

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS -
PPGCV**

**Avaliação do microbioma do trato respiratório de suínos – um
estudo longitudinal**

Doutoranda: M.Sc. Anne Caroline Ramos dos Santos

Orientador: Dr. Paulo Michel Roehe

Porto Alegre

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS -
PPGCV**

**Avaliação do microbioma do trato respiratório de suínos – um
estudo longitudinal**

Autora: M.Sc. Anne Caroline Ramos dos Santos

“Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau Doutor em Ciências
Veterinárias na área de Microbiologia
Veterinária – Virologia”

**Porto Alegre
2020**

ANNE CAROLINE RAMOS DOS SANTOS
MÉDICA VETERINÁRIA

DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Faculdade de Veterinária
Porto Alegre (RS), Brasil

Avaliada em: ____/____/2020

Pela comissão examinadora

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

Prof. Dra. Ana Cláudia Franco
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Membro da Comissão

Dra. Cristine Cerva
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a Deus, pois Nele tudo posso.
Agradeço a insistência, sabedoria, paciência e amor de minha mãe.
Ao apoio da minha família, meu namorado e amigos.
Sem eles nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e principalmente a Deus Todo Poderoso e a nossa mãezinha Nossa Senhora por toda glória recebida e por tudo que sou e que tenho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de ensino.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos nos meses do curso de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão de auxílio financeiro que possibilitaram o desenvolvimento do projeto de pesquisa finalizado nessa tese.

Ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) e pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) que disponibilizaram a estrutura necessária para o realização desse trabalho.

Ao meu orientador Paulo Michel Roehle, ao qual agradeço a oportunidade e obrigada por ter acreditado e apoiado o desenvolvimento do projeto. Agradeço também por esses quatro anos de amizade e respeito.

Aos funcionários do ICBS, da UFRGS e do IPVDF.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões que muito contribuíram para a conclusão dessa tese.

A todos os amigos do Laboratório de Virologia que me apoiaram, me ajudaram e me escutaram nas fases mais difíceis.

A todos os amigos que fiz durante esses quatro anos, obrigada por me fazerem sentir muito acolhida, mesmo estando muito distante de casa.

À minha família, em especial, Maria Aparecida, minha mãe, pelo amor e paciência dedicados por todos esses anos da minha vida e na minha jornada acadêmica.

Ao meu namorado Carlos, pelo apoio dado e pelo amor e paciência nos momentos mais difíceis.

E também a todos que não foram mencionados, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*“Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a
sabedoria.”*

Santo Agostinho

RESUMO

Ao nascimento, os leitões são apresentados a diversos microrganismos, muitos dos quais formarão a microbiota que o acompanhará por toda vida. Nos leitões, a mucosa nasal é um sítio importante colonizado por uma grande variedade de bactérias e vírus. Em particular, a cavidade nasal é uma importante porta de entrada para patógenos causadores de infecções respiratórias, um problema altamente significativo na produção de suínos. Portanto, o objetivo do presente estudo é examinar a composição do microbioma da cavidade nasal de leitões saudáveis após desmame e compará-los com leitões afetados por doença respiratória. Suabes nasais e laringeais foram coletados de 30 leitões saudáveis e 30 leitões afetados por doença respiratória, todos com 4-5 semanas de idade. Os leitões foram mantidos em um único rebanho, formado por animais adquiridos de cinco origens diferentes. Para a análise do viroma nasal, o RNA e DNA total foram extraídos das amostras de suabes nasais e suabes laringeais e amplificados randomicamente, utilizando o Kit REPLI-g WTA Single Cell e phi29 DNA Polymerase, respectivamente. Para o bacterioma, a região V4 hipervariável do gene 16S *rRNA* foi amplificada através de PCR utilizando primers específicos. O sequenciamento foi realizado em um Miseq Illumina TM Desktop Sequencer. Em relação ao viroma, o genoma de membros de 8 famílias distintas de vírus de mamíferos foram identificados nas amostras nasais e laringeais dos leitões que apresentavam sinais clínicos, os quais foram, em ordem de abundância, *Herpesviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Reoviridae*, *Circoviridae*, *Picobirnaviridae*, *Parvoviridae* e *Coronaviridae*. Nos leitões saudáveis, apenas 4 famílias foram identificadas: *Herpesviridae*, *Circoviridae*, *Parvoviridae* e *Picobirnaviridae*. A microbiota bacteriana nasal de leitões saudáveis e afetados por doenças respiratórias mostrou diferenças distintas nos componentes. Nos leitões saudáveis houve predomínio do filo *Firmicutes*, ao contrário dos leitões doentes, que o filo mais abundante foi *Proteobacteria*. Em conclusão, o microbioma nasal e laringeal de leitões afetados por doença respiratória demonstrou uma alta diversidade viral e diferenças na composição da microbiota. Esses achados ampliam o caracterização da microbiota suína, sendo de grande importância para o entendimento da suscetibilidade à doenças, principalmente em leitões vulneráveis.

ABSTRACT

At birth, piglets are presented to an abundance of microorganisms, many of which will become part of its microbiota throughout life. The nasal mucosa is an important site of microbial colonization of the host and, as such, is expected to harbor a variety of bacteria and viruses. In particular, the nasal cavity a major portal of entry for agents that cause respiratory infections, a highly significant problem in swine production. The aim of the present study was to examine the composition of microbiome of the nasal cavity and larynx of healthy piglets at post-weaning, and to compare such findings with those of piglets affected by respiratory disease. Nasal swabs were collected from 30 healthy piglets as well as the same number of piglets affected by respiratory disease, all 4-5 weeks of age. The piglets were kept in a single herd, formed by animals acquired from five different origins. For analysis of the nasal virome, the total RNA and DNA was extracted from nasal swabs samples and laryngotracheal mucus and were randomly amplified with REPLI-g WTA Single Cell Kit and phi29 DNA Polymerase kit, respectively. For the bacteriome, the hypervariable V4 region of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using specific primers. Sequencing was performed in a Miseq Illumina TM Desktop Sequencer. Regarding the virome, genome of members of 8 distinct families of mammalian viruses were identified in the nasal and laryngotracheal mucus samples of disease-affected piglets were, in order of abundance of nucleic acid sequence, *Herpesviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Reoviridae*, *Circoviridae*, *Picobirnaviridae*, *Parvoviridae* and *Coronaviridae*. In the healthy piglets only four families were identified were *Herpesviridae*, *Circoviridae*, *Parvoviridae* and *Picobirnaviridae*. The nasal microbiota of healthy and respiratory disease-affected piglets showed distinct differences in components. In the healthy piglets, there was a predominance of the *Firmicutes* phylum, unlike the diseased piglets, that the most abundant phylum was *Proteobacteria*. In conclusion, the nasal and laryngotracheal microbioma of piglets affected by respiratory disease showed a high viral diversity and differences in the composition of the microbiota. These findings expand the characterization of the porcine nasal microbiota, which is important for understanding susceptibility to disease.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1: Ranking de produção de carne suína mundial. Relatório Anual ABPA, 2019.....18
- Figura 2: Abate de suínos no Brasil (em milhões de toneladas) no ano de 2018 (EMBRAPA).....19
- Figura 3: Produção de suínos por região no Brasil em porcentagem ano de 2018 (EMBRAPA).....19
- Figura 4: Esquema ilustrativo do sequenciamento na plataforma Illumina NGS. O processo inclui quatro etapas: (A) preparação da biblioteca (B) formação dos clusters, (C) sequenciamento, e (D) alinhamento e análises dos dados. (Illumina).....25

MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 5. Esquema do galpão de coleta.31

RESULTADOS

- Figura 6: Classificação dos genomas virais detectados a partir de amostras da cavidade nasal de leitões que não apresentavam sinais clínicos respiratórios aos 33 dias de idade. Utilizado BLASTn. (A) Porcentagem das sequências com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 92,7%) e vírus eucarióticos (7,3%). (B) Porcentagem das sequências virais classificadas em diversas famílias.....38
- Figura 7: Classificação dos genomas detectados a partir de suabes nasais de leitões com sinais de doença respiratória aos 33 dias de idade. Programa utilizado: BLASTn. (A) Porcentagem das sequências genômicas com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 71,7%) e vírus eucarióticos (28,3%). (B) Porcentagem das sequências virais representativas das famílias identificadas no sequenciamento.....39
- Figura 8: Relação dos contigs virais com similaridade a genomas de membros de famílias virais detectadas na cavidade nasal de leitões com e sem sinais clínicos. Primeira coleta, leitões com 33 dias de idade. *SS: sem sinais clínicos/*CS: com sinais clínicos.....42
- Figura 9: Classificação das reads virais detectados nas amostras da cavidade nasal de leitões que não apresentavam sinais clínicos respiratórios aos 71 dias

de idade. Utilizado BLASTn. (A) Porcentagem das sequências com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 89,1%) e vírus eucarióticos (10,9%). (B) Porcentagem das sequências virais classificados em diversas famílias.....43

Figura 10: Classificação das reads virais detectados nas amostras da cavidade nasal de leitões que apresentavam sinais clínicos respiratórios aos 71 dias de idade. Utilizado BLASTn. (A) Porcentagem das sequências com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 75,9%) e vírus eucarióticos (24,1%). (B) Porcentagem das sequências virais classificados em diversas famílias.....43

Figura 11: Relação dos contigs virais de genomas virais detectados na cavidade nasal de leitões com e sem sinais clínicos. Segunda coleta, leitões com 71 dias de idade. *SS: sem sinais clínicos/*CS: com sinais clínicos.....44

Figura 12: Classificação das reads virais detectados nas amostras da cavidade nasal de leitões que não apresentavam sinais clínicos respiratórios aos com 173 dias de idade. Utilizado BLASTn. (A) Porcentagem das sequências com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 92,5%) e vírus eucarióticos (7,5%). (B) Porcentagem das sequências virais classificados em diversas famílias.....46

Figura 13: Classificação das reads virais detectados nas amostras da cavidade nasal de leitões que apresentavam sinais clínicos respiratórios aos 173 dias de idade. Utilizado BLASTn. (A) Porcentagem das sequências com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 90,4%) e vírus eucarióticos (9,6%). (B) Porcentagem das sequências virais classificados em diversas famílias.....47

Figura 14: Relação dos contigs virais com similaridade a genomas de membros de famílias virais detectadas na cavidade nasal de leitões com e sem sinais clínicos. Terceira coleta, leitões com 173 dias de idade. *SS: sem sinais clínicos/*CS: com sinais clínicos.....48

CAPÍTULO I

Figure 1. Relative abundance of virus families in the analyzed URT virome healthy piglets. The diagrams show the number of reads with sequence identities to a certain virus species in relation to all virus reads. The sequences were

defined by closest homolog, split into an overview of samples of the group without clinical signs. Percentages of most abundant eukaryotic viral sequence reads classified by viral species. Different colors were used for different virus species (see legend).....	65
Figure 2. Relative abundance of virus families in the analyzed URT virome of disease-affected piglets. The diagrams show the number of reads with sequence identities to a certain virus species in relation to all virus reads. The sequences were defined by closest homolog, split into an overview of samples of the group with clinical signs. Percentages of most abundant eukaryotic viral sequence reads classified by viral species. Different colors were used for different virus species (see legend).....	66
Figure 3: UTR virome of piglets from groups without clinical signs (WoCS) and with clinical signs (WCS).....	67
Figure 4. Principal Component Plots (jackknifed) representing beta diversity on rarefied samples. Beta diversity of nasal samples of piglets was computed through unweighted UniFrac analysis for each of the following groups: healthy piglets (G1 and G3); and piglets affected by respiratory disease (G2 and G4)....	68
Figure 5: Relative distribution of the most abundant phylum identified in the URT. The taxonomic classification of the sequence reads at the phylum level.....	69
Figure 6. Principal coordinate analysis (PCoA) characterizing the microbiota composition of healthy (S1, S2, S3, S7, S8, and S9) and diseased affected piglets (S4, S5, S6, S10, S11, and S12). Sørensen–Dice index. The clusters were generated using a subset of 963228 sequences.....	70
Figure 7. Alpha diversity in rarefied samples analyzed by health status. Species richness of URT samples from healthy piglets (G1 and G3) and piglets affected by respiratory disease (G2 and G4); continuous lines represent standard deviation (a) Shannon; (b) Simpson.....	70
Figure 8: Relative distribution of the most abundant family identified in the URT cavity. The taxonomic classification of the sequence reads at the family level....	71

CAPÍTULO II

Fig 1: (A) Genome organization of PPyV. Putative coding regions for the structural (VP1 and VP2 proteins) and the non-structural (T antigens) are separated by a predicted non-coding regulatory region. (B) Phylogenetic analysis

of large T gene of PyV. The large T nucleotide region and similar gene sequences from different species known polyomavirus in the GenBank database was used.....88

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1. Distribuição das coletas.	30
--	----

RESULTADOS

Tabela 2: Número de reads totais sequenciadas e após tratamento das sequencias por pool de amostra.....	36
---	----

Tabela 3. Abundância relativa de sequencias sugestivas de genomas virais a partir de suabes de secreções respiratórias coletados de leitões sem sinais clínicos respiratórios.....	37
--	----

Tabela 4. Abundância relativa de sequencias sugestivas de genomas virais a partir de suabes de secreções respiratórias coletados de leitões com sinais clínicos respiratórios aos 33 dias de idade.....	38
---	----

Tabela 5: Número de reads totais sequenciadas e número de reads virais após trimagem por pool de amostra da segunda coleta.....	41
---	----

Tabela 6. Porcentagem da abundância relativa das reads virais no grupo de leitões sem sinais clínicos aos 71 dias.....	42
--	----

Tabela 7. Porcentagem da abundância relativa das reads virais no grupo de leitões com sinais clínicos aos 71 dias de idade.....	43
---	----

Tabela 8. Número de reads totais sequenciadas e número de reads virais após trimagem por pool de amostra da terceira coleta.....	45
--	----

Tabela 9. Porcentagem da abundância relativa das sequencias virais no grupo de leitões saudáveis e no grupo de leitões com sinais clínicos.....	46
---	----

Tabela 10. Porcentagem da abundância relativa das sequencias virais no grupo de leitões saudáveis e no grupo de leitões com sinais clínicos.....	47
--	----

CAPÍTULO I

Table 1: Number of sequencing <i>reads</i> and the number of <i>reads</i> after trimming per pool of sample.....	63
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCS: Associação Brasileira de Criadores de Suínos

ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal

CC: Produção em Ciclo Completo

cDNA: DNA complementar

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA: *deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTP: *deoxynucleotide triphosphates* (desoxirribonucleotídeos trifosfatados)

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

HTS: High Throughput Sequencing

Kb: mil pares de base

mM: milimolar

NaCl: cloreto de sódio

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

ng: nanograma

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

rpm: rotações por minuto

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

UPL: Unidade Produtora de Leitões

UPD: Unidade Produtora de Desmamados

UT: Unidade de Terminação

TE: Tris EDTA

TEN: Tris EDTA Cloreto de sódio

μL: microlitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1. Suinocultura mundial.....	17
1.2 O microbioma do trato respiratório de suínos.....	20
1.3 Microrganismos envolvidos em problemas respiratórios de suínos	22
1.4 Aplicação de sequenciamento de alto desempenho	23
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Escolha da granja e dos animais.....	28
3.2 Histórico dos animais na granja	28
3.3 Administração de vacinações e medicamentos.....	29
3.4 Coleta das amostras.....	29
3.5 Formação dos grupos de coleta	30
3.6 Preparo das amostras	31
3.7 Preparo das amostras para detecção de genomas virais.....	32
4. RESULTADOS	36
4.1 Caracterização dos viromas da cavidade nasal de suínos aos 33 dias de idade - primeira coleta	36
4.2 Caracterização dos viromas da cavidade nasal de suínos aos 71 dias de idade - segunda coleta	40
4.3 Caracterização dos viromas da cavidade nasal de suínos aos 173 dias de idade - terceira coleta.....	44
5. DISCUSSÃO	49
5.1 O viroma da cavidade nasal de leitões saudáveis e afetados por doenças respiratórias – um estudo longitudinal	49
CAPÍTULO 1	55
CAPÍTULO II.....	82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
ANEXO I	98

INTRODUÇÃO

Estudos sobre o microbioma têm aumentado ao longo dos últimos anos com a chegada de tecnologias de sequenciamento de alto desempenho e bioinformática, fornecendo aos pesquisadores a oportunidade de examinar a composição e a diversidade das populações de vírus e bactérias com detalhes significativos (BIKEL et al., 2015). O microbioma, ou seja, o conjunto de microrganismos em um determinado nicho, tem sido extensivamente estudado em diversas espécies e tem demonstrado influenciar diretamente na saúde e doença do hospedeiro (CORREA-FIZ, FRAILE, ARAGON, 2016). A compreensão da microbiota em leitões ainda está sendo estabelecida, contudo há uma falta na caracterização no desenvolvimento da microbiota respiratória nos períodos iniciais de vida de suínos utilizando técnicas de sequenciamento de alto desempenho. Estudos mais profundos da microbiota do trato respiratório pode fornecer uma visão mais ampla da saúde dos suínos e da susceptibilidade à doenças.

O presente trabalho teve como objetivo, pesquisar o microbioma nasal e laringeal de leitões desmamados saudáveis e compará-los com amostras similares de animais nas mesmas condições, porem apresentando sinais de doenças respiratórias. Para tanto, foram utilizadas ferramentas para determinar as sequencias de ácidos nucleicos de microrganismos através de sequenciamento de alto desempenho (HTS). Foram examinados e caracterizados o viroma, ou seja conjunto de vírus presentes em determinado hospedeiro ou nicho e o bacterioma dos animais do presente estudo. Com isso, busca-se dimensionar o potencial impacto que a microbiota da cavidade nasal de leitões pode causar no *status* sanitário destes animais.

Na primeira parte desta tese doutorado é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a suinocultura no mundo e no Brasil e como é caracterizado o microbioma respiratório nos suínos com a utilização do HTS com ênfase em metagenômica. Em seguida é descrita a metodologia utilizada e os resultados obtidos nas amostras de suabe nasal, além da discussão dos resultados. O Capítulo I apresenta os resultados encontrados em análises do microbioma de suabes nasais e laringeais de leitões desmamados saudáveis. Estes foram

comparados com os resultados obtidos em leitões afetados por doença respiratória na mesma granja. No segundo capítulo é apresentada a descrição do genoma completo do primeiro poliomavírus de suínos (PPyV) descrito no Brasil, um dos agentes identificados na cavidade nasal dos leitões deste estudo. Alguns poliomavírus foram descritos como causadores de doença respiratória em outras espécies, entretanto em suínos a epidemiologia ainda não está bem estabelecida. Além de ser o primeiro relato no Brasil, após análises, foi possível concluir que se trata de uma nova espécie de PPyV no gênero *Poliomavirus*. A inclusão desse e de novos genomas auxilia no estabelecimento da epidemiologia do vírus e sua importância na ocorrência de doença respiratória em suínos.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Suinocultura mundial

Introduzidos no Brasil no ano de 1532 por Martim Afonso de Sousa, os porcos das raças Alentejana, Transtagana, Galega, Bizarra, Beiroa e Macau posteriormente deram origem as raças nacionais Piau, Tatu, Canastra, Nilo, Caruncho, Pereira e Pirapitinga, em um processo que levou mais de 400 anos. Somente em 1958, com a criação da Associação Brasileira de Criadores de Suínos (ABCS), teve início o controle genealógico e a importação de raças exóticas para melhoramentos na genética e produção de carne, já que nesse período a produção de banha estava perdendo espaço para o comércio de óleos vegetais (GASTARDELO e MELZ, 2014). As diversas raças introduzidas a partir deste momento deram origem aos animais produzidos nas granjas de todo país, que competem em produtividade e qualidade com outros países líderes na produção mundial de suínos (FÁVERO e FIGUEIREDO, 2009).

Consequentemente, o rebanho suíno brasileiro aumentou exponencialmente em quantidade, alcançando em 2018 a marca de 2.039.356 de matrizes, com maior destaque para a Região Sul, que abateu 68,6% dos animais produzidos em todo o país. Grande parte da produção brasileira, 84%, ainda permanece no mercado interno sendo 16% destinado à exportação para vários países da Europa, Oriente Médio, África, Ásia, Oceania e Américas do Norte, Central e do Sul (ABPA, 2019; ABCS, 2019).

No quesito consumo e produção, a China se destacou produzindo cerca de 54 mil toneladas somente em 2018, representando 50% da produção mundial. Em segundo lugar encontra-se a União Europeia, com produção de 24,3 mil toneladas e em terceiro lugar os Estados Unidos, produzindo 11,9 mil toneladas (ABPA, 2019). Em quarto lugar no ranking encontra-se o Brasil, que produziu cerca de 3,97 mil toneladas de carne suína no ano de 2018 (Figura 1) (ABPA,2019; ABCS, 2019).

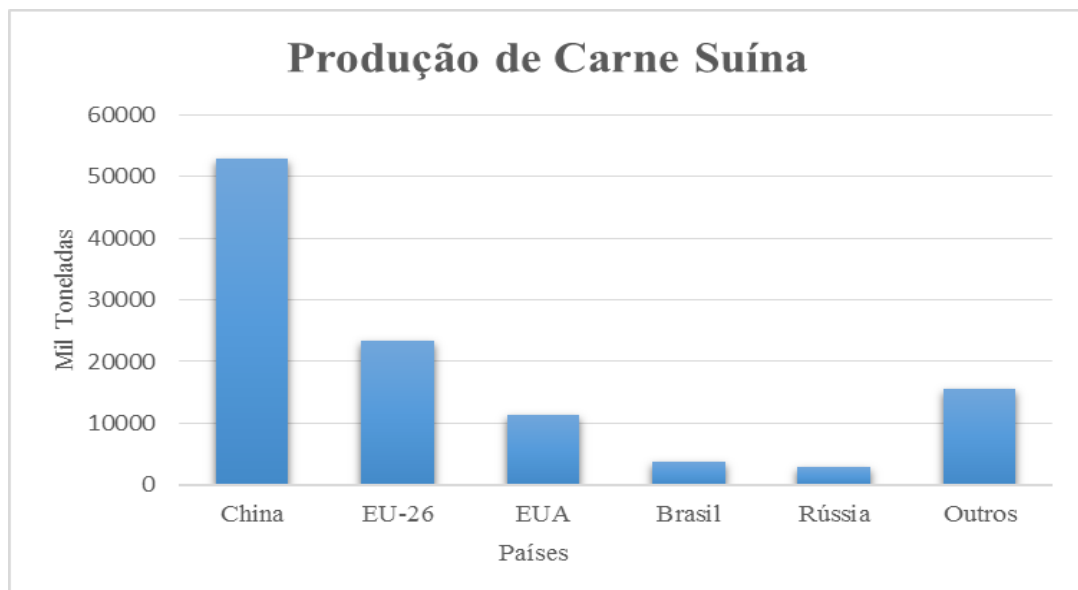


Figura 1: Ranking de produção de carne suína mundial. Relatório Anual ABPA, 2019.

O modelo produtivo no Brasil se diferencia de acordo com as distintas regiões do país. Na região Sul, há um predomínio de pequenos suinocultores, associados em sistemas denominados integrações ou cooperativas. Estes usualmente são especializados em uma determinada etapa de produção (unidades produtoras de leitões ou UPLs, crechários ou unidades de terminação - UT). Já na região sudeste a grande maioria dos produtores atua de forma independente e tendem a realizar o ciclo completo de produção na mesma propriedade (AMARAL et al., 2006).

Dentre os estados do sul do país, Santa Catarina encontra-se em primeiro lugar nos índices de produção de carne suína, abate, números de matrizes alojadas e distribuição de granjas entre os estados, enquanto que o Rio Grande do Sul fica em terceiro lugar em todas estas categorias. Estimativas da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) mostram que o volume de

carne suína abatida pelo estado do Rio Grande do Sul correspondeu a 23,27% do abate nacional em 2018 (ABPA, 2019) (Figura 2 e 3).

Abate de suínos no Brasil

*Em mil toneladas e variação entre 2000 e 2018, por regiões.
*Fonte: IBGE.

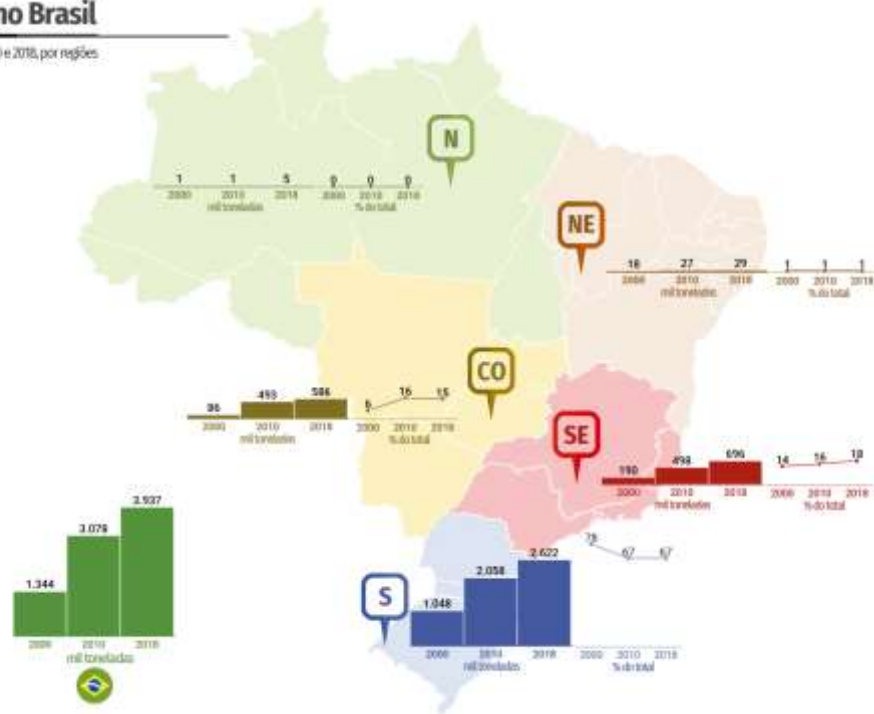


Figura 2: Abate de suínos no Brasil (em milhões de toneladas) no ano de 2018 (EMBRAPA).

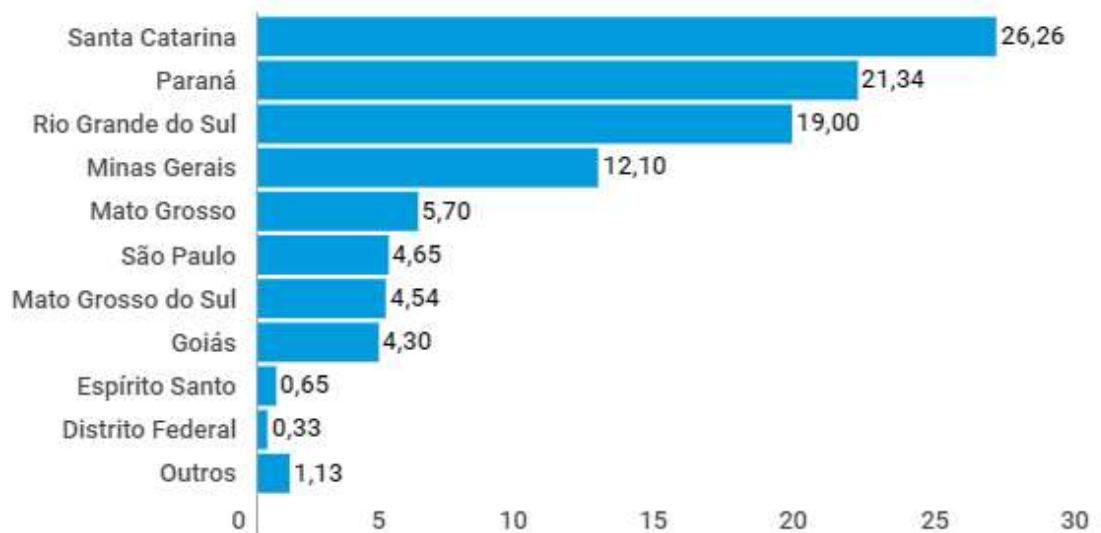


Figura 3: Produção de suínos por região no Brasil em porcentagem ano de 2018 (EMBRAPA).

1.2 O microbioma do trato respiratório de suínos

Lederberg e McCray (2001) definiram o microbioma como uma comunidade ecológica de microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos que compartilham o mesmo espaço corporal e que, durante muito tempo, foram ignorados como determinantes de saúde e doença. As relações existentes entre hospedeiro e microbioma é resultado de milhões de anos de co-evolução e geralmente são mutuamente benéficas. Contudo, a relação e o equilíbrio desses microrganismos e como eles agem no hospedeiro ainda é complexo e pouco compreendido (PALM, ZOETE, FLAVELL, 2015; NIEDERWERDER, 2017).

Os suínos são amplamente utilizados como modelo para estudos de doenças de diversas espécies e a descoberta da composição do microbioma nesses animais é de grande interesse. Entretanto, a maioria dos estudos focam nas populações bacterianas intestinais, embora outros locais como pele, boca ou nariz também apresentam uma microbiota que certamente possuem peculiaridades, ainda pouco conhecidas (SLIFIERZ, FRIENDSHIP e WEESE, 2015; CORREA-FIZ, FRAILE, ARAGON, 2016). Alterações da microbiota tem sido associadas a diversos quadros, os quais poderiam potencialmente alterar a produtividade dos animais, refletindo-se em perda de peso, tendência a sofrer maior número de infecções com agentes patogênicos, entre outros (CORREA-FIZ, FRAILE, ARAGON, 2016; ESPINOSA-GONGORA et al., 2016).

Durante períodos iniciais da vida do leitão, o microbioma é determinado a partir do nascimento, pelo uso de antibióticos ou probióticos, pela dieta oferecida, pelo contato com outros animais e pelo contato com o ambiente da granja. Um importante momento de colonização após o período gestacional ocorre durante a exposição do leitão à mucosa vaginal, microbiota fecal, pele da matriz e contato com microrganismos presentes no meio ambiente. Essa exposição será determinante na diversidade do microbioma que será estabelecido durante as primeiras semanas de vida (JANSMAN et al., 2012).

Nos primeiros momentos da vida do leitão, a colonização do trato gastrointestinal mostra-se fundamental para o desenvolvimento e regulação do sistema imune. A microbiota em desenvolvimento dos leitões é particularmente vulnerável e desequilíbrios podem ocorrer, levando ao que se denomina “disbiose”, ou seja, o desequilíbrio entre os microrganismos benéficos e patogênicos. O estresse, dieta, ambiente, práticas de manejo e uso de

compostos antimicrobianos são os principais causadores de disbiose e resultam em impactos de curto e longo prazo sobre o microbioma do animal (SCHOKKER et al., 2014; PALM, ZOETE, FLAVELL, 2015; SLIFIERZ, FRIENDSHIP e WEESE, 2015).

Após o desmame, as diarreias são os principais problemas sanitários. Além disso, a síndrome multissistêmica do definhamento (SMD), causada pelo circovírus suíno tipo 2 (PCV2), acomete os suínos desde a maternidade até o abate, resultando em infecção subclínica e uma doença sistêmica nos leitões. Já na fase de crescimento e terminação os problemas respiratórios são os maiores causadores de prejuízos econômicos (AMARAL et al., 2006; ZANELLA, MORÉS e BARCELLOS et al., 2016).

Outro sítio importante para o estabelecimento do microbioma é a cavidade nasal. A cavidade nasal de um suíno adulto abriga uma incrível diversidade microbiana, podendo conter cerca de 1.749 espécies de bactérias de 124 gêneros diferentes e 9 filos distintos, sendo que *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Spirochaetes* são predominantes. A mucosa nasal será colonizada por uma série de bactérias e vírus, muitos deles ainda desconhecidos (SLIFIERZ, FRIENDSHIP e WEESE, 2015), sendo que vários destes permanecerão no trato respiratório sem associação a doenças (LOWE et al., 2012; LUNG et al., 2015).

A composição da microbiota nasal saudável é dinâmica, pode sofrer alterações devido a dieta, idade, administração de agentes antimicrobianos e manejo. O desmame favorece o aumento de *Gammaprotebacteria* (particularmente *Moraxella*) e diminuição de *Clostridium* e *Bacilli*. Bactérias do gênero *Moraxella* parecem possuir um papel protetor na cavidade nasal de suínos, impedindo a colonização de alguns patógenos suínos, como o *Haemophilus parasuis* (SLIFIERZ, FRIENDSHIP e WEESE, 2015; ZEINELDIN et al., 2018). As tonsilas também são muito utilizadas em estudos da população microbiana do trato respiratório superior, contudo o focinho é o primeiro local onde os patógenos encontram uma barreira contra a infecção. Eles atuam como filtros sobre o ar inalado, contendo muitos microrganismos extremamente diversos (LEMON et al., 2010; CORREA-FIZ, FRAILE, ARAGON, 2016).

1.3 Microrganismos envolvidos em problemas respiratórios de suínos

Para diminuir as perdas econômicas e desenvolver formas de tratamento e prevenção de doenças mais efetivas, estudos que visam a identificação e caracterização dos microrganismos presentes nos animais aumentaram exponencialmente nos últimos anos (PALM, ZOETE, FLAVELL, 2015). Na suinocultura moderna, as doenças respiratórias são uma das principais causas de perdas econômicas. Essas perdas refletem no aumento dos gastos com medicamentos e alteram negativamente os índices zootécnicos, além das condenações de carcaças nos abatedouros (MORÉS et al., 2015).

Devido à capacidade ou não de induzir lesões nos tecidos respiratórios, os organismos patogênicos foram divididos em dois grupos: agentes infecciosos primários e secundários ou oportunistas (WEISSENBACHER-LANG et al., 2016). Os agentes infecciosos primários possuem potencial imunodepressor e atuam na dinâmica dos problemas respiratórios, favorecendo as infecções oportunistas (LUNG et al., 2015). A associação desses patógenos foi denominada de Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (PRDC), que é amplamente utilizado para descrever quadros de infecções mistas (PALZER et al., 2008; DEBLANC et al., 2012; LUNG et al., 2015; CHAE, 2016).

Os principais patógenos primários são o vírus Influenza A, o Circovírus Suíno do tipo 2 (PCV2), o Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos (PRRSV), o Coronavírus Respiratório Suíno (PRCV) e o *Mycoplasma hyopneumoniae*, (FABLET et al., 2011; LUNG et al., 2015). Os agentes oportunistas são, em sua grande parte, de etiologia bacteriana, os quais incluem o *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurela multocida* e *Salmonella cholerasuis* (DEBLANC et al., 2012; WILSON et al., 2012; OLIVEIRA FILHO et al., 2015).

Os principais agentes que podem se instalar de forma assintomática nas tonsilas são o *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurela multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Salmonella* spp. e *Streptococcus suis* (LOWE et al., 2012). Outras espécies frequentemente identificadas nas tonsilas incluem comensais da família *Pasteurellaceae*, como *Actinobacillus minor*, *Actinobacillus porcicus*, *Actinobacillus indolicus* e *Actinobacillus porcitonillarum*; espécies Gram-positivas como *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus porcicus*,

Staphylococcus aureus, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Arcanobacterium pyogenes* e *Lactobacillus reuteri* (LOWE et al., 2012; LUNG et al., 2015).

Os problemas respiratórios geralmente ocorrem em animais que são criados confinados, em altas densidades, muitas vezes em rebanhos com animais de várias origens (MORÉS et al., 2015). Em sistemas de criação de ciclo completo, UPL ou UT, as doenças respiratórias afetam principalmente animais nas fases de crescimento e terminação, normalmente entre 14 a 22 semanas de idade (PALZER et al., 2008; FABLET et al., 2011; WEISSENBACHER-LANG et al., 2016).

1.4 Aplicação de sequenciamento de alto desempenho

Estudos sobre microbiota e/ou composição da população microbiana em nichos específicos têm aumentado através dos anos com a chegada de tecnologias de sequenciamento de alto desempenho, ou “high throughput sequencing” (HTS). Como são baseados na identificação de ácidos nucleicos, estas tem superado as principais limitações dos instrumentos clássicos para detecção de agentes virais e bacterianos (POULADI et al., 2015). A recente introdução de instrumentos capazes de produzir de milhares a milhões de sequências em um único sequenciamento, combinados à uma alta qualidade dos dados gerados, foram capazes de fornecer respostas de forma rápida e com um custo relativamente baixo (GRADA e WEINBRECHT, 2013).

As técnicas de HTS tornaram-se um elemento chave na compreensão do microbioma de diversos seres vivos, auxiliando na compreensão dos microrganismos e na dinâmica das infecções. As aplicações do HTS permitiram a ampliação dos estudos comparativos entre amostras biológicas, mostrando a presença de uma grande variedade de organismos, muitos dos quais ainda desconhecidos. Com o avanço no uso e na tecnologia do HTS, a tendência será o aumento desses estudos e desenvolvimento de novas aplicações para esse tipo de sequenciamento (GRADA e WEINBRECHT, 2013; BUERMANS e DEN DUNNEN, 2014).

Utilizado pela primeira vez em 1998, o termo “metagenômica” referiu-se à coleção de todos os genomas encontrados em uma amostra de solo ambiental, incluindo sequências de organismos que não haviam sido ainda cultivados (HANDELSMAN et al., 1998). Desde então, o termo passou a ser utilizado em

um sentido mais amplo para descrever qualquer conjunto de genomas, identificados em amostras ambientais ou clínicas (PALLEN, 2014; CASTRIGNANO et al., 2015; SLIFIERZ et al., 2015).

Em razão da busca por um melhor resultado na obtenção de sequências virais, a metodologia utilizada na metagenômica viral consiste de quatro etapas: concentração e purificação das partículas virais da amostra; extração e amplificação de ácidos nucleicos; sequenciamento e análise de bioinformática (Figura 4). Na fase de concentração e purificação da extração, a quantidade de ácidos nucleicos geralmente demonstra ser muito baixa. Em virtude disto, o enriquecimento dos ácidos nucleicos é frequentemente utilizado na metagenômica viral para conseguir determinar o conjunto de genomas virais presentes em determinado microbioma (ZHANG et al., 2014).

O arquivo resultante de um sequenciamento gera sequências curtas, chamadas de leituras ou *reads*. As *reads* podem ser reunidas em sequências mais longas, denominadas *contigs*. As *reads* ou os *contigs* são anotadas após combinação e alinhamento local ou global com genomas ou genes de referência já disponibilizados na literatura (BIBBY, 2013).

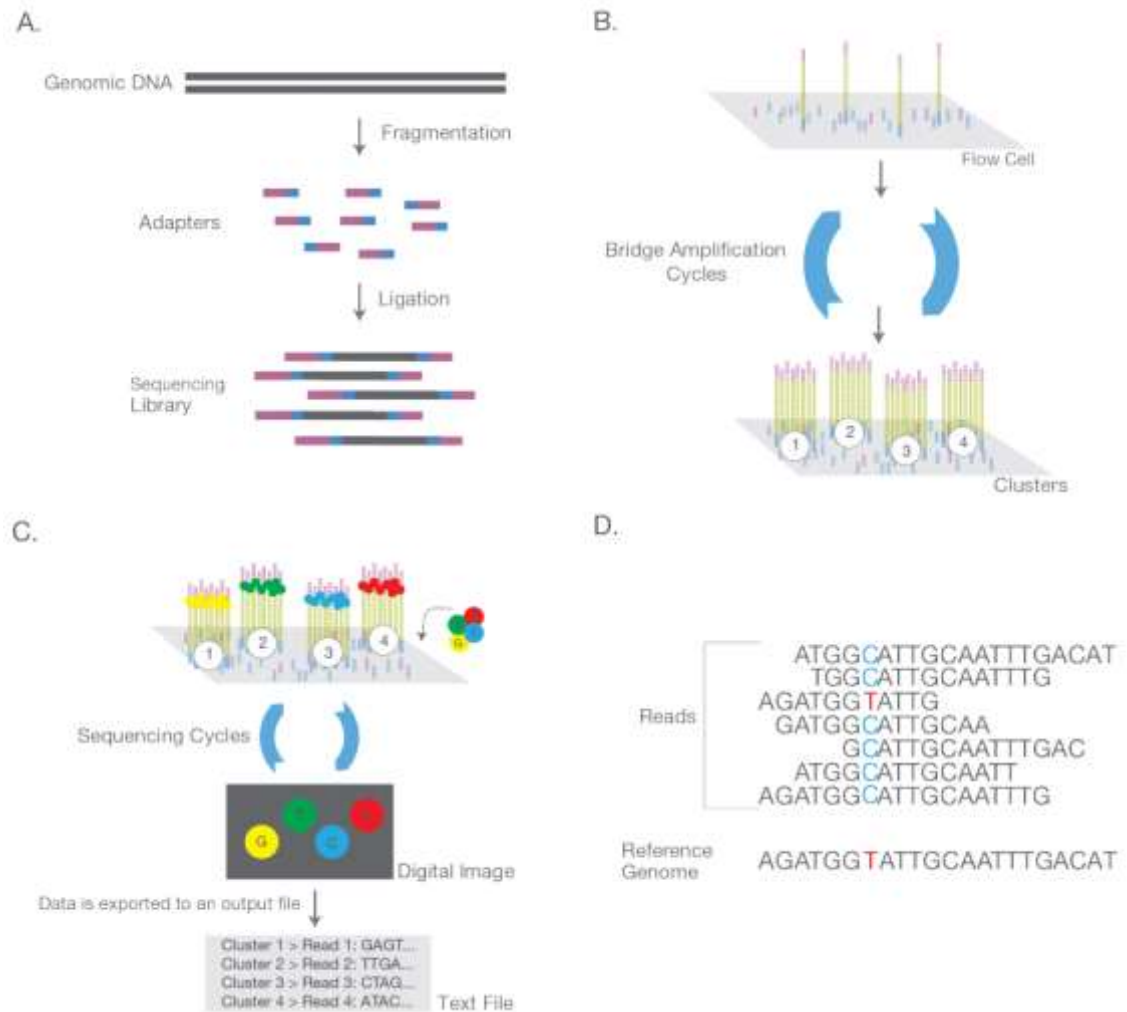


Figura 4: Esquema ilustrativo do sequenciamento na plataforma Illumina NGS. O processo inclui quatro etapas: (A) preparação da biblioteca (B) formação dos *clusters*, (C) sequenciamento, e (D) alinhamento e análises dos dados. (Illumina).

Além disso, a técnica de HTS é útil para a detecção de genomas de diversos vírus cuja identificação, antes da introdução dessa metodologia, não era possível (ALLEN et al., 2013; CASTRIGNANO et al., 2015). Como esperado, muitos genomas identificados não apresentam associação reconhecida com nenhuma doença, evidenciando assim um novo ângulo para a análise de viromas e infecções virais (BLOMSTRÖM, 2011).

A pesquisa do microbioma de doenças respiratórias através de HTS pode fornecer informações importantes sobre o potencial de transmissão e emergência de microrganismos entre as espécies animais (MENG, 2011; MASEMBE et al., 2012; ZHANG et al., 2014). Identificar co-infecções entre vírus ou vírus e bactérias é essencial para determinar a etiologia da doença

respiratória. A caracterização dos microrganismos presentes em determinada amostra auxilia no desenvolvimento de melhores tratamentos. Além disso, as análises metagenômicas e as ferramentas de bioinformática permitem a descoberta de novos vírus respiratórios (ROMERO-ESPINOZA et al., 2018).

Portanto, o objetivo deste projeto foi analisar e comparar o microbioma de leitões que apresentavam sinais clínicos respiratórios com o de animais sadios utilizando técnicas de HTS, buscando avaliar a diversidade dos microrganismos existentes nos problemas respiratórios.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento das populações microbianas da cavidade nasal e laringeal de suínos nas condições de manejo usualmente adotadas no Rio Grande do Sul.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar através de análises de metagenômica as populações virais e bacterianas presentes na cavidade nasal e laringeal de suínos nas fases de creche e terminação;

Analisar a interação entre as populações de vírus e bactérias que tenham sido identificadas por metagenômica, através de pipelines de bioinformática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS) – nº 33558/2018.

3.1 Escolha da granja e dos animais

Como critério, a granja selecionada para as coletas deveria ter relatos e queixas de doença respiratória recorrente e que o manejo adotado representasse a maioria das granjas do Rio Grande do Sul. Os animais da granja provinham de 5 diferentes unidades produtoras de leitões (UPLs) e foram misturados para a formação de um lote de cerca de 1900 animais, que foram alojados em um galpão. Outro fator importante foi a escolha da época do ano para iniciar as coletas das amostras, neste caso o inverno, pois é o período de maior ocorrência de problemas respiratórios. A seleção da granja ocorreu apenas na primeira coleta, sendo que nas coletas subsequentes os animais foram acompanhados até o momento pré-abate.

A granja selecionada localizava-se no município de Arroio do Meio/RS. O proprietário pertencia a um sistema de integração de uma empresa brasileira, que abastece tanto o mercado interno como externo. Os animais permaneciam nesta granja em regime de engorda até o 72º dia de vida e eram então transferidos para outras granjas terminadoras até o dia do abate.

Na granja escolhida foram realizadas a primeira e a segunda coleta deste estudo. Como mencionado acima, no 72º dia de vida os animais foram transferidos para uma granja terminadora, localizada no mesmo município, e que também pertencia a mesma integradora. Nesta última, igualmente ocorria a mistura de animais de diversas origens para formação dos lotes. Nesta ocasião, foi composto um lote com cerca de 1260 animais de 16 origens diferentes.

3.2 Histórico dos animais na granja

A primeira granja era constituída de um galpão com baias divididas por grades de ferro vazadas que permitiam a comunicação entre os leitões. Na primeira coleta, alguns leitões apresentavam quadros de diarreia, contudo foram mantidos separados do restante dos animais. Os lotes das 5 origens eram

provenientes de integrações produtoras de leitões pertencentes a mesma empresa e os animais foram alojados na granja no mesmo dia. A temperatura ambiente era controlada por ventiladores e cortinas operadas manualmente e a ração fornecida era extrusada e distribuída manualmente aos leitões em cochos de madeira. Após os animais serem transferidos, o galpão da granja era lavado com detergentes e desinfetantes comerciais e o vazio sanitário durava cerca de 3 a 4 dias.

Na segunda granja, os galpões dos suínos estavam situados próximos à uma leiteria, ambos pertencentes ao mesmo proprietário. Semelhante à primeira granja, não era realizada quarentena de animais doentes. O controle de temperatura era feito por cortinas operadas manualmente. A ração era extrusada e distribuída por comedouros automáticos. Os animais entravam no galpão todos no mesmo dia e saíam todos no mesmo dia, após cumprirem o período de engorda até o abate. Após a saída dos animais para abate, era realizada lavagem do galpão com detergente e desinfetante, com vazio sanitário de 12 dias.

3.3 Administração de vacinações e medicamentos

A granja adotava o seguinte regime de vacinações: a primeira dose das vacinas contra o *A. pleuropneumoniae*, *M. hyopneumoniae* e PCV2 era realizada na 4ª semana de vida dos animais. A segunda dose era administrada três semanas após a primeira dose. Eram administrados Tulatromicina por via intramuscular (Draxin®, Zoetis™) e Norfloxacin (Farmaflox®, Farmabase™) Adicionado à água de bebida aos 21 dias de idade.

Os animais a partir dos 174 dias receberam Diclofenaco (Vetflogin®, Vallee™) um anti-inflamatório; Tiamulina (Denagard®, Novartis Saúde Animal Ltda) administrado via ração ração peletada; e Enrofloxacin injetável (Iflox®, Hipra Saúde Animal Ltda).

3.4 Coleta das amostras

As coletas de suabe nasal e de suabe de laringe foram realizadas em três fases de ocorrência de infecções respiratórias em suínos de produção, aos 33,

71 e 173 dias de idade (AMARAL et al, 2006; Tabela 1). As coletas seguiram o seguinte cronograma:

Tabela 1. Distribuição das coletas.

	Dia da Coleta	Idade dos animais
Primeira Coleta (Tempo 1 – T1)	12 de julho de 2017	33 dias de idade
Segunda Coleta (Tempo 2 – T2)	21 de agosto de 2017	71 dias de idade
Terceira Coleta (Tempo 3 – T3)	1 de dezembro de 2017	173 dias de idade

3.5 Formação dos grupos de coleta

Para a formação dos grupos com e sem sinais clínicos (Figura 5), foi realizada a contagem de tosse e espirros após agitação, padronizada por Morés e colaboradores (2001). Os dois grupos de 30 animais foram formados a partir de vários grupos amostrados. Antes de iniciar as contagens, as cortinas do galpão foram abertas para diminuir a concentração de partículas proveniente de ração e poeira em suspensão aguardou-se alguns minutos antes de iniciar os procedimentos.

Foram realizadas três contagens de dois minutos a cada 100 animais. Após movimentação dos animais por um minuto foi realizado um intervalo entre as contagens de 1 minuto. Acessos de tosse ou espirro foram contabilizados. Para identificação dos animais com sinais clínicos respiratórios, foi utilizado bastão de marcação nos animais.

Após todas as contagens, a taxa de tosse e espirro foi obtida segundo a fórmula:

$$\frac{\text{média das 3 contagens}}{\text{número de animais}} \times 100$$

Os animais marcados formaram o grupo com sinais clínicos e foram brincados para facilitar o acompanhamento. O grupo sem sinais clínicos foi

formado por animais que não apresentaram nem tosse nem espirro e também foram brincados. Os números dos brincos foram anotados para posterior identificação dos animais e do grupo ao qual pertenciam. A temperatura corporal foi aferida utilizando termômetro retal digital, contudo não foi critério para formação dos grupos e a anamnese foi realizada para monitoramento dos sinais clínicos.

As amostras escolhidas para o estudo foram secreções nasais e laringeais, ambos coletados com auxílio de suabes estéreis. Os animais amostrados foram divididos em dois grupos de 30 animais cada, como segue:

- Grupo 1 (G1): animais clinicamente saudáveis – 30 animais;
- Grupo 2 (G2): animais com sinais clínicos: tosse e espirro – 30 animais.

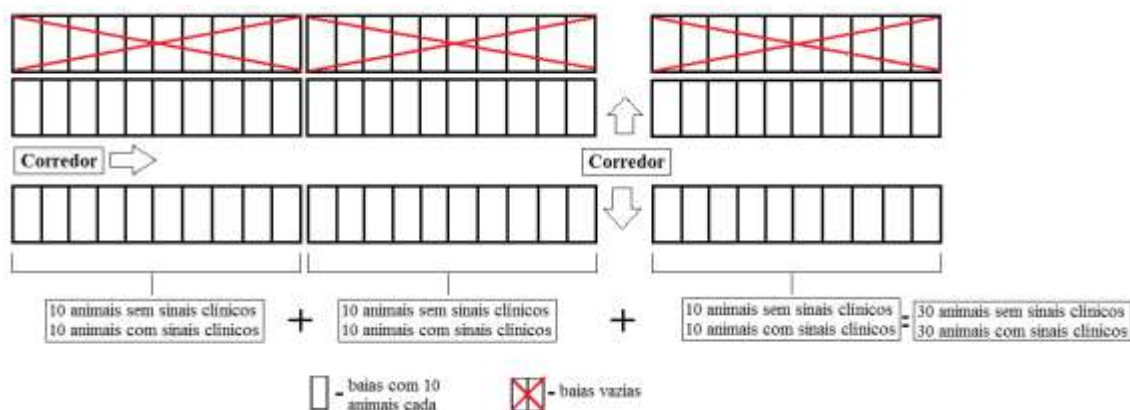


Figura 5: Esquema do galpão de coleta.

Os mesmos animais de cada grupo foram coletados aos 33 (T1), 71 (T2) e 173 (T3) dias como mencionado acima, totalizando 60 animais, 180 suabes nasais e 180 amostras de suabe de laringe.

Os suabes coletados foram mantidos em tubos estéreis, nos quais foram adicionados 400 µl de RNALater® (ThermoFisher Scientific). Foram transportados da granja ao laboratório em gelo no mesmo dia da coleta, e posteriormente estocados a -70°C até o processamento das amostras.

3.6 Preparo das amostras

3.6.1 Homogeneização dos suabes nasais e laringeais

Os suabes com RNALatter® foram descongelados e, a estes, adicionados 800µl de PBS (NaCl+Na₂HPO₄+NaH₂PO₄+H₂O). Para posterior homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos estéreis, contendo cerca de 5 *beads* de cerâmica estéreis. Com auxílio de um equipamento de agitação (Precellys® 24 - Bertin Technologies S.A.S, Versailles, France), os tubos foram agitados 3 vezes a 5500 rpm durante 20 segundos, com intervalos de 20 segundos entre cada ciclo. Após a homogeneização foram formados os *pools* das amostras. As amostras de secreções nasais da primeira coleta do grupo com sinais clínicos (total 30 amostras) foram dividida em três *pools* com 10 animais cada. O mesmo foi feito com as amostras de laringe. Esse processo foi adotado para todas as amostras das três coletas tanto para o grupo dos animais com sinais clínicos, como para o grupo dos animais sem sinais clínicos. Para a extração de DNA bacteriano foram retirados de cada *pool* cerca de 2 mL. Para a extração de ácidos nucleicos virais cerca de 7 mL cada *pool* foi filtrado com filtros 0,45µm estéreis.

3.7 Preparo das amostras para detecção de genomas virais

O processo de ultracentrifugação foi realizado utilizando os *pools* filtrados em tubos de 36 mL com colchão de sacarose 25%, centrifugado a ~ 131.000 x g por 2 horas. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* formado foi eluído em 200 µL de água Milli-Q. Após a ultracentrifugação, as amostras foram mantidas a -80°C até a realização da extração de DNA e RNA.

Para a extração de DNA e RNA, os pellets foram descongelados, ressuspensos em 200 µL de PBS e transferidos para um microtubo de 1,5 mL ao qual foram adicionados 40 µL de tampão de DNase (Thermo Scientific), 5 µL de RNase (Thermo Scientific) e 2,5µL de turbo DNase (Thermo Scientific). A amostra foi então incubada por 2 horas a 37°C. Após, as enzimas foram inativadas com 12,6 µL de EDTA 0,5 mM + 7,4 µL de água Milli-Q (total 20 µL) a 75°C durante 10 minutos. A amostra foi dividida em dois volumes de 200 µL, um para extração de DNA e o outro para extração de RNA.

3.7.1 Extração de ácidos nucleicos virais

Para extração de DNA, em 200 µL da amostra tratada, foi adicionado 200 µL de TEN 2 X, 40 µL de SDS 10% e 2 µL de Proteinase K (20 mg/mL). As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C sob agitação lenta. Foram adicionados 26 µL de NaCl 5 M e 440 µL de fenol, e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente em agitação por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 35.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, ao qual foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado, sendo homogeneizado por inversão. As amostras ficaram armazenadas a -20°C *overnight*. Após, foram centrifugadas a 35.000 x g durante 30 minutos a 4°C; o sobrenadante foi descartado e adicionado no tubo 1 mL de etanol 70% em temperatura ambiente, por gotejamento. A amostra foi centrifugada por 5 minutos a 4°C a 35.000 x g. Após, o sobrenadante foi descartado por inversão, o tubo foi centrifugado por 1 minuto a 4°C a 35.000 x g. O excesso de etanol foi removido e o pellet foi ressuscitado em 30 µL de água Milli-Q.

Para extração de RNA, em 200 µL da amostra preparada conforme o item 4.4, foram adicionados 800 µL de trizol, sendo homogeneizado com pipeta. A amostra foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, seguidos da adição de 200 µL de clorofórmio, homogeneizado manualmente por inversão durante 15 segundos e incubado por 2 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 35.000 x g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol absoluto, seguido de incubação durante 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 35.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e adicionado 1 mL de álcool 70%. O tubo foi centrifugado a 18.000 x g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, a amostra incubada a 40°C por 5 minutos e o pellet foi eluído em 30 µL de água Milli-Q.

3.7.2 Enriquecimento e purificação dos ácidos nucleicos e sequenciamento

O enriquecimento do RNA viral foi realizado de forma randômica com o kit REPLI-g WTA Single Cell Kit® (Qiagen), que sintetizou as fitas de cDNA (DNA complementar ao RNA). O enriquecimento do DNA extraído foi realizado com o kit phi29 DNA Polymerase® (Thermo Fisher Scientific), ambos conforme

instruções do fabricante. Após o enriquecimento, foram realizadas a purificação das amostras com o kit Ampure Xp Beads® (Beckman Coulter). A pureza e o rendimento do DNA foram estimados utilizando o espectrofotômetro L-Quant (LoccusBiotechnology) e Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen), respectivamente. A concentração final foi ajustada para 0,2 ng/μL em 20μL de DNA. Após, foram feitas bibliotecas de DNA com o kit Nextera®. O sequenciamento foi realizado através da plataforma Miseq™ Desktop Sequencer (Illumina).

3.7.3 Montagem de dados metagenômicos

As leituras (*reads*) brutas geradas pela plataforma Illumina MiSeq foram submetidas à análise de qualidade usando o software FastQC. As *reads* de baixa qualidade (Phred > 33), foram removidas com o software Trimmomatic versão 0.36 (BOLGER et al., 2014) e as *reads* com comprimento mínimo de 36 pares de bases (pb) foram selecionadas. Os adaptadores também foram removidos. As *reads* foram montadas novamente em *contigs* usando o software SPAdes Genome Assembler Program versão 3.11.1 (comando metaSPAdes; VASILINETC et al., 2015). Em seguida, os *contigs* foram submetidos à busca de homologia com os genomas disponíveis no banco de dados não redundante e filtro taxonômico de vírus por meio do software Blast2GO. As sequências correspondentes aos segmentos do genoma hospedeiro foram excluídas. A análise do genoma foi realizada com a busca de vírus eucarióticos comparando sequências de nucleotídeo (Blastn) e de proteínas (Blastx) disponíveis no portal NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências com os melhores escores BLAST (valores E $\leq 10^{-3}$) foram selecionadas e atribuídas a famílias virais conhecidas. *Contigs* > 300 pb foram confirmados pelo mapeamento de *reads* e selecionados para realizar predições de ORF e anotações de genoma usando o software Geneious (versão 9.1.8).

3.7.4 Análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos virais montados e as ORFs de aminoácidos traduzidos foram alinhados contra o banco de dados não redundante do GenBank com os algoritmos BLASTN e BLASTP para calcular suas identidades percentuais. As sequências representativas da família virais

foram obtidas do GenBank e, após o alinhamento, os valores de identidade aos pares e as análises filogenéticas foram realizadas usando o software MEGA 7 (<https://www.megasoftware.net/>) com MUSCLE e CLUSTAL. As árvores filogenéticas foram construídas usando o método de máxima verossimilhança e a avaliação da topologia das árvores foi baseada em 1000 repetições bootstrap.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos viromas da cavidade nasal de suínos aos 33 dias de idade - primeira coleta

O sequenciamento dos *pools* das amostras da primeira coleta gerou de 84.580 a 183.976 leituras de sequências (*reads*) (Tabela 2), com tamanho variando de 36 a 236 nucleotídeos após remoção das bases de baixa qualidade. Após comparação com o banco de dados de nucleotídeos do GenBank, 9,7% das *reads* nas amostras da cavidade nasal dos animais sem sinais clínicos e 30,8% das *reads* nas amostras dos animais com sinais clínicos apresentaram similaridade com sequências virais.

Tabela 2: Número de *reads* totais sequenciadas e após tratamento das sequências por *pool* de amostra.

<i>Pool no.</i>	Nº de <i>reads</i>	Nº de <i>reads</i> após trimagem (%)	Nº de <i>reads</i> virais (%)
Pool 1 Nasal SS*	108452	92249 (85,06%)	2035 (2,2%)
Pool 2 Nasal SS	157798	138469 (87,75%)	2092 (1,5%)
Pool 3 Nasal SS	84580	70596 (83,47%)	18013 (25,5%)
Pool 1 Nasal CS*	106703	92033 (86,25%)	45502 (49,4%)
Pool 2 Nasal CS	183976	158021 (85,89%)	27585 (17,5%)
Pool 3 Nasal CS	95719	83700 (87,44%)	21449 (25,6%)

*SS: sem sinais clínicos / *CS: com sinais clínicos

As *reads* obtidas deram origem a um número variável de *contigs* (1434 a 8850). Dentre os *contigs* virais presentes nas amostras de leitões sem sinais clínicos, 63,3% apresentaram similaridade com sequências de genomas de vírus eucarióticos. Nos leitões com sinais clínicos, 92,1% apresentaram similaridade com sequências de genomas de vírus eucarióticos. Os genomas virais cujo material genético era composto por DNA foram identificados em maior abundância nos animais sem sinais clínicos (99,5%). No grupo dos animais com

sinais clínicos, os vírus com genoma DNA foram identificados em 72,3% e os genomas de vírus de RNA em 27,7% das amostras sequenciadas.

4.1.1 Leitões sem sinais clínicos respiratórios – 33 dias de idade

Na figura 1 e na tabela 3, as amostras coletadas da cavidade nasal dos animais sem sinais clínicos foram sumarizadas. As *reads* virais apresentaram similaridade com sequências de genomas de vírus eucarióticos de membros de cinco famílias: *Smacoviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae*, *Picobirnaviridae* e *Polyomaviridae*, sendo que a família *Herpesviridae* foi mais abundante.

Dentre as *reads* de genomas virais representativos de membros da família *Smacoviridae*, foram identificados principalmente vírus circulares de fita simples (ssDNA), como o porcine associated porprismacovirus 1 (PoSM-1); entre as *reads* de genomas relacionados a membros da família *Herpesviridae*, foi identificado o genoma do citomegalovírus suíno (PCMV); na família *Parvoviridae*, foram identificados genomas de bocavírus suíno tipo 3 (PBoV-3); na família *Picobirnaviridae*, foi identificado picobirnavírus suíno (PPBV); e na família *Polyomaviridae*, genomas de poliomavírus suíno (PoPyV) (Figura 6).

Tabela 3. Abundância relativa de sequências sugestivas de genomas virais a partir de suabes de secreções respiratórias coletados de leitões sem sinais clínicos respiratórios.

Familia	Espécies	Abundância das reads (%)
<i>Herpesviridae</i>	Citomegalovirus suíno	95,48%
<i>Smacoviridae</i>	Porcine Associated Porprismacovirus 1	3,19%
<i>Parvoviridae</i>	Bocavirus suíno tipo 3	0,7%
<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirus suíno	0,6%
<i>Polyomaviridae</i>	Poliomavirus suíno	0,03%

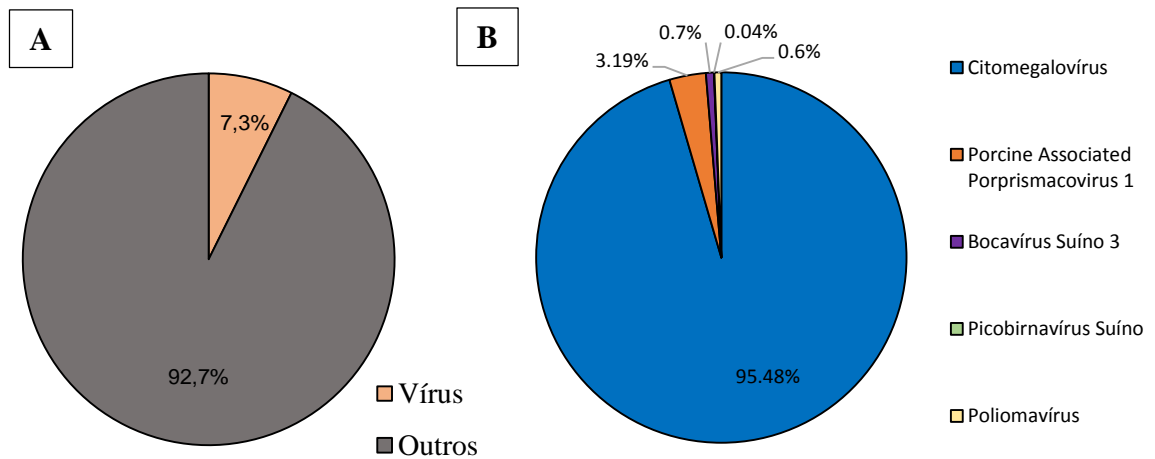


Figura 6: Classificação dos genomas virais detectados a partir de amostras da cavidade nasal de leitões que não apresentavam sinais clínicos respiratórios aos 33 dias de idade. Utilizado BLASTn. (A) Porcentagem das sequências com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 92,7%) e vírus eucarióticos (7,3%). (B) Porcentagem das sequências virais classificados em diversas famílias.

4.1.2 Leitões com sinais clínicos respiratórios – 33 dias de idade

Aos 33 dias de idade, as *reads* dos genomas virais mais frequentes detectados nos *pools* de suabe nasal de leitões que apresentaram sinais clínicos são representativos de membros de nove famílias: *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae*, *Picobirnaviridae*, *Polyomaviridae*, *Reoviridae* e *Smacoviridae* (Figura 9). A figura 7 e a tabela 4 resume as espécies virais identificadas. Apesar de outras famílias terem sido identificadas, o família *Herpesviridae* demonstrou-se a mais abundante.

Tabela 4. Abundância relativa de sequencias sugestivas de genomas virais a partir de suabes de secreções respiratórias coletados de leitões com sinais clínicos respiratórios aos 33 dias de idade.

Família	Espécies	Abundância das reads (%)
<i>Herpesviridae</i>	Citomegalovirus suíno	66,72%
<i>Astroviridae</i>	Astrovirus suíno	10,0%
<i>Caliciviridae</i>	Sapovirus suíno	5,0%
<i>Reoviridae</i>	Rotavirus A	0,31%
	Rotavirus B	5,0%
	Rotavirus C	1,0%

	Rotavirus H		1,0%
<i>Smacoviridae</i>	Porcine	Associated	2,3%
	Porprismacovirus 1		
<i>Coronaviridae</i>	Torovirus suíno		2,0%
	Vírus da Encefalomielite hemaglutinante suíno		2,0%
<i>Parvoviridae</i>	Bocavirus suíno		2,0%
<i>Polyomaviridae</i>	Poliomavirus suíno		2,0%
<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirus suíno		0,67%

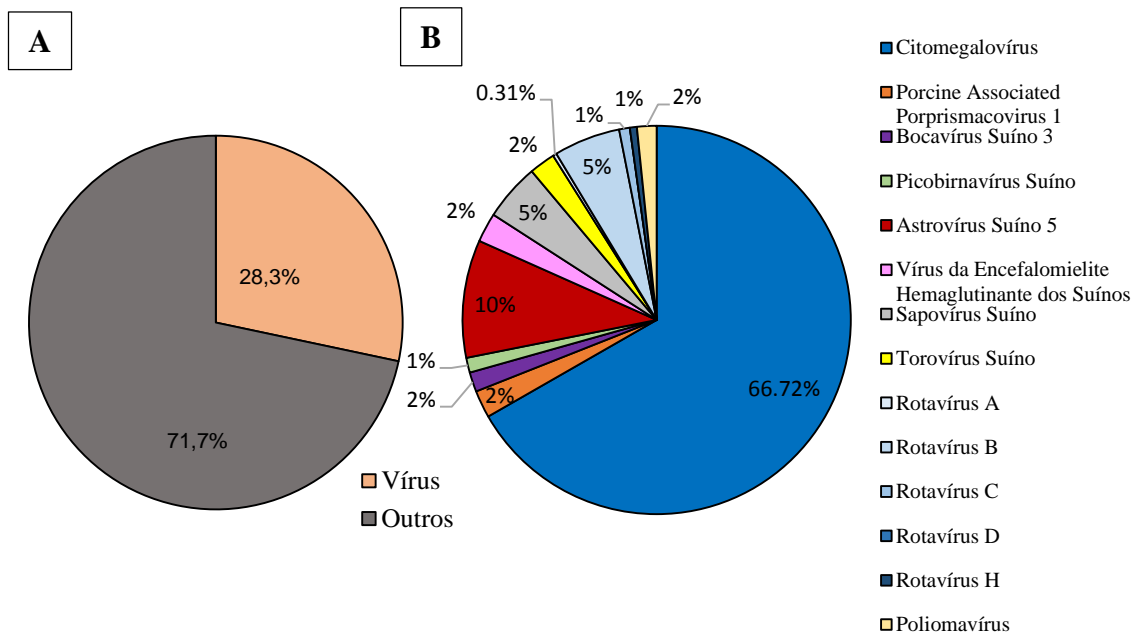


Figura 7: Classificação dos genomas detectados a partir de suabes nasais de leitões com sinais de doença respiratória aos 33 dias de idade. Programa utilizado: BLASTn. (A) Porcentagem das sequências genômicas com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 71,7%) e vírus eucarióticos (28,3%). (B) Porcentagem das sequências virais representativas das famílias identificadas no sequenciamento.

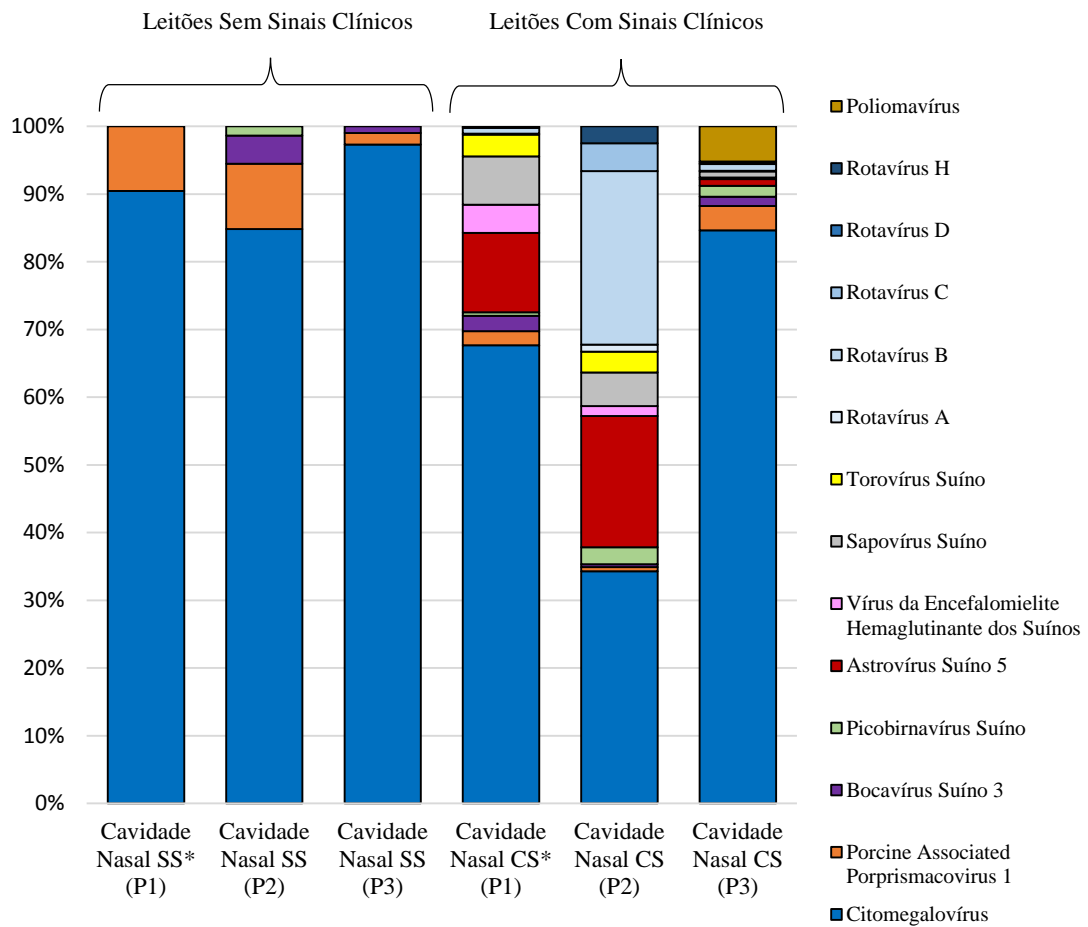


Figura 8: Relação dos *contigs* com similaridade a genomas de membros de famílias virais detectadas na cavidade nasal de leitões com e sem sinais clínicos. Primeira coleta, leitões com 33 dias de idade. *SS: sem sinais clínicos / *CS: com sinais clínicos

4.2 Caracterização dos viomas da cavidade nasal de suínos aos 71 dias de idade - segunda coleta

O sequenciamento dos *pools* das amostras de leitões de 71 dias gerou entre 98.723 a 168.131 *reads* (Tabela 5), com tamanho variando de 36 a 236 nucleotídeos após remoção das bases de baixa qualidade. Após comparação com o banco de dados de nucleotídeos do GenBank, 9,1% das *reads* nas amostras da cavidade nasal dos animais sem sinais clínicos e 27,3% das *reads* nas amostras dos animais com sinais clínicos apresentaram similaridade com seqüências virais.

Tabela 5. Número de *reads* totais sequenciadas e número de *reads* virais após trimagem por pool de amostra da segunda coleta.

<i>Pool</i> no.	Nº de <i>reads</i>	Nº de <i>reads</i> após trimagem (%)	Nº de <i>reads</i> virais (%)
Pool 1 Nasal SS*	110468	90657 (82,07%)	6076 (6,7%)
Pool 2 Nasal SS	168131	134386 (79,93%)	27630 (20,6%)
Pool 3 Nasal SS	98723	79408 (80,44%)	8 (0,01%)
Pool 1 Nasal CS*	121732	100769 (82,78%)	974 (1,1%)
Pool 2 Nasal CS	155676	136419 (87,63%)	16387 (12,0%)
Pool 3 Nasal CS	101926	88936 (87,26%)	61249 (68,9%)

*SS: sem sinais clínicos / *CS: com sinais clínicos

O sequenciamento dos pools das amostras deram origem a um número de *contigs* entre 923 a 2039. Dentre os *contigs* virais presentes nas amostras de leitões sem sinais clínicos 2,6% dos *contigs* apresentaram similaridade com sequências de genomas de vírus eucarióticos e nos leitões com sinais clínicos 92,3% dos *contigs* apresentaram similaridade com genomas de vírus eucarióticos. Em comparação com os vírus com genoma de RNA, os genomas virais de DNA foram identificados em menor abundância nos animais sem sinais clínicos (5,7%). No grupo dos animais com sinais clínicos, a identificação de vírus de DNA foi ainda menor (0,6%). Em contrapartida, os genomas de vírus de RNA foram os mais abundantes (99,4).

4.2.1 Leitões sem sinais clínicos respiratórios – 71 dias de idade

Os resultados das amostras coletadas da cavidade nasal dos leitões sem sinais clínicos estão sumarizados na Tabela 6. As *reads* virais identificadas apresentaram similaridade com sequências de genomas de vírus eucarióticos pertencentes à três famílias: *Smacoviridae*, *Parvoviridae* e *Picobirnaviridae* (Figura 12). Dentre as *reads* de genomas virais identificados, as *reads* similares a membros da família *Smacoviridae* foram o pig stool associated circular ssDNA virus (PoSCV); na família *Parvoviridae*, o Bocavírus Suíno tipo 3 (PBoV-3); e na família *Picobirnaviridae*, o picobirnavírus suíno (PPBV) (Figura 8).

Tabela 6. Porcentagem da abundância relativa das *reads* virais no grupo de leitões sem sinais clínicos aos 71 dias.

Familia	Espécies	Abundância das reads (%)
<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirus suíno	94,32%
<i>Smacoviridae</i>	Pig stool associated circular ssDNA virus	4,55%
<i>Parvoviridae</i>	Bocavirus suíno tipo 3	1,14%

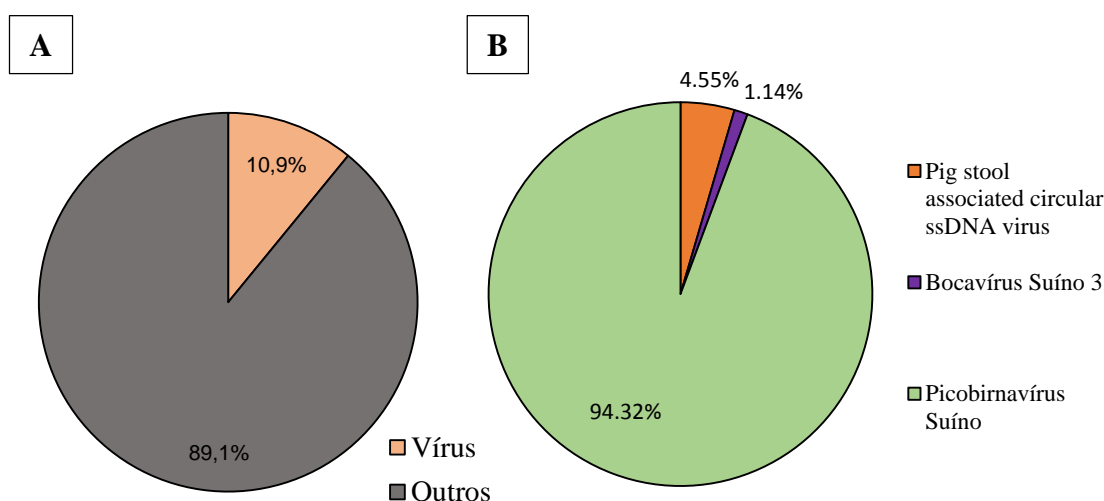


Figura 9: Classificação das *reads* virais detectados nas amostras da cavidade nasal de leitões que não apresentavam sinais clínicos respiratórios aos 71 dias de idade. Utilizado BLASTn. (A) Porcentagem das sequências com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 89,1%) e vírus eucarióticos (10,9%). (B) Porcentagem das sequências virais classificados em diversas famílias.

4.2.2 Leitões com sinais clínicos respiratórios – 71 dias de idade

Nas amostras de suabe nasal dos leitões que apresentaram sinais clínicos, as *reads* virais apresentaram similaridade com genomas de membros de cinco famílias: *Astroviridae*, *Herpesviridae*, *Picobirnaviridae*, *Reoviridae* e *Smacoviridae* (Figura 12). Semelhante à primeira coleta, as *reads* virais com similaridade ao membro da família *Astroviridae* foram o astrovírus suíno tipo 5 (PAsV-5); na família *Herpesviridae*, o PCMV; na família *Picobirnaviridae*, foi identificado o picobirnavírus suíno (PPBV); na família *Reoviridae* os rotavírus B e C (RVB e RVC); e na família *Smacoviridae*, foram identificados principalmente

vírus circulares de fita simples pig stool associated circular ssDNA virus (PoSCV). Os resultados estão sumarizados na Tabela 7 e Figura 9.

Tabela 7. Porcentagem da abundância relativa das *reads* virais no grupo de leitões com sinais clínicos aos 71 dias de idade.

Familia	Espécies	Abundância das reads (%)
<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirus suíno	98,4%
<i>Astroviridae</i>	Astrovirus suíno	0,85%
<i>Smacoviridae</i>	Pig stool associated circular ssDNA virus	0,47%
<i>Reoviridae</i>	Rotavirus B	0,09%
	Rotavirus C	0,09%
<i>Herpesviridae</i>	Citomegalovirus suíno	0,09%

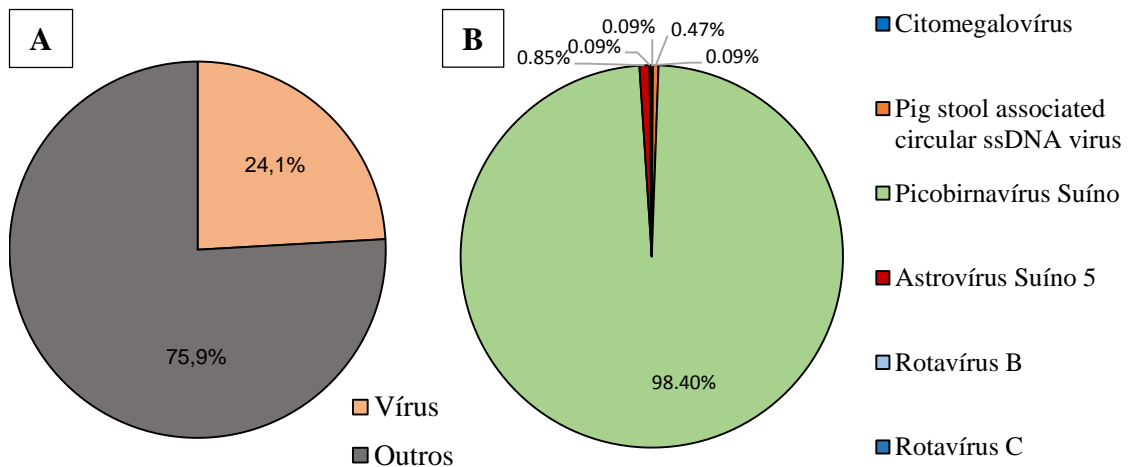


Figura 10: Classificação das *reads* virais detectados nas amostras da cavidade nasal de leitões que apresentavam sinais clínicos respiratórios aos 71 dias de idade. Utilizado BLASTn. (A) Porcentagem das sequências com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 75,9%) e vírus eucarióticos (24,1%). (B) Porcentagem das sequências virais classificados em diversas famílias.

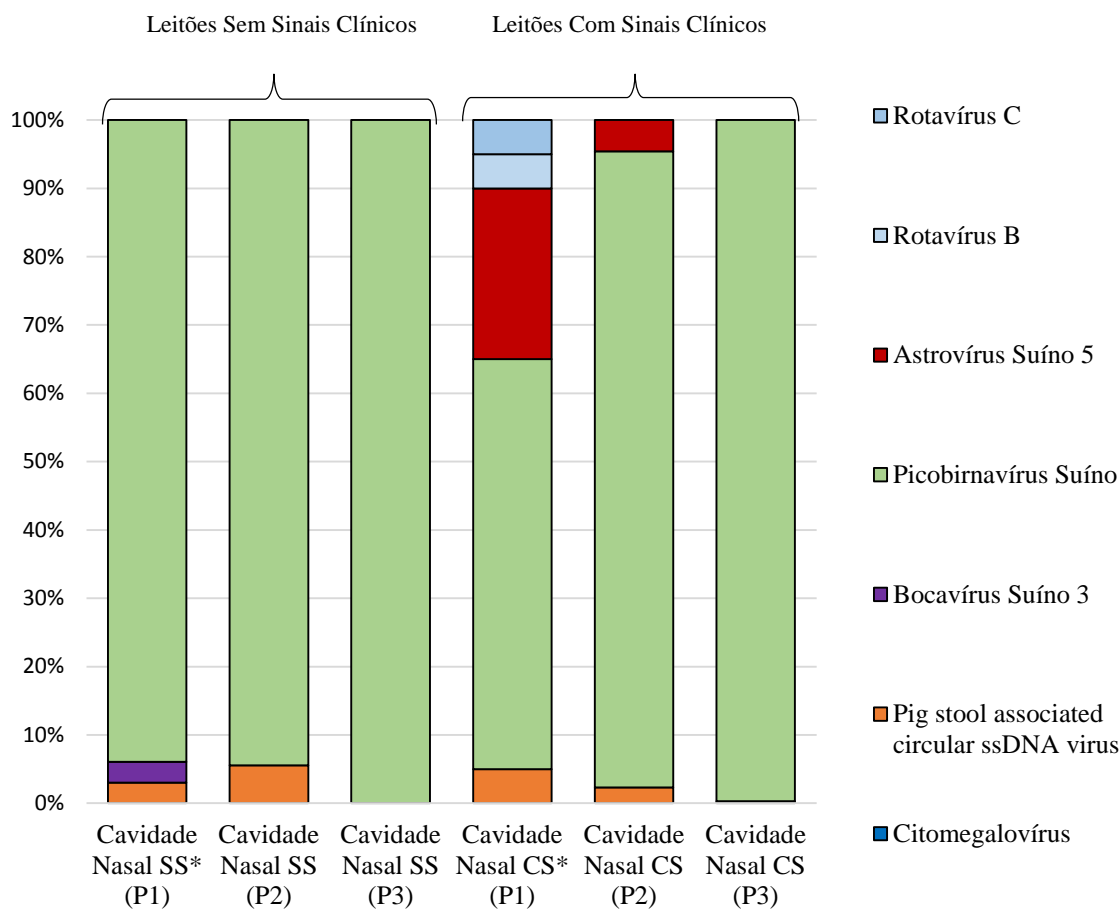


Figura 11: Relação das *reads* virais de genomas virais detectados na cavidade nasal de leitões com e sem sinais clínicos. Segunda coleta, leitões com 71 dias de idade. *SS: sem sinais clínicos / *CS: com sinais clínicos

4.3 Caracterização dos viromas da cavidade nasal de suínos aos 173 dias de idade - terceira coleta

O sequenciamento dos *pools* das amostras da terceira coleta gerou entre 146.641 a 169.328 *reads* (Tabela 8), com tamanho variando de 36 a 236 nucleotídeos após remoção das bases de baixa qualidade. Após comparação com o banco de dados, 7,5% das *reads* das amostras da cavidade nasal dos animais sem sinais clínicos e 9,6% das *reads* das amostras dos animais com sinais clínicos apresentaram similaridade com sequências virais depositadas no GenBank.

Tabela 8. Número de *reads* totais sequenciadas e número de *reads* virais após trimagem por pool de amostra da terceira coleta.

<i>Pool no.</i>	Nº de <i>reads</i>	Nº de <i>reads</i> após trimagem (%)	Nº de <i>reads</i> virais (%)
Pool 1 Nasal SS*	146641	131180 (89,46%)	22674 (17,3%)
Pool 2 Nasal SS	151069	136105 (90,09%)	4838 (3,6%)
Pool 3 Nasal SS	151777	133244 (87,79%)	2538 (1,9%)
Pool 1 Nasal CS*	152144	137033 (90,07%)	15597 (11,4%)
Pool 2 Nasal CS	169328	141912 (83,81%)	5339 (3,8%)
Pool 3 Nasal CS	161097	141089 (87,58%)	19585 (13,9%)

*SS: sem sinais clínicos / *CS: com sinais clínicos

As *reads* obtidas deram origem entre 1625 e 4217 *contigs* nos *pools* de amostras. Dentre os *contigs* virais presentes nas amostras de leitões sem sinais clínicos 94,4% deles apresentaram similaridade com sequências de genomas de vírus eucarióticos e nos leitões com sinais clínicos, 90,3% dos *contigs* apresentaram similaridade com sequências de genomas de vírus eucarióticos. Nesta coleta, os vírus cujo material genético é RNA foram mais predominantes em ambos os grupos.

4.3.1 Leitões sem sinais clínicos respiratórios – 173 dias de idade

Nas amostras coletadas da cavidade nasal dos leitões sem sinais clínicos, as *reads* virais apresentaram similaridade com sequências de genomas de vírus eucarióticos pertencem à três famílias: *Astroviridae*, *Genomoviridae* e *Picobirnaviridae* (Figura 14). Dentre as *reads* com similaridade viral, o astrovírus suíno tipo 5 (PAsV-5) foi identificado como membro da família *Astroviridae*; na família *Genomoviridae*, foram identificados o fur seal faeces associated circular DNA virus (FSfaCV); e na família *Picobirnaviridae*, o picobirnavírus suíno (PPBV). Os resultados estão sumarizados na Tabela 8 e Figura 10.

Tabela 9. Porcentagem da abundância relativa das *reads* virais no grupo de leitões sem sinais clínicos aos 173 dias de idade.

Família	Espécie	Abundância das reads (%)
<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirus suíno	98,11%
<i>Genomoviridae</i>	“Fur seal faeces associated circular DNA virus”	1,84%
<i>Astroviridae</i>	Astrovirus suíno	0,05%

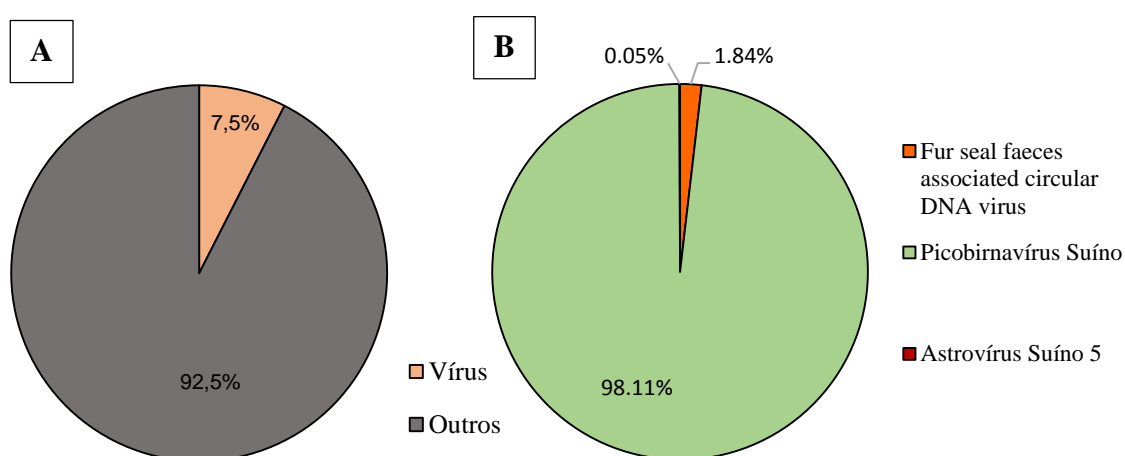


Figura 12: Classificação das *reads* virais detectados nas amostras da cavidade nasal de leitões que não apresentavam sinais clínicos respiratórios aos com 173 dias de idade. Utilizado BLASTn. (A) Porcentagem das sequências com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 92,5%) e vírus eucarióticos (7,5%). (B) Porcentagem das sequências virais classificados em diversas famílias.

4.3.2 Leitões com sinais clínicos respiratórios – 173 dias de idade

Nas amostras dos leitões que apresentaram sinais clínicos, as *reads* virais corresponderam a genomas de membros de quatro famílias: *Astroviridae*, *Herpesviridae*, *Picobirnaviridae* e *Genomoviridae* (Figura 14). Semelhante às duas outras coletas, as *reads* virais com similaridade a membros da família *Astroviridae* foram identificados o astrovírus suíno tipo 5 (PAsV-5); na família *Herpesviridae*, foram identificados genomas de PCMV; na família *Picobirnaviridae*, picobirnavírus suíno (PPBV); e na família *Genomoviridae*, foram identificados principalmente vírus circulares de fita simples (ssDNA), como o “fur seal faeces associated circular DNA virus” (FSfaCV).

Dentre os genomas identificados, o PPBV foi o vírus mais abundante tanto nos leitões saudáveis, quanto nos leitões doentes. Os resultados estão sumarizados na Tabela 10 e Figura 11.

Tabela 10. Abundância relativa das *reads* virais no grupo de leitões com sinais clínicos aos 173 dias de idade.

Família	Espécie	Abundância das reads (%)
<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirus suíno	99,57%
<i>Genomoviridae</i>	“Fur seal faeces associated circular DNA virus”	0,29%
<i>Herpesviridae</i>	Citomegalovirus suíno	0,14%

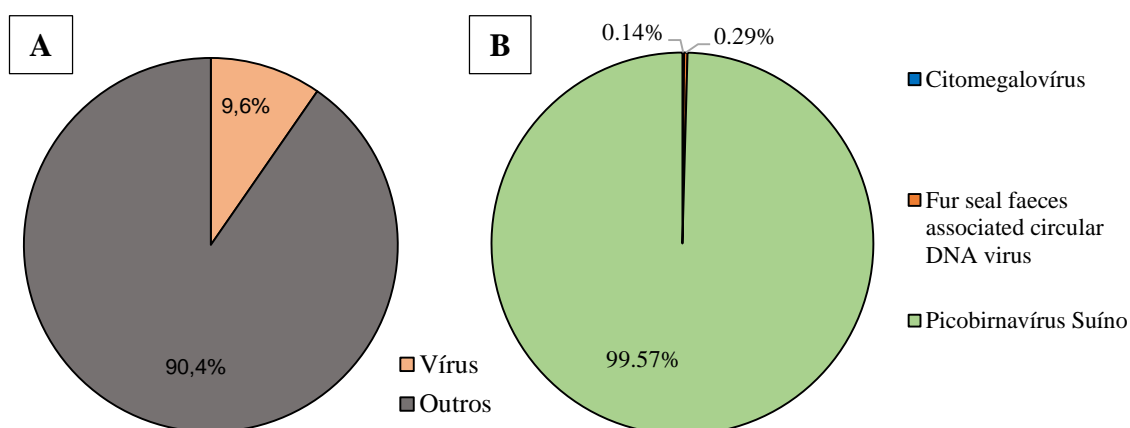


Figura 13: Classificação das *reads* virais detectados nas amostras da cavidade nasal de leitões que apresentavam sinais clínicos respiratórios aos 173 dias de idade. Utilizado BLASTn. (A) Porcentagem das sequências com similaridade com bactérias, fagos e vírus procarióticos (Outros – 90,4%) e vírus eucarióticos (9,6%). (B) Porcentagem das sequências virais classificados em diversas famílias.

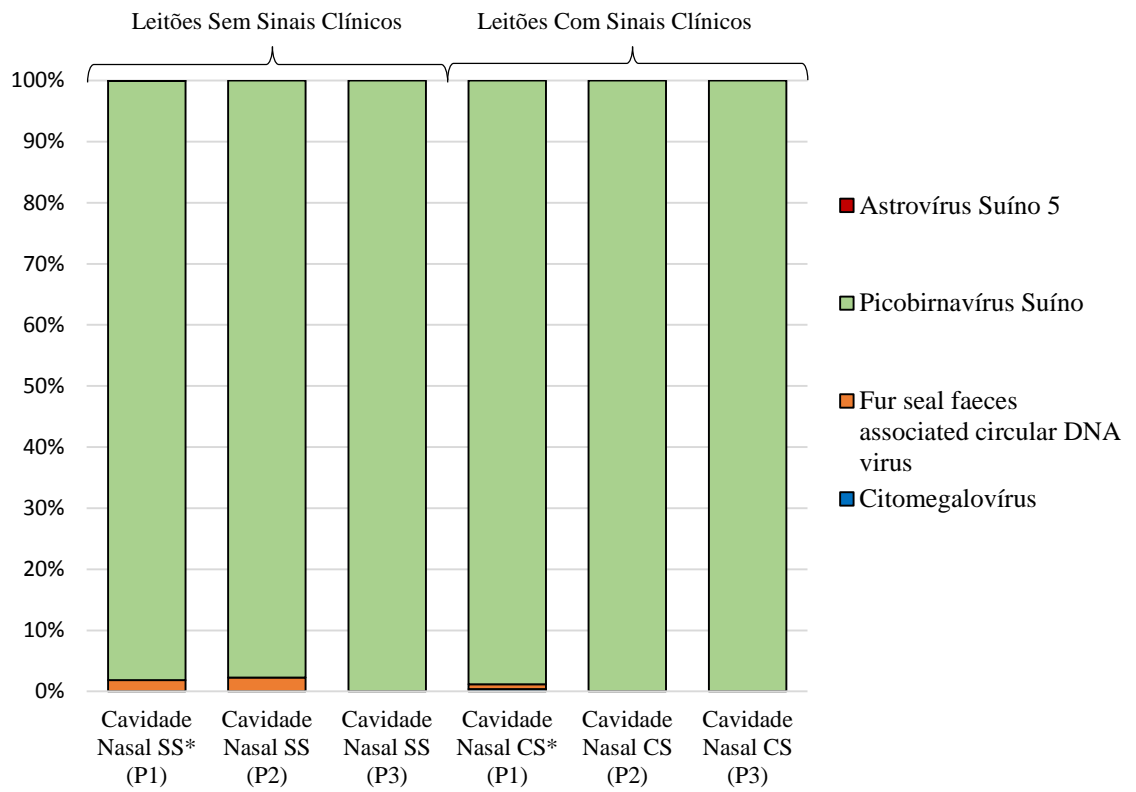


Figura 14: Relação das *reads* virais com similaridade a genomas de membros de famílias virais detectadas na cavidade nasal de leitões com e sem sinais clínicos. Terceira coleta, leitões com 173 dias de idade. *SS: sem sinais clínicos / *CS: com sinais clínicos

5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo, examinar comparativamente a microbiota viral da cavidade nasal de leitões desmamados saudáveis e de leitões afetados por problemas respiratórios, criados sob as mesmas condições de manejo. Com isso, buscou-se identificar as diferenças entre os viomas de leitões com problemas respiratórios e saudáveis. Poucos estudos relacionados à microbiota viral respiratória de suínos estão reportados na literatura (HAUSE et al., 2016; QIN et al, 2018). Os estudos disponíveis consistem da caracterização das bactérias e vírus presentes no trato gastroentérico, sendo poucos os estudos que demonstram o bacterioma do trato respiratório de suínos (SLIFIERZ, FRIENDSHIP, WEESE 2015; CORREA-FIZ, FRAILE, ARAGON, 2016; NIEDERWERDER, 2017).

No presente estudo, uma maior diversidade viral foi identificada no vioma dos leitões doentes de 33 dias de idade, no qual foram identificados genomas de 11 espécies diferentes. No vioma da cavidade nasal dos leitões saudáveis, foram identificados genomas de 5 espécies diferentes. No decorrer do estudo, houve uma maior abundância da família *Picornaviridae* na cavidade nasal dos leitões saudáveis e nos doentes, nas coletas realizadas aos 71 e 173 dias de idade. O PPBV é comumente descrito como componente natural da microbiota nasal (GANESH et al., 2012), entretanto um estudo demonstrou um alto potencial zoonótico entre suínos e trabalhadores intimamente relacionados aos animais (ANDRADE et al., 2019). Frente a isto, faz-se necessário estudos mais aprofundados acerca da patogenia do PPBV.

5.1 O vioma da cavidade nasal de leitões saudáveis e afetados por doenças respiratórias – um estudo longitudinal

Ao nascimento, alguns autores afirmam que os leitões são apresentados a diversos microrganismos, os quais se estabelecem como parte da sua microbiota, permanecendo ao longo de toda a vida do animal (JANSMAN et al., 2012). Neste estudo, foi possível demonstrar uma maior diversidade viral em leitões de 33 dias. Nas coletas subsequentes, houve uma prevalência maior de picobirnavírus na microbiota viral após os 71 dias de vida.

Além das vacinações e antibioticoterapia, o colostro fornecido ao leitão recém-nascido irá promover uma proteção passiva necessária para sua

sobrevivência até que os leitões se tornem capazes de desenvolver a própria resposta imune (HEIM et al., 2015; LAVALLEE et al., 2016). Contudo, alguns fatores podem resultar em impactos na estabilidade da microbiota e afetar a suscetibilidade dos leitões às doenças, tais como o primeiro contato com o meio ambiente após o nascimento, a diminuição da imunidade materna dos leitões após o desmame, a pressão de infecção causada pela mistura de lotes de leitões e potenciais estressores como mudanças na alimentação, práticas de manejo e administração de antimicrobianos (FABLET et al., 2011; SLIFIERZ, FRIENDSHIP & WEESE, 2015). A presença de genomas virais usualmente ligados à problemas entéricos na cavidade nasal demonstrou uma desestabilização da microbiota nasal dos leitões aos 33 dias de idade, provavelmente devido ao estresse causado pelo desmame, influenciando na entrada e permanência dos microrganismos entéricos identificados na cavidade nasal.

A cavidade nasal, além de ser a primeira porta de entrada para patógenos, abriga diversos microrganismos. A combinação desses patógenos pode resultar nas doenças respiratórias em suínos, sejam virais e/ou bacterianos (CHAE, 2016). Estudos demonstram a presença de co-infecções tanto em suínos saudáveis quanto nos afetados por diferentes complexos de doenças (AMINO et al., 2016; BLOMSTRÖM et al., 2016; CORREA-FIZ, FRAILE & ARAGON, 2016; BLOMSTRÖM et al., 2018; CHEN et al., 2018). Corroborando tais estudos, as co-infecções detectadas neste trabalho foram mais evidentes aos 33 dias de idade dos leitões, com a identificação de genomas de vírus respiratórios e entéricos.

5.1.1 A composição do microbioma viral na cavidade nasal de leitões aos 33 dias de idade

Na cavidade nasal de leitões aos 33 dias de idade, genomas de PCMV foram os mais abundantes principalmente nos leitões saudáveis, representando 95,5% das sequências virais identificadas. Nos leitões doentes, genomas de PCMV foram representados por 66,7% das sequências virais. O PCMV, como todos os membros da família *Herpesviridae*, possui um genoma de DNA fita dupla e é reconhecido causador de infecções latentes. O vírus latente pode eventualmente ser reativado em situações de estresse ou outras condições

imunossupressoras (SEKIGUCHI et al., 2012; MOROZOV et al., 2016; KAVANOVÁ et al., 2018).

O PCMV é ubíquo nos suínos do mundo todo, sendo estável e transmitido facilmente através de secreções respiratórias, pela placenta, pelo leite e por urina e fezes. Embora o vírus tenha sido identificado em casos clínicos, não é considerado um patógeno de importância em leitões desmamados (CIBULSKI et al., 2015; BASSO et al., 2017; MOROZOV et al., 2017; FIEBIG et al., 2018; LIU et al., 2018). Devido a capacidade de reativação a partir da latência, a identificação de genomas de PCMV nos leitões de 33 dias de idade, pode ser resultante do estresse ocorrido no momento do desmame e nos dias subsequentes, sendo esse o período de aclimação desses animais ao novo ambiente. Contudo, estudos avaliando a presença dos PCMV desde a placenta até o período pré-desmame demonstra-se necessário. A maior identificação de sequências de PCMV também pode estar relacionada com a possibilidade de uma infecção primária, resultando em viremia e alta excreção do viral.

O PCMV ocasionalmente está associado a rinite e pneumonia com corpúsculos de inclusão em leitões, distúrbios reprodutivos em fêmeas prenhes e ao complexo de doenças respiratórias de suínos (PRDC) (LIU et al., 2012; KAVANOVÁ et al., 2015). A infecção por PCMV geralmente é subclínica e auto-limitante em suínos mais velhos. De maneira semelhante ao citomegalovírus humano, o PCMV pode atravessar a barreira placentária, resultando em mumificações, abortos, leitões com baixa viabilidade e mortalidade após o desmame (DUTRA et al., 2015; KAVANOVÁ et al., 2015; PLOTZKI et al., 2016).

Outros estudos demonstram a recorrência de vírus em problemas respiratórios nas populações de suínos, como por exemplo o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) (OPRIESSNIG, GIMÉNEZ-LIROLA & HALBUR, 2011; FABLET et al., 2012; BLOMSTRÖM et al., 2018; QIN et al., 2018). A não detecção de genomas de PCV2 nesse estudo pode ser justificada pela vacinação previamente realizada na quarta semana de vida dos leitões.

Como mencionado anteriormente, foram identificados genomas de diversos vírus entéricos nos leitões doentes de 33 dias de idade, sendo eles o astrovírus suíno tipo 5 (PAsV-5), o sapovírus suíno (PSaV), o torovírus suíno (PToV) e os rotavírus A, B, C, D, e H (RVA, RVB, RVC, RVD e RVH). Os suínos utilizam o focinho para comunicação, reconhecimento do ambiente e

manutenção das relações de dominância (CAMERLINK e TURNER, 2013). Esse comportamento pode favorecer a uma presença transitória de microrganismos que não colonizam a cavidade nasal (CORREA-FIZ, FRAILE & ARAGON, 2016).

Como as amostras aqui examinadas foram coletadas na cavidade nasal, é possível que os genomas detectados sejam resultantes desse tipo de contaminação pelo estreito contato entre a cavidade nasal e as fezes, uma vez que o hábito dos suínos de utilizar o focinho em alimentos, fezes e fômites facilitaria esse contato. Ainda assim, a presença individual de qualquer vírus ou bactéria não determina uma causa direta da doença clínica, não refletindo uma multiplicação viral no hospedeiro.

As constantes re-exposições podem influenciar na permanência desses vírus na região nasal. A presença de patógenos primários, como o PAsV-5 e os diversos RV, além de agentes bacterianos, pode induzir lesões graves nos tecidos respiratórios, favorecendo a entrada de vírus entéricos na cavidade nasal e estes estarem atuando como agentes secundários de patógenos respiratórios (OPRIESSNIG, GIMÉNEZ-LIROLA & HALBUR, 2011). No presente estudo, os vírus entéricos foram identificados somente nos animais doentes, sendo possível que as lesões na neste local cavidade nasal.

Outro genoma viral identificado apenas nos leitões doentes de 33 dias de idade eram representativo do vírus da encefalomielite hemaglutinante dos suínos (PHEV). O PHEV é um membro da família *Coronaviridae*, que tem o trato respiratório como sítio primário de replicação (HIRAHARA et al., 1986; SAIF et al., 2012; LI et al., 2016). Sua transmissão se dá por secreções nasais contaminadas. É potencialmente neurotrópico, pois pode se propagar via sistema nervoso periférico para o sistema nervoso central, causando danos neurológicos, encefalomielites e vômito, eventualmente ocasionando o refugo de leitões lactentes (DING et al., 2017; LI et al., 2017). Contudo, a infecção geralmente permanece subclínica em leitões com mais de 14 dias de idade (VIJGEN et al., 2006; RHO et al., 2011), pois os leitões estão protegidos por anticorpos colostrais e desenvolvem resistência relacionada à idade contra o PHEV (RHO et al., 2011).

Também foram identificados nos leitões de 33 dias de idade genomas de bocavírus suíno tipo 3 (PBoV-3), membro da família *Parvoviridae*. Estes genomas foram identificados na cavidade nasal tanto de animais saudáveis

como doentes, porém em maior abundância de sequências em leitões com sinais clínicos do que nos leitões saudáveis. O PBoV-3 foi associado a doença respiratória grave (ZHANG et al., 2015; ZHENG et al., 2016) e os achados mais frequentes em amostras de animais com sinais respiratórios sugerem o envolvimento do PBoV-3 nesses quadros. Contudo, a importância da PBoV-3 na indução de quadros de doença respiratória em leitões desmamados necessita ser abordada com maior profundidade (ZHAI et al., 2010; JIANG et al., 2014).

5.1.2 Picobirnavirus suíno

O período após o desmame caracteriza-se por ser a fase na qual os leitões sofrem maior estresses. Após o estabelecimento de hierarquia e diminuição de brigas entre os animais, há uma diminuição do estresse na convivência entre os animais. Acerca disso foi possível observar que, partir dos 71 dias de idade ocorreu uma predominância dos genomas de PPBV na cavidade nasal, sugerindo que o viroma permaneceu menos variável entre a segunda coleta e o período pré-abate aos 173 dias de idade. Pertencente à família *Picobirnaviridae*, os picobirnavírus (PBV) são vírus pequenos, com RNA de fita dupla, bissegmentado e não envelopados (GANESH et al., 2012; BÁNYAI et al., 2014). Os PBVs foram identificados em amostras fecais de uma variedade de animais domésticos e em mamíferos, aves e répteis em cativeiro (CHEN et al., 2014; MALIK et al., 2014). Os genomas de PBV também foram detectados em amostras ambientais, incluindo sistema de esgoto e águas superficiais (ZHANG, et al., 2015; SYMONDS, GRIFFIN e BREITBART, 2009).

Em diversas espécies animais, incluindo os suínos, o PBV está mais associado a surtos agudos de gastroenterite ou diarreia esporádica, geralmente de forma secundária aos patógenos entéricos mais conhecidos, como o rotavírus, calicivírus e astrovírus (SMITS et al., 2011; GANESH et al., 2012), sendo a frequência nas fezes de suínos cerca de 65% (BÁNYAI et al., 2008). Todavia uma associação de infecção por PPBV como agente primário de quadros clínicos entéricos e/ou respiratórios não foi demonstrado até o momento (BÁNYAI et al., 2014). Alguns autores sugerem que o PBV pode atuar como agente patogênico secundário em problemas respiratórios (SMITS et al., 2011), porém mais dados são necessários para confirmação desta hipótese.

Assim como diversos estudos de prevalência (FREGOLENTE et al., 2009; LISTE et al., 2000; GIORDANO et al., 2011), os dados aqui apresentados demonstram uma alta frequência do PPBV nas amostras na cavidade nasal de leitões doentes e saudáveis, fator que dificulta o estabelecimento da patogenia do vírus. Acerca da excreção do vírus, Martinez e colaboradores (2010) evidenciaram uma maior excreção do PBV em fêmeas durante o período de lactação e no período final da gestação, sugerindo uma associação de estresse e aumento na eliminação do vírus. Esses fatores de estresse pode estar envolvidos com o momento do desmame e pelas trocas de unidade, pois os leitões são transferidos e sofrem estresse.

Devido a esses diversos vírus identificados, faz-se necessário uma melhor compreensão do viroma respiratório de suínos juntamente com o microbioma da cavidade nasal.

CAPÍTULO 1

Characterization of Upper Respiratory Tract Microbiome in Susceptible and Healthy Weaned Piglets

Anne Caroline Ramos dos Santos^a; Pabulo Henrique Rampelotto ^b; Márcia Regina Loiko^c; Deise Maria Pereira^a; Raíssa Nunes dos Santos^a; Ana Paula Mutterle Varela^a; Ana Cláudia Franco^a; Fabiana Quoos Mayer^d; Paulo Michel Roehe^{a*}

^aUniversidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Av. Sarmiento Leite 500, sala 208, Porto Alegre, RS - CEP 90050-170, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bHospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA - R. Ramiro Barcelos, 2350 - Santa Cecilia, Porto Alegre, RS - CEP 90035-007, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cUniversidade FEEVALE, Laboratório de Virologia, Instituto de Ciências da Saúde (ICS). Câmpus II ERS-239, 2755 | Novo Hamburgo, RS - CEP 93525-075, Rio Grande do Sul, Brazil.

^dFEPAGRO Saúde Animal Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul - CEP 92990-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author

Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Av. Sarmiento Leite 500, sala 208, Porto Alegre, CEP 90050 170, Rio Grande do Sul, Brazil.

Email address: anne_carolsantos@hotmail.com

Artigo em fase de conclusão a ser submetido em periódico científico.

ABSTRACT

At birth, piglets are presented to an abundance of microorganisms, many of which will become part of its microbiota throughout life. The nasal mucosa is an important site of microbial colonization of the host and, as such, is expected to harbor a variety of bacteria and viruses. In particular, the nasal cavity a major portal of entry for agents that cause respiratory infections, a highly significant problem in swine production. The aim of the present study was to examine the composition of microbiome of the upper respiratory tract (URT) of healthy piglets at post-weaning, and to compare such findings with those of piglets affected by respiratory disease. Nasal and larynx swabs were collected from 30 healthy piglets as well as the same number of piglets affected by respiratory disease, all 4-5 weeks of age. The piglets were kept in a single herd, formed by animals acquired from five different origins. For analysis of the nasal virome, total nucleic acid was extracted from nasal swabs samples and randomly amplified with REPLI-g WTA Single Cell Kit and phi29 DNA Polymerase kit. For the bacteriome, the hypervariable V4 region of the 16S rRNA gene was amplified by PCR. Sequencing was performed in a Miseq Illumina TM Desktop Sequencer. Regarding the virome, genome of members of 9 distinct families of mammalian viruses were identified in the nasal samples of disease-affected piglets were, in order of abundance of nucleic acid sequence, *Herpesviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Reoviridae*, *Smacoviridae*, *Picobirnaviridae*, *Parvoviridae*, *Polyomaviridae* and *Coronaviridae*. In the healthy piglets only 5 families were identified in nasal samples were *Herpesviridae*, *Smacoviridae*, *Parvoviridae*, *Polyomaviridae* and *Picobirnaviridae*. The nasal microbiota of healthy and respiratory disease-affected piglets showed distinct differences in components. In the phylum level in healthy piglets was a predominance of *Firmicutes* and in the diseased piglets, the most abundant phylum was *Proteobacteria*. In conclusion, the composition of the nasal microbioma of piglets showed that, in the piglets affected by respiratory disease, a high variability was present in both viral and bacterial analyzes, which were significantly altered in these piglets.

Keywords: metagenomics, virome, bacteriome, URT, nursery piglets.

1. INTRODUCTION

The microbiome provides the first line of defense against pathogens due to the interaction between bacteria, which can protect a host from colonization by pathogenic microorganisms (SLIFIERZ, FRIENDSHIP & WEESE, 2015). In piglets, the nasal mucosa is an important site of entry for microorganisms, which, in healthy hosts, is expected to be colonized by non-pathogenic bacteria and viruses (LOWE et al., 2012; SLIFIERZ, FRIENDSHIP & WEESE, 2015; LUNG et al., 2015).

The relationship between the host and its microbiota is the result of millions of years of co-evolution; as such, a relationship is expected to be mutually beneficial (PALM, ZOETE & FLAVELL, 2015). However, recent studies in pigs have shown that some commensal agents of the microbiota may exert great effects on host immunity, altering susceptibility to disease. Such as *Streptococcus* genus, which remains asymptomatic in the upper respiratory tract, can escape from the host's immune system and cause disease (HAAS & GRENIER, 2017).

After birth, piglets are abruptly exposed to the environmental microbiota. Colonization of microorganisms in piglets begins during exposure since the gestational period, pass to the vaginal mucosa and fecal microbiota of the sow at the time of birth (NIEDERWERDER, 2017). The next, most likely source of contact of piglets with microorganisms will be suckling, where the newborns will have access to colostrum and to the microbiota in the sow's skin. Such exposures will determine the diversity of the microbiome that will be maintained during the first weeks of the piglet's life (JANSMAN et al., 2012).

In currently adopted industrial pig farming systems, respiratory diseases in piglets are a major cause of economic losses. They affect animals at the growth and finishing phases, often 14 to 22 weeks old piglets (WEISSENBACHER-LANG et al., 2016). The animals may display signs of disease such as pyrexia, anorexia, fever, cough, and dyspnea, besides poor growth and food conversion rates (HANSEN et al., 2010; OPRIESSNIG et al., 2011). Stress, diet, environment, management practices and use of antimicrobial compounds also causes instability and result in short and long term impacts on the animal's microbiome (SCHOKKER et al., 2014; PALM, ZOETE, FLAVELL, 2015; SLIFIERZ, FRIENDSHIP & WEESE, 2015).

The aim of this study is to identify the viral and bacterial populations present in the upper respiratory tract (URT) of apparently healthy weaned piglets through metagenomic analyzes. The microbiome was compared to that of piglets at the same age and management conditions but displaying signs of respiratory disease.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Ethics statement

In this study, all the experiments were performed according to the permit guidelines established by the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. The experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS), Brazil and the animal certification number was nº 33558/2018.

2.2 Animals and samples

Samples were collected in 2017 from a commercial farm in the Rio Grande do Sul State, Brazil. Sixty nursery piglets at 4-5 weeks of age were divided into 2 groups: Group 1 (30 piglets) exhibited clinical signs of acute respiratory, like cough, sneeze, depression and labored breathing; and Group 2 (30 piglets) was the control sample with clinically healthy piglets. Both groups were randomly selected for sampling after cough and sneeze counting by mechanical agitation. There was no difference between the body temperatures of both groups, with an average of 39 °C. For sample collection, the piglets were contained and nasal swabs and laryngeal swabs were taken and placed into 400 ul of RNALater® (ThermoFisher Scientific). These two types of samples characterized the upper respiratory tract (URT). Until further processing, the samples were stored at -80°C.

2.3 Sample preparation and viral nucleic acid extraction

Prior to the extraction, the URT samples were homogenized in a Precellys® 24 (Bertin Technologies S.A.S, Versailles, France) and three pooled samples of each group (Group 1 and Group 2) and sample (nasal and laryngeal swabs) were assembled using 700 µL of each swab samples. The pooled

samples were filtered through a 0.45- μ m filter (Millipore). The ultracentrifugation process was performed with 25% sucrose mattress and centrifuged at 150.000 x g for 2 hours at 4°C (Sorvall AH-629 rotor). The resulting pellets were resuspended in ultrapure water and treated with 40 μ l of digestion buffer (Life Technologies/Ambion), 2,5 μ l Turbo DNase (Life Technologies/Ambion) and 5 μ l of RNase (Thermo Scientific/Fermentas) at 37°C for 2 hours to digest susceptible nucleic acids. Viral DNA was extracted using the standard phenol-chloroform protocol and viral RNA was extracted using the trizol-chloroform protocol. The reverse-transcribed and random amplification of nucleic acids from RNA extraction were performed with the REPLI-g WTA Single Cell Kit (Qiagen). Random amplification of DNA extraction was performed with the ϕ 29 DNA Polymerase® kit (Thermo Fisher Scientific), both according to the manufacturer's instructions.

2.3.1 Viral sample purification, library preparation, and sequencing

Sample purification was performed after enrichment with the Ampure XP Beads® kit (Beckman Coulter). DNA purity and quality were estimated using the L-Quant spectrophotometer (Loccus Biotechnology) and Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen), respectively. The final concentration was adjusted to 0.2 ng/ μ L in 20 μ L of DNA. Afterward, DNA fragment libraries were prepared with 50 ng of the purified viral derived, enriched nucleic acids, using a Nextera DNA sample preparation kit (Illumina). Sequencing was performed in an Illumina®MiSeq instrument using the Illumina v2 reagent kit (2 \times 150 paired-end reads).

2.3.2 Viral metagenomic data assembly and phylogenetic analysis

The Illumina-generated raw sequence reads were submitted to quality analysis using the FastQC software. After the low-quality sequencing with Phred>33 was trimmed using Trimmomatic software version 0.36 (BOLGER et al., 2014) also to remove the adaptor-related reads and a 36 bp minimum length was selected. The paired-end sequences reads were *de novo* assembled in contigs using the SPAdes Genome Assembler Program version 3.11.1 (metaSPAdes command; BANKEVICH et al., 2012). Next, the contigs were submitted to the search for homology with the genomes available in the database nr and viruses taxonomic filter through Blast2GO software. Sequences matching

with segments of the host genome were excluded. The genome analysis was performed with the search for eukaryotic viruses with nucleotide (Blastn) and protein (Blastx) tools available on the NCBI portal (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequences with the best BLAST scores (E values $\leq 10^{-3}$) were selected and assigned to known viral families. Contigs >300 bp were confirmed by mapping reads and selected to perform ORF predictions and genome annotations using the Geneious software (version 9.1.8). The assembled viral nucleotide sequences and open reading frame-translated peptides were aligned against the nonredundant database with BLASTN and BLASTP algorithms to calculate their percentage identities. Sequences representative of the families found in this study were obtained from GenBank and then alignment, pairwise identity values, and phylogenetic analyses were carried out using MEGA 7 software (<https://www.megasoftware.net/>) with both MUSCLE and CLUSTAL. These were used to generate maximum-likelihood phylogenetic trees using PHYML (Guindon et al., 2010) with best fit substitution models determined by Smart Model Selection (Lefort et al., 2017). Statistical significance analyses of tree topologies were performed with the approximate likelihood branch support test (aLRT) (Guindon and Gascuel, 2003).

2.4 Bacterial DNA nucleic acid extraction, PCR, purification, and quantification

Microbial DNA was extracted using the Magmax Pathogen DNA / RNA kit (Life Technologies, Inc.) purification kit according to the manufacturer's instructions. The V4 region of the bacterial 16S gene was amplified by PCR (94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 sec, 55 °C for 30 sec, and 68 °C for 45 sec and a final extension at 68 °C for 5 min) using 16S 5' - barcode primers (TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCC GCG GTA A) - 3' and 16S 3' - (GTC TCG TGG GCT CGG AGT TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT) - 5', where the barcode is a sequence of twenty unique bases for each sample (Kozich et al., 2013). PCR reactions were performed in triplicate, in which 25 μ L of the mixture contained 5 μ L of HS Buffer, 0.5 μ L of dNTPs, 0.5 μ L of forward primer, 0.5 μ L of primer reverse, 0.1 μ L of Phusion Polymerase, and 2.5 μ L of 5 ng/ μ L) of the DNA sample. The PCR products were purified by 1% agarose gel. The amplification

products were purified with Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter/Life Sciences). DNA purity and yield were estimated using the L-Quant spectrophotometer (Loccus Biotechnology) and Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen), respectively. The final concentration was adjusted to 2.5 ng/μL. Afterward, DNA libraries were made with the Nextera® kit. Sequencing was performed through the Miseq™ Desktop Sequencer (Illumina) platform.

2.4.1 16S rRNA reads processing for downstream analyses

The sequence data exported from the MiSeq System was processed using a custom pipeline in Mothur v.1.41.1 (Schloss et al. 2009). Initially, sequences were depleted of barcodes and primers (where no mismatch was allowed) and then a quality filter was applied to eliminate low quality reads. Quality control was conducted by trimming the low-quality reads, those with incorrect length, those containing an ambiguous base, or containing homopolymers longer than 8 bp. All potentially chimeric sequences were identified and removed using VSEARCH (Rognes et al., 2016).

After these initial quality filtering and trimming steps, the remaining sequences were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) based on a 99% identity level and were classified against the SILVA v132 reference database at 97% similarity (Quast et al., 2013). Sequences that could not be classified (i.e., “unknown” sequences), as well as sequences identified as eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts, were removed prior to further analysis. Subsequent analyses of the sequence dataset were performed in R v. 3.4.1 or QIIME v. 1.9.0.

2.4.2 Microbial community and statistical analysis

QIIME version 1.9.0 was used to estimate alpha and beta diversity (Caporaso et al., 2010). OTU abundances were used to calculate the alpha diversity metrics, including OTU richness, Chao1 richness estimation, Shannon diversity index, and Simpson diversity index. For overall comparison of significant differences among bacterial communities (i.e. beta diversity), principal coordinates analysis (PCoA) was performed. A matrix using phylogenetic (weighted and unweighted Unifrac) and non-phylogenetic (Bray–Curtis dissimilarity) metrics was calculated for each pair of samples. The distances were

turned into points in space with the number of dimensions one less than the number of samples. To achieve statistical confidence for the sample grouping observed by PCoA, a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was performed on the distance matrix. To compare additional differences among the microbial communities, clustering methods based on Bray–Curtis dissimilarity were performed. The results of hierarchical clustering were visualized using heatmaps and dendrograms.

To detect potential taxa biomarkers, the linear discriminant effect size (LEfSe) method was performed (Segata et al., 2011). The algorithm performs a nonparametric factorial Kruskal-Wallis sumrank test and LDA to determine statistically significant different features among taxa and estimates the effect size of the difference. Differences were considered significant for a logarithmic LDA score threshold of ± 1.0 and a p-value < 0.05 after adjusting for multiple hypotheses testing with the Benjamini–Hochberg method.

2.4.3 Metagenome prediction

Predictive functional gene profiling was based on 16S rRNA gene sequencing data using Piphillin (Iwai et al., 2016) with an updated KEGG database (May 2017) and a confidence cutoff value of 97. Piphillin uses direct nearest-neighbor matching between 16S rRNA amplicons and genomes to predict the represented genomes. Beta diversity of KEGG orthology (KO) abundances was calculated using the Bray–Curtis metric. A comparison of functional profiles of each population was performed using PERMANOVA. Differentially abundant features were determined using linear discriminant analysis (LDA) effect size (LefSe). Benjamini–Hochberg adjusted p-value was calculated to control the false discovery rate (FDR) in multiple testing. The KEGG groups were considered significantly enriched by satisfying an FDR corrected p-value of 0.05.

3. RESULTS

3.1 Overview of Sequencing Data

Upper respiratory tract (UTR) samples from respiratory disease-affected piglets (n=60; Group 1) and healthy piglets (n=60; Group 2) were collected on a

high-density farm and pooled according to a clinical condition, resulting in 12 pools.

Viral deep sequencing was made and 1.827.594 paired-end reads were generated from Illumina MiSeq sequencing. The 41.513 *de novo*-assembled sequence contigs, with a minimum length of 250 nucleotides, were created using the reads and classified on the basis of best BLASTx E-scores. Of the 4.068 sequence contigs that matched the known sequences in GenBank, 3.381 had significant similarity to sequences of known viruses in GenBank. The most abundant fractions of viral sequences were homologous to mammalian viruses and the remainder of the viral sequence contigs were homologous to bacteriophages and plant viruses.

Although blastn and blastx analysis showed that a majority of the sequences were non-viral, with the percentage of eukaryotic virus reads detected in the healthy piglets 4.3% and. In the group of animals with respiratory clinical signs, 21.7% was from eukaryotic virus reads (Table 1).

Table 1: Number of sequencing *reads* and the number of *reads* after trimming per pool of sample.

<i>Pool no.</i>	Nº of reads	Nº of the reads after trimming (%)	Nº of viral reads (%)
Pool 1 Nasal WoCS*	108452	92249 (85.06%)	2035 (2.20%)
Pool 2 Nasal WoCS	157798	138469 (87.75%)	2067 (1.49%)
Pool 3 Nasal WoCS	84580	70596 (83.47%)	17910 (25.37%)
Pool 1 Nasal WCS*	106703	92033 (86.25%)	45516 (49.46%)
Pool 2 Nasal WCS	183976	158021 (85.89%)	27591 (17.46%)
Pool 3 Nasal WCS	95719	83700 (87.44%)	20932 (25.00%)
Pool 1 Larynx WoCS	435218	389311 (89.45%)	19203 (20.00%)
Pool 2 Larynx WoCS	126611	102502 (80.96%)	12 (0.01%)
Pool 3 Larynx WoCS	120314	97460 (81.00%)	222 (0.22%)
Pool 1 Larynx WCS	95512	77213 (80.84%)	106 (0.14%)
Pool 2 Larynx WCS	120739	103767 (85.94%)	7647 (7.37%)
Pool 3 Larynx WCS	191972	149905 (78.09%)	102 (0.07%)

*WoCS: without clinical signs / *WCS: with clinical signs

In the same way, the 16S analysis generated a total of 692.741 sequences that passed the quality control measures. The reads were joined and the erroneous or poor quality reads ($Q < 25$) were eliminated. The Operational Taxonomic Units (OTU) were identified in all samples by clustering sequences at 98% sequence homology. Among the phylum found in the URT cavity, there was no difference between the OTUs of animals WoCS and WCS, there was a difference in the abundance of OTUs.

3.2 Virome of the upper respiratory tract (URT) of healthy and respiratory-affected piglets

The viral metagenomic analyses in the UTR of weaned piglets revealed a variety of viruses, most of them unrelated to respiratory problems. The most represented viruses in order of the number of reads were classified into nine different virus families infecting mammals: *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Smacoviridae*, *Coronaviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae*, *Picobirnaviridae*, *Polyomaviridae*, and *Reoviridae*. The analyses demonstrated that the relative abundance of reads varied between respiratory sample pools.

At 33 days of age, the most frequent viral genomes detected in nasal swab pools of healthy piglets are representative of members of nine families: *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae*, *Picobirnaviridae*, *Polyomaviridae*, and *Reoviridae*. Figure 1 summarizes the viral species identified.

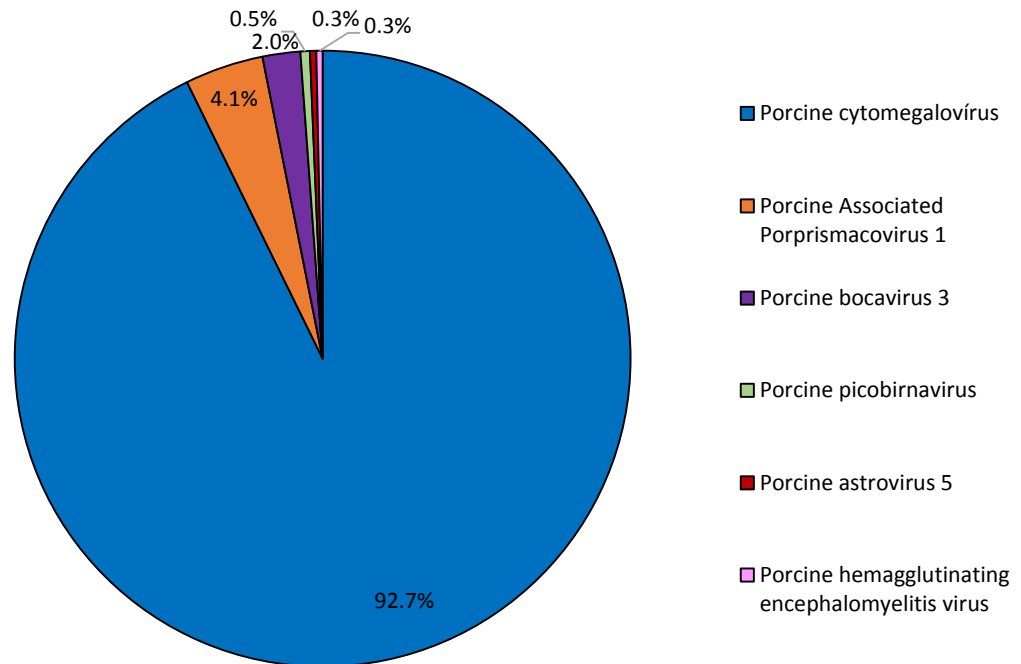


Fig 1. Relative abundance of virus families in the analyzed URT virome healthy piglets. The diagrams show the number of reads with sequence identities to a certain virus species in relation to all virus reads. The sequences were defined by closest homolog, split into an overview of samples of the group without clinical signs. Percentages of most abundant eukaryotic viral sequence reads classified by viral species. Different colors were used for different virus species (see legend).

The most highly represented respiratory viruses in diseased group were porcine cytomegalovirus (PCMV), porcine astrovirus (PAsV), porcine sapovirus (PSaV), porcine associated porprismacovirus 1 (PoSM-1), porcine bocavirus (PBoV), porcine torovirus (PToV), porcine rotavirus A (RVA), porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV), porcine polyomavirus (PPyV) and porcine picobirnavirus (PPBV) (Figure 2).

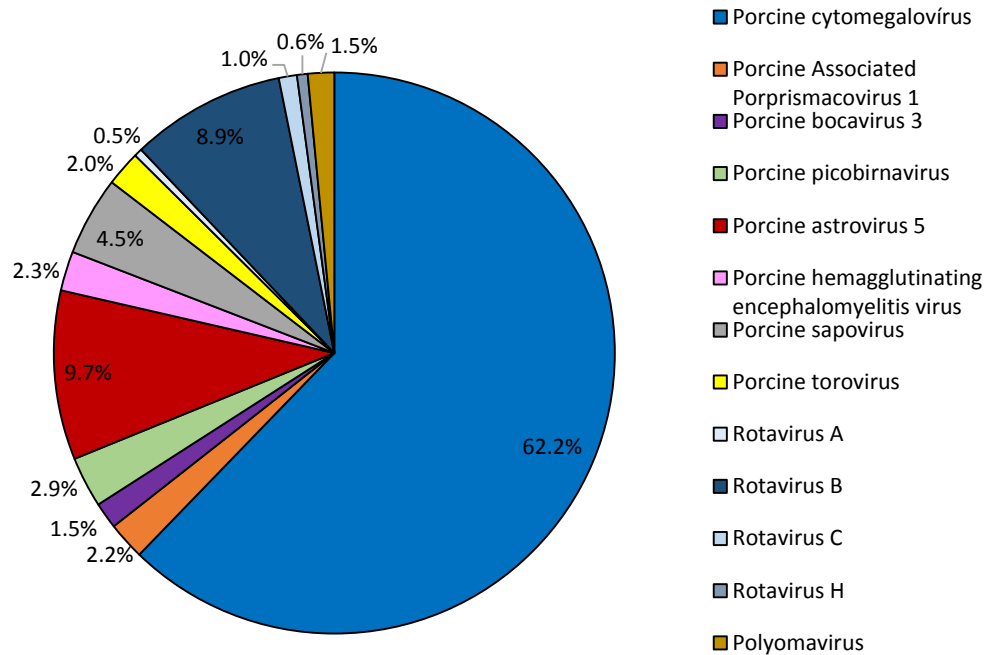


Fig 2. Relative abundance of virus families in the analyzed URT virome of disease-affected piglets. The diagrams show the number of reads with sequence identities to a certain virus species in relation to all virus reads. The sequences were defined by closest homolog, split into an overview of samples of the group with clinical signs. Percentages of most abundant eukaryotic viral sequence reads classified by viral species. Different colors were used for different virus species (see legend).

3.2.1 Comparison of common virus families

The three common virus families found in these samples was *Herpesviridae*, *Smacoviridae*, and *Picobirnaviridae*. The most abundant virus family in both groups was *Herpesviridae*, which accounted for 92.7% of reads in the healthy group and 62.2% in the diseased group. The sequences from this family belong to PCMV and, despite the high prevalence PCMV in swine worldwide, associations between PCMV and the viruses of the porcine respiratory disease complex have not been investigated thus far.

The sequences classified in *Smacoviridae* family in diseased and healthy groups were identified, on a nucleotide level, as porcine stool associated circular virus, fur seal feces associated circular DNA virus, porcine associated porprismacovirus and porcine stool-associated circular virus 2 and porcine stool-associated circular virus 7.

The previous results show a high diversity of viral co-infection in diseased respiratory-affected piglets (Figure 3).

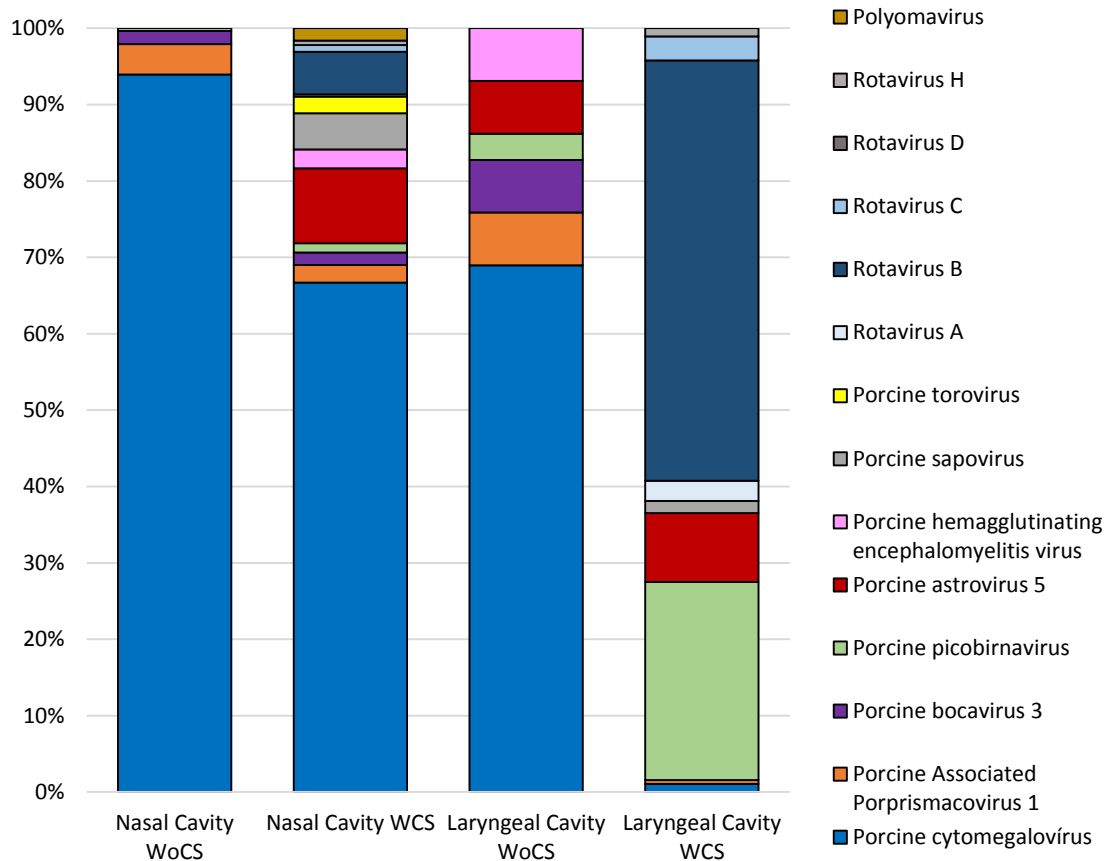


Figure 3. UTR virome of piglets from groups without clinical signs (WoCS) and with clinical signs (WCS). The abundance of viral reads found in the *pools* of URT swabs of 4–5 weeks-old piglets was presented. Analyzed samples were grouped based on health status (WoCS and WCS).

3.3 16S Bacterial Sequencing

Globally, the phylum found in all samples of nursery pigs was *Firmicutes* represented a mean of 43%, *Proteobacteria* 42%, *Bacteroidetes* 9%, and *Actinobacteria* 4%. The other phylum, like *Tenericutes*, *Fusobacteria*, *Euryarchaeota*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, among others, did not represent more than 1% of the abundance (Figure 4).

Each phylum was represented by several families and showing a great diversity. The phylum *Firmicutes* was represented for *Streptococcaceae* being the most abundant, with a mean relative abundance of 24%, followed by *Lactobacillaceae* (6%), *Lachnospiraceae* (5%) and *Ruminococcaceae* (3%). Within *Proteobacteria* phylum, the *Moraxellaceae* and *Pasteurellaceae* family was the most abundant, representing 21% and 18 % of all the families found, respectively (Figure 5). The phylum *Bacteroidetes* was present in all samples and

was represented for *Weeksellaceae* (4%). The phylum *Actinobacteria* was represented by the family *Micrococcaceae* (3%).

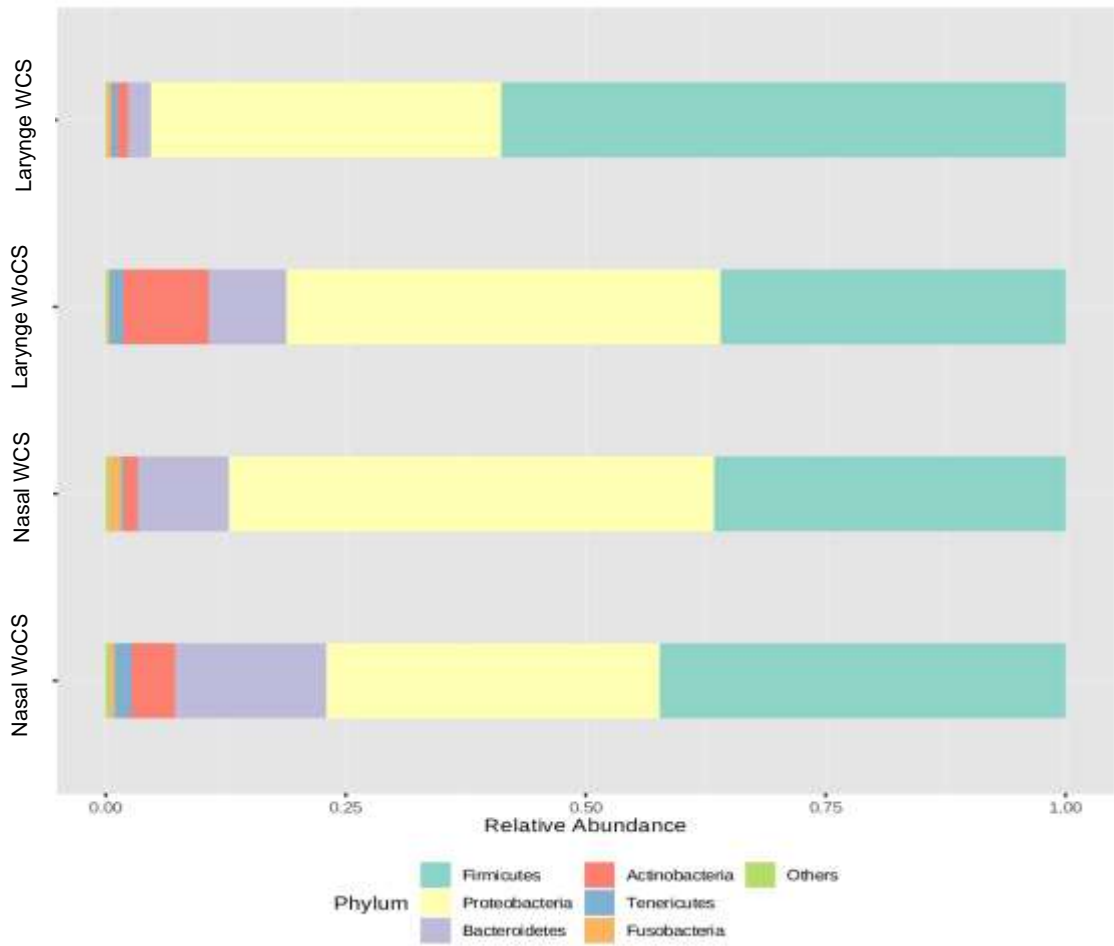


Figure 4: Relative distribution of the most abundant phylum identified in the URT. The taxonomic classification of the sequence reads at the phylum level. The *pool* of samples was analyzed and grouped based on the health status (WoCS and WCS) and sample (nasal or laryngeal swab). The mean relative abundance of OTUs found in UTR swabs of 33 days old piglets is presented.

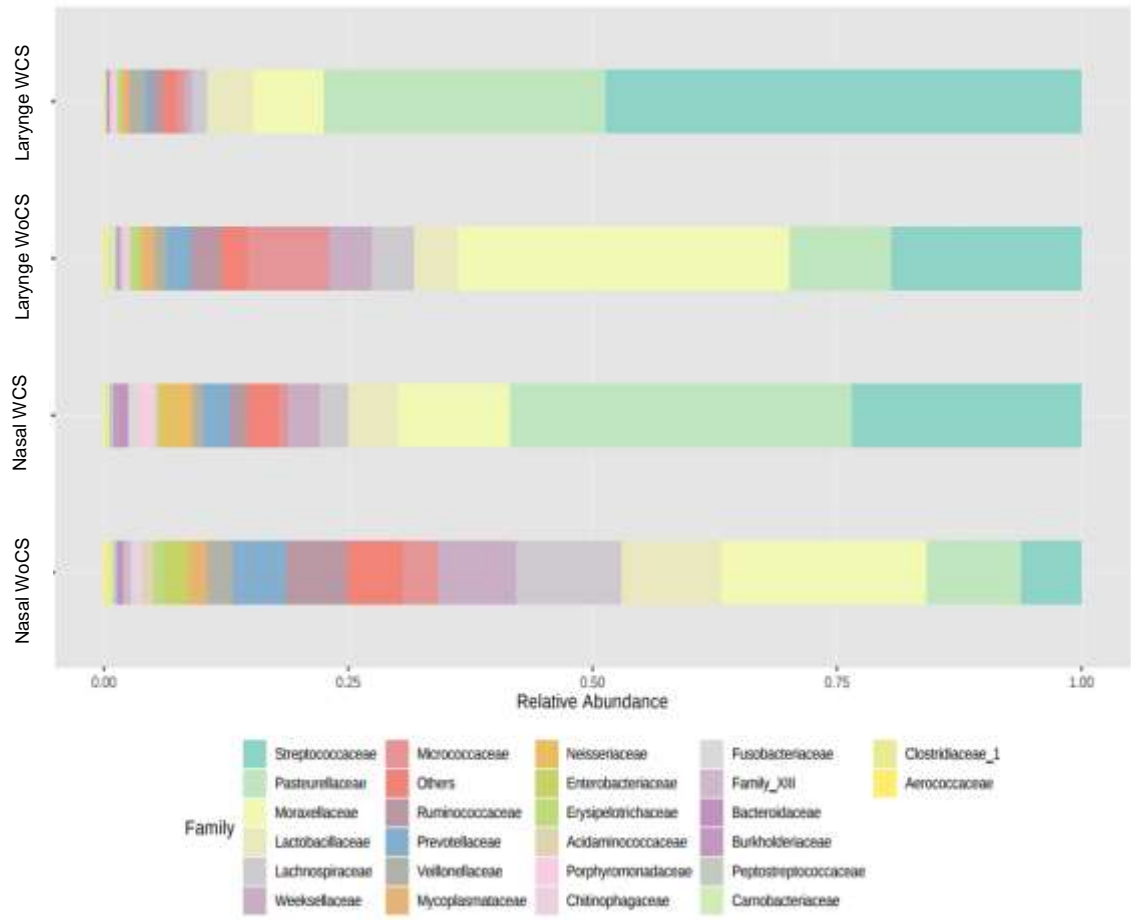


Figure 5: Relative distribution of the most abundant family identified in the URT cavity. The taxonomic classification of the sequence reads at the family level. The *pool* of samples was analyzed and grouped based on the health status (WoCS and WCS) and sample (nasal or laryngeal swab). The mean relative abundance of OTUs found in URT swabs of 33 years old piglets is presented.

Beta (β) and alpha (α) diversity (Figure 6 and 8) involves differences in species composition and their abundance between fragments. The β diversity between the WoCS and WCS groups showed the composition of species varied from one group to another (Figure 7).

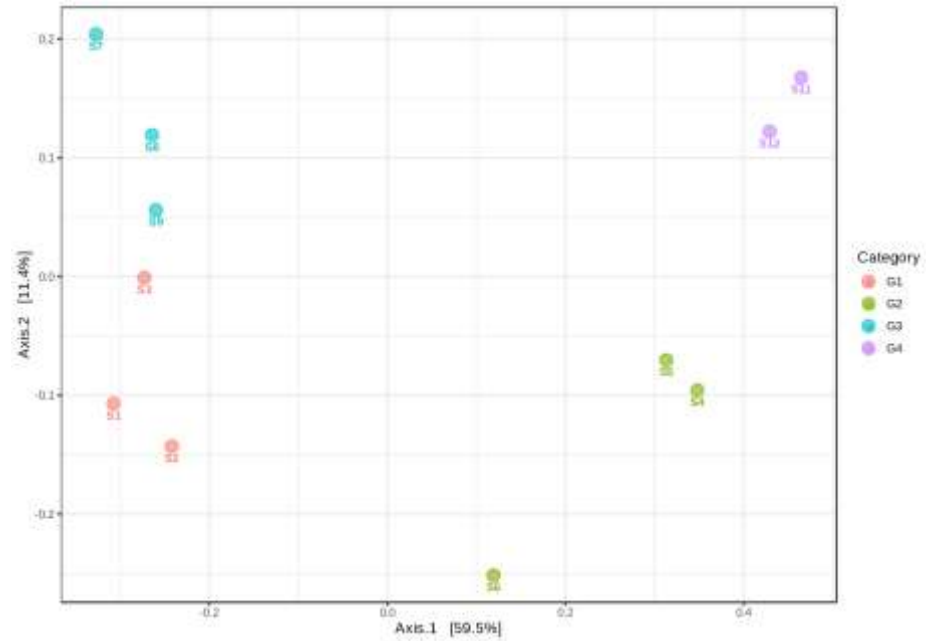


Figure 6. Principal Component Plots (jackknifed) representing beta diversity on rarefied samples. Beta diversity of URT samples of piglets was computed through unweighted UniFrac analysis for each of the following groups: healthy piglets (G1 and G3); and piglets with respiratory disease (G2 and G4).

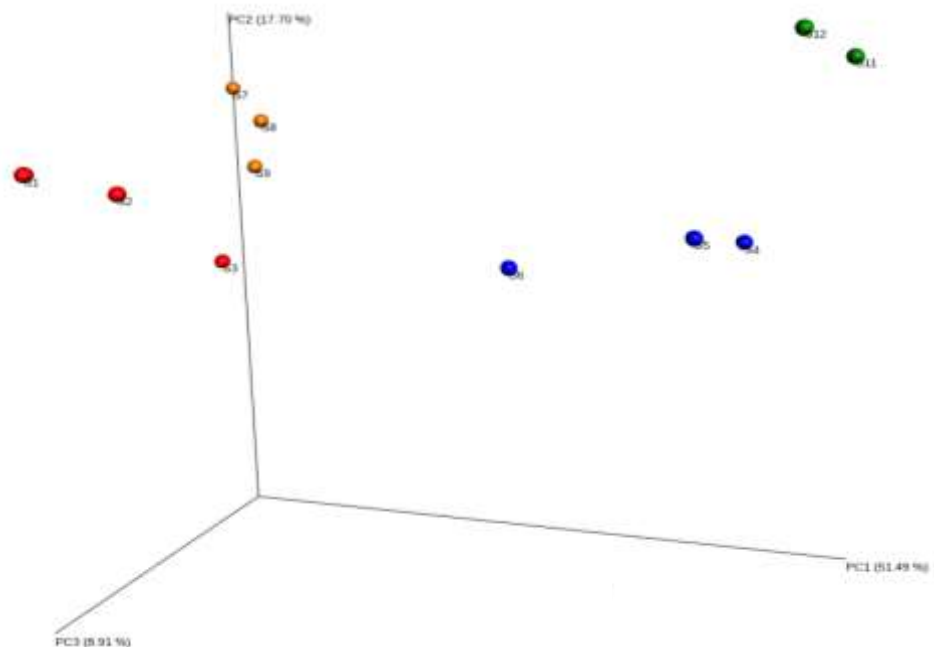


Figure 7. Principal coordinate analysis (PCoA) characterizing the microbiota composition of healthy (S1, S2, S3, S7, S8, and S9) and diseased affected piglets (S4, S5, S6, S10, S11, and S12). Sørensen–Dice index. The clusters were generated using a subset of 963228 sequences.

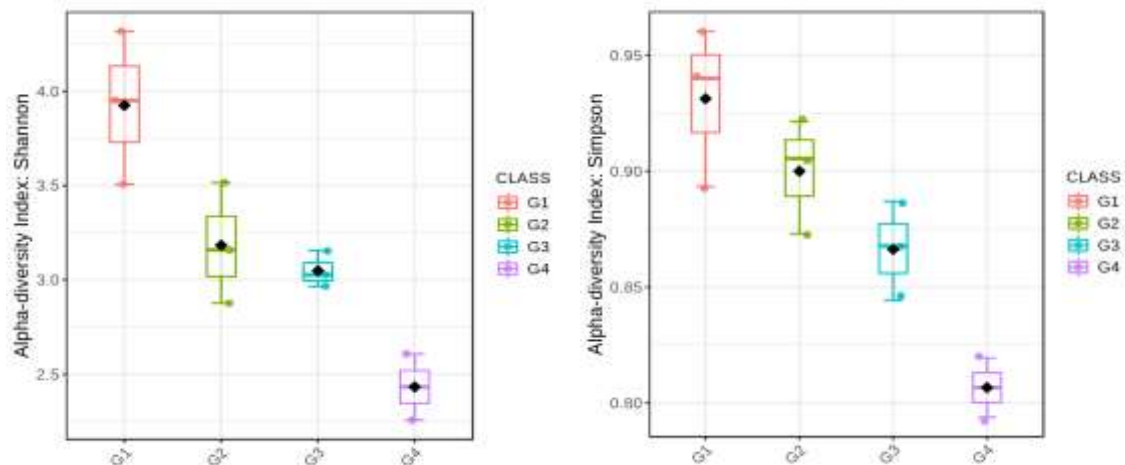


Figure 8. Alpha diversity in rarefied samples analyzed by health status. Species richness of URT samples from healthy piglets (G1 and G3) and piglets affected by respiratory disease (G2 and G4); continuous lines represent standard deviation (a) Shannon; (b) Simpson.

3.3.1 The bacterial population between healthy piglets and respiratory disease affected

The structure of the URT bacterial community of healthy and diseased piglets differed from each other. There was a decrease in the relative proportion of dominant bacterial genera in diseased piglets, indicated by the lower diversity in the sample pools. In the healthy piglets, there was greater regularity in the microbiota (DOU et al., 2017).

Sequence analysis of the URT microbiota of healthy piglets revealed that the most abundant OTUs at the phylum level were *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Bacteroidetes*, with a dominance of the phylum *Firmicutes*. The abundance of the families *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* it was higher than diseased affected piglets. Whereas the families *Moraxellaceae*, *Streptococcaceae*, *Pasteurellaceae*, and *Prevotellaceae* were lower in WoCS piglets compared to WCS pigs. At the genus level, there was an abundance of genus *Lactobacillus* and *Blautia*. This population is of particular interest due to the supposed benefits to function and intestinal health (ANGELIS et al., 2006). *Lactobacillus* sp., a lactic acid bacterium, plays a significant role in the modulation of the systemic immune response following a respiratory infection (NIEDERWERDER, 2017).

In the analysis of URT sequences of the WCS piglets, the most abundant OTUs at the phylum level were *Proteobacteria* and *Firmicutes*. There was a significant increase in families *Moraxellaceae* and *Streptococcaceae*, represented by the genera *Moraxella* and *Streptococcus*, respectively. The natural habitat of *Streptococcus* is the upper respiratory tract (SANTOS et al., 2012; HAAS et al., 2017; SEGURA et al., 2016) and remains low in the natural microbiota of the swine and, in presence of low immunity, the *Streptococcus* replicates in high rates, being able to cause disease (CORREA-FIZ, FRAILE & ARAGON, 2016; DUTKIEWICZ et al., 2018).

4. DISCUSSION

The aim of this study was to research the microbiome of the upper respiratory tract (URT) of healthy weaned piglets. In parallel, the virome of piglets affected by respiratory problems was performed, raised under the same conditions, and the differences between the microbiome of piglets with respiratory and health problems were analyzed. For our knowledge, this is the first report to describe both communities in healthy weaned piglets and respiratory diseased-affected piglets.

Few studies related to swine respiratory viral microbiota are reported in the literature (BLOMSTRÖM et al., 2018; HAUSE et al., 2016; QIN et al, 2018). The available studies consist of the characterization of bacteria and viruses present in the gastroenteric tract, with few studies showing the bacterial microbiota in the swine respiratory tract (SLIFIERZ, FRIENDSHIP, WEESE 2015; CORREA-FIZ, FRAILE, ARAGON, 2016; NIEDERWERDER, 2017). In the literature, there are some studies showing the virome and the bacteriome simultaneously, the majority demonstrated in humans (LYSHOLM et al., 2012; ROMERO-ESPINOZA et al., 2018). In this study, the virome and bacteriome of healthy piglets were analyzed and then compared with piglets affected by respiratory disease.

4.1 The virome of the upper respiratory tract (URT) of healthy and diseased-affected piglets by respiratory diseases

At birth, the piglets are introduced to several microorganisms, many of which established as part of microbiota, and in some cases remaining throughout the animal's life (JANSMAN et al., 2012). Colostrum consumption will provide the

newborn piglet the passive protection necessary for survival until they are able to develop their own immune response (HEIM et al., 2015; LAVALLEE et al., 2016). However, some factors can result in impacts on the stability of the microbiota and affect the susceptibility to diseases. The first contact with the environment after birth, the decrease in the maternal immunity of the piglets after weaning, the pressure of infection caused by the mixture of piglet lots and potential stressors such as changes in feeding, and administration of antimicrobials may be involved in piglet susceptibility to disease (FABLET et al., 2011; SLIFIERZ, FRIENDSHIP & WEESE, 2015). The presence of enteric viral genomes in the URT demonstrated a destabilization of piglets microbiota, probably due to the stress caused by weaning, influencing the entry and multiplication of the identified enteric microorganisms.

URT is the habitat to several microorganisms and also the first entrance for pathogens. The combination of these pathogens can result in respiratory diseases in pigs, whether viral and/or bacterial (CHAE, 2016). Studies demonstrate the presence of co-infections in healthy pigs and in those affected by different disease complexes (AMINO et al., 2016; BLOMSTRÖM et al., 2016; CORREA-FIZ, FRAILE & ARAGON, 2016; BLOMSTRÖM et al., 2018; CHEN et al., 2018). Our studies corroborate these data, due to the evident co-infections detected in piglets at 33 days of age, with the identification of respiratory and enteric virus genomes.

4.1.1 The composition of the viral microbiome in the URT of piglets at 33 days of age

In the URT cavity of piglets at 33 days of age, PCMV genomes were the most abundant, mainly in healthy piglets, representing 92.7% of the identified viral sequences. In diseased piglets, PCMV genomes were represented by 62.2% of viral sequences. PCMV, as all members of the *Herpesviridae* family, has a double-stranded DNA genome and known to cause latent infections. The latent virus can eventually be reactivated in situations of stress or other immunosuppressive conditions (SEKIGUCHI et al., 2012; MOROZOV et al., 2016; KAVANOVA et al., 2018).

PCMV is ubiquitous in pigs worldwide, being stable and easily transmitted through respiratory secretions, the placenta, milk, urine, and feces. Although the

virus has been identified in clinical cases, it is not considered a pathogen of importance in weaned piglets (CIBULSKI et al., 2015; BASSO et al., 2017; MOROZOV et al., 2017; FIEBIG et al., 2018; LIU et al., 2018). Due to the ability to reactivate from latency, the identification of PCMV genomes in piglets at 33 days of age may result from the stress that occurred at the time of weaning and the period of acclimatization of these animals to the new environment. However, studies are needed evaluating the presence of PCMV from the placenta until the pre-weaning period, to assess whether the primary infection occurred during the maternity period. If the primary infection has occurred after weaning, the greater identification of PCMV sequences in sick piglets may result in viremia and with high viral excretion.

PCMV has occasionally associated inclusion body rhinitis in piglets, reproductive disorders in pregnant females and is included as a pathogen in the porcine respiratory disease complex (PRDC) (LIU et al., 2012; KAVANOVÁ et al., 2015). Similar to the human cytomegalovirus, PCMV can cross the placental barrier, resulting in mummifications, abortions, piglets with low viability and mortality after weaning. PCMV infection is usually subclinical and self-limiting in older pigs. (DUTRA et al., 2015; KAVANOVÁ et al., 2015; PLOTZKI et al., 2016).

As mentioned, genomes of various enteric viruses have been identified in diseased piglets, including porcine astrovirus type 5 (PAsV-5), porcine sapovirus (PSaV), porcine torovirus (PToV) and rotavirus A, B, C, and H (RVA, RVB, RVC, and RVH). Being a natural behavior of the animal, pigs use the snout to communicate, recognize the environment and maintain dominance relationships (CAMERLINK et al., 2013). This practice favors the transient presence of microorganisms that do not usually colonize the URT (CORREA-FIZ, FRAILE & ARAGON, 2016). However, the individual presence of any virus or bacteria does not determine a direct cause of the clinical disease and does not reflect viral multiplication in the host.

The constant re-exposure can influence the permanence of these viruses in the UTR region. The presence of primary pathogens, such as PAsV-5 and the various RVs, in addition to bacterial agents, can induce serious lesions in the respiratory tissues, favoring the entry of enteric viruses in the URT cavity and these are acting as secondary agents of respiratory pathogens (OPRIESSNIG, GIMÉNEZ-LIROLA & HALBUR, 2011). In the present study, enteric viruses were

identified only in sick animals. Probably these animals were already depleted and a possible lesion in the oronasal mucosa facilitated the entry of enteric viruses in the oronasal cavity.

In healthy and diseased piglets, genomes of porcine bocavirus type 3 (PBoV-3), a member of the *Parvoviridae* family, were identified. These genomes were identified in a higher abundance of sequences in piglets with clinical signs. PBoV-3 was associated with severe respiratory disease (ZHANG et al., 2015; ZHENG et al., 2016) and the most frequent findings in animal samples with respiratory signs suggest the involvement of PBoV-3 in these conditions. However, the importance of PBoV-3 in the induction of respiratory diseases in weaned piglets need more investigations (ZHAI et al., 2010; JIANG et al., 2014).

Recently, the use of sequencing and metagenomics techniques have revealed an unprecedented diversity of viruses whose genome is single circular stranded DNA (ssDNA) (ROSARIO et al., 2012; CUI et al., 2017). These genomes demonstrate a challenge for taxonomic classification and an opportunity to analyze some hypotheses about the evolutionary history of these viruses (BIAGINI et al., 2012; ROSARIO et al., 2012). The ssDNA genomes encode a replication initiator protein (Rep) and a capsid protein (Cap) and contain a DNA stem-loop structure required for the initiation of DNA replication. They are present in the virome of many ecosystems and are known to infect a wide range of organisms, including vertebrates, plants, crustaceans, and fungi (NG et al., 2016). ssDNA has a small (1.8 to 3 kb) non-enveloped genome (STEEL et al., 2016). Although the ssDNA genome has been detected in piglet respiratory samples, the relationship between this virus and clinical disease cannot be established without further studies.

4.2 The URT bacterial community of healthy and respiratory disease-affected piglets

The importance of the microbiota in the development of piglets is significant for the stimulation and regulation of an effective immune system (HUFFNAGLE & DICKSON, 2016). The URT microbiota of weaned piglets from this study exhibited rich and diverse bacterial communities. The alpha diversity analyzed in this study was higher in healthy piglets, when compared to animals affected by respiratory disease. After birth, piglets are exposed to thousands of

bacterial species that play an important initial role in establishing a stable microbiota, becoming more evident between 2 and 3 weeks after weaning (SLIFIERZ, FRIENDSHIP & WEESE, 2015). However, the instability of the microbiota in the early stages of the piglet's life can result in a greater susceptibility to imbalances, which can create predispositions for diseases (PALM, ZOETE & FLAVELL, 2015). The analysis of the 16S rRNA gene provided in this study showed the presence of a diverse community present in the URT. The methodology used produced the visualization of results at the family level, on which the discussion directions be based.

4.2.1 The nasal bacterial community of healthy and respiratory disease-affected piglets

The structure of the nasal bacterial community of healthy and disease-affected piglets diverged from each other. There was a decrease in the relative proportion of dominant bacterial families in disease-affected piglets, shown by the lower diversity in the sample pools. In healthy piglets, there was greater uniformity in the microbiota. Our results are similar to other studies of nasal microbiota available in the literature (LOWE et al., 2012; SLIFIERZ, FRIENDSHIP, WEESE 2015; CORREA-FIZ, FRAILE, ARAGON, 2016; NIEDERWERDER, 2017).

In the sequences analysis of the URT region of the diseased-affected piglets, the most abundant OTUs at the phylum level were *Proteobacteria* and *Firmicutes*. There was a significant increase in families *Streptococcaceae* and *Pasteurellaceae*. The relevant findings of the present study include the fact that the *Streptococcaceae* family was more abundant in piglets affected by respiratory disease, and an increase in *Pasteurellaceae* was also observed. One of the hypotheses that can be constructed was that the higher abundance of these pathogens could confer a greater risk of developing a respiratory disease; however, further studies need to be done.

The *Moraxellaceae* family was found more prominent in healthy piglets. This family rarely causes bacteremia and is usually an opportunistic genus (SCHAAR et al., 2011). It is of particular interest due to its high abundance of pigs throughout their lives (PETTIGREW et al., 2008). Previous research has shown that the presence of *Moraxella* in the nasal cavity of swine appears as a preventative against colonization with other swine pathogens (SLIFIERZ,

FRIENDSHIP & WEESE, 2015). This report is relevant, due to a decrease in unhealthy piglets, concomitantly with the increase in *Streptococcaceae*, may have helped the presence of other pathogens in the URT, such as viruses. The URT is the natural habitat of family *Streptococcaceae* (SANTOS et al., 2012; HAAS et al., 2017; SEGURA et al., 2016) and remains at low levels in the natural microbiota of the swine. The presence of low immunity, the *Streptococcus* replicates at high rates, being able to cause disease (CORREA-FIZ, FRAILE & ARAGON, 2016; DUTKIEWICZ et al., 2018).

At the time of weaning, important microbial changes occur in response to the transition to solid food, and it depends on factors such as fiber and carbohydrate sources. After weaning, *Enterobacteriaceae* and *Lactobacillus spp.* decrease in abundance, while other species, such as *Streptococcus*, increase in abundance (NIEDERWERDER et al., 2017). The *Lactobacillaceae* family demonstrates a particular interest in pigs, due to the assumed benefits to function and intestinal health (ANGELIS et al., 2006). *Lactobacillus sp.*, a lactic acid bacterium, performs a significant role in the modulation of the systemic immune response following a respiratory infection (NIEDERWERDER, 2017).

Studies have shown that the normal microbiota of the respiratory cavity also works a role in the susceptibility of respiratory pathogens. Correa-Fiz et al. (2016) demonstrated that the nasal microbiomes of piglets before weaning act as a predisposing factor in the development of respiratory diseases associated with *Haemophilus parasuis*. In this study, healthy piglets showed greater richness and diversity of microbial species when compared to respiratory diseased affected piglets. In confined cattle, it was observed that the increase in the diversity of the nasopharyngeal microbiome was directly associated to the lower occurrence of clinical respiratory disease (HOLMAN et al., 2015). Alpha diversity demonstrated that a more limited microbial community was related to greater identification of viral genomes, especially in piglets affected by respiratory diseases.

5. CONCLUSION

In summary, the data show high variability of the microbiome in the respiratory tract of weaned piglets with clinical signs. The results of comparative virome and 16S rRNA analyses of piglets may help in understanding the complex

interactions between viruses and bacteria in the respiratory tract. The large diversity of viruses identified in URT cavity samples indicates that weaned piglets are reservoirs for many different viruses. The respiratory tract is exposed to thousands of bacterial species and we were able to demonstrate, through a noninvasive approach, that the URT cavity of weaned piglets is colonized by a relatively diversified microbiota.

This study proves that the metagenomic allows the efficient analysis of viral and bacterial communities, showing the diversity in clinical samples. To the knowledge of the author, is the first study to perform a full, detailed analysis of the virome and microbiota of weaned piglets.

6. REFERENCES

ANGELIS, M.; SIRAGUSA, S.; BERLOCO, M.; CAPUTO, L.; SETTANNI, L.; ALFONSI, G.; AMERIO, M.; GRANDI, A.; RAGNI, A.; GOBBETTI, M. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Research in Microbiology*, v. 157, p. 792-801, 2006.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, p. 2114-2120, 2014.

CHAE, C. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *The Veterinary Journal*, v. 212, p. 1-6, 2016.

CHEN, V. B.; DAVIS, I. W.; RICHARDSON, D. C. KING (Kinemage, Next Generation): a versatile interactive molecular and scientific visualization program. *Protein Science*, v. 11, p. 2403-2409, 2009.

CORREA-FIZ, F.; FRAILE, L.; ARAGON, V. Piglet nasal microbiota at weaning may influence the development of Glässer's disease during the rearing period. *Biomedical Central Genomics*, v. 17, p. 1-14, 2016.

DOU, S.; GADONNA-WIDEHEM, P.; ROME, V.; HAMOUDI, D.; RHAZI, L.; LAKHAL, L.; LARCHER, T.; BAHJ-JABER, N.; PINON-QUINTANA, A.; GUYONVARCH, A.; HUEËROU-LURON, I. L. E.; ABDENNEBI-NAJAR, I. Characterisation of Early-Life Fecal Microbiota in Susceptible and Healthy Pigs to Post-Weaning Diarrhoea. *Plos One*, v. 12, p. 1-20, 2017.

DUTKIEWICZ, J.; ZAJĄC, V.; SROKA, J.; WASIŃSKI, B.; CISAK, E.; SAWCZYN, A.; KLOC, A.; WÓJCIK-FATLA, A. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part II – Pathogenesis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 25, p. 186–203, 2018.

DUTRA, M. C.; MORENO, L. Z.; AMIGO, C. R.; FELIZARDO, M. R.; FERREIRA, T. S. P.; COUTINHO, T. A.; SANCHES, A. A.; GALVIS, J. A.; MORENO, M.; MORENO, A. M. Molecular survey of Cytomegalovirus shedding profile in commercial pig herds in Brazil. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 10, p. 1268-1270, 2016.

FABLET, C.; MAROIS, C.; KUNTZ-SIMON, G.; ROSE, N.; DORENLOR, V.; EONO, F.; EVENO, E.; JOLLY, J. P.; LE DEVENDEC, L.; TOCQUEVILLE, V.; QUÉGUINER, S.; GORIN, S.; KOBISCH, M.; MADEC, F. Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Veterinary Microbiology*, v. 147, p. 329-339, 2011.

GOTTSCHALK, M. The challenge of detecting herds sub-clinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *The Veterinary Journal*, v. 206, p. 30-38, 2015.

HAAS, B.; GRENIER, D. Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: A veterinary, medical, and economic challenge. *Medicine Et Maladies Infectieuses*, v. 48, p. 159-166, 2018.

HANSEN, M. S., PORS, S. E., JENSEN, H. E., BILLE-HANSEN, V., BISGAARD, M., FLACHS, E. M., NIELSEN, O. L. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *Journal of Comparative Pathology*, v. 143, a. 2-3, p.120-131, 2010.

HEIM, G.; O'DOHERTY, J. V.; O'SHEA, C. J.; DOYLE, D. N.; EGAN, A. M.; THORNTON, K.; SWEENEY, T. Maternal supplementation of seaweed-derived polysaccharides improves intestinal health and immune status of suckling piglets. *Journal of Nutritional Science*, v. 4, p. 1-12, 2015.

HUFFNAGLE, G. B.; DICKSON, R. P. The bacterial microbiota in inflammatory lung diseases. *Clinical Immunology*, v. 159, p. 177-182, 2015.

JANSMAN, A. J. M.; ZHANG, J.; KOOPMANS, S. J.; DEKKER, R. A.; SMIDT, H. Effects of a simple or a complex starter microbiota on intestinal microbiota composition in caesarean derived piglets. *Journal of Animal Science*, v. 90, p. 433-435, 2012.

KARLSSON, O. E.; LARSSON, J.; HAYER, J.; BERG, M.; JACOBSON, M. The Intestinal Eukaryotic Virome in Healthy and Diarrhoeic Neonatal Piglets. *Plos One*, v. 11, p. 1-16, 2016.

KAVANOVÁ, L.; MOUTELÍKOVÁ, R.; PRODĚLALOVÁ, J.; FALDYNA, M.; TOMAN, M.; SALÁT, J. Monocyte derived macrophages as an appropriate model for porcine cytomegalovirus immunobiology studies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 197, p. 58-62, 2018.

KIM, H. B.; ISAACSON, R. E. The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Veterinary Microbiology*, v. 177, p. 242-251, 2015.

LOWE, B. A.; MARSH, T. L.; Isaacs-Cosgrove, N.; Kirkwood, R. N.; Kiupel, M.; MULKS, M. H. Defining the “core microbiome” of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs. *Microbiology*, v. 12, p. 1-14, 2012.

LUNG, O.; OHENE-ADJEI, S.; BUCHANAN, C.; JOSEPH, T.; KING, R.; ERICKSON, A.; DETMER, S.; AMBAGALA, A. Multiplex PCR and Microarray for Detection of Swine Respiratory Pathogens. *Transboundary and Emerging Diseases*, doi:10.1111/tbed.12449, 2015.

MOROZOV, V. A.; MOROZOV, A. V.; DENNER, J. New PCR diagnostic systems for the detection and quantification of porcine cytomegalovirus (PCMV). *Archives of Virology*, v. 161, p. 1159-68, 2016.

NIEDERWERDER, M. C. Role of the microbiome in swine respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, v. 209, p. 97–106, 2017.

OPRIESSNIG, T., GIMENEZ-LIROLA, L. G., HALBUR, P. G. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal Health Research Reviews*, v.12, n.2, p. 133-148, 2011.

PALM, N. W.; ZOETE, M. R.; FLAVELL, R. A. Immune–microbiota interactions in health and disease. *Clinical Immunology*, v. 159, p. 122–127, 2015.

PETTIGREW, M. M., GENT, J. F.; REVAI, K.; PATEL, J. A.; CHONMAITREE, T. Microbial Interactions during Upper Respiratory Tract Infections. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 1584-1591, 2008.

SANTOS, L. J.; BARCELLOS, D.; Meningite estreptocócica. SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. *Doenças dos suínos*, 2edição; Goiânia, Cãnone Editorial 2012, Pág. 203-208.

SCHAAR, V.; NORDSTRÖM, T.; MÖRGELIN, M.; RIESBECK, K. *Moraxella catarrhalis* Outer Membrane Vesicles Carry β -Lactamase and Promote Survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by Inactivating Amoxicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 3845-3853, 2011.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 7537–7541, 2009.

SCHOKKER, D.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; VASTENHOUW, S. A.; HEILIG, H. G. H. J.; SMIDT, H.; REBEL, J. M. J.; SMITS, M. A. Early-Life Environmental Variation Affects Intestinal Microbiota and Immune Development in New-Born Piglets. *Plos One*, v. 9, p. 1-16, 2014.

SEGURA, M.; CALZAS, C.; GRENIER, D.; GOTTSCHALK, M. Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses. *FEBS Letters*, v. 590, p. 3772–3799, 2016.

SLIFIERZ, M. J.; FRIENDSHIP, R. M.; WEESE, J. S. Longitudinal study of the early-life fecal and nasal microbiotas of the domestic pig. *Biomedical Central Microbiology*, v. 184, a. 15, p. 1-12, 2015.

WEISSENBACHER-LANG, C.; KURELJUŠIĆ, B.; NEDOROST, N.; MATULA, B.; SCHIE, W.; STIXENBERGER, D.; WEISSENBOCK, H. Retrospective Analysis of Bacterial and Viral Co-Infections in *Pneumocystis* spp. Positive Lung Samples of Austrian Pigs with Pneumonia. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0158479, 2016.

ZHANG, B.; TANG, C.; YUE, H.; REN, Y.; SONG, Z. Viral metagenomics analysis demonstrates the diversity of viral flora in piglet diarrhoeic faeces in China. *Journal of General Virology*, v. 95, p. 1603-1611, 2014.

CAPÍTULO II

Artigo submetido à revista Virus Genes.

A NEW SPECIES OF PORCINE POLYOMAVIRUS IN WEANED PIGS IN BRAZIL

ABSTRACT

Metagenomic analysis in nasal swabs of weaned piglets with respiratory disease of unknown etiology was performed. A new species of porcine polyomavirus was discovered and related more closely to Betapolyomaviruses, which is frequently detected in mammalian respiratory samples. This is the first report of a porcine polyomavirus in Brazil swine herds.

Anne Caroline Ramos dos Santos^a; Raíssa Nunes dos Santos^a; Márcia Regina Loiko^b, Deise Maria Pereira^a; Ana Paula Mutterle Varela^a; Ana Cláudia Franco^a; Fabiana Quoos Mayer^c; Paulo Michel Roehe^{a*}

^aUniversidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Av. Sarmiento Leite 500, sala 208, Porto Alegre, CEP 90050 170, Rio Grande do Sul, Brazil; ^bUniversidade FEEVALE, Laboratório de Virologia, Instituto de Ciências da Saúde (ICS). Câmpus II ERS-239, 2755 | Novo Hamburgo, RS - CEP 93525-075, Rio Grande do Sul, Brazil; ^cFEPAGRO Saúde Animal Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, CEP 92990 000, Rio Grande do Sul, Brazil.

Keywords: metagenomic; nasal swabs; polyomavirus; piglets; respiratory

Polyomavirus (PyVs) are members of the *Polyomaviridae*, which comprises small, non-enveloped viruses with a circular double-stranded DNA genome of approximately 5000 bp (Song et al., 2016). PyVs has been described in several species, including birds, humans, nonhuman primates, bovines, horses, rabbits, bats, rodents, sea lion, raccoons (Dela Cruz et al., 2013; Tao et

al., 2013). In swine, the first complete genomic sequence of named porcine polyomavirus (PPyV), a betapolyomavirus-like virus, was recovered from nasal swabs of piglets in the USA (Hause et al., 2018). Since then, several PPyVs genomes have been reported in China (GenBank accession number MK377478 to MK377483, MK377486 to MK377488, MK377492, MH824512 to MH824514, unpublished data) in environmental samples and diarrheic feces of piglets. The transmission pathways of PPyVs have not been fully established. Contaminated faeces, respiratory secretions (O'Hara, Stehle and Garcea, 2014; Song et al., 2016), fomites and/or environmental sources are likely (Bofill-Mas et al., 2013). Most mammalian PyVs establish persistent subclinical infections in healthy hosts, although on occasions PyVs have been associated with acute disease in immunologically suppressed hosts (Imperiale and Jiang, 2016). In the present report, a PPyV whose genome was recovered by high throughput sequencing (HTS) is introduced; such genome was recovered from nasal swabs of weaned piglets with clinical signs of respiratory disease.

The PPyV genome was recovered from a pool prepared from weaned piglets of 33 days old with respiratory disease from a commercial farm in the Rio Grande do Sul State, Brazil, in 2017. The nasal swabs were placed in RNALater® (ThermoFisher Scientific) and vigorously homogenized. The pooled samples were filtered through a 0.45-µm filter (Millipore) and centrifuged at 100000 x g on a 25% sucrose cushion for 2 hours at 4°C (Sorvall AH-629 rotor). The resulting pellets were treated with a nuclease cocktail. Viral DNA was extracted using a standard phenol-chloroform protocol. Random amplification of the extracted DNA was performed with phi29 DNA Polymerase® kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Sequencing libraries were prepared using an Illumina Nextera XT kit and sequenced on an Illumina MiSeq system using paired 150-bp reads. The Illumina-generated raw sequence reads were submitted to quality analysis, trimmed and passed by *de novo* assembled in contigs. The genome analysis was performed with a search for eukaryotic viruses with nucleotide (Blastn) and protein (Blastx) tools available on the NCBI portal (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Contigs>300 bp were confirmed by mapping reads and selected to perform open reading frame (ORF) predictions and genome annotations using the Geneious software (version 9.1.8). The assembled viral nucleotide sequences and ORF-translated peptides were aligned

against the nonredundant database with Blastn and Blastx algorithms to calculate their percentage identities.

The total number of nucleotide sequences so obtained was 737,228 paired-end reads. After assembly, about 2,104 reads revealed a full genome with homology to the of porcine polyomavirus (PPyV) strain PP85 (GenBank accession number MH824512, unpublished) resulting in a complete genome of the virus. This brief communication is due to the identification of the complete PPyV genome and the first occurrence of this virus in Brazil.

The organization of PPyV genome here reported (Fig. 1) is typical of the polyomavirus genus *Betapolyomavirus*, including a regulatory region flanked by earlier small and large T antigen genes and the late genes VP1 and VP2. BLASTn analysis of the complete genome found 99,9% identity to chinese PPyV PP85 (GenBank accession number MH824512). In the same way, predicted proteins for the large T, small T antigen, and VP1 and VP2 capsid proteins were identical to Chinese polyomavirus PP85 (100% identity). Complete genome alignment of the first PPyV described (GenBank accession number MG976810, Hause et al., 2018) demonstrated an identity of 75.8% with the PPyV described in this study and, according to the ICTV polyomavirus study group (Calvignac-Spencer et al., 2016), when two PyV exhibits <15% observed genetic distance, biological properties can justify the creation of a new species.

The alignments of the nucleotide sequences of the large T gene were made with 21 genomes of different species of animals were obtained from GenBank. The alignment and pairwise identity values were carried out using MEGA 7 software (<https://www.megasoftware.net/>) with both MUSCLE and CLUSTAL alignment. In the phylogeny (Figure 1), the best model found under the Bayesian Information Criterion for the large T gene was upon General Time Reversible model (Lanave et al., 1984) with addition of a proportion of invariable sites (+I) (Shoemaker & Fitch, 1989) and rate of variation across sites (+G) (Yang, 1994). Phylogenetic trees were constructed by BEAST software using the maximum-likelihood method and the tree topology evaluation was based on 1000 bootstrap replicates. Aminoacid phylogenetic analysis with the large T gene described in this study point to a predominant relationship with Chinese polyomavirus. Overall, PPyV found in this study appears closely related to other porcine and vicugna polyomaviruses. The first study in pigs (Hause et al., 2018)

demonstrated the similarity to vicugna polyomavirus and human polyomavirus, and both of them have been associated with respiratory disease. These reports corroborate our findings, as the complete genome was identified in piglets with clinical respiratory signs.

Thus, it is proposed that the virus genome introduced here and the PPyV PP85, of Chinese origin, represent a new species in the genus Polyomavirus, for which the name PPyV-2 is proposed.

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare that they have no conflict of interest.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

The experiments were performed according to the permit guidelines established by Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil and the experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS), Brazil and the animal certification number was nº 33558/2018.

INFORMED CONSENT

Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.

ACKNOWLEDGMENTS

Accession number(s). The complete genome sequence of PPyV 2 was deposited in GenBank under accession number MN486202.

Fig 1: (A) Genome organization of PPyV. Putative coding regions for the structural (VP1 and VP2 proteins) and the non-structural (T antigens) are separated by a predicted non-coding regulatory region. (B) Phylogenetic analysis of large T gene of PyV. The large T nucleotide region and similar gene sequences from different species known polyomavirus in the GenBank database was used. The PPyV genome reported in this study is marked with black circles. Only bootstrap values greater than 70% are shown.

REFERENCES

BOFILL-MAS, S.; RUSIÑOL, M.; FERNANDEZ-CASSI, X.; CARRATALÀ, A.; HUNDESA, A.; GIRONES, R (2013) Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. *Biomed Res Int*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/192089>.

Polyomaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses; CALVIGNAC-SPENCER, S.; FELTKAMP, M. C. W.; DAUGHERTY, M. D.; MOENS, U.; RAMQVIST, T.; JOHNE, R.; EHLERS, B (2016) A taxonomy update for the family *Polyomaviridae*. *Arch Virol* 161:1739-1750. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2794-y>.

DELA CRUZ, F. N. JR.; GIANNITTI, F.; LI, L.; WOODS, L. W.; DEL VALLE, E. D.; PESAVENTO, P. A (2013) Novel polyomavirus associated with brain tumors in free-ranging raccoons, Western United States. *Emerg Infect Dis* 19:77-84. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1901.121078>.

HAUSE, B. M.; SMITH, C.; BISHOP, B.; STEWART, C.; SIMONSON, R (2018) Complete genome sequence of a porcine polyomavirus from nasal swabs of pigs with respiratory disease. *Gen Annou* 6:1-2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00344-18>.

IMPERIALE, M. J.; JIANG, M (2016) Polyomavirus persistence. *Ann Rev of Virol* 3:517-532. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042226>

LANAVE, C.; PREPARATA, G.; SACONE, C.; SERIO, G (1984) A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J Mol Evol* 20:86-93. <https://doi.org/10.1007/bf02101990>

O'HARA, S. D.; STEHLE, T.; GARCEA, R (2014) Glycan receptors of the *Polyomaviridae*: structure, function, and pathogenesis. *Curr Opin Virol* 7:73-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2014.05.004>.

SHOEMAKER, J. S.; FITCH, W. M (1989) Evidence from nuclear sequences that invariable sites should be considered when sequence divergence is calculated.

Mol Biol Evol 6:270–289.

<http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040550>.

SONG, X.; GHELUE, M. V.; LUDVIGSEN, M.; NORDBO, S. A.; EHLERS, B.; MOENS, U (2016) Characterization of non-coding control region of polyomavirus KI isolated from nasopharyngeal samples from patients with respiratory symptoms or infection and from blood from healthy blood donors in Norway. J Gen Virol 97:1647-1657. <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000473>.

TAO, Y.; SHI, M.; CONRARDY, C.; KUZMIN, I. V.; RECUENCO, S.; AGWANDA, B.; ALVAREZ, D. A.; ELISON, J. A.; GILBERT, A. T.; MORAN, D.; NIEZGODA, M.; LINDBRADE, K. A.; HOLMES, E. C.; BREIMAN, R. F.; RUPPRECHT, C. E.; TONG, S (2013) Discovery of diverse polyomaviruses in bats and evolutionary history of the *Polyomaviridae*. J Gen Virol 94:738-748. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.047928-0>

YANG, Z (1994) Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. J Mol Evol 39:306–314. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00160154>

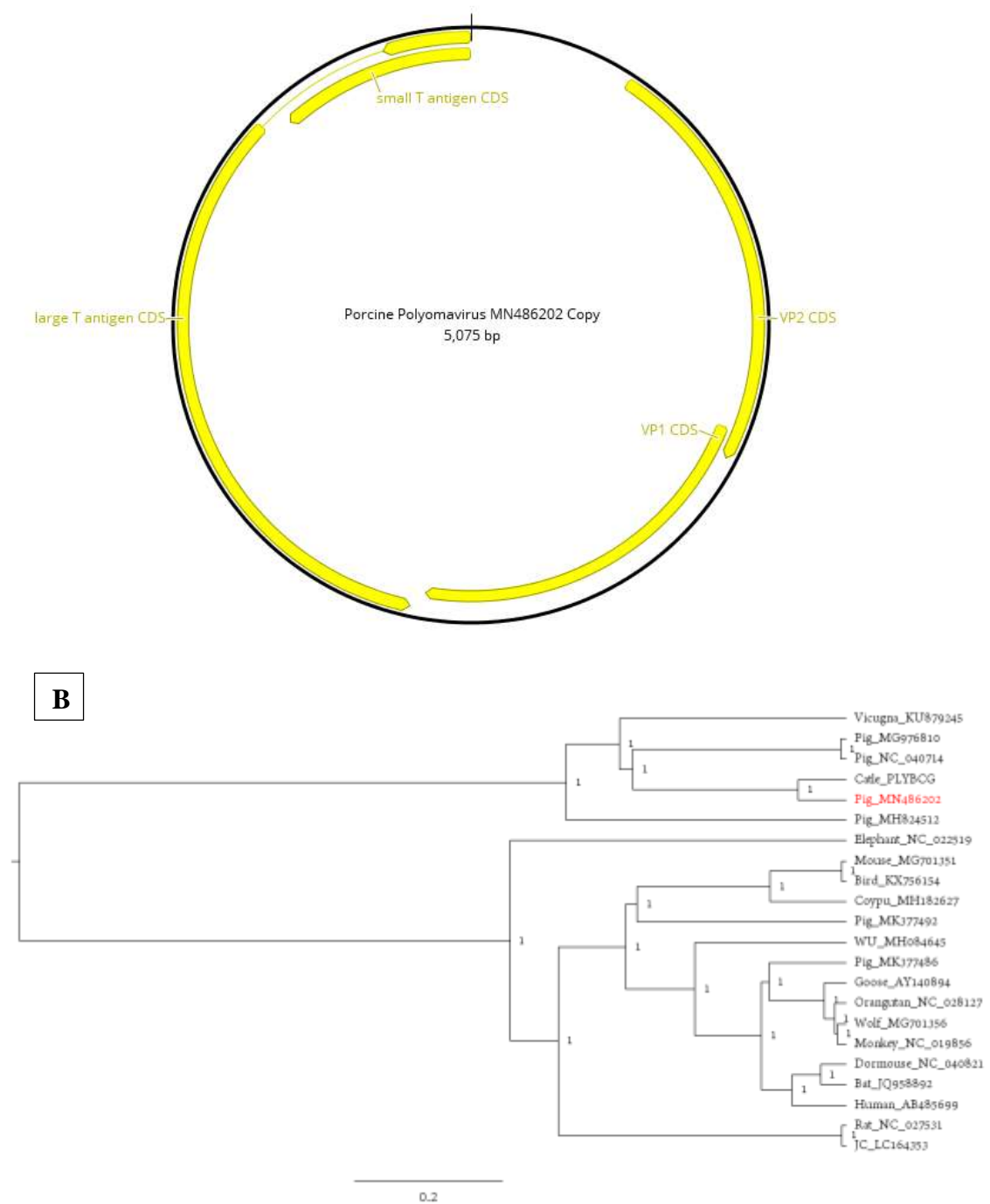


Fig 1: (A) Genome organization of PPyV. Putative coding regions for the structural (VP1 and VP2 proteins) and the non-structural (T antigens) are separated by a predicted non-coding regulatory region. (B) Phylogenetic analysis of large T gene of PyV. The large T nucleotide region and similar gene sequences from different species known polyomavirus in the GenBank database was used. The PPyV genome reported in this study is marked with read. Only bootstrap values greater than 70% are shown.

7. CONCLUSÕES

Para o nosso conhecimento, é o primeiro estudo comparativo metagenômico realizado em leitões desmamados saudáveis e em leitões apresentando sinais clínicos respiratórios realizado no Brasil. Nas amostras de nasais e laringeais analisadas, os genomas virais predominantes foram classificados na espécie citomegalovírus suíno. Em resumo, os dados mostraram uma alta variabilidade do microbioma na cavidade nasal e laringeal de leitões desmamados, principalmente nos leitões que apresentaram sinais clínicos. Esses dados prévios indicam que os leitões podem atuar como reservatório desses vírus.

Na caracterização da microbiota nasal houve uma avaliação da diversidade bacteriana existente na população. Atualmente, informações dessa natureza ainda são escassas. Os dados aqui obtidos mostraram que existe uma grande diversidade de bactérias na cavidade nasal de leitões desmamados. Entretanto, na presença de doença respiratória, este microbioma sofre diversas alterações.

Esses dados demonstram a importância da caracterização da diversidade viral e bacteriana de leitões após o desmame, possibilitando o conhecimento dos agentes potencialmente infecciosos circulantes nesses animais, inclusive aqueles que podem vir a ter impacto na saúde animal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCS - Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. Mapeamento da Suinocultura Brasileira e suas Dimensões. Disponível em: <https://issuu.com/revistaabcs/docs/mapeamento_revista__web_>. Acesso em 05 de fevereiro de 2016.

ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Relatório Anual 2017. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017>>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2018.

ALLEN, H. K.; BUNGE, J.; FOSTER, J. A.; BAYLES, D. O.; STANTON, T. B. Estimation of viral richness from shotgun metagenomes using a frequency count approach. *Microbiome*, v. 1, p. 1-7, 2013.

AMARAL, A. L.; SILVEIRA, P. R. S.; LIMA, G. J. M. M.; KLEIN, C. S.; PAIVA, D. P.; MARTINS, F.; KICH, J. D.; ZANELLA, J. R. C.; FÁVERO, J.; LUDKE, J. V.; BORDIN, L. C.; MIELE, M.; HIGARASHI, M. M.; MORÉS, N.; COSTA, O. A. D.; OLIVEIRA, P. A. V.; BERTOL, T. M.; SILVA, V. S. Boas práticas de produção de suínos. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006. 60 p. (Circular Técnica, 50). Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_k5u59t7m.pdf>. Acesso em: 05 de março de 2018.

BÁNYAI, K.; POTGIETER, C.; GELLÉRT, A.; GANESH, B.; TEMPESTA, M.; LORUSSO, E.; BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V. Genome sequencing identifies genetic and antigenic divergence of porcine picobirnaviruses. *Journal of General Virology*, v. 95, p. 2233–2239, 2014.

BASSO, W.; MARTI, H.; HILBE, M.; SYDLER, T.; STAHEL, A.; BÜRGI, E.; SIDLER, X. Clinical cystoisosporosis associated to porcine cytomegalovirus (PCMV, Suid herpesvirus 2) infection in fattening pigs. *Parasitology International*, v. 66, p. 806-809, 2017.

BIBBY, K. Metagenomic identification of viral pathogens. *Trends in Biotechnology* v 31, p. 275-279, 2013.

BIKEL, S.; VALDEZ-LARA, A.; CORNEJO-GRANADOS, F.; RICOA, K.; CANIZALES-QUINTEROS, S.; SOBERÓN, X.; DEL POZO-YAUNER, L.; OCHOA-LEYVA, A. Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 13, p. 390-401, 2015.

BLOMSTRÖM, A. Viral metagenomics as an emerging and powerful tool in veterinary medicine. *Veterinary Quarterly*, v. 31, p. 107-114, 2011.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, p. 2114-2120, 2014.

BUERMANS, H. P. J.; DEN DUNNEN, J. T. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1842, p. 1932-1941, 2014.

CAMERLINK, I.; TURNER, S. C. The pig's nose and its role in dominance relationships and harmful behavior. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 145, p. 84– 91, 2013.

CASTRIGNANO, S. B.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K. The metagenomic approach and causality in virology. *Revista Saúde Pública*, v. 49, p. 1-5, 2015.

CHAE, C. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *The Veterinary Journal*, v. 212, p. 1-6, 2016.

CHEN, M.; SUN, H.; LAN, D.; HUA, X.; CUI, L.; YUAN, C.; YANG, Z. Molecular detection of genogroup I and II picobirnaviruses in pigs in China. *Virus Genes*, v. 48, p. 553–556, 2014.

CIBULSKI, S. P.; PASQUALIM, G.; TEIXEIRA, T. F.; VARELA, A. P. M.; DEZEN, D.; HOLZ, C. L.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Porcine cytomegalovirus infection is not associated to the occurrence of post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Medicine and Science*, v. 1, p. 23–29, 2015.

CORREA-FIZ, F.; FRAILE, L.; ARAGON, V. Piglet nasal microbiota at weaning may influence the development of Glässer's disease during the rearing period. *Biomedical Central Genomics*, doi 10.1186/s12864-016-2700-8, 2016.

DEBLANC, C.; GORIN S.; QUÉGUINER, S.; GAUTIER-BOUCHARDON, A. V.; FERRÉ, S.; AMENNA, N.; CARIOLET, R.; SIMON, G. Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* modifies outcomes of infection with European swine influenza virus of H1N1, but not H1N2, subtype. *Veterinary Microbiology*, v. 157, n. 1-2, p. 96-105, 2012.

DING, N.; ZHAO, K.; LAN, Y.; LI, Z.; LV, X.; SU, J.; LU, H.; GAO, F.; HE, W. Induction of Atypical Autophagy by Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Contributes to Viral Replication. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, p. 1-11, 2017.

DUTRA, M, C.; MORENO, L. Z.; AMIGO, C. R.; FELIZARDO, M. R.; FERREIRA, T. S. P.; COUTINHO, T. A.; SANCHES, A. A.; GALVIS, J. A.; MORENO, M.; MORENO, A. M. Molecular survey of Cytomegalovirus shedding profile in commercial pig herds in Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 10, p. 1268-1270, 2015.

ESPINOSA-GONGORA, C.; LARSEN, N.; SCHØNNING, K.; FREDHOLM, M.; GUARDABASSI, L. Differential Analysis of the Nasal Microbiome of Pig Carriers or Non-Carriers of *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 11(8): e0160331. doi:10.1371/journal.pone.0160331, 2016.

FABLET, C.; MAROIS, C.; KUNTZ-SIMON, G.; ROSE, N.; DORENLOR, V.; EONO, F.; EVENO, E.; JOLLY, J. P.; LE DEVENDEC, L.; TOCQUEVILLE, V.; QUÉGUINER, S.; GORIN, S.; KOBISCH, M.; MADEC, F. Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Veterinary Microbiology*, v. 147, p. 329-339, 2011.

FÁVERO, J. A.; FIGUEIREDO, E. A. P. Evolução do melhoramento genético de suínos no Brasil. *Revista Ceres*, v. 56, p. 420-427, 2009.

FIEBIG, U.; ABICHT, J.; MAYR, T.; LÄNGIN, M.; BÄHR, A.; GUETHOFF, S.; FALKENAU, A.; WOLF, E.; REICHART, B.; SHIBAHARA, T.; DENNER, J. Distribution of Porcine Cytomegalovirus in Infected Donor Pigs and in Baboon Recipients of Pig Heart Transplantation Viruses, v. 10, p. 1-20, 2018.

FREGOLENTE, M. C. D.; CASTRO-DIASA, E.; MARTINSA, S. S.; SPILKI, F. R.; ALLEGRETTI, S. M.; GATTIA, M. S. V. Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts. *Virus Research*, v. 143, p. 134–136, 2009.

GANESH, D.; BÁNYAI, K.; MARTELLA, V.; JAKAB, F.; MASACHESSI, G.; KOBAYASHI, N. Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. *Reviews in Medical Virology*, v. 22, p. 245-256, 2012.

GASTARDELO, T. A. R.; MELZ, L. J. A Suinocultura industrial no mundo e no Brasil. *Revista UNEMAT de Contabilidade, Brasil*, v. 3, n. 6, p. 72-92, 2014.

GIORDANO, M. O.; MARTINEZ, L. C.; MASACHESSI, G.; BARRIL, P. A.; FERREYRA, L. J.; ISA, M. B.; VALLE, M. C.; MASSARI, P. U.; NATES, S. V. Evidence of closely related picobirnavirus strains circulating in humans and pigs in Argentina. *Journal of Infection*, v. 62, p. 45-51, 2011.

GRADA, A.; WEINBRECHT, K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, p. 1-4, 2013.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for a natural products. *Chemical Biology*, v. 5, p. 245-249, 1998.

HAUSE, B. M.; DUFF, J. W.; SCHEIDT, A.; ANDERSON, G. Virus detection using metagenomic sequencing of swine nasal and rectal swabs. *Journal of Swine Health and Production*, v. 24, p. 304-308, 2016.

HEIM, G.; O'DOHERTY, J. V.; O'SHEA, C. J.; DOYLE, D. N.; EGAN, A. M.; THORNTON, K.; SWEENEY, T. Maternal supplementation of seaweed-derived polysaccharides improves intestinal health and immune status of suckling piglets. *Journal of Nutritional Science*, v. 4, p. 1-12, 2015.

HIRAHARA, T.; YASUHARA, H.; KODAMA, K.; NAKAI, M.; SASAKI, N. Isolation of hemagglutinating encephalomyelitis virus from respiratory tract of pigs in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi*, v. 49, p. 85-93, 1987.

JANSMAN, A. J. M.; ZHANG, J.; KOOPMANS, S. J.; DEKKER, R. A.; SMIDT, H. Effects of a simple or a complex starter microbiota on intestinal microbiota composition in caesarean derived piglets. *Journal of Animal Science*, v. 90, p. 433–435, 2012.

JIANG, Y.; XIAO, C.; YIN, S.; GERBER, P. F.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. High prevalence and genetic diversity of porcine bocaviruses in pigs in the USA, and identification of multiple novel porcine bocaviruses. *Journal of General Virology*, v. 95, p. 453–465, 2014.

KAVANOVÁ, L.; MOUTELÍKOVÁ, R.; PRODĚLALOVÁ, J.; FALDYNA, M.; TOMAN, M.; SALÁT, J. Monocyte derived macrophages as an appropriate model for porcine cytomegalovirus immunobiology studies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 197, p. 58–62, 2018.

LAVALLEE, C. M.; MACPHERSON, J. A. R.; ZHOU, M.; GAO, Y.; WIZZARD, P. R.; WALES, P. W.; TURNER, J. M.; WILLING, B. P. Lipid Emulsion Formulation of Parenteral Nutrition Affects Intestinal Microbiota and Host Responses in Neonatal Piglets. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 41, p. 1301-1309, 2017.

LEDERBERG, J.; MCCRAY, A. T. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, v. 15, p. 7-8, 2001.

LEMON, K. P., KLEPAC-CERAJ, V.; SCHIFFER, H. K.; BRODIE, E. L.; LYNCH, S. V.; KOLTERB, R. Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. *mBio* 1(3):e00129-10. doi:10.1128/mBio.00129-10. 2010.

LISTE, M. B.; NATERA, I.; SUAREZ, J. A.; PUJOL, F. H.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J. E. Enteric Virus Infections and Diarrhea in Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Children. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 2873–2877, 2000.

LIU, X.; WEI, H.; LIAO, S.; YE, J.; ZHU, L.; XU, Z. MicroRNA transcriptome analysis of porcine vital organ responses to immunosuppressive porcine cytomegalovirus infection. *Virology Journal*, v. 15, p. 1-12, 2018.

LOWE, B. A.; MARSH, T. L.; ISAACS-COSGROVE, N.; KIRKWOOD, R. N.; KIUPEL, M.; MULKS, M. H. Defining the “core microbiome” of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs. *Biomedical Central Microbiology*, p. 12-20, 2012.

LUNG, O.; OHENE-ADJEI, S.; BUCHANAN, C.; JOSEPH, T.; KING, R.; ERICKSON, A.; DETMER, S.; AMBAGALA, A. Multiplex PCR and Microarray for Detection of Swine Respiratory Pathogens. *Transboundary and Emerging Diseases*, doi:10.1111/tbed.12449, 2015.

MALIK, Y. S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; DHAMA, K.; SHABBIR, M. Z.; GANESH, B.; KOBAYASHI, N.; BANYAI, K. Epidemiology, Phylogeny, and Evolution of Emerging Enteric Picobirnaviruses of Animal Origin and Their Relationship to Human Strains. *BioMed Research International*, p. 1-13, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/780752>.

MARTÍNEZ, L. C.; MASACHESSI, G.; CARRUYO, G.; FERREYRA, L. J.; BARRIL, P. A.; ISA, M. B.; GIORDANO, M. A.; LUDERT, J. E.; NATES, S. V. Picobirnavirus causes persistent infection in pigs. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 10. p. 984–988, 2010.

MASEMBE, C.; MICHUKI, G.; ONYANGO, M.; RUMBERIA, C.; NORLING, M.; BISHOP, R. P.; DJIKENG, A.; KEMP, S. J.; ORTH, A.; SKILTON, R. A.; STÄHL, K.; FISCHER, A. Viral metagenomics demonstrates that domestic pigs are a potential reservoir for Ndumu virus. *Virology Journal*, v. 9, p. 1-6, 2012.

MENG, X. J. Emerging and Re-emerging Swine Viruses. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 59, p. 85–102, 2012.

MORÉS, N.; BARIONI JUNIOR, W.; SOBESTANSKY, J.; DALLA COSTA, O. A.; PIFFER, I. A.; PAIVA, D. P.; GUZZO, R.; COIMBRA, J. B. S. Estimativa dos índices de pneumonia, pela tosse, e de rinite atrófica, por espirros, em suínos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, p. 1-6, 2001.

MORÉS, M. A. Z.; OLIVEIRA FILHO, J. X.; REBELATTO, R.; KLEIN, C. S.; BARCELLOS, D. E. N.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N. Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, p. 725-733, 2015.

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

NIEDERWERDER, M. C. Role of the microbiome in swine respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, v. 209, p. 97–106, 2017.

OLIVEIRA FILHO, J. X.; MORÉS, M. A. Z.; REBELATTO, R.; AGNOL, A. M. D.; PLIESKI, C. L. A.; KLEIN, C. S.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORÉS, N. *Pasteurella multocida* type A as the primary agente of pneumonia and septicemia in pigs. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. v. 35, n.8, p. 716-724, 2015.

OPRIESSNIG, T., GIMENEZ-LIROLA, L. G., HALBUR, P. G. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal Health Research Reviews*, v.12, n.2, p. 133-148, 2011.

PALLEN, M. J. Diagnostic metagenomics: potential applications to bacterial, viral and parasitic infections. *Parasitology*, v. 141, p. 1856–1862, 2014.

PALM, N. W.; ZOETE, M. R.; FLAVELL, R. A. Immune–microbiota interactions in health and disease. *Clinical Immunology*, v. 159, p. 122–127, 2015.

PALZER, A.; RITZMANN, M.; WOLF, G.; HEINRITZI, K. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Veterinary Record*, v. 162, p. 267-271.

PLOTZKI, E.; KELLER, M.; IVANUSIC, D.; DENNER, J. A new Western blot assay for the detection of porcine cytomegalovirus (PCMV). *Journal of Immunological Methods*, v. 437, p. 37-42, 2016.

POULADI, N.; BIME, C.; GARCIA, J. G. N.; LUSSIER, Y. A. Complex genetics of pulmonary diseases: lessons from genome-wide association studies and next-generation sequencing. *Translational Research*, v. 168, p. 22-39, 2015.

QIN, S.; RUAN, W.; YUE, H.; TANG, C.; ZHOU, K.; ZHANG, B. Viral communities associated with porcine respiratory disease complex in intensive commercial farms in Sichuan province, China. *Scientific Reports*, v. 8, p. 133-141, 2018.

RHO, S.; MOON, H. J.; PARK, S. J.; KIM, H. K.; KEUM, H. O.; HAN, J. Y.; NGUYEN, G. V.; PARK, B. K. Detection and genetic analysis of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus in South Korea. *Virus Genes*, v. 42, p. 90-96, 2011.

SAIF, J. L. PENSART, M. B.; SESTAK, K.; YEO, S.; JUNG, K. Hemagglutinating encephalomyelitis virus. In: Zimmerman, J. J.; Karriker, L. A.; Ramirez, A.; Schwartz, K. J.; Stevenson, G. W., editors. *Diseases of swine*, 10 ed. Editora: Wiley-Blackwell; 2012. p. 517-520.

SCHOKKER, D.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; VASTENHOUW, S. A.; HEILIG, H. G. H. J.; SMIDT, H.; REBEL, J. M. J.; SMITS, M. A. Early-Life Environmental Variation Affects Intestinal Microbiota and Immune Development in New-Born Piglets. *Plos One*, v. 9, p. 1-16, 2014.

SEKIGUCHI, M.; SHIBAHARA, T.; MIYAZAKI, A.; TAJIMA, T.; SHIMIZU, S.; KABALI, E.; TAKANO, Y.; SASAKI, Y.; KUBO, M. *In situ* hybridization and immunohistochemistry for the detection of porcine cytomegalovirus. *Journal of Virological Methods*, v. 179, p. 272-275, 2012.

SLIFIERZ, M. J.; FRIENDSHIP, R. M.; WEESE, J. S. Longitudinal study of the early-life fecal and nasal microbiotas of the domestic pig. *Biomedical Central Microbiology*, v. 184, a. 15, p. 1-12, 2015.

SYMONDS, E. M.; GRIFFIN, D. W.; BREITBART, M. Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. *Applied and environmental microbiology*, v. 75, p. 1402-1409, 2009.

ANDRADE, J. A.; LORENCENA, D.; CLAUS, M. P.; TAKIUCHI, E. Detection of Picobirnavirus in Feces of Pigs from Commercial and Subsistence Farms in the Western Region of Paraná. *Anais de congresso XXIX Congresso Brasileiro de Virologia*, 2019. Disponível em: http://consulteventos.com.br/virologia2018/?page_id=12161

VASILINETC, I.; PRJIBELSKI, A. D.; GUREVICH, A.; KOROBAYNIKOV, A.; PEVZNER, P. A. Assembling short reads from jumping libraries with large insert sizes, *Bioinformatics*, v. 31, p. 3262–3268, 2015.

VIJGEN, L.; KEYAERTS, E.; LEMEY, P.; MAES, P.; VAN REETH, K.; NAUWYNCK, H.; PENSAERT, M.; VAN RANST, M. Evolutionary History of the Closely Related Group 2 Coronaviruses: Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43. *Journal of Virology*, v. 80, p. 7270–7274, 2006.

YU, J.; LI, J.; AO, Y.; DUAN, Z. Detection of novel viruses in porcine fecal samples from China. *Virology Journal*, v. 10, p. 1-6, 2013.

WILSON, S.; BRUSSEL, L. V.; SAUNDERS, G.; TAYLOR, L.; ZIMMERMANN, L.; HEINRITZI, K.; RITZMANN, M.; BANHOLZER, E.; EDDICKS, M. Vaccination of piglets at 1 week of age with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine reduces lung lesions and improves average daily gain in body weight. *Vaccine*, v. 30, p.7625-7629. 2012.

WEISSENBACHER-LANG, C.; KURELJUŠIĆ, B.; NEDOROST, N.; MATULA, B.; SCHIE, W.; STIXENBERGER, D.; WEISSENBÖCK, H. Retrospective Analysis of Bacterial and Viral Co-Infections in *Pneumocystis* spp. Positive Lung Samples of Austrian Pigs with Pneumonia. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0158479, 2016.

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

ZEINELDINA, M.; ALDRIDGEA, B.; BLAIRA, B.; KANCERA, K.; LOWEA, J. Microbial shifts in the swine nasal microbiota in response to parenteral antimicrobial administration. *Microbial Pathogenesis*, v. 121, p. 210–217, 2018.

ZHAI, S.; YUE, C.; WEI, Z.; LONG, J.; RAN, D.; LIN, T.; DENG, Y.; HUANG, L.; SUN, L.; ZHENG, H.; GAO, F.; ZHENG, H.; CHEN, S.; YUAN, S. High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China. *Archives of Virology*, v. 155, p. 1313–1317, 2010.

ZHANG, B.; TANG, C.; YUE, H.; REN, Y.; SONG, Z. Viral metagenomics analysis demonstrates the diversity of viral flora in piglet diarrhoeic faeces in China. *Journal of General Virology*, v. 95, p. 1603–1611, 2014.

ZHANG, S.; HAN, B.; GU, J.; WANG, C.; WANG, P.; MA, Y.; CAO, J.; HE, Z. Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. *Chemosphere*, v. 135, p. 138-145, 2015.

ZHENG, B. J.; CHANG, R. X.; MA, G. Z.; XIE, J. M.; LIU, Q.; LIANG, X. R.; NG, M. H. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *Journal of Medical Virology*, v. 34, p. 29-37, 1991.

ZHENG, X.; LIU, G.; OPRIESSNIG, T.; WANG, Z.; YANG, Z.; JIANG, Y. Development and validation of a multiplex conventional PCR assay for simultaneous detection and grouping of porcine bocaviruses. *Journal of Virological Methods*, v. 236, p. 164–169, 2016.

ZHOU, L.; WEI, H.; ZHOU, Y.; XU, Z.; ZHU, L.; HORNE, J. Molecular epidemiology of Porcine torovirus (PToV) in Sichuan Province, China: 2011–2013. *Virology Journal*, v. 11, p. 1-9, 2014.

ZHOU, Y.; FERNANDEZ, S.; YOON, I.; SIMASATHIEN, S.; WATANAWEERADEJ, V.; YANG, Y.; MARTE-SALCEDO, O. A.; SHUCK-LEE, D. J.; THOMAS, S. J.; HANG, J.; JARMAN, R. G. Metagenomics Study of Viral Pathogens in Undiagnosed Respiratory Specimens and Identification of Human Enteroviruses at a Thailand Hospital. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n.3, p. 663–669, 2016.

ANEXO I

PROPOSTA DE COLABORAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA

Título: " Avaliação do microbioma do trato respiratório de suínos nas fases críticas de produção"

Com a expansão do setor suinícola e a intensificação da atividade, houve um agravamento nos problemas sanitários dos rebanhos, e as enfermidades respiratórias tiveram aumento expressivo em sua ocorrência, aumentando os prejuízos econômicos. A fim de que se possam adotar medidas de prevenção e diminuição do impacto dessas enfermidades no plantel, as metodologias de diagnóstico são de grande importância. Baixos níveis de infecções no trato respiratório comumente ocorrem, porém o real envolvimento de agentes virais e bacterianos ainda são pouco avaliados. Agentes como o Influenza Vírus Suíno, o Circovírus Suíno tipo 2, o Mycoplasma hyopneumoniae e Haemophilus parasuis já foram associados ao complexo de doenças respiratórias dos suínos. O objetivo desse projeto é avaliar o envolvimento desses agentes virais e bacterianos em amostras de suabes nasais e laringeais através da sua identificação por técnicas moleculares.

A equipe do Laboratório de Virologia da UFRGS propõe:

- Realizar visitas à granja.
- Acompanhar as fases críticas na produção (previamente agendados).
- Coletar suabes nasais e laringeais de leitões em fases de crescimento e terminação.
 - Encaminhar o material para o laboratório.
 - Apresentar resultados preliminares da primeira coleta em uma reunião de trabalho com veterinário responsável pela sanidade da Empresa Seara Alimentos, data a definir.
 - Em reunião, serão repassadas as informações técnicas e metodologia utilizada, que por ventura, possam ser utilizadas na unidade.

A partir da primeira coleta, será realizado um projeto piloto para aperfeiçoar a metodologia a ser utilizada nas próximas coletas. As visitas sempre serão previamente agendadas com o proprietário.

O trabalho será realizado pelo grupo de profissionais que segue abaixo listado:

- Anne Caroline R. dos Santos – Med. Veterinária e doutoranda Lab. Virologia/UFRGS.
- Márcia Loiko – Med. Veterinária e doutoranda Lab. Virologia/UFRGS.
- Deisi Maria Pereira – Aluna de graduação e iniciação científica Lab. Virologia/UFRGS.

Todos os membros da equipe respeitarão as normas de funcionamento e biossegurança da empresa, previamente informadas.

Será dado sigilo das informações da empresa, bem como as informações cedidas para as análises na pesquisa científica. A empresa permanecerá anônima para o público em geral e o nome somente será revelado mediante autorização prévia.

Contrapartida do proprietário:

- Acesso à granja, acesso às informações relevantes na análise dos dados e auxílio técnico na coleta.
- Liberação de informações gerais das granjas previamente determinadas para futuros trabalhos científicos, resumo de congresso e artigos científicos.
- Autorização na divulgação dos resultados da “Avaliação do microbioma do trato respiratório de suínos nas fases críticas de produção” em formato de informação científica.

Eventuais alterações necessárias da proposta serão previamente acordadas por ambas as partes em reunião ou contato direto.

Porto Alegre, ____ de _____ de 201__.

Prof. Paulo Michel Roehe, Med. Vet., M.Sc., Ph.D.
Professor Titular DEMIP/ICBS-UFRGS
Orientador e responsável por este projeto

Anne Caroline R. dos Santos, Med. Vet, M.Sc.
Doutoranda em Ciências Veterinárias
Laboratório de Virologia/ICBS/UFRGS

Proprietário da Granja

Veterinário, responsável pela Sanidade ou representante da empresa