

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

**GENOMAS DE VÍRUS DE DNA DE FITA SIMPLES DETECTADOS EM SOROS
DE SUÍNOS COM SÍNDROME MULTISSISTÊMICA DO DEFINHAMENTO DO
SUÍNO ATRAVÉS DE METAGENÔMICA**

CRISTINE CERVA

Porto Alegre

2017

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

**GENOMAS DE VÍRUS DE DNA DE FITA SIMPLES DETECTADOS EM SOROS
DE SUÍNOS COM SÍNDROME MULTISSISTÊMICA DO DEFINHAMENTO DO
SUÍNO ATRAVÉS DE METAGENÔMICA**
(Tese de Doutorado)

Autora: Cristine Cerva

**Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área de
concentração em Microbiologia
Veterinária – Virologia, da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul.**

Orientador: Paulo Michel Roehle

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Cerva, Cristine

Genomas de vírus de DNA de fita simples detectados em soros de suínos com síndrome multissistêmica do definhamento do suíno através de metagenômica / Cristine Cerva. -- 2017.

71 f.

Orientador: Paulo Michel Roehle.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. suínos. 2. Síndrome multissistêmica do definhamento do suíno. 3. sequenciamento genético. 4. vírus. 5. metagenômica. I. Roehle, Paulo Michel, orient. II. Título.

CRISTINE CERVA

GENOMAS DE VÍRUS DE DNA DE FITA SIMPLES DETECTADOS EM SOROS DE
SUÍNOS COM SÍNDROME MULTISSISTÊMICA DO DEFINHAMENTO DO SUÍNO
ATRAVÉS DE METAGENÔMICA

Aprovada em 24 de março de 2017

APROVADO POR:

Prof. Dr. Paulo Michel Roehe
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Membro da banca

Dr. Helton Fernandes dos Santos
Membro da banca

Dra. Rúbia Marília Medeiros
Membro da banca

AGRADECIMENTOS

Agradeço de forma especial meu esposo Cláudio e minha filha Amanda por serem pacientes e compreensíveis com o meu envolvimento com a pesquisa.

Aos meus pais Cesar e Avani que sempre me apoiaram e me deram suporte para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao professor Paulo Roehle pela orientação, ensinamentos e confiança e por ter possibilitado a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e do Laboratório de Virologia do ICBS/UFRGS pelo companheirismo, ajuda, ensinamentos e estímulo quando precisei.

A todos que de alguma forma fizeram ser possível a realização deste trabalho, me dando força, acreditando em mim, me fazendo rir, tornando meus dias mais leves e me mostrando que a amizade e o amor tornam tudo mais fácil.

GENOMAS DE VÍRUS DE DNA DE FITA SIMPLES DETECTADOS EM SOROS DE SUÍNOS COM SÍNDROME MULTISSISTÊMICA DO DEFINHAMENTO DO SUÍNO ATRAVÉS DE METAGENÔMICA

RESUMO

As doenças associadas ao circovírus suíno (DACS) causam impacto econômico negativo nos sistemas de criação de suínos no mundo todo. As perdas incluem tratamento da doença, mortalidade, bem como diminuição no desempenho dos animais. Uma das manifestações mais relevantes das DACS é a síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS). O principal agente patogênico na causa da SMDS é o circovírus suíno tipo 2 (PCV2), no entanto, estudos observacionais e experimentais demonstraram que outros agentes estão envolvidos na patogênese e manifestação dos sinais clínicos. O sequenciamento de alto desempenho aliado a metagenômica são ferramentas que tornam possível a identificação da microbiota total de uma determinada amostra, independentemente de cultivo dos microrganismos. Visando contribuir para o conhecimento dos possíveis vírus envolvidos na SMDS, o presente trabalho realizou o sequenciamento genético de alto desempenho de soros de suínos e posterior análise do metagenoma resultante. Foram utilizadas amostras de soro coletadas em 2008, de 16 suínos com sinais clínicos da SMDS, entre 80 e 100 dias de idade, em uma granja no interior do Rio Grande do Sul. Os dados revelaram sequências virais de PCV2, parvovírus suíno tipo 1 a 6 (PPV1-6), torque teno vírus de suínos (TTSuV) tipo 1b, k2a e k2b e vírus de DNA circular de fita simples codificador de proteína associada a replicação (CRESS). A ocorrência de PCV2, PPV1-5 e TTSuV já foi descrita em suínos com SMDS, portanto este estudo reforça resultados anteriores. O PPV6 foi recentemente descrito na China, Europa e Estados Unidos, e os estudos não relacionaram o vírus com nenhuma doença específica de suínos. Os CRESS já foram identificados em todos os continentes, em vários tipos de amostras, incluindo fezes de suínos, mas sem nenhuma conexão com doenças de animais. Portanto, este é o primeiro relato de PPV6 e CRESS em suínos apresentando sinais de SMDS. Porém estudos posteriores são necessários para poder atribuir relação entre PPV6 e CRESS no desenvolvimento da SMDS.

Palavras-chave: SMDS, vírus de suínos, metagenômica, PCV2, PPV, TTSuV, CRESS.

SINGLE STRANDED DNA VIRUS GENOMES IDENTIFIED IN SWINE SERA WITH PORCINE CIRCOVIRUS ASSOCIATED DISEASE THROUGH METAGENOMIC

ABSTRACT

Porcine circovirus associated disease (PCVAD) is one of the causes of negative economic impact on pig farming systems described worldwide. Losses include expenditures with treatment, increased mortality rates, and decreased productivity. One of the most relevant manifestations of PCVAD is the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The main pathogen present in PMWS is porcine circovirus type 2 (PCV2). However, observational and experimental studies have shown that other agents may be involved in the pathogenesis and clinical manifestation. High-throughput sequencing combined with metagenomics analyses make it possible to identify the total microbiota in a given sample, regardless of microorganism culture. In order to contribute to the knowledge of the viruses involved in PMWS, the present study carried out the high-throughput sequencing of swine sera and subsequent analysis of the resulting metagenome. Sixteen serum samples collected in 2008 on a farm in Rio Grande do Sul, from 80 and 100 days old pigs with clinical signs of PMWS, were examined. Data revealed viral sequences of PCV2, porcine parvovirus type 1 through 6 (PPV1-6), torque teno sus virus (TTSuV) types 1b, k2a and k2b and circular replication-associated protein (Rep) encoding single-stranded (CRESS) DNA viruses. The occurrences of PCV2, PPV1-5 and TTSuV have already been described in pigs with PMWS, so this study reinforces previous results. PPV6 was recently described in China, Europe and the United States, and the studies did not correlate the virus to any specific disease. CRESS DNA viruses have been identified on all continents in various types of samples, including swine feces, but without any connection to animal diseases. The present study is the first report of PPV6 and CRESS in pigs presenting PMWS signals. However, further studies are necessary to be able to attribute the relationship between PPV6 and CRESS in the development of SMDS.

Keywords: SMDS, swine virus, metagenomics, PCV2, PPV 1-6, TTSuV, CRESS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Organização genômica ambisenso do PCV2, no qual a REP está na fita de sentido positivo e a CAP no sentido contrário, na fita complementar da forma replicativa (FR) do vírus. A estrutura em forma de laço (stem-loop) indica a origem da replicação (ori) entre as extremidades 5' da REP e da CAP (BIAGINI et al., 212) 17
- Figura 2.** Esquema do genoma linear dos PPVs; (A) organização das duas ORFs principais (REP e CAP) na mesma fita do DNA de fita simples dos PPVs tipos 1, 2, 3, 5 e 6; (B) uma ORF3, entre a REP e a CAP descritas nos PPV4 (Geneious versão 9.1.6) 20
- Figura 3.** Genoma circular de TTSuV evidenciando uma sequência rica em GC na região não codificadora e quatro ORFs na mesma fita de DNA (BIAGINI et al., 2012)21
- Figura 4.** Organização genômica esquemática dos vírus de DNA CRESS, demonstrando a orientação das ORFs principais REP e CAP, a stem-loop (círculo pequeno) e o nonâmero conservado na mesma fita da REP (estrela) ou na fita oposta (sem estrela) (Geneious versão 9.1.6) 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comparação das técnicas utilizadas em estudos realizados para detecção de vírus presentes em suínos com SMDS	15
Tabela 2 Classificação corrente dos virus de suínos da subfamília Parvovirinae, nomenclatura formalmente usada e abreviatura.....	19
Tabela 3 Classificação do virus de DNA CRESS baseado nas características genômicas, incluindo a orientação das ORFs e localização da stem-loop e do nonâmero conservado.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	111
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	133
2.1 Histórico da Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Suíno (SMDS)	133
2.2 Vacinação Contra Doenças Associadas ao Circovírus Suíno	144
2.3 Os Vírus Descritos na SMDS.....	166
2.3.1 Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2).....	16
2.3.2 Parvovirus Suíno (PPV).....	18
2.3.3 Torque Teno Virus Suíno (TTSuV)	20
2.4 Vírus atualmente identificados em análise metagenômica.....	21
2.4.1 Vírus de DNA circular de fita simples codificador de proteína associada a replicação (CRESS)	21
2.4.2 Vírus da família Microviridae.....	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
4 CAPÍTULO I	26
Viral DNA genomes identified in sera of swine with porcine circovirus associated disease	26
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

A agropecuária é uma importante atividade para a economia brasileira e, entre os diversos setores produtivos, destaca-se a suinocultura. O Brasil se estabelece como o quarto maior produtor mundial de carne suína, proteína mais consumida no mundo todo (DE ALMEIDA et al, 2015). O controle de enfermidades representa um grande desafio para a suinocultura, tornando-se ainda maior nas últimas décadas, devido à disseminação de doenças associadas ao circovírus suíno (DACS). É descrito que a DACS, além de causar redução no desempenho dos animais, aumenta a susceptibilidade a infecções secundárias (OPRIESSNIG et al, 2007; GRAU-ROMA et al, 2011).

A DACS afeta suínos de 5 a 12 semanas de idade, com morbidade de 5 a 30% e mais de 50% de mortalidade. Evidências revelam que suínos afetados com DACS podem desenvolver imunodepressão grave (WALKER et al, 2000; SEGALÉS et al, 2004; YIN et al, 2010), além de desordens reprodutivas, nefropatia, dermatite, lesões no sistema nervoso, complexo de doenças respiratórias, enterite e pneumonia necrotizante degenerativa (ZHAI et al, 2014).

Uma das manifestações mais relevantes entre a DACS é a síndrome multissistêmica do definhamento do suíno (SMDS), que afeta principalmente leitões no desmame e os sinais clínicos associados são perda de peso, dispnéia, palidez, icterícia, aumento dos linfonodos e diarreia (HARDING 1996; HARDING E CLARK, 1997, SEGALÉS et al., 2005). O principal agente patogênico envolvido na SMDS é o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) (MEEHAN et al., 1998, ALLAN et al., 1998, DUPONT et al., 2007; SALGADO et al., 2014). Contudo, a maioria dos animais infectados com PCV2 não desenvolve a doença. Idade, manejo, variante viral e outros patógenos também têm sido associados com o desenvolvimento das DACS (BLOMSTRÖM et al, 2009). Embora o PCV2 seja necessário para ocorrência da doença (SEGALÉS, 2008), a presença do agente viral, isoladamente, não é suficiente para o desenvolvimento dos sinais clínicos (CINO-OZUNA et al, 2011).

Portanto, o envolvimento de outros agentes infecciosos continua sendo objeto de investigações. A recente abordagem da metagenômica viral tem proporcionado eficiente triagem de amostras para detecção de agentes infecciosos, sem necessidade de conhecimento etiológico prévio e de cultivo viral, bem como tem auxiliado no diagnóstico e controle de doenças (BELÁK et al., 2013). A metagenômica é o estudo de comunidades de genomas microbianos que residem em animais, plantas e amostras ambientais. As amostras são coletadas e analisadas sem a necessidade de isolamento microbiano prévio. O sequenciamento de alto desempenho (SAD) é uma tecnologia capaz de produzir, a baixo custo, considerável

volume de dados de sequenciamento de DNA e, em alguns casos, superiores a um bilhão de *reads* por corrida (METZKER, 2010). O SAD, aliado à metagenômica, são ferramentas utilizadas para compreensão da ecologia e evolução dos ecossistemas microbianos (DE FILIPPO et al., 2012). A metagenômica viral tem auxiliado na investigação, não só de doenças com etiologia desconhecida, como também da biota viral de diferentes reservatórios e vetores (BLOMSTRÖM et al., 2012).

Recentemente, novos vírus foram detectados através de SAD seguido de análise metagenômica (BLOMSTRÖM et al., 2009; BELÁK et al., 2013; LIMA et al., 2017). Além das sequências virais conhecidas, genomas circulares de DNA de fita simples (ssDNA) têm sido descobertos sem similaridade com os genomas depositados nos bancos de dados existentes (BLINKOVA et al., 2010; SIKORSKI et al., 2013; DAYARAM et al., 2013). Dessa forma, diversos novos vírus identificados são consideravelmente divergentes geneticamente dos vírus já descritos e, provavelmente, representem novas famílias virais (MARTIN et al., 2011).

O presente estudo foi desenvolvido para identificar agentes infecciosos adicionais aos já descritos, que possam estar associados à ocorrência de SMDS, através do sequenciamento de alto desempenho e análise metagenômica em amostras de soros de suínos com sinais da síndrome. Espera-se que os resultados auxiliem na compreensão da epidemiologia, bem como colaborem para o desenvolvimento de medidas de controle mais eficazes contra SMDS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Suíno (SMDS)

A SMDS foi descrita pela primeira vez na década de 90 no Canadá (HARDING, 1996). Desde este relato inicial, a SMDS tem sido considerada, em quase todos os países, uma doença emergente que atinge severamente a população mundial de suínos (SEGALÉS et al., 2005; ALARCON et al., 2013). No Brasil os primeiros relatos ocorreram em Santa Catarina, (CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2001), no Rio Grande do Sul (PESCADOR et al., 2003) e Rio de Janeiro (FRANÇA et al., 2005). Porém, ainda hoje a SMDS continua causando prejuízos, mesmo com a utilização das vacinas disponíveis no mercado nacional a partir de 2007 (SALGADO et al., 2014; DE MENEZES et al., 2016).

Inicialmente, O PCV2 era o único agente conhecido como causador da SMDS, entretanto estudos revelaram que outros agentes virais estariam relacionados com o desenvolvimento da síndrome. As diferentes variantes virais de parvovírus suíno (PPV1 ao 5) tem sido relatadas como participantes, juntamente com o PCV2, em casos clínicos da SMDS. Vários artigos referem a co-infecção por PPV1 e PCV2 como responsáveis por causar SMDS (ALLAN et al., 1999; ELLIS et al., 1999; ALLAN & ELLIS, 2000; ELLIS et al., 2000; KENNEDY et al., 2000; KRAKOWKA et al.; 2000; OPRIESSNIG et al., 2004). Considerando que os PPVs tipos 2 a 5 foram descritos mais recentemente, o número de artigos relacionando estes vírus com a síndrome é menor. No entanto, os estudos disponíveis indicam que estes novos parvovírus podem estar envolvidos na co-infecção com PCV2 para a ocorrência da SMDS (CHEUNG et al., 2010; HUANG et al., 2010a; LI et al., 2013; OPRIESSNIG et al., 2014; SOUZA et al., 2016). A patogênese do recentemente descrito PPV6 permanece desconhecida já que sua prevalência em animais saudáveis e doentes é similar (NI et al., 2014; SCHIRTZINGER et al., 2015; CUI et al., 2016).

Outro vírus mencionado como participante na SMDS é o torque teno vírus suíno (TTSuV). A infecção com TTSuV em suínos é comum tanto em animais saudáveis (BLOIS et al., 2014) quanto em animais doentes (RAMMOHAN et al., 2012). Entretanto, trabalhos que investigam a prevalência de TTSuVs indicam que a presença destes vírus é mais frequente em animais afetados do que em não afetados pela SMDS (KEKARAINEN et al., 2006; ELLIS et al., 2008; ARAMOUNI et al., 2011; OZAWA et al., 2015). Acredita-se que os TTSuVs estão amplamente disseminados em suínos domésticos e javalis (MARTÍNEZ et al., 2006; KEKARAINEN e SEGALÉS, 2009) e podem ser capazes de estabelecer infecções crônicas

em mamíferos, impedindo uma resposta anti-viral eficiente das células do hospedeiro (SINGH e RAMAMOORTHY, 2016). A tabela 1 apresenta um resumo dos estudos sobre os vírus detectados nos animais com sinais de SMDS.

Os vírus de DNA de fita simples (ssDNA) evoluem rapidamente devido a seus mecanismos de replicação que predispõe a recombinação (LEFEUVRE et al., 2009) e altas taxas de substituição (DUFFY et al., 2008). Este rápido potencial evolutivo pode ter facilitado a emergência e disseminação destes vírus ssDNA como patógenos (ROSARIO et al., 2012). A recente análise metagenômica proporcionou a descoberta rápida de uma diversidade de vírus que ainda não pode ser classificada em famílias virais conhecidas. Em particular, aqueles atualmente denominados vírus de DNA circular de fita simples codificador de proteína associada a replicação (CRESS) (STEEL et al., 2016). Os CRESS são ubíquos e foram identificados em amostras ambientais, insetos, plantas e fezes de animais (WHON et al., 2012; DAYARAM et al., 2014; ROSARIO et al., 2011; KRABERGER et al., 2015; SIKORSKI et al., 2013; LIMA et al., 2017). Até agora estes novos vírus não classificados não foram relacionados com doenças em animais.

2.2 Vacinação Contra Doenças Associadas ao Circovírus Suíno

Tentativas iniciais no controle das DACS incluíram a utilização de uma vacina PPV morta. Como os suínos são frequentemente co-infectados com PPV e PCV2, esperava-se que a vacinação em idade precoce evitasse desenvolvimento das doenças. Entretanto o benefício não foi confirmado quando a vacina foi testada em condições controladas (OPRIESSNIG et al., 2004).

A primeira vacina de PCV2 disponível no mercado contra o PCV2 foi a CIRCOVAC (Merial) produzida a partir do vírus inativado e utilizada em animais em idade de reprodução (OPRIESSNIG, et al, 2007). Experiências em porcas SPF evidenciaram que o colostro de fêmeas vacinadas com CIRCOVAC continha células T CD8 + específicas de PCV2, ao passo que o mesmo não se detectou no colostro de porcas não vacinadas (MCCULLOUGH et al., 2007). O uso da vacina inativada em porcas demonstrou ser benéfico na redução da circulação do PCV2 e no estado de saúde nas primeiras semanas de vida dos leitões (CHARREYRE, C. et al., 2006). A implantação do programa de vacinação com a vacina inativada diminuiu significativamente a mortalidade dos leitões em granjas no Canadá, após 6 meses de utilização do produto (PLOURDE e MACHELL, 2007).

Tabela 1 Comparação das técnicas utilizadas em estudos realizados para detecção de vírus presentes em suínos com SMDS

Vírus detectados	Técnicas utilizadas	Referência
PCV2	Sorologia	Harding, 1996
PCV2 e PPV	Imunofluorescência Indireta	Allan et al., 1999
PCV2 e PPV	Imunoistoquímica/Sorologia/PCR/ Isolamento Viral	Ellis et al., 1999
PCV2 e PPV	Imunoistoquímica/PCR	Ellis et al., 2000
PCV2 e PPV	Imunoistoquímica	Kennedy et al., 2000
PCV2 e PPV	Imunoistoquímica/Sorologia/PCR	Krakowka et al., 2000
PCV2	Imunoperoxidase	Ciacchi e Morés, 2001
PCV2	Imunoistoquímica	Pescador et al., 2003
PCV2 e PPV	Imunoistoquímica/Sorologia/PCR	Opriessnig et al., 2004
PCV2	Imunoistoquímica/PCR	França et al., 2005
PCV2 e TTSuV	Hibridização <i>in situ</i> /PCR	Kekarainen et al., 2006
PCV2 e TTSuV	Imunoistoquímica/PCR	Ellis et al., 2008
PCV2, TTSuV e PPV4	PCR	Huang et al., 2010a
PCV2 e PPV4	PCR/Sequenciamento por Sanger	Cheung et al., 2010
PCV2 e TTSuV	Hibridização <i>in situ</i> /PCR tempo real	Aramouni et al., 2011
PCV2 e PPV3	PCR/Sequenciamento por Sanger	Li et al., 2013
PCV2, PPV1 a 5	PCR	Opriessnig et al., 2014
PCV2 e TTSuV	PCR	Ozawa et al., 2015
PCV2 e PPV3	PCR	Souza et al., 2016

Além da vacina de vírus inativado, duas vacinas de sub-unidade baseadas na proteína do capsídeo do PCV2, expressas em baculovírus, foram lançadas no mercado. São elas a Ingelvac CircoFLEX (Boehringer Ingelheim) e a Circumvent (MSD Animal Health). Estas vacinas de sub-unidade demonstraram diminuições significativas na mortalidade em suínos quando administrada em leitões com 3 semanas de idade (DESROSIER et al., 2007; VON RICHTHOFEN, et al., 2007)

A vacina Suvaxyn (Fort Dodge) é baseada em um vírus quimérico inativado contendo a sequência do capsídeo do PCV2 inserida no genoma do PCV1 (circovírus suíno não patogênico). Estudos demonstraram que houve diminuição da mortalidade dos suínos bem

como redução dos custos com tratamento de animais doentes nas granjas onde a vacina foi utilizada (CONNOR e ELSENER, 2007)

De uma forma geral, as vacinas comerciais contra o PCV2 aumentam o ganho diário de peso dos leitões e diminuem a taxa de mortalidade nos rebanhos, não havendo diferença significativa entre os efeitos das diferentes vacinas (KRISTENSEN et al., 2011). Entretanto, foram descritos casos de ocorrência de surtos de SMDS em sistemas de produção nos quais utilizavam a vacina contra PCV2. Os vírus identificados nestes surtos apresentavam mudanças antigênicas (*antigen drift*) em relação aos vírus anteriormente descritos (XIAO et al., 2012; SALGADO et al., 2014). Estas mudanças antigênicas são devidas ao acúmulo de substituições de aminoácidos, ao longo do tempo, reduzindo a avidéz de ligação do anticorpo como os sítios de ligação do antígeno do viral, diminuindo a eficácia das vacinas (HENSLEY et al., 2009; RASH et al., 2017).

2.3 Os Vírus Descritos na SMDS

2.3.1 Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2)

O circovirus suíno tipo 2 (PCV2) pertence à família *Circoviridae*. O PCV2 é um vírus pequeno (17–20,7 nm diâmetro), icosaédrico, não envelopado, contendo genoma de DNA circular de fita simples que varia de 1,7 a 2,3 kb de tamanho. Os circovírus tem uma organização do genoma ambisenso e replicam-se utilizando uma forma replicativa (FR) intermediária de DNA circular de dupla fita. Através do mecanismo de replicação em círculo rolante (RCR) a FR é produzida empregando a DNA polimerase da célula hospedeira, durante a fase S de divisão celular (BIAGINI, et al., 2012). As fases abertas de leitura (ORFs) estão dispostas nas diferentes cadeias do DNA de dupla fita da FR do PCV2 (Figura 1). Duas ORFs principais, codificando a proteína de replicação (REP) na fita senso do vírion e a proteína do capsídeo (CAP) na cadeia complementar da FR podem ser identificadas em genomas de circovírus (BIAGINI et al., 2012). A REP, que possui sequencias características envolvidas na replicação, é a proteína mais conservada dos circovírus. Já a CAP, que é mais divergente, é apenas caracterizada por uma região rica em aminoácidos básicos, geralmente arginina, na região N-terminal (NIAGRO et al., 1998; ROSARIO et al., 2012). A região intergênica entre as extremidades 5' destes dois genes contém o nonâmero conservado (T/N)A(G/T)TATTAC (N podendo ser T, C, A ou G), localizado no ápice de uma estrutura em forma de laço (*stem-*

loop), no qual se dá a origem da replicação (*ori*) por círculo rolante (ROSARIO et al., 2017). Apesar da REP e da CAP estarem sempre presentes, outras proteínas também podem ser expressas nos circovírus (HAMEL et al., 1998). Os PCV2 são conhecidos por codificarem uma terceira proteína denominada VP3 (ORF3), com capacidade de apoptose (LIU et al., 2005; HOUGH et al., 2015) bem como uma quarta com potencial anti-apoptótico (LV, et al., 2016).

O suíno parece ser o hospedeiro natural do PCV2 (SEGALÉS e DOMINGO, 2002), entretanto genomas deste vírus já foram identificados em javalis doentes (ELLIS et al., 2003). A comparação entre sequências de PCV2 identificadas em suínos afetados e não afetados por SMDS não indicou nenhum marcador molecular que pudesse diferenciar cepas patogênicas das não patogênicas (ALLAN et al., 2003; DE BOISSESON et al., 2004).

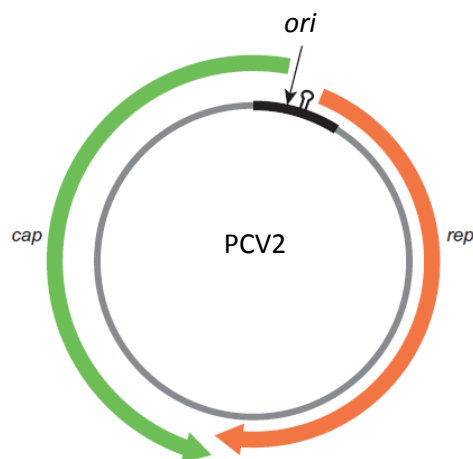


Figura 1 Organização genômica ambisenso do PCV2, no qual a REP está na fita de sentido positivo e a CAP no sentido contrário, na fita complementar da forma replicativa (FR) do vírus. A estrutura em forma de laço (stem-loop) indica a origem da replicação (*ori*) entre as extremidades 5' da REP e da CAP (BIAGINI et al., 212).

A infecção com PCV2 é necessária para a expressão completa do quadro de SMDS (ALLAN and ELLIS, 2000). Contudo, nem todos os suínos infectados com PCV2 desenvolvem sinais clínicos da síndrome (ALLAN et al., 1999; KRAKOWKA et al., 2000). O mecanismo pelo qual outros vírus podem desencadear o desenvolvimento da SMDS em suínos doentes infectados com PCV2 ainda é desconhecido. Especula-se que a estimulação antigênica com agentes infecciosos cause a multiplicação das células de defesa, aumentando o número de células na fase S de divisão celular (KRAKOWKA et al., 2000). Consequentemente, há um aumento da quantidade de enzima DNA polimerase, necessária para replicação dos vírus de ssDNA (TISCHER et al., 1987; SAEKHOW et al., 2015). Por esta razão, os parvovírus têm sido associados à patogênese da SMDS devido ao seu tropismo

por tecidos mitoticamente ativos, tais como os linfonodos, que também são os alvos primários do PCV2 (LAU et al., 2008; OPRIESSNIG et al., 2014). Além disso, as células do sistema imunológico dos suínos com SMDS têm uma capacidade diminuída de desempenhar as suas funções (DARWICH et al., 2003). Áreas foliculares com depleção linfocítica e diminuição de células B e T em órgão linfóides levam os animais infectados com PCV2 a um estado de imunodepressão (SEGALÉS et al., 2004).

2.3.2 Parvovirus Suíno (PPV)

A família *Parvoviridae* compreende duas subfamílias: *Parvovirinae*, que inclui vírus que infectam vertebrados, e *Densovirinae*, abrangendo vírus que infectam artrópodes (COTMORE, et al., 2014). A subfamília *Parvovirinae* é ainda subdividida em oito gêneros, dos quais *Protoparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, e *Tetraparvovirus* possuem vírus que infectam suínos (STRECK et al., 2015). A classificação de alguns vírus de suínos caracterizados nestes gêneros não está bem estabelecida e nomes diferentes foram usados para os mesmos grupos de vírus (CSÁGOLA et al., 2012; XIAO et al., 2013a) (Tabela 2).

Os parvovirus estão entre os menores vírus conhecidos, envolvidos em um capsídeo de cerca de 20-30 nm de diâmetro. Apresentam um genoma linear, não segmentado de ssDNA, com cerca de 4-6,3 kb de tamanho. O genoma dos parvovírus contém duas ORFs; a ORF1 que codifica as proteínas não estruturais (REP), necessárias para a transcrição e replicação do DNA e a ORF2 que codifica as proteínas estruturais do capsídeo (CAP) (TIJSSEN et al., 2012). Uma ORF3 de função desconhecida é descrita em genomas de parvovírus suíno 4 (PPV4). As ORFs estão dispostas na mesma fita de DNA de todos os parvovírus suínos (HUANG et al., 2010a; TIJSSEN et al., 2012) (Figura 2). As extremidades 5' e 3' do genoma dos parvovirus apresentam um complexo de sequências palindrômicas que formam estruturas em forma de grampos, com aproximadamente 120 a 200 bases (BERNS e HAUSWIRTH, 1984). A replicação viral ocorre no núcleo e requer que a célula hospedeira se apresente na fase S do ciclo celular, indicando uma associação entre a replicação viral e a do hospedeiro. A replicação origina uma série de concatêmeros resultantes de um mecanismo de replicação por grampo rolante, no qual envolve a utilização da DNA polimerase do hospedeiro (TIJSSEN et al., 2012).

Desde a sua primeira associação com uma doença suína (CARTWRIGH e HUCK, 1967), o parvovírus suíno 1 (PPV1) tem sido encontrado em todo o mundo e foi identificado como o principal agente causador de morte fetal e infertilidade em suínos (MENGELING et al., 1988; STRECK et al., 2015). Nos anos de 2001 a 2014, foram relatados cinco espécies adicionais (PPV2 a PPV6) (HIJIKATA et al., 2001; LAU et al., 2008; CHEUNG et al., 2010; XIAO et al., 2013b; Ni et al, 2014). O PPV2 foi relacionado com a ocorrência de sinais clínicos em suínos como dispneia e enterites (XIAO et al., 2013c; CSÁGOLA et al., 2016). A co-infecção por PPV3 e PCV2, em animais apresentando SMDS, é mencionado em alguns estudos realizados na China, Europa e Brasil (LAU et al., 2008; LI et al., 2013; SOUZA et al., 2016). O PPV4 e o PPV5 também têm sido relacionados com casos de suínos afetados com SMDS (CHEUNG et al., 2010; WU et al, 2014).

Tabela 2 Classificação corrente dos vírus de suínos da subfamília Parvovirinae, nomenclatura formalmente usada e abreviatura

Gênero	Espécie	Variantes virais (nome formalmente utilizado)	Abreviatura
<i>Bocaparvovirus</i>	<i>Ungulate bocaparvovirus 2</i>	Porcine bocavirus 1	PBoV1
		Porcine bocavirus 2	PBoV2
		Porcine bocavirus 6	PBoV6
	<i>Ungulate bocaparvovirus 3</i>	Porcine bocavirus 5	PBoV5
	<i>Ungulate bocaparvovirus 4</i>	Porcine bocavirus 7	PBoV7
	<i>Ungulate bocaparvovirus 5</i>	Porcine bocavirus 3	PBoV3
		Porcine bocavirus 4-1	PBoV4-1
Porcine bocavirus 4-2		PBoV4-2	
<i>Copiparvovirus</i>	<i>Ungulate copiparvovirus 2</i>	Porcine parvovirus 4	PPV4
<i>Protoparvovirus</i>	<i>Ungulate protoparvovirus 1</i>	Porcine parvovirus Kresse (Porcine Parvovirus 1)	PPV-Kr (PPV1)
		Porcine parvovirus NADL-2 (Porcine parvovirus 1)	PPV-NADL2 (PPV1)
<i>Tetraparvovirus</i>	<i>Ungulate tetraparvovirus 2</i>	porcine hokovirus (porcine parvovirus 3)	P-PARV4 (PPV3)
	<i>Ungulate tetraparvovirus 3</i>	porcine Cn virus (porcine parvovirus 2)	CnP-PARV4 (PPV2)
Not yet classified		porcine parvovirus 5	PPV5
		porcine Parvovirus 6	PPV6

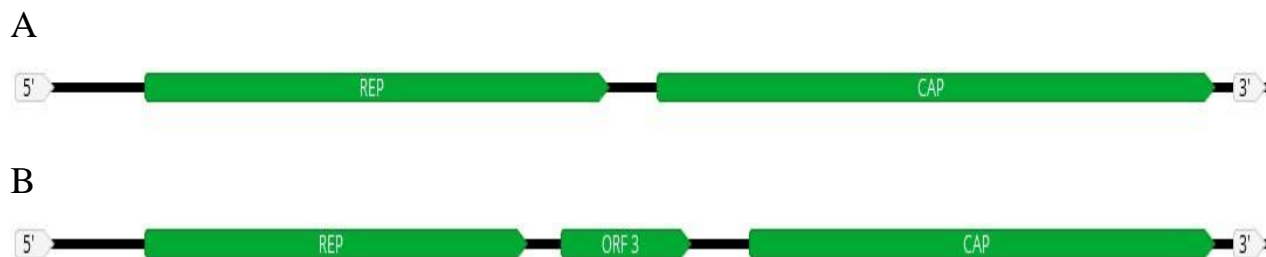


Figura 2 Esquema do genoma linear dos PPVs; (A) organização das duas ORFs principais (REP e CAP) na mesma fita do DNA de fita simples dos PPVs tipos 1, 2, 3, 5 e 6; (B) uma ORF3, entre a REP e a CAP descritas nos PPV4 (Geneious versão 9.1.6)

2.3.3 Torque Teno Virus Suíno (TTSuV)

Os torque teno vírus suínos (TTSuV) são vírus que pertencem a família *Anelloviridae*. Os vírus desta família não possuem envelope e apresentam tamanho próximo a 30 nm. Exibem genoma circular de ssDNA de 2,1 a 3,8 kb (OKAMOTO et al., 2002). A organização genômica é senso negativo e a região não codificante geralmente contém uma ou duas sequências entre 80 a 110 nucleotídeos com alto conteúdo de GC (aproximadamente 90%), o qual forma a estrutura de *stem-loop* (KEKARAINEN e SEGALÉS, 2009). Duas ORFs principais, ORF1 e ORF2 e ORFs adicionais podem ser observadas nos Torque teno vírus (TTVs). Estas ORFs se sobrepõem parcialmente e seus tamanhos estimados variam de acordo com o isolado (Figura 3). Já foi demonstrado que os torque tenos podem codificar pelo menos 7 proteínas expressas via transcrição alternativa. A ORF1 possui sequências ricas em arginina na porção N-terminal e pelo menos uma sequência de aminoácidos com o qual a replicação em círculo rolante dos vírus de DNA está associada. Por causa destas características, acredita-se que a ORF1 codifica a CAP e a REP dos anelovirus. A ORF2, que apresenta o motivo conservado WX₇HX₃CXCX₅H, codifica um peptídeo capaz de suprimir o fator nuclear kappa B (NF-κB), o qual desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção. A ORF3 tem um domínio rico em serina na região C-terminal, capaz de gerar diferentes sítios de fosforilação. Estes sítios podem estar ligados à função de manter persistente a infecção viral (BIAGINI et al., 2012).

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV*), os TTSuVs são divididos em dois gêneros: *Iotatorquevirus* e *Kappatorquevirus*, possuindo cada um duas espécies: 1a, 1b e k2a, k2b, respectivamente. Todas as espécies de TTSuV já foram descritas em vários países (NIEL et al., 2005;

CORNELISSEN-KEIJSERS et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2015), porém no Brasil ainda não foi detectada a presença do TTSuVk2b.

Os TTSuVs estão disseminados em todos os rebanhos de suínos do mundo (HUANG et al., 2010b; GAUGER et al., 2011; BLOIS et al., 2014). Alguns autores relatam não haver relação entre TTSuV e animais doentes (LEE et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2013). Já em outros trabalhos, propõem-se que a co-infecção do TTSuV e PCV2 é necessária para a ocorrência dos sinais clínicos da SMDS (ARAMOUNI, et al., 2011; ELLIS et al., 2008).

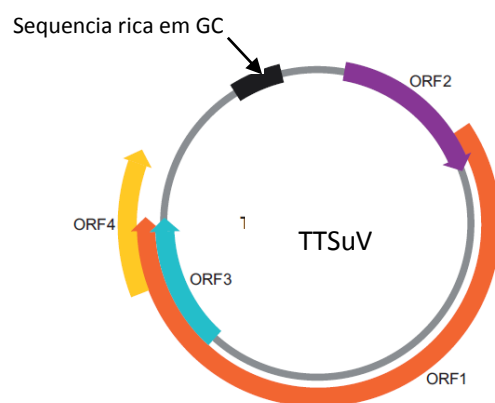


Figura 3 Genoma circular de TTSuV evidenciando uma sequência rica em GC na região não codificadora e quatro ORFs na mesma fita de DNA (BIAGINI et al., 2012).

2.4 Vírus atualmente identificados em análise metagenômica

2.4.1 Vírus de DNA circular de fita simples codificador de proteína associada a replicação (CRESS)

Recentemente, a metagenômica revelou uma diversidade sem precedentes de vírus de ssDNA circulares, expandindo suas conhecidas distribuições ambientais (ROSARIO et al., 2012). Genomas Identificados através da metagenômica demonstraram arquiteturas únicas e revelaram um desafio para a classificação na taxonomia atual e uma oportunidade para revisitar hipóteses sobre a história evolutiva desses vírus (ROSARIO et al., 2012). Os vírus ssDNA são largamente identificados com base nos motivos e resíduos catalíticos conservados nas proteínas de replicação em círculo rolante (BIAGINI et al., 2012). Os novos genomas identificados através da metagenômica, em particular os vírus de DNA circular de fita simples codificadores de proteína associada a replicação, os denominados CRESS, estão presentes no viroma de muitos ecossistemas e são conhecidos por infectar uma ampla gama de organismos.

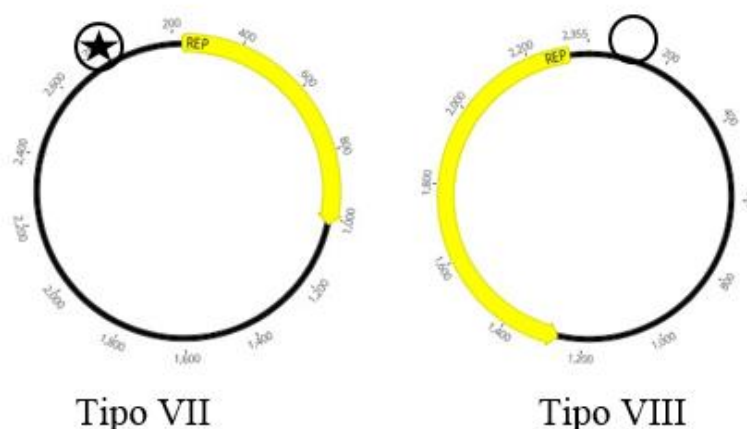


Figura 4 Organização genômica esquemática dos vírus de DNA CRESS, demonstrando a orientação das ORFs principais REP e CAP, a stem-loop (círculo pequeno) e o não-número conservado na mesma fita da REP (estrela) ou na fita oposta (sem estrela) (Geneious versão 9.1.6)

Tabela 3 Classificação do vírus de DNA CRESS baseado nas características genômicas, incluindo a orientação das ORFs e localização da stem-loop e do não-número conservado

Tipo	Orientação das ORFs principais	Posição da <i>stem-loop</i> (Ω) em relação às ORFs	Presença do não-número na mesma fita da REP
I	ambisenso	$\leftarrow \Omega \rightarrow$	sim
II	ambisenso	$\leftarrow \Omega \rightarrow$	não
III	ambisenso	$\rightarrow \Omega \leftarrow$	sim
IV	ambisenso	$\rightarrow \Omega \leftarrow$	não
V	unisenso	$\rightarrow \Omega \rightarrow$	sim
VI	unisenso	$\leftarrow \Omega \leftarrow$	não
VII	única ORF	$\Omega \rightarrow$	sim
VIII	única ORF	$\leftarrow \Omega$	não

2.4.2 Vírus da família Microviridae

Os bacteriófagos (vírus de bactérias), pertencentes à família *Microviridae*, são as entidades biológicas mais numerosas na Terra, recuperadas de todos os tipos de biomas (corpo humano, ecossistemas aquáticos, amostras de solo, etc.) (ROUX et al., 2012). Sabe-se que esses vírus são importantes membros da virosfera e têm sido identificados em estudos de metagenômica em uma variedade de ecossistemas (ANGLY et al., 2009; TUCKER et al., 2011)

Os membros da família *Microviridae* não possuem envelope, apresentam simetria icosaédrica e são vírus de ssDNA que infectam procariotos. Existem duas morfologias

representadas dentro da família *Microviridae*, que junto com a organização do genoma, homologias de sequência e estilo de vida do hospedeiro, separam a família em duas partes distintas, o gênero *Microvirus* e os três gêneros da subfamília *Gokushovirinae*. Os membros do gênero *Microvirus* infectam enterobactérias e partilham uma morfologia e organização genômica tipificada pelo fago Enterobacteria ϕ X174 (ϕ X174). Membros do *Gokushovirinae* infectam bactérias parasitas intracelulares obrigatórias (*Bdellovibrio* e *Chlamydia*) e mollicutes (*Spiroplasma*), e compartilham a morfologia, tipificada por Spiroplasma fago 4 (SpV4) (CHERWA e FANE, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Expandir o conhecimento sobre os vírus relacionados com a ocorrência da síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS)

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar espécies de vírus de DNA nos soros de suínos com SMDS
- Detectar novos vírus, ainda não descritos na literatura, envolvidos com a SMDS
- Estabelecer caracterização genética e estudo de filogenia dos vírus detectados a fim de classificar as espécies envolvidas na SMDS

4 CAPÍTULO I

Viral DNA genomes identified in sera of swine with porcine circovirus associated disease

Trabalho submetido na forma de artigo científico ao periódico Journal of General Virology

Viral DNA genomes identified in sera of swine with porcine circovirus associated disease through metagenomics approach

Cristine Cerva^{1,2}, Fabiana Q. Mayer², Márcia R. Loiko^{1,2}, Ana Paula M. Varela¹, Samuel P. Cibulski³, Dennis M. Junqueira⁴, Thais F. Teixeira¹, Diane A. Lima^{1,2}, Camila M. Scheffer^{1,2}, Paulo M. Roehle¹

¹Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rio Grande do Sul, Brazil

²Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Rio Grande do Sul, Brazil.

³Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴Centro Universitário Ritter dos Reis – UniRitter, Rio Grande do sul, Brazil.

§Corresponding author:

Tel/Fax: 55 51 34813711

E-mail: cristine-cerva@seapi.rs.gov.br

Word count summary: 184

Word count text: 2880

No. of figures: 5

No. of supplementary table: 5

Selected complete or partial genome sequences were submitted to GenBank and 23 accession numbers were obtained:

Porcine Circovirus 2 PCV2-BR, KY084478; Porcine Parvovirus 1 PPV1-NS1-BR, KY586143; Porcine Parvovirus 1 PPV1-VP1-BR, KY609510; Porcine Parvovirus

2 PPV2-BR, KY586144; Porcine Parvovirus 3 PPV3-BR, KY586145; Porcine Parvovirus 4 PPV4-BR, KY586146; Porcine Parvovirus 5 PPV5-BR, KY605380; Porcine Parvovirus 6 PPV6-BR, KY094494; Torque Teno Sus Virus TTSuVk2b-BR/RS/2008, KY742732; Torque Teno Sus Virus TTSu1b-BR/RS/2008, KY742733; Torque Teno Sus Virus TTSuVk2a-BR/RS01/2008, KY742734; Torque Teno Sus Virus TTSuVk2a-BR/RS02/2008, KY742735; Torque Teno Sus Virus TTSuVk2a-BR/RS03/2008, KY742736; Torque Teno Sus Virus TTSuVk2a-BR/RS04/2008, KY742737; Torque Teno Sus Virus TTSuVk2a-BR/RS05/2008, KY742738; Torque Teno Sus Virus TTSuVk2a-BR/RS06/2008, KY742739; Torque Teno Sus Virus TTSuVk2a-BR/RS07/2008, KY742740; Torque Teno Sus Virus TTSuVk2a-BR/RS08/2008, KY742741; Porcine Serum Associated Circular Virus PoSeCV/BR2, KU203352; Porcine Serum Associated Circular Virus PoSeCV/BR3, KU203353; Porcine Serum Associated Circular Virus PoSeCV/BR4, KU203354; Porcine Serum Associated Circular Virus PoSeCV/BR5, KU203355; Porcine Serum Associated Circular Virus PoSeCV/BR6, KU203356

ABSTRACT

Porcine circovirus associated disease (PCVAD) is one of major cause of economic losses related to pig rearing systems. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), is one of the most often identified condition within PCVAD. The main pathogen involved in PMWS is porcine circovirus type 2 (PCV2); however, observational and experimental studies have shown that other agents are involved in the pathogenesis and manifestations of PMWS-associated clinical signs. The objective of this study is to know the range of viral agents present in PMWS-affected animals. Therefore, 16 serum samples collected from pigs between 80 and 100 days old showing PMWS signs were evaluated. The DNA extracted from the samples was submitted to high throughput sequencing (HTS). Metagenomics analysis revealed sequences of *Anelloviridae*, *Parvoviridae* and *Microviridae* viral families. The group of unclassified viruses had an important participation in the hits distribution. Genomes of PCV2, porcine parvovirus (PPV), torque teno sus virus (TTSuV) and circular replication-associated protein (Rep) encoding single-stranded (CRESS) DNA viruses were identified, some of them not yet described in PMWS affected pigs. The relationship between these viruses and PMWS development needs to be further investigated.

Keywords: swine, metagenomic, virome, high-throughput sequencing.

INTRODUCTION

Porcine circovirus associated disease (PCVAD) cause economic losses in pig rearing systems worldwide due to expenses with disease prevention and treatment and animals' mortality [1,2]. Furthermore, subclinical infections with PCV2 leads to increased food intake and lower feed conversion rate [3]. One of the most relevant manifestations among PCVAD is the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), a condition that mainly affects nursery and fattening pigs, whose clinical signs are wasting, dyspnea, pallor, icterus, enlarged lymph nodes and diarrhea [4,5]. The main pathogen involved in PMWS is porcine circovirus type 2 (PCV2) [6,7]. However, studies have shown that other viruses may be involved in disease pathogenesis such as porcine parvovirus (PPV) [8–10] and torque teno sus virus (TTSuV) [11–13].

In veterinary medicine, high throughput sequencing (HTS) techniques have allowed the identification of several new viruses in recent years [14,15]. A wide variety of genomes have been discovered without any similarity to the genomes previously described [16,17], probably representing new viral families [18]. Thus, the HTS approach can be applied in search of viral agents unsuspected to be involved with diseases conditions. In this sense, the present study described the genomic characterization of DNA viruses identified in sera of PMWS-affected pigs in Southern Brazil.

RESULTS

After trimmed, a total of 1,254,410 reads were obtained from the sequencing, and when assembly, 11,192 contigs were created. Of these, 89% were

from viral sequences. The viral families with higher frequency were *Anelloviridae* (39,8%), *Parvoviridae* (35,4%) and *Microviridae* (12,5%). Unclassified viruses also had an important contribution in the distribution (2,4%). Only 0.2% of hits distribution was from *Circoviridae* family (Figure 1). After individual analysis of the contigs, checking for similarities to sequences available on GenBank, only those with best BLASTx hits were annotated. Complete and partial sequences of porcine circovirus2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV), torque teno virus (TTSuV) and unclassified ssDNA virus were identified.

Viral genomic characterization and Phylogeny

PCV2

A circular DNA genome with 1767 nt in length, named PCV2-BR (GenBank accession KY084478) was identified. The sequence has 11 ORFs, 4 of positive sense and 7 of negative sense. The conserved nonanucleotide motif NANTATTAC (AAGTATTAC), which marks the origin of replication in the circoviruses [19] is present in the sequence. The genome-wide pairwise identities were 94-99% when comparing with complete PCV2 sequences described in GenBank. In addition, PCV2-BR also presented genomic features that characterize members of the family *Circoviridae*, such as three RCR motifs at the REP N-terminus including, motif I (FTLNN), motif II (PHLQG) and Motif III (YCSK). Still in the REP region, dNTP-binding domains were also identified. They are indicative of helicase activity characteristic of superfamily 3 (SF3) helicases, including motifs Walker-A (GPPGCGKS), Walker-B (VIDDF), and motif C (ITSN) [20].

The phylogenetic analysis of the PCV2-BR genome demonstrated that the sample isolated in this study grouped within subtype b clade (PCV2b), according

to the genetic classification proposed by [21]. This same pattern is observed for the majority of Brazilian sequences used as references in the phylogeny (Figure 2).

Parvovirus

Two partial regions of PPV1 were recovered; the first contains a coding region of REP (aa positions 502-662/ GenBank accession number KY586143) and the second a portion of the CAP (aa positions 358-439/ GenBank accession number KY609510). In the coding region of CAP, one mutation (A92→R), described only in pathogenic strains of PPV1 [22], was identified.

Nearly complete genomes of PPV type 2 to 6 (GenBank accession numbers KY586144, KY586145, KY586146, KY605380 and KY094494, respectively) were also recovered (Supplementary Table S1). Like other PPV4 genomes previously described, the PPV4 of this study showed a third ORF called ORF3, located between the REP and CAP ORFS. The recovered PPV5 genome presents complete REP and CAP with the partial C-terminal portion. Overall, these parvovirus sequences exhibited high pairwise identity with those available in Genbank (Supplementary Table S2).

The alignment of the predicted CAP protein sequence of the Brazilian parvovirus genomes (PPVs-BR) with other parvoviruses suggests that the motifs of Ca²⁺ binding loop (YXGXG/F/R), the HDXXY domain, and the amino acid D in the catalytic center of phospholipase A₂ (PLA₂) [23,24] are highly conserved. However, the Ca²⁺ binding loop and the catalytic center of PLA₂ motifs were not present in PPV4, as already described by Xiao [25](2013). Likewise, motifs important for replication were all conserved in PPVs-BR: the replication initiator

motif (I and II) and the NTP-binding and the helicase domains A, B, and C in REP [26,27].

A concatenated CAP/REP alignment was submitted to phylogenetic analysis. The resultant tree confirms the presence of PPV types 2, 3, 4, and 6 in the pig sera isolated in this study. Due to the length of the alignment used to reconstruct the phylogenetic trees, samples KY586143 (PPV1) and KY605380 (PPV5) were excluded from the analysis (Figure 3). However, the phylogenetic tree encompassing solely the REP region corroborates the classification of these samples as PPV1 and PPV5 respectively (data not shown).

Torque teno sus virus

Ten torque teno sus virus (TTSuV) full-length genomes (TTSuVs-BR) were recovered from swine sera. The sequences ranged from 2610 to 2873 nt and presented 3 ORFs. ORF1 and ORF2 presented among 1863-1935 nt and 1863-1935 nt, respectively. The ORF3 showed two coding intervals interspersed by an intron and the length of these coding regions ranged from 516 to 861 nt.

The TTSuVs-BR sequences have some of the patterns well conserved in anellovirus, such as high GC content in the untranslated region (about 80%), the arginine-rich domain in the ORF1 N-terminal region and the serine-rich sequence in the ORF3 C-terminal portion (Biagini, *et al.*, 2012). The ORF2 conserved motif $WX_7H_3CXCX_5H$ was identified harboring the mutation: $WX_7HX_3CXCX_5H$ in all Brazilian TTSuVs. TTSuVs-BR were classified into three (TTSuV1b, TTSuVk2a and TTSuVk2b) of the four existing torque teno virus phylogenetic groups (based on ORF1 sequences; Figure 4).

The comparison of TTSuVs-BR with those available in GenBank database showed that the nucleotide identity of the complete genome was 66-96% and the ORF1 identity was above 65%, confirming the species classification criterion (Biagini *et al.*, 2012) (Supplementary Table S3). The pairwise identity among the eight TTSuVk2a Brazilian strains showed 66-89% variation for genomic nucleotide identity and 67-84% for ORF1.

CRESS DNA virus

Five complete circular replication associated protein-encoding single stranded (CRESS) DNA viruses are described herein (CRESS-BR). The sequences range from 1837 to 2430 nt in length, with REP varying between 615 to 915 nt and the CAP between 516 to 1107 nt. Genomes were named porcine serum-associated circular viruses with the ending BR2-6 subtypes (PoSeCV/BR2-6). All CRESS-BR harbor the characteristic and unique sequence of nonanucleotides [29] at the apex of a stem-loop structure located in the long intergenic region (LIR) or in the short intergenic region (SIR). As for the circovirus, conserved REP motifs involved in the initiation of the CRESS replication and helicase activity [20,29] were identified in the CRESS-BR (Supplementary Table S4).

Pairwise identities among CRESS-BR showed high diversity at the nucleotide level for genome-wide (17-84%), REP (22-90%) and CAP (15-72%). The same occurred when compared to CRESS DNA virus already described (Supplementary Table S5). In the phylogenetic tree, two sequences described in this study (KU203352 e KU203353) grouped in the same clade of smacovirus. The three other CRESS-BR (KU203354 to KU203356) sequences clustered with sequences identified as unclassified CRESS DNA viruses (Figure 5).

DISCUSSION

There are established criteria for the diagnosis of PMWS, such as: weight loss, growth retardation, enlargement of inguinal lymph nodes, dyspnea, jaundice, presence of characteristic histopathological lesions (lymphocyte depletion, granulomatous inflammation in the lungs and/or lymphoid tissues) and detection of PCV2 within the characteristic lesions [5]. However, more recent studies have reported the occurrence of PMWS, based on clinical signs and the presence of PCV2 [7,30]. With the advent of high throughput sequencing, the presence of the complete PCV2 genome, coupled with the clinical signs, supports the confirmation of the PMWS diagnosis with great certainty. This work combines the presence of PCV2 with the knowledge of the clinical signs, compatible with PMWS and also identifies several viruses present in the sera of the affected animals. Some of the viruses detected have been previously described as causing the PMWS [9,13]. However, other viral families described here, had not yet been identified in pigs with PMWS. Therefore, the metagenomic approach in animals affected with PMWS provides important information to draw the profile of the viroma found in these animals. The metagenomic used here identified viral sequences of the families *Anelloviridae*, *Parvoviridae*, *Microviridae*, *Circoviridae* and non-classified CRESS DNA viruses in the sera of PMWS-affected pigs. Although a percentage of *Microviridae* family viruses were identified, the study focused on description of eukaryotic virus.

In the family *Circoviridae*, more than one PCV2 subtype has already been described in Brazil [31]. The sequence described here was of PCV2 subtype 2b (Figure 2), which has been also identified in a recent PMWS outbreak in Brazil [7]. Studies of virus identification and prevalence indicate that the predominant genotype in Brazil

is PCV2b [31–33]. Segalez et al [21] (2008) mention that from 2004, PCV2b has been more common in PMWS outbreaks in North America and Europe. Interestingly, the PCV2-BR grouped closely to PCV2 genomes retrieved from wild boars sampled in different Brazilian states and years (KT216675 – Santa Catarina, 2012; KC261601 – São Paulo, 2008). This result suggests that PCV2 may be circulating among the domestic and wild swine populations in Brazil. This has also been observed in Greece, where high-identity genomes were detected in wild boars of different groups and in domestic pigs [34].

Porcine parvoviruses are included in subfamily Parvovirinae and are composed of a linear, nonsegmented molecule of single stranded DNA (ssDNA) of about 4–6.3 kb in size [35]. Parvoviruses cause disease in pigs related to reproductive problems [36] and when associated with PCV2, increase the severity of PMWS clinical signs [37]. The PPVs-BR grouped with high support within 4 distinct groups (2, 3, 4 and 6) (Figure 3), besides PPV1-BR and PPV5-BR have also been confirmed in separate phylogeny (data not shown). Although PPV1 to 5 have already been described in animals with PMWS [1], PPV6 had not yet been linked to this syndrome. Moreover, the PPV1 partial CAP sequence described here presented one of the mutations found only in the pathogenic strains of this virus [22], also suggesting PPV1 involvement in the disease; this finding needs to be further investigated in a case-control study. The conserved motifs found in PLA₂ site on parvovirus capsid proteins have catalytic properties and are related to virus entry into host cells inducing viral infectivity [23,24]. In this study, PPV2, 3, 5 and 6 were shown to have these conserved domains, indicating that these viruses may be involved in the development of PMWS. In addition, this is the first report of the detection and characterization of genomes of PPV5 and PPV6 in Brazil.

Torque teno virus (family *Anelloviridae*) are believed to be able to establish chronic infections of a variety of mammalian hosts by decreasing the immune response to infections (Biagini *et al.*, 2012; Singh & Ramamoorthy, 2016). In pigs it is reported a higher prevalence of TTSuV infection in animals with PMWS than in pigs without this condition [11]. Three species of TTSuV (1b, k2a and k2b) were detected in the present study despite the fact that k2b species had not been previously reported in Brazil [13]. In this study, the species with the highest number of virus variants in PMWS-affected pigs was TTSuVk2a, with 8 identified strains (Figure 4). Regarding other viruses, only one strain of TTSuV1b and one of TTSuVk2b were observed. This result is in agreement with previous studies that described that among the torque teno sus virus, the highest occurrence in PCVAD affected pigs is TTSuVk2a specie [39,40]. There is great genetic variability among TTSuVs-BR and also in comparison to those available in the sequence database. Interestingly the animals tested here revealed coinfection with multiple TTSuV species. This finding was also observed in a previous study in Japan, which suggested that the co-infection with multiple TTSuV strains may be more frequent in PMWS-affected pigs than healthy animals [41].

The CRESS-BR had high genetic variability and evidenced similar architecture with some new proposed groups such as the smacovirus [42] and the unclassified CRESS DNA viruses [29]. The variability may be explained because circular single-stranded DNA viruses evolve rapidly due to their replication mechanisms that predispose to recombination [43] and high substitution rates [44]. The CRESS-BR that grouped with the smacovirus, remained in the same clade that CRESS recovered from pig (Germany), bovine (South Korea) and sheep (New Zealand). CRESS-BR, grouped with the unclassified CRESS DNA viruses, divided

the group with CRESS from samples of bats (United States and Brazil), bovine, duck and deer (New Zealand). A relevant result of this study was the fact that CRESS-BR were isolated from sera of pigs while the CRESS identified in all other species were detected in faeces. It can be observed, in phylogenetic analysis, that in addition to the diversity of hosts in the same group, there are also several countries in which they have been identified. These findings may suggest that these viruses have an extensive distribution worldwide, a wide range of hosts and have no preference for organs. There is some speculation in pointing out the new unclassified CRESS DNA virus as causative of plant diseases [45], but there is no evidence that they are responsible for clinical signs in animals. Therefore, it is early to state that the CRESS identified in this study have a role in the development of PMWS.

CONCLUSIONS

There were no previous reports of the presence of PPV6 and CRESS in sera from pigs affected with the syndrome. The fact that CRESS viruses found in swine sera in this study are phylogenetically close to those detected in animal faeces stimulate further research on the virome of different hosts and organs. The present study provides the description of several viruses that can be involved in PMWS etiology. It may serve as a basis for case-control studies in which these candidate viruses can be tested for their association to the disease.

METHODS

Sample collection and preparation

Swine sera used in this study were collected in 2008 and derived from health monitoring on certified farms submitted to Instituto de Pesquisas Veterinárias

Desidério Finamor, in Rio Grande do Sul State, Brazil. Sera from 16 swine aged between 80 and 100 days showing clinical signs such as weight loss, pneumonia, diarrhea and increased inguinal lymph nodes were evaluated. The samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. For sample preparation, sera were thawed and filtered through 0.22 syringe filters (Merck Millipore, Germany). The sera were pooled (2 mL of each serum) and centrifuged on a 25% sucrose cushion at $100,000 \times g$ for 4 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sorvall AH629 rotor). The resulting pellet was resuspended in 200 μL of TE buffer (Tris-hydrochloride buffer, pH 8.0, 1 mM EDTA) and submitted to DNA extraction.

DNA extraction, amplification and sequencing

The pellet containing viral particles was treated with a mixture of 5 μL RNase A (20 mg/mL, Invitrogen) and 2 μL DNase (2 Units/ μL , Turbo DNase, Ambion) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for two hours to digest susceptible nucleic acids [46]. Viral DNA was then extracted using a standard phenol-chloroform protocol [47] and enriched by multiple displacement amplification (MDA) using phi29 DNA polymerase [48]. The enriched DNA was purified using Agencourt[®] Ampure[®] XP beads and the quality and quantity were assessed by spectrophotometry (L-Quant, Locus Biotechnology) and fluorometry (Qubit, Invitrogen), respectively. The libraries were further prepared with 50 ng of purified DNA using a Nextera DNA sample preparation kit and sequenced using an Illumina MiSeq[®] instrument (2x250 paired-end reads with the Illumina v2 reagent kit).

Data assembly and processing

The quality of generated sequences was checked using FastQC. The sequences with bases having a *phred* quality score <20 were trimmed with aid of the Geneious Bioinformatics Platform version 8.0 (<http://www.geneious.com>). The paired end raw reads were assembled into contigs with SPAdes 3.0. All assemblies generated by SPAdes were confirmed by mapping reads to contigs using Geneious version 8.0 software. The BLASTx software was used to search for similarities of assembled contigs with previously known sequences. The viral blast hits with an E-value $\leq 10^{-4}$ were analyzed based on the taxonomic origin of the sequence with the best E-value. Open reading frame (ORF) predictions and genome annotations were performed with the support of Geneious software. Gene and protein comparisons were performed with BLASTn and BLASTp. The metagenomics RAST server (MG-RAST) was used to analyze the distribution of viral hits.

Phylogenetic analysis

The sequences recovered in this study were aligned with reference sequences available at GenBank by BLAST analysis. When adequate, outgroup sequences were included in the alignment using MAFFT version 7.222. Phylogenetic trees were generated by the maximum likelihood (ML) method using PhyML [49] and incorporating the best-fitted nucleotide (nt) substitution model as determined in MEGA7 [50]. The confidence levels of the tree branch nodes were obtained by analysis of 1000 bootstrap replicates. Analyses were made on MEGA7. The GenBank accession numbers of the viral sequences used in the phylogenetic analyses are shown on tree figures.

Funding information

This work was financial supported by the government agencies FINEP, CNPq and EMBRAPA. P.M. Roehle is a CNPq 1A research fellow.

Acknowledgements

We thank the employees of the Desidério Veterinary Research Institute for their help in the development of this project

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest regarding this manuscript.

Ethical statement

The protocol for this study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (project number 31670).

No animals were sacrificed for the purpose of this study.

REFERENCES

- [1] Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG. Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. *Vet Microbiol* 2014;173:9–16. doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.024.
- [2] Allan GM, Ellis JA. Porcine Circoviruses: A Review. *J Vet Diagnostic Investig* 2000;12:3–14. doi:10.1177/104063870001200102.
- [3] Alarcon P, Rushton J, Wieland B. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England - An economic disease model. *Prev Vet Med* 2013;110:88–102. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.02.010.
- [4] Harding JS, Clark EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Heal Prod* 1997;5:201–3.
- [5] Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Anim Heal Res Rev* 2005;6:119–42. doi:10.1079/AHR2005106.
- [6] Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Daft B, Clarke EG, Ellis J a., et al. Isolation of Porcine Circovirus-like Viruses from Pigs with a Wasting Disease in the USA and Europe. *J Vet Diagnostic Investig* 1998;10:3–10. doi:10.1177/104063879801000102.
- [7] Salgado RL, Vidigal PM, de Souza LF, Onofre TS, Gonzaga NF, Eller MR, et al. Identification of an Emergent Porcine Circovirus-2 in Vaccinated Pigs from a Brazilian Farm during a Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome Outbreak. *Genome Announc* 2014;2:1–2. doi:10.1128/genomeA.00163-14.

- [8] Krakowka S, Ellis J a, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 2000;37:254–63. doi:10.1354/vp.37-3-254.
- [9] Wang F, Wei Y, Zhu C, Huang X, Xu Y, Yu L, et al. Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae. *Virus Genes* 2010;41:305–8. doi:10.1007/s11262-010-0506-3.
- [10] Souza CK, Streck AF, Gonçalves KR, Pinto LD, Ravazzolo AP, de Barcellos DE dos SN, et al. Phylogenetic characterization of the first ungulate tetraparvovirus 2 detected in pigs in Brazil. *Brazilian J Microbiol* 2016;47:513–7. doi:10.1016/j.bjm.2016.01.025.
- [11] Kekarainen T, Sibila M, Segalés J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J Gen Virol* 2006;87:833–7. doi:10.1099/vir.0.81586-0.
- [12] Ellis JA, Allan G, Krakowka S. Torque Teno Virus on Porcine Circovirus Type 2 – Syndrome in Gnotobiotic Pigs. *Blood* 2008;69.
- [13] Cornelissen-Keijsers V, Jiménez-Melsió A, Sonnemans D, Cortey M, Segalés J, van den Born E, et al. Discovery of a novel Torque teno sus virus species: Genetic characterization, epidemiological assessment and disease association. *J Gen Virol* 2012;93:2682–91. doi:10.1099/vir.0.045518-0.

- [14] Belák S, Karlsson OE, Blomström AL, Berg M, Granberg F. New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches. *Vet Microbiol* 2013;165:95–101. doi:10.1016/j.vetmic.2013.01.022.
- [15] Lima D, Cibulski SP, Finkler F, Teixeira TF, Varela APM, Cerva C, et al. Faecal virome of healthy chickens reveals a large diversity of the eukaryote viral community, including novel circular ssDNA viruses. *J Gen Virol* 2017;98:690–703. doi:10.1099/jgv.0.000711.
- [16] Blinkova O, Victoria J, Li Y, Keele BF, Sanz C, Ndjango JBN, et al. Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. *J Gen Virol* 2010;91:74–86. doi:10.1099/vir.0.015446-0.
- [17] Dayaram A, Goldstien S, Zawar-Reza P, Gomez C, Harding JS, Varsani A. Novel ssDNA virus recovered from estuarine mollusc (*Amphibola crenata*) whose replication associated protein (Rep) shares similarities with Rep-like sequences of bacterial origin. *J Gen Virol* 2013;94:1104–10. doi:10.1099/vir.0.050088-0.
- [18] Martin DP, Biagini P, Lefeuvre P, Golden M, Roumagnac P, Varsani A. Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses. *Viruses* 2011;3:1699–738. doi:10.3390/v3091699.
- [19] Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segal J, Delwart E, Biagini P, et al. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch Virol* 2017;162:1447–63. doi:10.1007/s00705-017-3247-y.
- [20] Rosario K, Duffy S, Breitbart M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: Insights gained from metagenomics. *Arch Virol* 2012;157:1851–71. doi:10.1007/s00705-012-1391-y.

- [21] Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwynck H, Larsen L, et al. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 2008;162:867 LP-868.
- [22] Bergeron J, Hébert B, Tijssen P. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J Virol* 1996;70:2508–15.
- [23] Zádori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Gariépy S, Raymond P, et al. A Viral Phospholipase A2 Is Required for Parvovirus Infectivity. *Dev Cell* 2001;1:291–302. doi:10.1016/S1534-5807(01)00031-4.
- [24] Dorsch S, Liebisch G, Kaufmann B, von Landenberg P, Hoffmann JH, Drobnik W, et al. The VP1 Unique Region of Parvovirus B19 and Its Constituent Phospholipase A2-Like Activity. *J Virol* 2002;76:2014–8. doi:10.1128/JVI.76.4.2014-2018.2002.
- [25] Xiao CT, Giménez-Lirola LG, Jiang YH, Halbur PG, Opriessnig T. Characterization of a Novel Porcine Parvovirus Tentatively Designated PPV5. *PLoS One* 2013;8:1–11. doi:10.1371/journal.pone.0065312.
- [26] Tijssen P, Bergoin M. Densonucleosis Viruses Constitute An Increasingly Diversified Subfamily Among The Parvoviruses. *Semin Virol* 1995;6:347–55. doi:10.1006/smvy.1995.0041.
- [27] Sukhumsirichart W, Attasart P, Boonsaeng V, Panyim S. Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon*. *Virology* 2006;346:266–77. doi:10.1016/j.virol.2005.06.052.

- [28] Biagini, P., Bendinelli, M., Hino, S., Kakkola, L., Mankertz, A., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S., Teo, C.G. and Todd D. Family Anelloviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus Taxon. Classif. Nomencl. Viruses*. 9th ed., USA: Elsevier Academic Press; 2012, p. 1327.
- [29] Steel O, Kraberger S, Sikorski A, Young LM, Catchpole RJ, Stevens AJ, et al. Circular replication-associated protein encoding DNA viruses identified in the faecal matter of various animals in New Zealand. *Infect Genet Evol* 2016;43:151–64. doi:10.1016/j.meegid.2016.05.008.
- [30] de Menezes Cruz AC, Silveira RL, Baez CF, Varella RB, de Castro TX. Clinical aspects and weight gain reduction in swine infected with porcine circovirus type 2 and torque teno sus virus in Brazil. *Vet Microbiol* 2016;195:154–7. doi:10.1016/j.vetmic.2016.09.012.
- [31] Chiarelli-Neto O, Yotoko KSC, Vidigal PMP, Silva FMF, Castro LA, Fietto JLR, et al. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. *Virus Res* 2009;140:57–63. doi:10.1016/j.virusres.2008.11.002.
- [32] Dezen D, Rijsewijk FAM, Teixeira TF, Holz CL, Cibulski SP, Franco AC, et al. Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: Applications on detection, sequencing and virus isolation. *Res Vet Sci* 2010;88:436–40. doi:10.1016/j.rvsc.2009.10.006.
- [33] Pérez LJ, De Arce HD, Cortey M, Domínguez P, Percedo MI, Perera CL, et al. Phylogenetic networks to study the origin and evolution of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Cuba. *Vet Microbiol* 2011;151:245–54. doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.022.

- [34] Sofia M, Billinis C, Psychas V, Birtsas P, Sofianidis G, Leontides L, et al. Detection and Genetic Characterization of Porcine Circovirus 2 Isolates from the First Cases of Postweaning Multisystemic and Wasting Syndrome in Wild Boars in Greece. *J Wildl Dis* 2008;44:864–70.
- [35] Tijssen P, Agbandje-McKenna M, Almendral JM, Bergoin, M. F, T.W., Hedman, K., Kleinschmidt J, Li Y, et al. Family Parvoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus Taxon. Classif. Nomencl. Viruses*. 9th ed., USA: Elsevier Academic Press; 2012, p. 1327.
- [36] Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Anim Reprod Sci* 2000;60:199–210.
- [37] Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, et al. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 1999;121:1–11. doi:10.1053/jcpa.1998.0295.
- [38] Singh P, Ramamoorthy S. Lack of strong anti-viral immune gene stimulation in Torque Teno Sus Virus1 infected macrophage cells. *Virology* 2016;495:63–70. doi:10.1016/j.virol.2016.04.028.
- [39] Huang YW, Ni YY, Dryman BA, Meng XJ. 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* 2010;396:289–97. doi:10.1016/j.virol.2009.10.031.

- [40] Aramouni M, Segal J, Sibila M, Martin-Valls GE, Nieto D, Kekarainen T. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Vet Microbiol* 2011;153:377–81. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.046.
- [41] Ozawa M, Kawabata T, Okuya K, Nagano K, Kanda T, Kanazawa N, et al. Full genome sequences of torque teno sus virus strains that coinfect a pig with postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan: implications for genetic diversity. *Arch Virol* 2015;160:3067–74. doi:10.1007/s00705-015-2593-x.
- [42] Ng TFF, Zhang W, Sachsenröder J, Kondov NO, da Costa AC, Vega E, et al. A diverse group of small circular ssDNA viral genomes in human and non-human primate stools. *Virus Evol* 2015;1:vev017. doi:10.1093/ve/vev017.
- [43] Lefeuvre P, Lett J-M, Varsani A, Martin DP. Widely Conserved Recombination Patterns among Single-Stranded DNA Viruses. *J Virol* 2009;83:2697–707. doi:10.1128/JVI.02152-08.
- [44] Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet* 2008;9:267–76.
- [45] Basso MF, da Silva JCF, Fajardo TVM, Fontes EPB, Zerbini FM. A novel, highly divergent ssDNA virus identified in Brazil infecting apple, pear and grapevine. *Virus Res* 2015;210:27–33. doi:10.1016/j.virusres.2015.07.005.
- [46] Shan T, Li L, Simmonds P, Wang C, Moeser A, Delwart E. The Fecal Virome of Pigs on a High-Density Farm. *J Virol* 2011;85:11697–708. doi:10.1128/JVI.05217-11.
- [47] Sambrook JF, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

- [48] Dean F, Nelson J, Giesler T, Lasken R. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 polymerase and a multiply-pimed rolling circle amplification. *Genome Res* 2001;11:1095–1099 ST–Rapid amplification of plasmid a. doi:10.1101/gr.180501.
- [49] Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 2010;59:307–21. doi:10.1093/sysbio/syq010.
- [50] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725–9. doi:10.1093/molbev/mst197.

Figure 1 Distribution of the taxa in the metagenomics analysis of the serum samples from pigs affected with PMWS. (A) Virus families accounted for 89.4% of distribution in relation to the other families; (B) Among the virus families, *Anelloviridae*, *Parvoviridae*, *Microviridae* and unclassified viruses were prominent in the distribution of hits.

Figure 2. Maximum likelihood phylogeny of the PCV2-BR genome. Sequences from various parts of the world were aligned with the sequences of PCV2 generated in this study (indicated by black circles). Sequence names include the accession number of the sequence, country and year of sampling. The * denotes clades with an aLRT support greater than 70. The branch support is evidenced only for the main clades. Porcine circovirus 1 sequence was used as outgroup.

Figure 3 Phylogenetic analysis of PPV CAP/REP concatenated sequences. The black circles indicate the sequences generated in this study. Sequence names include the accession number of the sequence, country and year of sampling. The * denotes clades with an aLRT support greater than 70. The branch support is evidenced only for the main clades. *Galleria mellonella* densovirus sequence was used as outgroup.

Figure 4 Maximum likelihood phylogenetic analysis of the TTSuVs ORF1 region. Sequences from various parts of the world were aligned with the sequences of TTSuVs generated in this study (indicated by black circles). Sequence names include the accession number of the sequence, country and year of sampling. The * denotes clades with an aLRT support greater than 70. The branch support is evidenced only for the main clades. Torque teno virus from macaque (ORF1 sequence) was used as outgroup.

Figure 5. Midpoint-rooted maximum likelihood phylogenetic tree of CRESS DNA virus complete genome. Sequence names include the accession number of the sequence, country and year of sampling. The * denotes clades with an aLRT support greater than 70. The branch support is evidenced only for the main clades.

Figure1

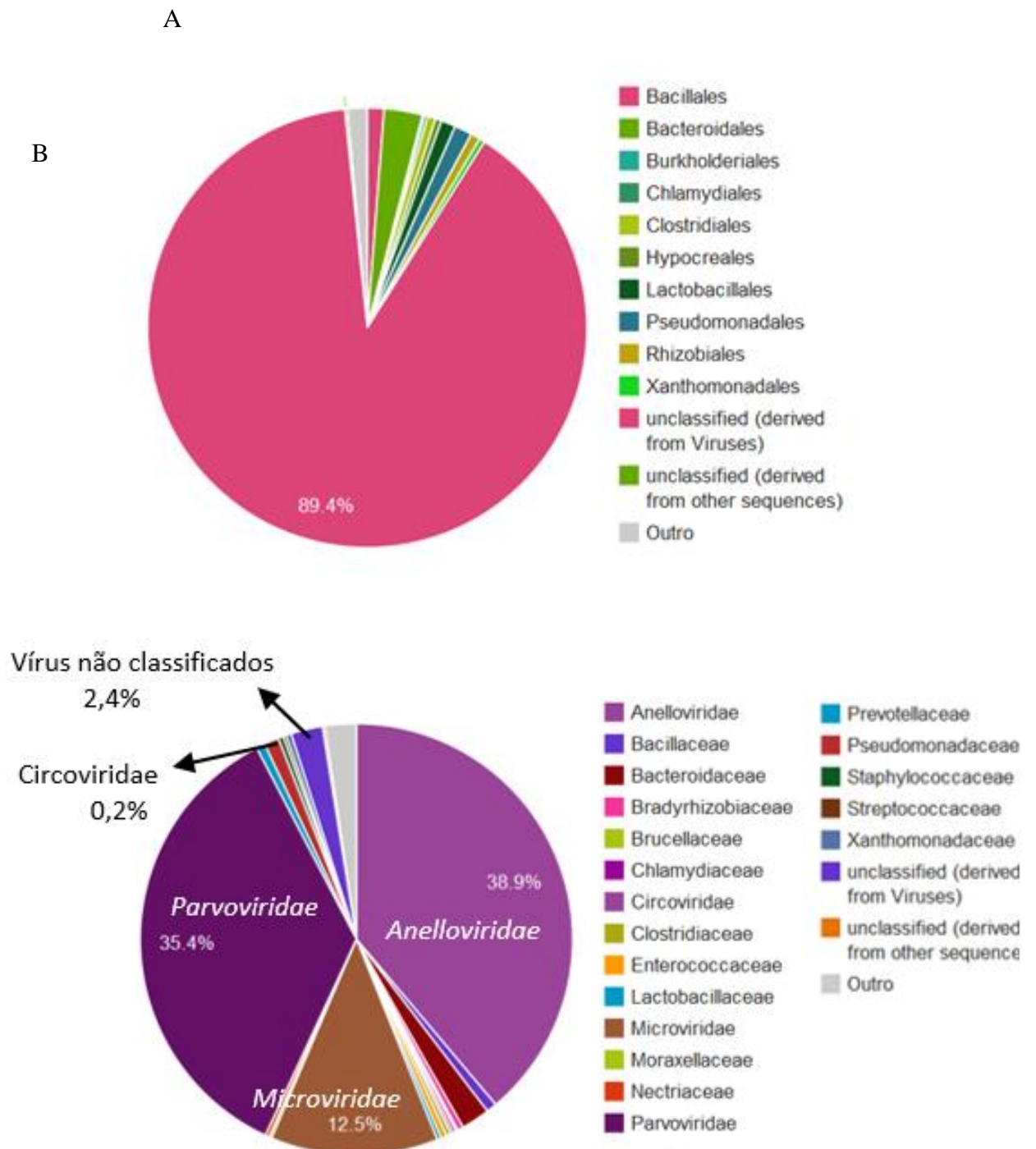


Figure 2

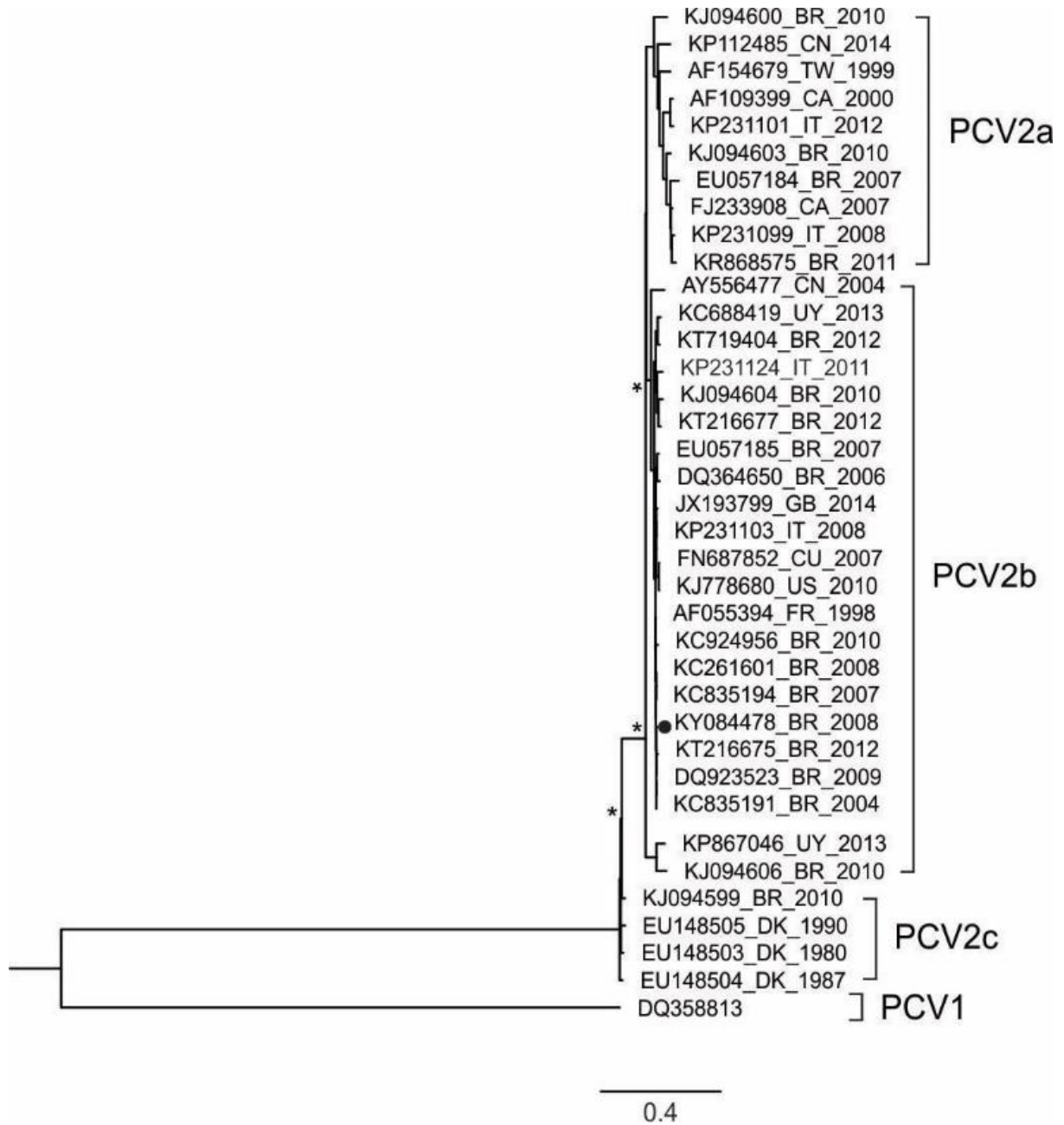


Figure 3

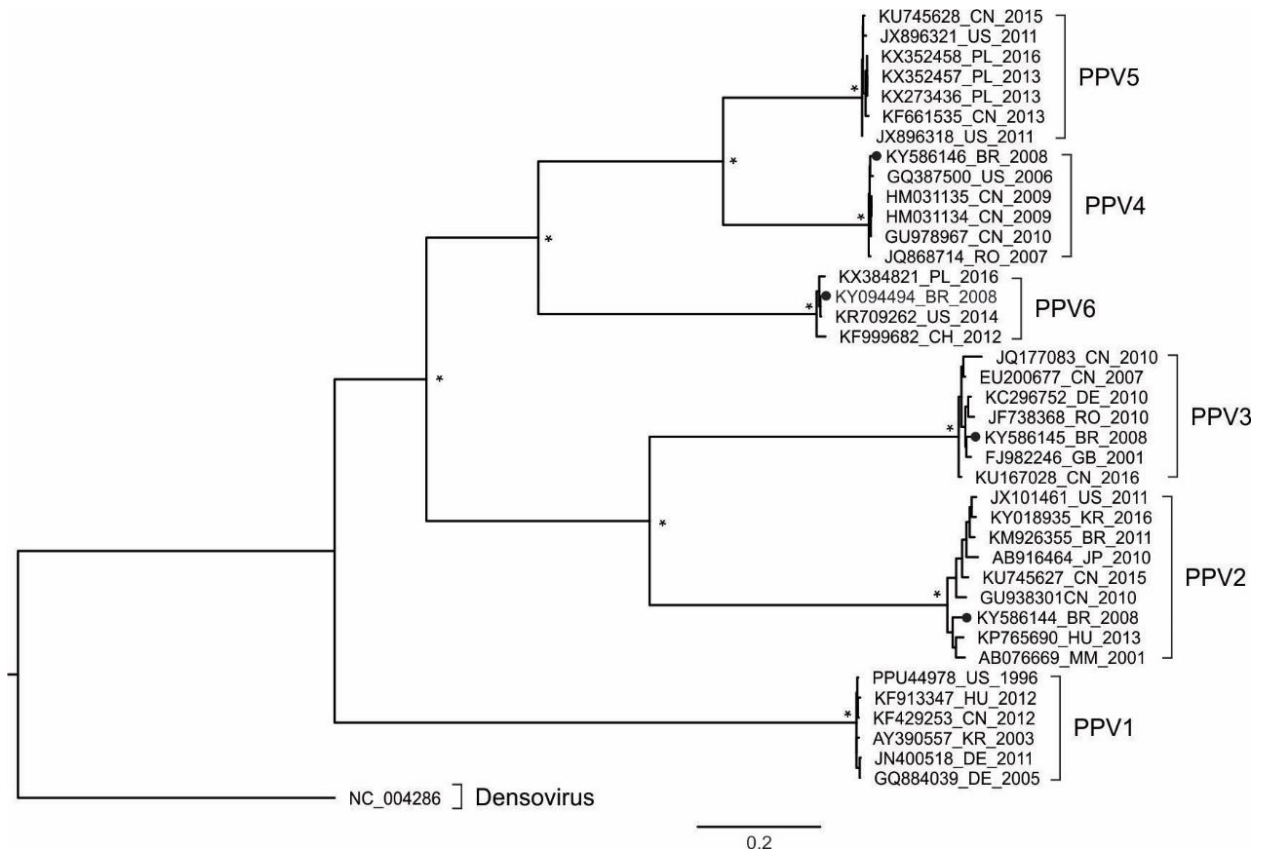


Figure 4

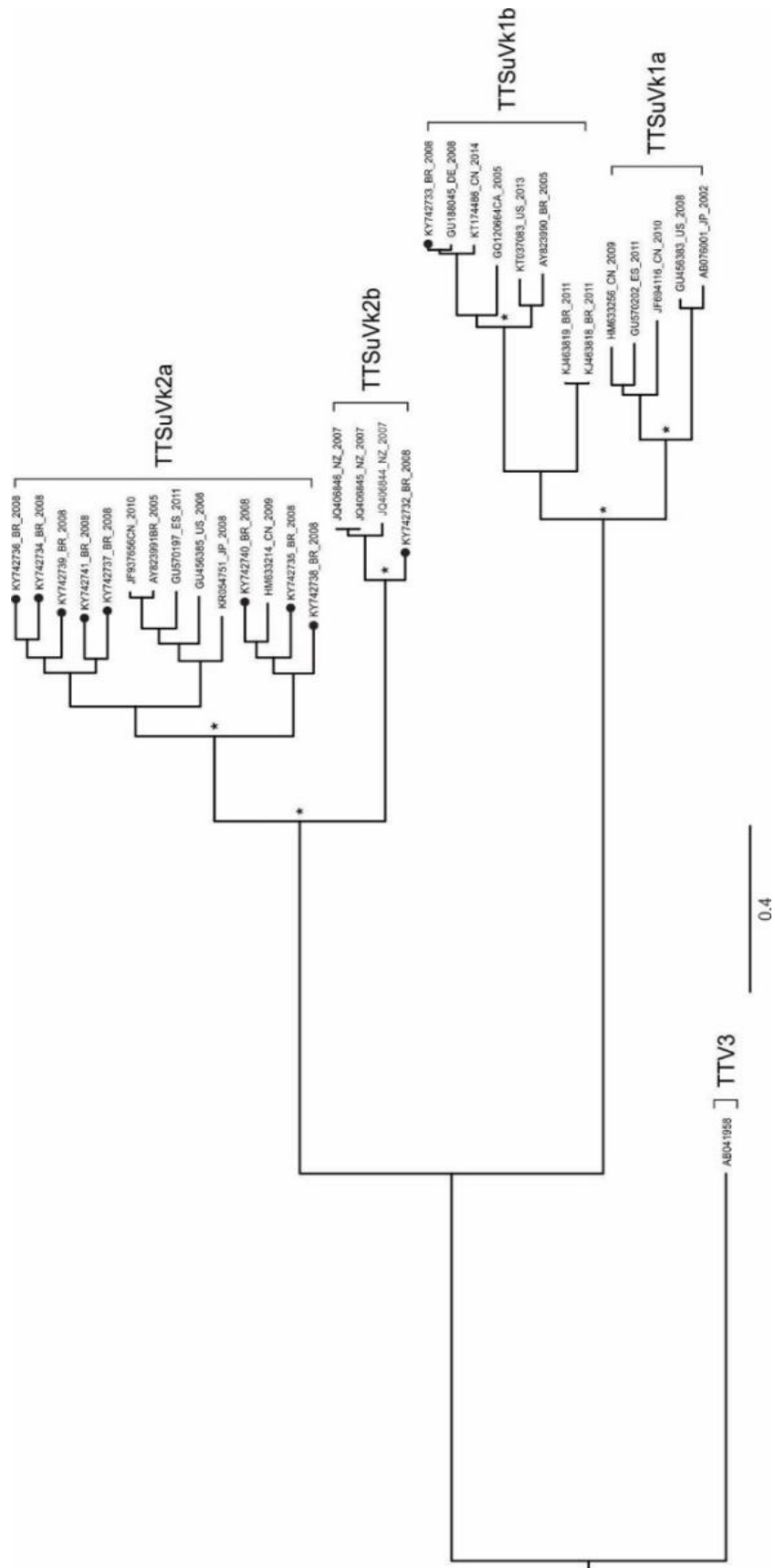


Figure 5

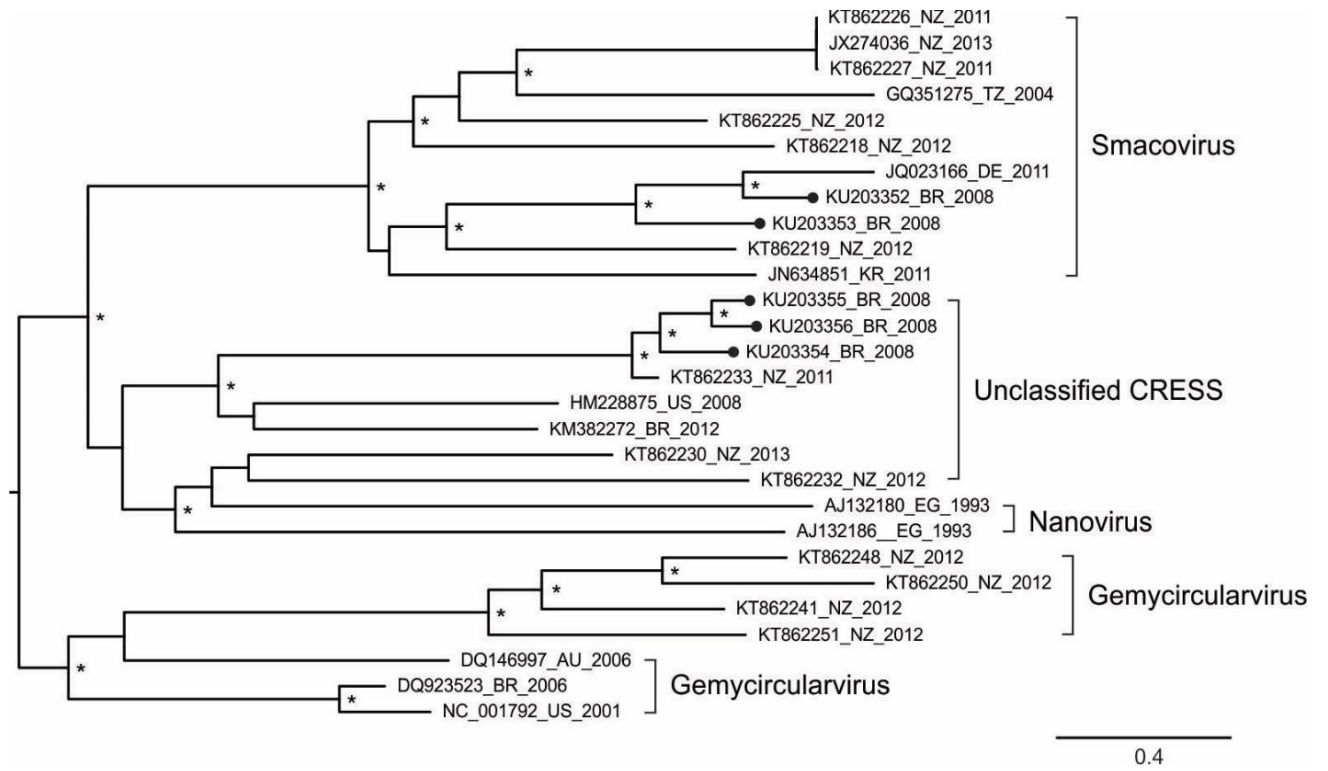


Table S1 The length of the nearly complete genome and their ORFs of parvovirus identified in this study

GenBank accession	Virus	Genome (nt)	REP (nt)	CAP (nt)	ORF3 (nt)
KY586144	PPV2	5316	1986	3099	-
KY586145	PPV3	5113	1911	2778	-
KY586146	PPV4	5851	1797	2187	615
KY605380	PPV5*	3356	1806	1290	
KY094494	PPV6	6199	1989	3570	

* Partial genome

Table S2 Complete genome and the predicted proteins pairwise identity of the PPVs-BR with available genomes from GenBank

Strain	GenBank accession	% Pairwise identity		
		Full-length (nt)	REP (aa)	CAP (aa)
PPV1-BR	KY586143 ^a /KY609510 ^b	NA	98 – 100	95 – 100
PPV2-BR	KY586144	94 – 96	96 – 98	95 – 98
PPV3-BR	KY586145	95 – 98	89 – 98	96 – 99
PPV4-BR	KY586146	94 – 99	98 – 99	99
PPV5-BR	KY605380	97 – 98	95 – 97	98 – 99
PPV6-BR	KY094494	97 – 99	99 – 100	96 – 99

REP= predicted replicase protein; CAP=predicted capsid protein; nt=nucleotide; aa=amino acid; NA=not available

^a NS1 PPV1 accession; ^b CAP PPV1 accession;

Table S3 Pairwise identity comparison of the TTSuV genomes of this study and its ORFs with other sequences available on GenBank. Each TTSuV was compared with strains of the same genotype

Genotype	GenBank accession	Sequence name	Pairwise identity % (nt)			
			Full-length	ORF1	ORF2	ORF3
K2a	KY742734	TTSuVk2a-BR/RS01/2008	70 – 73	68 – 72	78 – 79	71 – 77
K2a	KY742735	TTSuVk2a-BR/RS02/2008	68 – 82	67 – 82	80 – 81	68 – 79
K2a	KY742736	TTSuVk2a-BR/RS03/2008	70 – 72	68 – 73	79	72 – 78
K2a	KY742737	TTSuVk2a-BR/RS04/2008	73 – 76	70 – 74	87	74 – 82
K2a	KY742738	TTSuVk2a-BR/RS05/2008	70 – 85	66 – 82	80 – 83	63 – 73
K2a	KY742739	TTSuVk2a-BR/RS06/2008	72 – 75	70 – 73	88 – 89	75 – 82
K2a	KY742740	TTSuVk2a-BR/RS07/2008	71 – 88	67 – 85	87 – 90	67 – 80
K2a	KY742741	TTSuVk2a-BR/RS08/2008	66 – 69	67 – 85	75 – 78	71 – 77
K2b	KY742732	TTSuVk2b-BR/RS/2008	81 – 82	84 – 85	66 – 67	76
1b	KY742733	TTSuV1b-BR/RS/2008	78 – 96	65 – 97	94 – 97	69 – 84

Table S4 The nonamer and conserved motifs in the REP of CRESS DNA virus identified in this study

GenBank accession	Sequence name	Nonamer	Motif I	Motif II	Motif III	Walker A	Walker B	Walker C
KU203352	PoSeCV/BR2	TGATGATAT	DATAWT	RHYQF	YVYK	EKGNSGKT	YIIDT	ILCN
KU203353	PoSeCV/BR3	TAATATTTT	DATIWV	RHLQF	YVYK	EKGNNAKT	YILDM	LMVN
KU203354	PoSeCV/BR4	TAATATTAT	LITYPQ	EHYHA	YVKK	GPTGTGKT	IFDDI	IFTS
KU203355	PoSeCV/BR5	TAATATTAA	LLTYPQ	EHYHA	YVKK	GSTGTGKT	IFDDI	IFTS
KU203356	PoSeCV/BR6	TAATATTAG	LVTYPQ	EHYHA	YVKK	GDTGTGKT	IFDDI	IFTS

Table S5 Pairwise identity comparison of the CRESS DNA virus of this study at the nucleotide level for full-length genome, REP and CAP with CRESS available in GenBank

GenBank accession	Sequence name	Pairwise identity % (nt)		
		Full-length	REP	CAP
KU203352	PoSeCV/BR2	14 – 66	21 – 89	15 – 53
KU203353	PoSeCV/BR3	14 – 48	19 – 66	16 – 57
KU203354	PoSeCV/BR4	15 – 70	23 – 89	15 – 60
KU203355	PoSeCV/BR5	16 – 64	24 – 81	15 – 67
KU203356	PoSeCV/BR6	16 – 63	24 – 80	15 – 65

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de determinadas doenças na produção animal é um dos fatores mais importantes para a suinocultura (Ciacci Zanella, et al., 2016). Salgado et al (2014), relatam nova cepa brasileira de PCV2 isolada de suínos vacinados durante um surto de PMWS, que é semelhante aos isolados associados a surtos por falhas na vacinação ocorridos em outros países. O autor comenta que esta nova cepa de PCV2 está circulando e pode ser a causa de falhas na vacinação em todo o mundo. Em relação a esta teoria, pode-se pensar que o conhecimento sobre os vírus circulantes nos plantéis de animais de produção é de grande importância para a prevenção das doenças. Atualmente as novas tecnologias de sequenciamento genético possibilitam o conhecimento sobre o viroma destes animais.

No presente estudo foram escolhidas amostras de 2008 pois neste período não havia programa de vacinação para circovirose nas granjas do Rio Grande do Sul e os animais apresentavam sinais graves característicos do quadro clínico de SMDS. As amostras se originaram de suínos apresentando tais sinais. Neste trabalho foi possível constatar o viroma de suínos afetados com SMDS. Embora alguns vírus resultantes do sequenciamento já tenham sido relatados, outros são inéditos na descrição da doença. A SMDS foi relatada pela primeira vez na década de 90 (HARDING e CLARK, 1997). Apesar disso, ainda hoje não se sabe exatamente os mecanismos que desencadeiam a doença. Sabe-se que o manejo e a idade estão relacionados com a gravidade dos sinais (BLOMSTRÖM et al, 2009), mas as informações sobre os patógenos envolvidos não estão claramente esclarecidas.

Uma investigação sobre o viroma de suínos clinicamente saudáveis é necessária para comparar com os resultados aqui obtidos. Porém as informações aqui geradas sobre a composição das comunidades virais encontradas em soros de suínos afetados com SMDS podem servir de parâmetro para posteriores estudos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, G. M. et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 1, p. 3-10, 1998.

ALLAN, G. M. et al. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, n. 1, p. 1-11, 1999.

ALLAN, G. M., & Ellis, J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 12(1), 3-14, 2000.

ALLAN, G. M. et al. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs experimentally inoculated with a Swedish porcine circovirus 2 isolate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 6, p. 553-560, 2003.

ANGLY, F. E. et al. The GAAS metagenomic tool and its estimations of viral and microbial average genome size in four major biomes. **PLOS Computational Biology**, v. 5, n. 12, p. e1000593, 2009.

ARAMOUNI, M. et al. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 377-381, 2011.

BELÁK, S. et al. New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 1, p. 95-101, 2013.

BERNS, K.I.; HAUSWIRTH, W.W. Adeno-associated virus DNA structure and replication. In: **The Parvoviruses**. Springer US, 1984: p. 1-31.

BIAGINI, P., BENDINELLI, M., HINO, S., KAKKOLA, L., MANKERTZ, A., NIEL, C., OKAMOTO, H., RAIDAL, S., TEO, C.G. AND TODD, D. P. In: Family *Anelloviridae* and *Circoviridae*. In **Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses 9th of the**

International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press; 2012:331–349.

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

BLOIS, S. et al. High prevalence of co-infection with multiple Torque teno sus virus species in Italian pig herds. **PloS One**, v. 9, n. 11, p. e113720, 2014.

BLOMSTRÖM, A.L. et al. Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. **Virus Research**, v. 146, n. 1, p. 125-129, 2009.

BLOMSTRÖM, A. L. et al. Viral metagenomic analysis of bushpigs (*Potamochoerus larvatus*) in Uganda identifies novel variants of Porcine parvovirus 4 and Torque teno sus virus 1 and 2. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 192, 2012.

CARTWRIGH, S. F.; HUCK, R. A. Viruses isolated in association with herd infertility abortions and stillbirths in pigs. **Veterinary Record**, v. 81, p. 196-197, 1967.

CHARREYRE, C. et al. Virological protection of piglets against a PCV2 experimental challenge by vaccinating gilts with an inactivated adjuvanted PCV2 vaccine. **Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress**, 16-19 July, Copenhagen, Denmark, 1:177, 2006

CHEUNG, A. K. et al. Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. **Archives of Virology**, v. 155, n. 5, p. 801-806, 2010.

CHERWA, J.E. Jr. and FANE, B.A. In: Family *Microviridae*. In **Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses 9th of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press; 2012:384–393.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N. Diagnóstico da síndrome multisistêmica do definhamento do leitão desmamado (SMDLD) no Brasil causada pelo circovírus suíno tipo 2. **Comunicado Técnico–EMBRAPA–CNPSA**, v. 270, p. 1-3, 2001.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N.; DE BARCELLOS, D. E. S. N. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 443-453, 2016.

CINO-OZUNA, A.G. et al. Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 2012-2016, 2011.

CONNOR, J.; ELSENER, J. Field Efficacy of Suvaxyn PCV-2 One Dose in pigs. **Proceedings of the 38th American Association Swine Veterinary meeting**, March 3-6th, Orlando, Florida, USA, v. 38, p. 151–152, 2007

CORNELISSEN-KEIJERS, V. et al. Discovery of a novel Torque teno sus virus species: genetic characterization, epidemiological assessment and disease association. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 12, p. 2682-2691, 2012.

COTMORE, S. F. et al. The family Parvoviridae. **Archives of Virology**, v. 159, n. 5, p. 1239-1247, 2014.

CSÁGOLA, A. a et al. Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. **Archives of Virology**, v. 157, n. 6, p. 1003-1010, 2012.

CSÁGOLA, A. et al. Detection of Porcine Parvovirus 2 (Ungulate Tetraparvovirus 3) Specific Antibodies and Examination of the Serological Profile of an Infected Swine Herd. **PloS One**, v. 11, n. 3, p. e0151036, 2016.

CUI, J. et al. First identification of porcine parvovirus 6 in Poland. **Virus Genes**, p. 1-5, 2016.

DARWICH, L. et al. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 12, p. 3453-3457, 2003.

DAYARAM, A. et al. Novel ssDNA virus recovered from estuarine Mollusc (*Amphibola crenata*) whose replication associated protein (Rep) shares similarities with Rep-like sequences of bacterial origin. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 5, p. 1104-1110, 2013.

DAYARAM, A. et al. Novel circular DNA viruses identified in *Procordulia grayi* and *Xanthocnemis zealandica* larvae using metagenomic approaches. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, p. 134-141, 2014.

DE ALMEIDA PADRÃO, G.; DOROW, R. PLANEJAMENTO E MERCADOS: o caso da suinocultura catarinense frente à crise russo-ucraniana. **Revista Políticas Públicas & Cidades**, v. 2, n. 1, 2015.

DE BOISSESON, C. et al. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 2, p. 293-304, 2004.

DE FILIPPO, C. et al. Bioinformatic approaches for functional annotation and pathway inference in metagenomics data. **Briefings in Bioinformatics**, v. 13, n. 6, p. 696-710, 2012.

DE MENEZES C. A.C. et al. Clinical aspects and weight gain reduction in swine infected with porcine circovirus type 2 and torque teno sus virus in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 195, p. 154-157, 2016.

DESROSIER, R.; CLARK, E.; TREMBLAY, D. Pulmonary results with Ingelvac Circo FLEX to protect multiple ages of Quebec pigs against PCVAD. **Proceedings of American Association Swine Practitioners**, v. 38, p. 143-145, 2007

DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 4, p. 267-276, 2008.

DUPONT, K. et al. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case–control study supports a shift in genotypes with time. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 56-64, 2008.

ELLIS, J.A. et al. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 1, p. 3-14, 1999.

ELLIS, J. A. et al. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 1, p. 21-27, 2000.

ELLIS, J.A. et al. Porcine circovirus 2–associated disease in Eurasian wild boar. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 4, p. 364-368, 2003.

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, 2008.

FRANÇA, T.N. et al. Surto de circovirose (Síndrome do Definhamento Multissistêmico de Suínos Desmamados) no Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 39-53, 2005.

GAUGER, P. C. et al. Postweaning multisystemic wasting syndrome produced in gnotobiotic pigs following exposure to various amounts of porcine circovirus type 2a or type 2b. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 229-239, 2011.

GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L.; SEGALÉS, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 1, p. 23-32, 2011.

HAMEL, A. L.; LIN, L.L.; NAYAR, G.P.S. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **Journal of Virology**, v. 72, n. 6, p. 5262-5267, 1998.

HARDING J.C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: Preliminary epidemiology and clinical findings. **Proceedings of Western Canadian Association Swine Practitioners**, v. 21, 1996.

HARDING, J.C.S, CLARK, E. G. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Swine Health and Production**, v. 5, n. 5, p. 201-203, 1997.

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, 2001.

HOUGH, K. P. et al. Transformed cell-specific induction of apoptosis by porcine circovirus type 1 viral protein 3. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 2, p. 351-359, 2015.

HUANG, L. et al. Detection of a novel porcine parvovirus, PPV4, in Chinese swine herds. **Virology Journal**, v. 7, n. 1, p. 333, 2010a.

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 US prototype PTTV strains: implication for genotyping of PTTV. **Virology**, v. 396, n. 2, p. 289-297, 2010b.

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. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 4, p. 833-837, 2006.

KEKARAINEN, T.; SEGALÉS, J. Torque teno virus infection in the pig and its potential role as a model of human infection. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 2, p. 163-168, 2009.

KENNEDY, S. et al. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in

combination with porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, n. 1, p. 9-24, 2000.

KRABERGER, S. et al. Identification of novel Bromus-and Trifolium-associated circular DNA viruses. **Archives of Virology**, v. 160, n. 5, p. 1303-1311, 2015.

KRAKOWKA, S. et al. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 3, p. 254-263, 2000.

KRISTENSEN, C. S.; BAADSGAARD, N. P.; TOFT, N. A meta-analysis comparing the effect of PCV2 vaccines on average daily weight gain and mortality rate in pigs from weaning to slaughter. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, n. 4, p. 250-258, 2011.

LAU, S. K. P et al. Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 8, p. 1840-1848, 2008.

LEE, S.S. et al. Quantitative detection of porcine Torque teno virus in Porcine circovirus-2-negative and Porcine circovirus-associated disease-affected pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 2, p. 261-264, 2010.

LEFEUVRE, P. et al. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. **Journal of Virology**, v. 83, n. 6, p. 2697-2707, 2009.

LI, S. et al. Prevalence of porcine hokovirus and its co-infection with porcine circovirus 2 in China. **Archives of Virology**, v. 158, n. 9, p. 1987-1991, 2013.

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**, In Press, 2017.

LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8262-8274, 2005.

LV, Q. et al. The ORF4 protein of porcine circovirus type 2 antagonizes apoptosis by stabilizing the concentration of ferritin heavy chain through physical interaction. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 7, p. 1636-1646, 2016.

MCCULLOUGH, K.C.; VINCENT, I.E.; SUMMERFIELD, A. The immunology of PCV2 infections. **Proceedings of the 38th American Association of Swine Veterinarians Meeting**, March 3-6, Orlando, Florida, USA, p. 497-506, 2007

MARTIN, D. P. et al. Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1699-1738, 2011.

MARTÍNEZ, L. et al. Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the European wild boar (*Sus scrofa*). **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3, p. 223-229, 2006.

MEEHAN, B.M. et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. **Journal of General Virology**, v. 79, n. 9, p. 2171-2179, 1998.

MENGELING, W. L.; RIDPATH, J. F.; VORWALD, A. C. Size and antigenic comparisons among the structural proteins of selected autonomous parvoviruses. **Journal of General Virology**, v. 69, n. 4, p. 825-837, 1988.

METZKER, M.L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews/Genetics**, January, v. 11, p. 31-46, 2010.

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

NIAGRO, F. D. et al. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. **Archives of Virology**, v. 143, n. 9, p. 1723-1744, 1998.

NIEL, C.; DINIZ-MENDES, L.; DEVALLE, S. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 5, p. 1343-1347, 2005.

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 tupaias. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 6, p. 1291-1297, 2002.

OPRIESSNIG, T. et al. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 209-220, 2004.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 6, p. 591-615, 2007.

OPRIESSNIG, T. et al. Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. **Veterinary Microbiology**, v. 173, n. 1, p. 9-16, 2014.

PESCADOR, C. et al. Principais lesões histológicas associadas a circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos do Rio Grande do Sul. **Anais XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos (Abraves)**, Goiânia, p. 105-106, 2003.

PLOURDE, N.; MACHELL, N. Evaluation of the changes in total mortality rates observed after six months of use of Circovac® porcine circovirus vaccine allowed in Canada for Emergency use. **Proceedings of the 38th American Association of Swine Veterinarians Meeting**, March 3-6, Orlando, Florida, USA, v. 38, p.139-140, 2007

RAMMOHAN, L. et al. Increased prevalence of torque teno viruses in porcine respiratory disease complex affected pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 61-68, 2012.

ROSARIO, K. et al. Dragonfly cyclovirus, a novel single-stranded DNA virus discovered in dragonflies (Odonata: Anisoptera). **Journal of General Virology**, v. 92, n. 6, p. 1302-1308, 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, 2012.

ROSARIO, K. et al. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. **Archives of Virology**, v.162, n. 5, p.1447-1463, 2017.

ROUX, S. et al. Evolution and diversity of the Microviridae viral family through a collection of 81 new complete genomes assembled from virome reads. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40418, 2012.

SALGADO, R. L. et al. Identification of an emergent porcine circovirus-2 in vaccinated pigs from a Brazilian farm during a postweaning multisystemic wasting syndrome outbreak. **Genome Announcements**, v. 2, n. 2, p. e00163-14, 2014.

SAEKHOW, P. et al. Coincidental detection of genomes of porcine parvoviruses and porcine circovirus type 2 infecting pigs in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 12, p.1581-6, 2015

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 24, n. 3, p. 109-124, 2002.

SEGALÉS, J. et al. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 151-158, 2004.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 02, p. 119-142, 2005.

SEGALÉS, J. et al. PCV-2 genotype definition and nomenclature. **The Veterinary Record**, v. 162, n. 26, p. 867, 2008.

SEGALÉS, J. et al. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 199-207, 2009.

SCHIRTZINGER, E.E. et al. First identification of porcine parvovirus 6 in North America by viral metagenomic sequencing of serum from pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 170, 2015.

SIKORSKI, A. et al. Discovery of a novel circular single-stranded DNA virus from porcine faeces. **Archives of Virology**, v. 158, p.283–289, 2013.

SINGH, P.; RAMAMOORTHY, S. Lack of strong anti-viral immune gene stimulation in Torque Teno Sus Virus1 infected macrophage cells. **Virology**, v. 495, p. 63-70, 2016.

SOUZA, C. K. et al. Phylogenetic characterization of the first Ungulate tetraparvovirus 2 detected in pigs in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 513-517, 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, 2016.

STRECK, A.F.; CANAL, C. W.; TRUYEN, U. Molecular epidemiology and evolution of porcine parvoviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 36, p. 300-306, 2015.

TEIXEIRA, T. F. et al. Torque teno sus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome. **Virus Genes**, v. 47, n. 2, p. 276-281, 2013.

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, 2015.

TIJSSEN, P, et al, P.: **Family Parvoviridae**. In: Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses 9th of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press; 2012:405–425.

TISCHER, I. et al. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. **Archives of Virology**, v. 96, n. 1-2, p. 39-57, 1987.

TUCKER, K. P. et al. Diversity and distribution of single-stranded DNA phages in the North Atlantic Ocean. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v. 5, n. 5, p. 822-830, 2011.

VON RICHTHOFEN, I.; WOOLFENDEN, N.; LISCHEWSKI, A. Field efficacy of a PCV2 vaccine in three week old piglets in the United Kingdom. **Fifth Symposium on Emerging and Re-Emerging Pig Diseases**, Krakow, Poland, p. 122, 2007.

WALKER, I. W. et al. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n.5, p. 400-405, 2000.

WHON, T. W. et al. Metagenomic characterization of airborne viral DNA diversity in the near-surface atmosphere. **Journal of Virology**, v. 86, n. 15, p. 8221-8231, 2012.

WU, R. et al. First complete genomic characterization of a porcine parvovirus 5 isolate from China. **Archives of Virology**, v. 159, n. 6, p. 1533-1536, 2014.

XIAO, C.T.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T. Molecular evolutionary genetic analysis of emerging parvoviruses identified in pigs. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v. 16, p. 369-376, 2013a.

XIAO, C.T.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. Complete genome sequence of a novel porcine parvovirus (PPV) provisionally designated PPV5. **Genome Announcements**, v. 1, n. 1, p. e00021-12, 2013b.

XIAO, C. T. et al. Characterization of porcine parvovirus type 2 (PPV2) which is highly prevalent in the USA. **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 3, p. 325-330, 2013c.

YIN, S. et al. 2010. Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from Escherichia coli. **Virology Journal**, v.7, n.166, 2010.

ZHAI, S.L. et al. 2014. Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control. **Virology Journal**, v. 11, p.88