentemente saudáveis na Alemanha (SACHSENROEDER *et al.*, 2012). A identidade em nível de aminoácidos da Rep entre essas duas sequências foi de 82,5%, apesar da identidade de nucleotídeos não ultrapassar 41%.

O PoSCV 12 RS/BR formou um *cluster* com o *porcine stool-associated circular virus* (NC_021204), identificado em fezes de suínos jovens (1 dia e 6 semanas de idade) com diarreia em um estudo realizado nos Estados Unidos (CHEUNG *et al.*, 2013). Esse agrupamento é reafirmado pela identidade superior a 82% entre esses genomas (tanto de aa, quanto de nucleotídeos).

O resultado da filogenia aliado aos dados da tabela 6 mostra que somente dois, dos seis genomas de CRESS-DNA identificados (PoSCV 8 RS/BR e PoSCV 12 RS/BR), apresentaram similaridade com sequências previamente descritas em suínos. Mais estudos são necessários a fim de melhor caracterizar os genomas identificados e inferir propriedades taxonômicas de acordo com a proposta atual (SIMMONDS *et al.*, 2017). A identificação desses genomas em soro de matrizes, oriundas de granjas geograficamente distantes, sugere uma ampla disseminação desses agentes no Rio Grande do Sul. Além disso, esses achados contribuem para o conhecimento de vírus que circulam em matrizes e suportam a ideia de que a diversidade de vírus CRESS-DNA é subestimada.

6. CONCLUSÕES

- O viroma do soro de matrizes suínas apresentou sequências similares ao torqueno vírus suíno (1a e 1b), circovírus suíno, CRESS, fagos e outros (vírus de plantas, algas, protozoários e insetos).
- *Reads* similares às sequências de membros das famílias *Anelloviridae* foram identificadas em maior quantidade.
- O perfil do viroma foi muito similar em ambos os grupos (matrizes que pariram e matrizes que não pariram natimortos) e não foi possível associar uma família viral com os casos de natimortalidade.
- Ao todo, 20 genomas completos foram obtidos e caracterizados: 10 TTSuV 1a, dois TTSuV 1b, seis CRESS-DNA (PoSCV) e dois genomas de PCV3.
- Os CRESS identificados apresentaram baixa similaridade com outras sequências depositadas tratando-se de genomas novos. Análises mais aprofundadas devem ser realizadas para caracterizar melhor esses genomas, bem como para avaliar se tais genomas apresentam alguma associação com quadros patogênicos.
- O genoma de PCV3 foi identificado no soro de matrizes com casos de natimortalidade de duas granjas diferentes.
- Esse é o primeiro relato da identificação de genomas de PCV3 em soro de suínos na América do Sul.

7. PERSPECTIVAS

- Comparar os resultados obtidos nesse estudo com o viroma presente em tecido de leitões natimortos.
- Pesquisar com maior profundidade a importância de infecções pelo PCV3 e seu papel como agente de enfermidades reprodutivas em suínos.
- Pesquisar o genoma dos diferentes CRESS identificados nesse estudo nas amostras de soros individuais.
- Padronizar uma PCR em tempo real quantitativa para pesquisar o PCV3 nas amostras de soro individuais e avaliar a carga viral.
- Caracterizar de forma mais detalhada os genomas obtidos nesse estudo.
- Analisar os resultados obtidos nesse estudo em conjunto com os dados epidemiológicos das matrizes suínas (idade, número de partos, tamanho da leitegada, número de natimortos, etc.).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA, Associação Brasileira de Produção Animal. **Relatório anual 2016**, São Paulo. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/>>. Acesso em: 1 Nov. 2016.

ALLANDER, T. *et al.* Identification of a third human polyomavirus. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, n. 8, p. 4130–4136, 2007.

ALMOND, G. W. *et al.* Diseases of the reproductive system. *In*: STRAM, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Ed). **Diseases of Swine**. 9 ed. Ames, Blackwell Publishing Ltd, 2006, p. 126-127.

AMANN, R. I., LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, Mar 1995.

AMIMO, J. O. *et al.* Metagenomic analysis demonstrates the diversity of the fecal virome in asymptomatic pigs in East Africa. **Archives of virology**, v. 161, n. 4, p. 887-897, Apr 2016.

ANTHONY, S. J. *et al.* A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. **Mbio**, v. 4, n. 5, Sep 2013.

ARAMOUNI, M. *et al.* Age-related tissue distribution of swine Torque teno sus virus 1 and 2. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 3-4, p. 350-353, Dec 2010.

ARAMOUNI, M. *et al.* Increased viral load and prevalence of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) in pigs experimentally infected with classical swine fever virus (CSFV). **Virus Research**, v. 172, n. 1-2, p. 81-84, Mar 2013.

BASSAMI, M. R. *et al.* Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in psittacine species in Australia. **Virology**, v. 279, n. 2, p. 392-400, Jan 2001.

BEXFIELD, N.; KELLAM, P. Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. **Veterinary Journal**, v. 190, n. 2, p. 191-198, Nov 2011.

BIAGINI, P. Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates. **The Journal of General Virology**, v. 82, n. 2, p. 379-83, Feb 2001.

BIGARRE, L. *et al.* Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. **The Journal of General Virology**, v. 86, n. 3, p. 631-635, Mar 2005.

BLINKOVA, O. *et al.* Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. **The Journal of General Virology**, v. 91, n. 1, p. 74-86, Jan 2010.

BLOMSTROM, A. L. *et al.* Viral Metagenomic Analysis Displays the Co-Infection Situation in Healthy and PMWS Affected Pigs. **PLoS One**, v. 11, n. 12, Dec 2016.

BORGES, V. F. *et al.* Risk factors for stillbirth and foetal mummification in four Brazilian swine herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 70, n. 3-4, p. 165-176, Set 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Situação sanitária das doenças de animais terrestres. 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/SituacaodedoencasanimaisnoBrasil2016_1.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2017.

BREITBART, M. *et al.* Genomic analysis of uncultured marine viral communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22, p. 14250-14255, Oct 2002.

CANARIO, L. *et al.* Between-breed variability of stillbirth and its relationship with sow and piglet characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 12, p. 3185-3196, Dec 2006.

CANARIO, L., BIDANEL, J. P., RYDHMER, L. Genetic trends in maternal and neonatal behaviors and their association with perinatal survival in French Large White swine. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 410, Dec 2014.

CARSON, T. L. Toxic Minerals, Chemicals, Plants, and Gases. *In*: STRAM, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Ed). **Diseases of Swine**. 9 ed. Ames, Blackwell Publishing Ltd, 2006, p. 971-983.

CHAMPLLOT S. *et al.* An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. **PLoS One**, v. 5, n. 9, Sep 2010.

CHEUNG, A. K. A divergent clade of circular single-stranded DNA viruses from pig feces. **Archives of Virology**, v. 158, n. 10, p. 2157-2162, Oct 2013.

CHEUNG, A. K. *et al.* Identification of a novel single-stranded circular DNA virus in pig feces. **Genome Announcements**, v. 2, n. 2, May 2014.

CHEUNG, A. K. *et al.* Identification of several clades of novel single-stranded circular DNA viruses with conserved stem-loop structures in pig feces. **Archives of Virology**, v. 160, n. 1, p. 353-358, Jan 2015.

CIACCI-ZANELLA, J. R. *et al.* Erradicação da doença de Aujeszky em Santa Catarina: importância da condição sanitária das leitoas de reposição. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 749-754, Jun 2008.

CIACCI-ZANELLA, J. R. *et al.* Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 449-455, Apr 2004.

CIBULSKI, S. P. *et al.* A Novel Anelloviridae Species Detected in Tadarida brasiliensis Bats: First Sequence of a Chiropteran Anellovirus. **Genome Announcements**, v. 2, n. 5, Oct 2014.

CONESA, S. *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3674-3676, Sep. 2005.

CORLESS, C. E. *et al.* Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1747-52, May 2000.

DEAN, F. B. *et al.* Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 8, p. 5261-5266, Apr 2002.

DELWART, E. L. Viral metagenomics. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, n. 2, p. 115-131, Apr 2007.

DELWART, E. Animal virus discovery: improving animal health, understanding zoonoses, and opportunities for vaccine development. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 3, p. 344-352, Jun 2012.

DELWART, E.; LI, L. Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. **Virus Research**, v. 164, n. 1-2, p. 114-121, Mar 2012.

DESAI, N. *et al.* From genomics to metagenomics. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 72-76, Feb 2012.

DUNNE, H. W. Abortion, stillbirth, fetal death, and infectious infertility. In: Dunne, H. W. **Disease of Swine**. 3 ed. Ames, Iowa States University Press, 1970, p. 836-868.

EDWARDS, R. A.; ROHWER, F. Viral metagenomics. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 504-510, Jun 2005.

EHRICHT, R.; HOTZEL, H.; SACHSE, K.; SLICKERS, P. Residual DNA in hermostable DNA polymerases - a cause of irritation in diagnostic PCR and microarray assays. **Biologicals**, v. 35, n. 2, p. 145-147, Apr 2007.

ELLIS, J. A.; ALLAN, G.; KRAKOWKA, S. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. **American journal of veterinary research**, v. 69, n. 12, p. 1608-1614, Dec 2008.

FREITAS, T. R. P. *et al.* Classical Swine Fever in Brazil: An Update. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 2, n. 8, p. 997-1002, Aug 2012.

GALLEI, A. *et al.* Porcine Torque teno virus: determination of viral genomic loads by genogroup-specific multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. **Veterinary microbiology**, v. 143, n. 2-4, p. 202-212, Jul 2010.

GARIGLIANY, M. M. *et al.* Characterization of a novel circo-like virus in *Aedes vexans* mosquitoes from Germany: evidence for a new genus within the family Circoviridae. **Journal of general virology**, v. 96, n. 4, p. 915-920, Apr 2015.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 270-285, Aug 2008.

GLASSING, A. *et al.* Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 24, May 2016.

GRARD, G. *et al.* A novel rhabdovirus associated with acute hemorrhagic fever in central Africa. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 9, Sep 2012.

HANDELSMAN, J. *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. 245–249, Oct 1998.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669–685, Dec 2004.

HAUSE, B. M. *et al.* Virus detection using metagenomic sequencing of swine nasal and rectal swabs. **Journal of Swine Health and Production**, v. 24, n. 6, p. 304-308, Nov 2016.

HAYES, S.; MAHONY, J.; NAUTA, A.; VAN SINDEREN, D. Metagenomic Approaches to Assess Bacteriophages in Various Environmental Niches. **Viruses**, v. 9, n. 6, May 2017.

HERPIN, P. *et al.* Effects of the level of asphyxia during delivery on viability at birth and early postnatal vitality of newborn pigs. **Journal of animal science**, Champaign, n. 74, n. 9, p. 2067-2075, Sep 1996.

HERPIN, P. *et al.* Effect of oxygen inhalation at birth on the reduction of early postnatal mortality in pigs. **Journal of animal science**, v. 79, n. 1, p. 5-10, Jan 2001.

HIJIKATA, M. *et al.* Genotypes of TT virus (TTV) compared between liver disease patients and healthy individuals using a new PCR system capable of differentiating 1a and 1b types from others. **Archives of Virology**, v. 144, n. 12, p. 2345–2354, Dec 1999.

HIJIKATA, M. *et al.* Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 54, n. 6, p. 244-245, Dec 2001.

HOLLER, L. D. Diagnosis of swine abortion. **Swine Health and Production**, v. 2, n. 6, Dez 1994.

HOUŠKA, L. *et al.* Economic values for traits of pigs in Hungary. **Czech Journal of Animal Science**, v. 55, n. 4, p. 139-148, 2010.

HUANG, Y. W. *et al.* Multiple infection of porcine Torque teno virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U.S. prototype PTTV strains: implication for genotyping of PTTV. **Virology**, v. 396, n. 2, p. 289-297, Jan 2010.

ICTV, Virus Taxonomy, **Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, 2011. London, 2016. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/>. Acesso em: 12 dez. 2016.

ITOH, Y. *et al.* Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 279, n. 2, p. 718-724, Dec 2000.

KARLSSON, O. E. *et al.* The Intestinal Eukaryotic Virome in Healthy and Diarrhoeic Neonatal Piglets. **PLoS One**, v. 11, n. 3, Mar 2016.

KEKARAINEN, T.; SIBILA, M.; SEGALES, J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. **The Journal of general virology**, v. 87, n. 4, p. 833-837, Apr 2006.

KEKARAINEN, T.; SEGALES, J. Torque teno sus virus in pigs: an emerging pathogen?. **Transboundary and emerging diseases**, v. 59, n. 1, p. 103-108, Mar 2012.

KENNEDY, J. *et al.* Marine metagenomics: new tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism. **Marine drugs**, v. 8, n. 3, p. 608-628, Mar 2010.

KIM, H. K. *et al.* Identification of a novel single-stranded, circular DNA virus from bovine stool. **The Journal of general virology**, v. 93, n. 3, p. 635-639, Mar 2012.

KIRKBRIDE, C. A.; MCADARAGH, J. P. Infectious agents associated with fetal and early neonatal death and abortion in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 4, p. 480-483, Feb 1978.

KNOL, E. F., LEENHOUWERS, J. I., VAN DER LENDE, T. Genetic aspects of piglet survival. **Livestock Production Science**, v. 78, n. 1, p. 47-55, Nov 2002.

KRAKOWKA, S. *et al.* Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. **American journal of veterinary research**, v. 69, n. 12, p. 1615-1622, Dec 2008.

LADINIG, A. *et al.* Birth weight, intrauterine growth retardation and fetal susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. 1-11, Oct 2014.

LE COZLER, Y. *et al.* Factors associated with stillborn and mummified piglets in high-prolific sows. **Animal Research**, v. 51, n. 3, p. 261-268, May 2002.

- LEARY, T. P. *et al.* Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. **The Journal of general virology**, v. 80, n. 8, p. 2115-2120, Aug 1999.
- LEENHOUWERS, J. I. *et al.* Fetal development in the pig in relation to genetic merit for pig survival. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 7, p. 1579–1770, Jul 2002.
- LEENHOUWERS, J. I., VAN DER LENDE, T., KNOL, E. F. Analysis of stillbirth in different lines of pig. **Livestock Production Science**, v. 57, n. 3, p. 243–253, Feb 1999.
- LI, L. *et al.* Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. **Journal of virology**, v. 84, n. 14, p. 6955-6965, Jul 2010.
- LI, L. *et al.* Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. **Journal of general virology**, v. 92, n. 4, p. 768-72, Apr 2011.
- LIMA, F. E. *et al.* Genomic characterization of novel circular ssDNA viruses from insectivorous bats in Southern Brazil. **PLoS One**, v. 10, n. 2, 2015.
- LIMA, D. *et al.* Fecal virome of healthy chickens reveals a large diversity of the eukaryote viral community, including novel circular single-stranded DNA viruses. **Journal of General Virology**, Jan 2017.
- LIU, L. *et al.* Identification of a novel bufavirus in domestic pigs by a viral metagenomic approach. **The Journal of General Virology** v. 97, n. 7, p. 1592-1596, Jul 2016.
- LUCIA, T. Jr. *et al.* Risk factors for stillbirths in two swine farms in the south of Brazil. **Preventive veterinary medicine**, v. 53, n. 4, p. 285-292, Apr 2002.
- LUSK, R. W. Diverse and Widespread Contamination Evident in the Unmapped Depths of High Throughput Sequencing Data. **PloS one**, v. 9, n. 10, Oct 2014.
- MACHADO-NETO, R.; GRAVES, C. N.; CURTIS, S. E. Immunoglobulins in piglets from sows heat-stressed prepartum. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 65, n. 2, p. 445–455, Aug 1987.
- MALDONADO, J. *et al.* Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. **Veterinary journal**, v. 169, n. 3, p. 454-456, May 2005.
- MANKERTZ, A. *et al.* Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. **Veterinary microbiology**, v. 98, n. 2, p. 81-88, Feb 2004.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, p. 31, Jul 2015.

MARTINEZ-GUINO, L.; KEKARAINEN, T.; SEGALES, J. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1390-1395, Jun 2009.

MASSA, R. *et al.* Situação atual da disseminação do vírus da síndrome reprodutiva respiratória em suínos (PRRSV) no mundo e os perigos de introdução no Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 2, p. 112-131, 2014.

MASEMBE, C. *et al.* Viral metagenomics demonstrates that domestic pigs are a potential reservoir for Ndumu virus. **Virology journal**, v. 9, p. 218, Sep 2012.

MCKEOWN, N. E. *et al.* Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. **Veterinary microbiology**, v. 104, n. 1-2, p. 113-117, Nov 2004.

MEYER, F. *et al.* The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 386, Sep 2008.

MIELE, M.; WAQUI, P. D. Estrutura e dinâmica dos contratos na suinocultura de Santa Catarina: um estudo de casos múltiplos. **Estudos Econômicos**, São Paulo, v. 37, n. 4, Dez 2007.

MOKILI, J. L.; ROHWER, F.; DUTILH, B. E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. **Current opinion in virology**, v. 2, n. 1, p. 63-77, Feb 2012.

MONINI, M. *et al.* Detection of Torque Teno Sus Virus in Pork Bile and Liver Sausages. **Food and environmental virology**, v. 8, n. 4, p. 283-288, Dec 2016.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, n. 5, p. 255-264, Nov 2008.

MORÉS, N. *et al.* Causas infecciosas de problemas reprodutivos na produção de suínos. **Comunicado técnico 498**, EMBRAPA, Concórdia, 9 p, Dez 2011.

NÄÄS, I. A.; TOLON, T. B.; BARACHO, M. S. Conforto ambiental em suínos: conceitos e dados. In: Associação Brasileira dos Criadores de Suínos (Ed). **Produção de suínos: teoria e prática**, 1 ed. Brasília, 2014, p. 869-876.

MARTINEZ-GUINO, L. *et al.* Torque teno sus virus (TTV) detection in aborted and slaughterhouse collected fetuses. **Theriogenology**, v. 74, n. 2, p. 277-281, Jul 2010.

MOSTROM, M. S. Zearalenone. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Veterinary Toxicology: Basic and clinic principles**. Academic Press, New York, 2007, p.977-982.

NÄÄS, I. A.; TOLON, T. B.; BARACHO, M. S. Conforto ambiental em suínos: conceitos e dados. In: Associação Brasileira dos Criadores de Suínos (Ed). **Produção de suínos: teoria e prática**, 1 ed. Brasília, 2014, p. 869-876.

NG, T. F. F. *et al.* A diverse group of small circular ssDNA viral genomes in human and non-human primate stools. **Virus Evolution**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 1-12, Dec 2015.

NI, J. *et al.* Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in china. **Virology Journal**, v. 11, n. 1, p. 203, Dec 2014.

NISHIZAWA, T. *et al.* A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post transfusion hepatitis of unknown etiology. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 241, n. 1, p. 92-97, Dec 1997.

NURK, S. *et al.* metaSPAdes: a new versatile de novo metagenomics assembler. Apr 2016. Disponível em < <https://arxiv.org/abs/1604.03071> >. Acesso em: 8 nov. 2016

O'CONNOR B. *et al.* Multiple porcine circovirus 2- associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, n. 7, p. 551-553, Jul 2001.

OKAMOTO, H. *et al.* TT Virus mRNAs Detected in the Bone Marrow Cells From an Infected Individual. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 279, n. 2, p. 700-707, Dec 2000.

OKAMOTO, H. *et al.* Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 6, p. 1291-1297, Jun 2002.

OLIVEIRA, L. G. *et al.* Peste suína clássica: caracterização da enfermidade e ações de controle e erradicação adotadas no Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 3, p. 343-358, Set 2014.

OLIVIERO, C. *et al.* Environmental and sow-related factors affecting the duration of farrowing. **Animal Reproduction Science**, v. 119, n. 1-2, p. 85-91, Dec 2010.

OSWEILER, G. D.; STAHR, H. M.; BERAN, G. W. Relationship of micotoxins to swine reproductive failure. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 73-75, 1990.

PALINSKI, R. M., MITRA, N., HAUSE, B. M. Discovery of a novel Parvovirinae virus, porcine parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs. **Virus genes**, v. 52, n. 4, p. 564-567, Aug 2016.

PALINSKI, R. *et al.* A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. **Journal of Virology**, v. 91, n. 1, Jan 2017.

- PENSAERT, M. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 175-183, 2004.
- PESCADOR, C. A. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Causas infecciosas de aborto e natimortalidade em suínos no sul do Brasil. Porto Alegre. 96 p, 2008.
- PHAM, V. H.; KIM, J. Cultivation of unculturable soil bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 475-484, Sep 2012.
- PHAN, T. G. *et al.* The fecal viral flora of wild rodents. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, p. 1-16, Sep 2011.
- PHAN, T. G. *et al.* Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 184, Nov 2016.
- PHENIX, K. V. *et al.* Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus circovirus of the family Circoviridae. **Journal of general virology**, v. 82, n. 11, p. 2805-2809, Nov 2001.
- POZZUTO, T. *et al.* In utero transmission of porcine torque teno viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 3-4, p. 375-379, Jun 2009.
- RAMIREZ, E. *et al.* Evaluation of the pathogenicity and transmissibility of a Chilean isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 55, n. 2, p. 115-124, 2008.
- RASBECH, N. O. A review of the causes of reproductive failure in swines. **British Veterinary Journal**, v.125, n. 12, p.599-616, Dec 1969.
- REYES, A. *et al.* Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 607-17, Sep 2012.
- RITTERBUSCH, G. A. *et al.* Natural co-infection of torque teno virus and porcine circovirus 2 in the reproductive apparatus of swine. **Research in veterinary science**, v. 92, n. 3, p. 519-523, Jun 2012.
- ROCHA, D. L.; ALBERTON, G. C.; DOS SANTOS, J. L. *et al.* Identificação do circovírus suíno tipo 2 e do parvovírus suíno em fetos suínos natimortos e mumificados provenientes de granjas no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, 2010.
- ROEHE, P. M. *et al.* Encephalomyocarditis virus (EMCV) in swine in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 16, n. 2, p. 117-120, Abr 1985.
- RONDON, M. R. *et al.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 6, p. 2541–2547, Jun 2000.

- ROSA, D. C.; GARCIA, K. C. O. D.; MEGID, J. Soropositividade para brucelose em suínos em abatedouros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 7, p. 623-626, Jul 2012.
- ROSARIO, K.; BREITBART, M. Exploring the viral world through metagenomics. **Current opinion in virology**, v. 1, n. 4, p. 289-297, Oct 2011.
- ROSARIO, K.; DUFFY, S.; BREITBART, M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. **Archives of Virology**, v. 157, n. 10, p. 1851-1871, Oct 2012.
- ROSSOW, K. D. *et al.* Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 1, p. 95-99, Jan 1996.
- SACHSENROEDER, J. *et al.* Simultaneous identification of DNA and RNA viruses present in pig faeces using process-controlled deep sequencing. **PLoS One**, v. 7, n. 4, Apr 2012.
- SALAY, E.; MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: Occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, v. 13, n. 2, p.87-92, Mar 2002.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 ed, v. 1, **Cold Spring Harbor**, 2001.
- SANCHEZ JR, R. E. *et al.* Porcine Circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 169-176, Jul 2001.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n.12, p. 5463-5467, Dec 1977.
- SCHOLZ, M. B.; LO, C. C.; CHAIN, P. S. Next generation sequencing and bioinformatics bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 9-15, Feb 2012.
- SCRUGGS, D. W.; SORDEN, S. D. Proliferative vasculopathy and cutaneous hemorrhages in porcine neonates infected with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 3, p. 339-342, May 2001.
- SCHAEFER, R. *et al.* Characterization of Aujeszky's disease virus isolated from South Brazil in the last twenty years by restriction enzyme analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.37, p. 390-394, Sep 2006.
- SHAN, T. The fecal virome of pigs on a high-density farm. **Journal of virology**, v. 85, n. 22, p. 11697-11708, Nov 2001.

SCHMIDT, C. *et al.* Swine Influenza Virus and Association with the Porcine Respiratory Disease Complex in Pig Farms in Southern Brazil. **Zoonoses Public Health**, v. 63, n. 3, p. 234-240, May 2016.

SIBILA, M. *et al.* Torque teno virus (TTV) infection in sows and suckling piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 3-4, p. 354-358, Jun 2009.

SILVA, G. S. *et al.* Case-control study evaluating the sow's risk factors associated with stillbirth piglets in Midwestern in Brazil. **Tropical animal health and production**, v. 47, n. 2, p. 445-449, Feb 2015.

SOBESTIANSKY, J. *et al.* Classificação das doenças. *In*: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Ed). **Doenças dos Suínos**. 2 ed, Cãnone editorial, 2012, p. 15-20.

STANO, M.; BEKE, G.; KLUCAR, L. viruSITE-integrated database for viral genomics. **Database (Oxford)**, v. 2016, Nov 2016.

STEEL, O. *et al.* Circular replication-associated protein encoding DNA viruses identified in the faecal matter of various animals in New Zealand. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 151-164, Sep 2016.

SUGIMORI, T. *et al.* A status quo survey on stillbirth and abortion in swine. III. Relationship between the day of pregnancy at the time of outbreak of Japanese encephalitis and the occurrence of stillbirth and abortion. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 27, p. 282–285, 1974.

SVRAKA, S. *et al.* Metagenomic sequencing for virus identification in a public-health setting. **The Journal of General Virology**, v. 91, n. 11, p. 2846-2856, Nov 2010.

TAIRA, O. *et al.* Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. **Veterinary Microbiology**, n. 139, n. 3-4, p. 347-350, Nov 2009.

TEIXEIRA, T. F. *et al.* Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) viral loads in serum of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and healthy pigs in Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 101, p.38-41, Aug 2015.

TEMMAM, S. *et al.* Viral metagenomics on animals as a tool for the detection of zoonoses prior to human infection?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 10377-10397, Jun 2014.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, n. 1, Feb 2012.

TODD, D. *et al.* Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. **Virology**, v. 286, n. 2, p. 354-62, Aug 2001.

TOKARNIA, C. H. *et al.* O surto de peste suína africana ocorrido em 1978 no município de Paracambi, Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 223-238, Dez 2004.

VAN DER LENDE T., KNOL E. F., LEENHOUWERS J. I. Prenatal development as a predisposing factor for perinatal losses in pigs. **Reproduction Supplement**, Cambridge, v. 58, p. 247-261, 2001.

VAN DER LENDE, T.; VAN RENS, B.T. Critical periods for foetal mortality in gilts identified by analysing the length distribution of mummified foetuses and frequency of non-fresh stillborn piglets. **Animal Reproduction Science**, v. 75, n. 1-2, p. 141–150, Jan 2003.

VAN DIJK, A. J. *et al.* Factors affecting duration of the expulsive stage of parturition and piglet birth intervals in sows with uncomplicated, spontaneous farrowings. **Theriogenology**, v. 64, n. 7, p. 1573-1590, Oct 2005.

VAN RENS, B. T.; VAN DER LENDE, T. Parturition in gilts: duration of farrowing, birth intervals and placenta expulsion in relation to maternal piglets and placental traits. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 331-352, Jul 2004.

VANDERHAEGHE, C. *et al.* Longitudinal field study to assess sow level risk factors associated with stillborn piglets. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 78-83, Jul 2010.

VANDERHAEGHE, C. *et al.* Non-infectious factors associated with stillbirth in pigs: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 139, n. 1-4, p. 76-88, Jun 2013.

VANNIER, P. Infectious Causes of Abortion in Swine. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 34, n. 1, 1999.

VIRGIN, H. W. The virome in mammalian physiology and disease. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 142-150, Mar 2014.

XIAO, C. T.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. Characterization of a Novel Porcine Parvovirus Tentatively Designated PPV5. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. 1-11, Jan 2013.

WALDVOGEL, A. S. *et al.* Diagnosis of fetal infection with porcine parvovirus by in situ hybridization. **Veterinary microbiology**, v. 47, n. 3-4, p. 377-385, Dec 1995.

WEST, H. *et al.* Myocarditis and abortion associated with intra-uterine infection of sows with porcine circovirus 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 530-532, Nov 1999.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 6578-6583, Jun 1998.

WYLIE, K. M.; WEINSTOCK, G. M.; STORCH, G. A. Emerging view of the human virome. **Translational Research**, v. 160, n. 4, p. 283–290, Oct 2012.

ZALESKI, H. M.; HACKER, R. R. Variable related to the progress of parturition. **Canadian Veterinary Journal**, v. 34, p. 109-113, Feb 1993.

ZHANG, Z. *et al.* Natural infection with torque teno sus virus 1 (TTSuV1) suppresses the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccination. **Archives of Virology**, v. 157, n. 5, p. 927-933, May 2012.

ZHANG, B. *et al.* Viral metagenomics analysis demonstrates the diversity of viral flora in piglet diarrhoeic faeces in China. **The Journal of general virology**, v. 95, n. 7, p. 1603-1611, Jul 2014.