

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

**CARACTERIZAÇÃO DO VIROMA DE SORO DE SUÍNOS, EQUINOS E BOVINOS**

**WILLIAN PINTO PAIM**

**PORTO ALEGRE**

**2021**

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

**CARACTERIZAÇÃO DO VIROMA DE SORO DE SUÍNOS, EQUINOS E BOVINOS**

**Autor: Willian Pinto Paim**

**Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Veterinárias na área de Medicina Veterinária  
Preventiva e Patologia – Virologia.**

**Orientador: Dr. Cláudio Wageck Canal**

**Coorientador: Dr. Matheus Nunes Weber**

**PORTO ALEGRE**

**2021**

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

#### CIP - Catalogação na Publicação

Paim, Willian Pinto  
Caracterização do viroma de soro de suínos, equinos  
e bovinos / Willian Pinto Paim. -- 2021.  
116 f.  
Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Coorientador: Matheus Nunes Weber.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2021.

1. Sequenciamento de Alto Desempenho . 2. Vírus. 3.  
Cressnaviricota. 4. Metagenômica. I. Canal, Cláudio  
Wageck, orient. II. Weber, Matheus Nunes, coorient.  
III. Título.

**Willian Pinto Paim**

**CARACTERIZAÇÃO DO VIROMA DE SORO DE SUÍNOS, EQUINOS E BOVINOS**

Aprovada em 09 abril de 2021

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Matheus Nunes Weber  
Coorientador e Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Franciele Maboni Siqueira  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Franscisco Esmale Sales de Lima  
Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Juliana Felipetto Cargnelutti  
Membro da Comissão

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese aos meus pais, pelo apoio incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Tânia e Salatiel, à minha noiva, Camila, e a meus irmãos, Luciana e Marcelo, pelo amor, apoio e suporte para que eu pudesse concretizar este sonho.

Em especial aos meus avós, Manoela e Pereci, por todos os conselhos e por tudo que me ensinaram, mesmo tendo nos deixado, serão sempre lembrados.

Gostaria também de agradecer a minha segunda família, os Schiavos, pelo apoio que mesmo de longe se fizeram presentes.

Aos amigos do laboratório pela assistência e amizade desde o momento em que ingressei no grupo de Virologia da FAVET/UFRGS, até o final do meu doutorado.

Agradeço a Mayara Maggioli e Fernando Bauermann por todo o aprendizado proporcionado e por tornar extremamente gratificante o meu período do doutorado sanduíche na Universidade do Estado de Oklahoma nos Estados Unidos.

Agradeço ao meu orientador Cláudio Wageck Canal pela oportunidade, confiança e pelos tantos ensinamentos que contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço ao meu coorientador Matheus Nunes Weber pela amizade, incentivo, paciência, pelos ensinamentos e por toda ajuda até aqui.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente estiveram envolvidas nessa conquista e por todo o apoio dado.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela oportunidade de realizar doutorado em um programa de excelência e ao Departamento de Patobiologia Veterinária da Universidade do Estado de Oklahoma pelo auxílio durante o período do doutorado sanduíche.

## EPÍGRAFE

*“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade”.*

(Júlio Verne)

## RESUMO

Os suínos, equinos e bovinos possuem uma histórica importância econômica e social. A criação de suínos de exposição para participar em eventos agrícolas é uma atividade relevante na região Centro-Oeste dos Estados Unidos. Os equinos são utilizados para o lazer, esporte, equoterapia e força de tração no trabalho rural. Os bovinos apresentam um papel essencial na indústria de carne e leite. Além disso, equinos e bovinos são fontes de soro, um produto biológico utilizado na pesquisa e para a fabricação de vacinas. Dessa forma, o conhecimento do *status* sanitário de suínos, equinos e bovinos é um ponto estratégico para a epidemiologia molecular de agentes virais que causam prejuízos econômicos à saúde animal. O conhecimento limitado da comunidade viral presente no soro desses animais dificulta o esclarecimento das possíveis causas de doenças de etiologia infecciosa. O emprego do sequenciamento de alto desempenho (*high-throughput sequencing, HTS*) tem permitido a detecção de agentes virais em amostras biológicas de muitas espécies animais. Porém, os soros de suínos de exposição, e lotes de soros equinos e bovinos comerciais de diferentes países ainda carecem de investigação da presença de vírus adventícios através da metagenômica viral. Nesse sentido, o presente estudo visa ampliar o conhecimento sobre a diversidade do viroma do soro desses animais utilizando o HTS. No Capítulo 1, foram analisadas 400 amostras de soros de suínos, divididas em dois *pools* de 200 amostras cada. Foram obtidas sequências de genomas das famílias *Arteriviridae*, *Circoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae* e *Retroviridae*. Vinte e três espécies virais foram detectadas, incluindo o primeiro bufavírus suíno nos Estados Unidos. Assim como, o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína, pestivírus atípico de suíno e circovírus suíno. Além disso, 17 genomas completos foram recuperados e os dois primeiros *bocaparvovirus ungulado 3* dos Estados Unidos. No Capítulo 2, foram investigados cinco lotes de soros comerciais de equinos com origem na Nova Zelândia (três lotes), Brasil e dos Estados Unidos (um lote cada). Nestes soros foram detectadas sequências genômicas das famílias *Flaviviridae*, *Herpesviridae* e *Parvoviridae*. Particularmente, hepacivírus e pegivírus equinos foram os mais frequentes. No Capítulo 3, foram sequenciados sete lotes de soros comerciais de bovinos com origem na Nova Zelândia (dois lotes), México (um lote) e dos Estados Unidos (quatro lotes). Os soros de bovinos apresentaram genomas das famílias *Adenoviridae*, *Flaviviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Pneumoviridae*, *Polyomaviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae* e vírus circulares DNA fita simples codificantes de replicase (*circular rep-encoding single-stranded, CRESS*) (*Genomoviridae*, *Circoviridae* e *Smacoviridae*). Doze genomas completos de parvovírus bovino 2 e 3, bosavírus, hokovírus bovino e poliomavírus bovino 1 foram recuperados. Além disso, foram detectadas sequências relacionadas à crAssphage, um bacteriófago associado a contaminação fecal humana. Portanto, o estudo ilustra os agentes virais presentes nos soros de suínos, equinos e bovinos, buscando contribuir para o conhecimento do viroma presente nos soros desses animais e auxiliar no esclarecimento de possíveis causas de doenças de etiologia infecciosa.

Palavras-chave: Sequenciamento de Alto Desempenho , Vírus, Cressnaviricota, Metagenômica.



## ABSTRACT

*Pigs, horses, and cattle have historical economic and social importance. Raising show pigs to participate in agricultural events is a major activity in the Midwest region of the United States. Horses are used for leisure, sport, hippotherapy and traction force in rural work. Cattle play an essential role in the meat and milk industry. In addition, horses and cattle are sources of serum, a biological product used in research and for the manufacture of vaccines. Thus, knowledge of the health status of pigs, horses and cattle is a strategic point for the molecular epidemiology of viral agents that cause economic damage to animal health. The limited knowledge of the viral community present in the serum of these animals makes it difficult to clarify the possible causes of diseases of infectious etiology. The use of high-throughput sequencing (HTS) has allowed the detection of viral agents in biological samples of many animal species. However, the sera from show pigs, and batches of commercial equine and bovine sera from different countries still need to be investigated for the presence of adventitious viruses through viral metagenomics. In this sense, the present study aims to expand the knowledge about the diversity of the sera virome of these animals using the HTS. In Chapter 1, 400 swine serum samples were analyzed, divided into two pools of 200 samples each. Genome sequences were obtained from the Arteriviridae, Circoviridae, Flaviviridae, Herpesviridae, Parvoviridae and Retroviridae families. Twenty-three viral species were detected, including the first porcine bufavirus in the United States. As well as the porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine atypical pestivirus and porcine circovirus. In addition, 17 complete genomes were retrieved and the first two ungulate bocaparvovirus 3 from the United States. In Chapter 2, five batches of commercial equine sera originating in New Zealand (three batches), Brazil and the United States (one batch each) were investigated. In these sera, genomic sequences of the Flaviviridae, Herpesviridae and Parvoviridae families were detected. In particular, equine hepacivirus and pegivirus were the most frequent. In Chapter 3, seven batches of commercial bovine sera from New Zealand (two batches), Mexico (one batch) and the United States (four batches) were sequenced. Bovine sera showed genomes of the Adenoviridae, Flaviviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Pneumoviridae, Polyomaviridae, Poxviridae, Reoviridae, Retroviridae and circular Rep-encoding single-stranded (CRESS) DNA virus (Genomoviridae, Circoviridae e Smacoviridae). Twelve complete genomes of bovine parvovirus 2 and 3, bosavirus, bovine hokovirus and bovine polyomavirus 1 were recovered. Furthermore, sequences related to crAssphage, a bacteriophage associated with human fecal contamination, were detected. Therefore, the study illustrates the viral agents present in the pigs, horses, and cattle sera, seeking to contribute to the knowledge of the virome present in these animals sera and to help clarify possible causes of infectious etiology diseases.*

*Keywords: High-throughput sequencing, Virus, Cressdnviricota, Metagenomics.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática da estrutura e organização genômica de TTSuV...	20
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da estrutura e organização genômica de PRRSV..	23
<b>Figura 3</b> - Estrutura, organização do genoma e processamento de poliproteínas de membros do gênero <i>Hepacivirus</i> .....	26
<b>Figura 4</b> - Estrutura, organização genômica e processamento de poliproteína dos pegivírus.....	31
<b>Figura 5</b> - Estrutura, organização genômica e processamento de poliproteína dos pestivírus.....	35
<b>Figura 6</b> - Estrutura e organização genômica de três representantes da subfamília <i>Parvovirinae</i> .....	41
<b>Figura 7</b> - <i>Motifs</i> de sequência de proteínas Rep de vírus CRESS-DNA.....	50
<b>Figura 8</b> - Árvore filogenética de máxima verossimilhança não enraizada de proteínas Rep de vírus CRESS-DNA.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Espécies virais pertencentes ao gênero <i>Hepacivirus</i> .....	27
<b>Tabela 2</b> - Espécies virais pertencentes ao gênero <i>Pegivirus</i> .....	32
<b>Tabela 3</b> - Espécies virais pertencentes ao gênero <i>Pestivirus</i> .....	36
<b>Tabela 4</b> - Parvovírus suínos pertencentes à subfamília <i>Parvovirinae</i> .....	44
<b>Tabela 5</b> - Parvovírus bovinos pertencentes à subfamília <i>Parvovirinae</i> .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPV	Pestivírus atípico de suíno ( <i>atypical porcine pestivirus</i> )
BCS	Soro de bezerro bovino ( <i>bovine calf serum</i> )
BoHV	Herpesvírus bovino ( <i>bovine herpesvirus</i> )
BosaV	Bosavírus ( <i>Bosavirus</i> )
BPI3V	Vírus da parainfluenza bovina 3 ( <i>bovine parainfluenza type 3 virus</i> )
BRV	Rotavírus bovino ( <i>bovine rotavirus</i> )
BRV	Vírus da rinite bovina ( <i>bovine rhinitis virus</i> )
BPV	Parvovírus de bovino ( <i>bovine parvovirus</i> )
BRSV	Vírus sincicial respiratório bovino ( <i>bovine respiratory syncytial virus</i> )
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina ( <i>bovine viral diarrhea virus</i> )
CRESS-DNA	Circular Rep-encoding ssDNA
CSFV	Vírus da peste suína clássica ( <i>classical swine fever virus</i> )
CT	Tremor congênito ( <i>Congenital tremor</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EqHV	Hepacivírus equino ( <i>equine hepacivirus</i> )
EqPV	Parvovírus equino ( <i>equine parvovirus</i> )
EPgV	Pegivírus equino ( <i>equine pegivirus</i> )
FBS	Soro fetal bovino ( <i>fetal bovine serum</i> )
GP	Glicoproteína
HCV	Vírus da hepatite C ( <i>Hepacivirus C</i> )
HTS	Sequenciamento de alto desempenho ( <i>high-throughput sequencing</i> )
HV	Hepacivírus
IV	Vírus da influenza ( <i>Influenza virus</i> )
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral ( <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> )
IDV	Vírus influenza D ( <i>Influenza D virus</i> )
IRES	Sítio interno de entrada no ribossomo ( <i>internal ribosome entry site</i> )
kb	Quilobases ( <i>kilobases</i> )
M	Matriz
mRNAsg	RNA mensageiros subgenômicos

N	Nucleocapsídeo
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica ( <i>Nacional Center for Biotechnology Information</i> )
NCS	Soro bovino de recém-nascido ( <i>newborn calf serum</i> )
Nm	Nanômetros
NPHV	Hepacivírus de não primatas ( <i>non-primate hepacivirus</i> )
NS	Proteína não estrutural ( <i>non-structural protein</i> )
ORF	Fases de leitura aberta ( <i>open reading frame</i> )
PBoV	Bocavírus suínos ( <i>porcine bocavirus</i> )
PBuV	Bufavírus suíno ( <i>porcine bufavirus</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PCV	Circovírus suíno ( <i>porcine circovirus</i> )
PEDV	Vírus da diarreia epidêmica suína ( <i>porcine epidemic diarrhea virus</i> )
PgV	Pegivírus equino
PKV	Kobuvírus suíno ( <i>porcine kobuvirus</i> )
PMWS	Síndrome do definhamento multissistêmica pós-desmame ( <i>post-weaning multisystemic wasting syndrome</i> )
PPV	Parvovírus suíno ( <i>porcine parvovirus</i> )
PRRSV	Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína ( <i>porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i> )
PRVA	Rotavírus suíno A ( <i>Porcine rotavirus group A</i> )
Rep	Proteína da replicase
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>ribonucleic acid</i> )
RpRd	RNA polimerase RNA-dependente
SBV	Vírus Schmallenberg ( <i>Schmallenberg virus</i> )
ssDNA	Single strand DNA (DNA de fita simples)
TGEV	Vírus da gastroenterite transmissível ( <i>transmissible gastroenteritis virus</i> )
TTSuV	Torque teno sus virus
UTR	Região não codificadora ( <i>untranslated region</i> )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>2.1 Metagenômica viral</b> .....	17
<b>2.2 Agentes virais comumente identificados em soro suíno, equino e bovino</b> .....	19
2.2.1 Torque teno vírus suíno .....	19
2.2.2 Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos .....	22
2.2.3 Hepacivírus equino .....	25
2.2.4 Pegivírus equino .....	30
2.2.5 Pestivírus de bovino e suíno .....	33
2.2.6 Vírus da diarreia viral bovina .....	37
2.2.7 Pestivírus atípico de suíno .....	38
2.2.8 Parvovírus .....	39
2.2.9 Parvovírus de suínos .....	42
2.2.10 Parvovírus de bovinos .....	46
2.2.11 <i>Circular Rep-encoding single-stranded (CRESS) DNA viruses</i> .....	49
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	53
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	53
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	53
<b>4 ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	54
<b>4.1 Capítulo 1: Caracterização do viroma em soro de suínos de exposição saudáveis criados em Oklahoma demonstrou grande diversidade de vírus ssDNA</b> .....	55
<b>4.2 Capítulo 2: Caracterização dos genomas virais presentes em lotes comerciais de soro equino obtidos por sequenciamento de alto rendimento</b> .....	56
<b>4.3 Capítulo 3: Virome characterization in commercial batches of bovine serum from North America and New Zealand</b> .....	57
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	93
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	94

## 1 INTRODUÇÃO

Animais de produção como suínos, equinos e bovinos possuem uma histórica importância econômica e social. A carne suína é uma das principais fontes de proteína animal mais consumida no mundo e representa quase metade do consumo e da produção de carnes (MCGLONE, 2013). Os equinos devido a sua habilidade locomotora são utilizados para o lazer, esporte, equoterapia, força de tração no trabalho rural e fornecem hemoderivados para a produção de biológicos (WHO, 2016). Os bovinos são as principais fontes de carne e leite para a indústria. Além disso, também são usados como doadores de sangue para produção de soro aplicado na pesquisa e fabricação de vacinas (VAN DER VALK *et al.*, 2018). O Brasil possui o quarto maior rebanho comercial de suínos do mundo, terceiro de equinos e o segundo de bovinos, sendo que o agronegócio em torno dessas atividades gera muitos empregos diretos e indiretos (GILBERT *et al.*, 2018; USDA, 2016). Em vista disso, o monitoramento de enfermidades relacionadas a saúde animal e doenças com potencial zoonótico torna-se fundamental.

O advento do sequenciamento de alto desempenho (*high-throughput sequencing*, HTS), tem permitido a identificação e caracterização genética de agentes virais que não podem ser facilmente isolados em cultivo celular (CHEVAL *et al.*, 2011; LAMBERT *et al.*, 2018). Essa tecnologia tem proporcionado a detecção de agentes virais previamente desconhecidos, como um novo bocavírus em amostras de fezes de suínos aparentemente saudáveis (YU *et al.*, 2013), bufavírus em suínos domésticos (LIU *et al.*, 2016), circovírus associado à dermatite, síndrome de nefropatia e falha reprodutiva em suínos (PALINSKI *et al.*, 2017), parvovírus suíno 7 (*porcine parvovirus 7*, PPV-7) em amostras de suabe retal de suínos (PALINSKI; MITRA; HAUSE, 2016), vírus circulares de DNA associado às fezes suínas (CHEUNG *et al.*, 2013) e a identificação de pestivírus atípico de suíno (*atypical porcine pestivirus*, APPV) nos Estados Unidos (HAUSE *et al.*, 2015). Em equinos, o HTS permitiu a detecção de pegivírus equino (*pegivirus D e E*, EPgV-D e EPgV-E) (CHANDRIANI *et al.*, 2013; KAPOOR *et al.*, 2013a), hepacivírus equino (*equine hepacivirus*, EqHV) (LI *et al.*, 2015) e um recente parvovírus equino (*equine parvovirus*, EqPV) em amostras de soro e fígado de equino (DIVERS *et al.*, 2018). Além disso, foi encontrado vírus circular de DNA codificadores da proteína Rep em bovino com enterite hemorrágica na China (GUO *et al.*, 2018b), parvovírus de bovino em amostras de sangue de animais da região Sul do

Brasil (DE SOUZA *et al.*, 2018) e a detecção de rotavírus bovino A (*bovine rotavirus A, BRV-A*), em um caso de diarreia epizootica bovina (MASUDA *et al.*, 2014).

O continente asiático é a maior região produtora de carne suína do mundo, seguida pela União Europeia e pela América do Norte (USDA, 2016). Historicamente, os suínos foram criados em pequenos rebanhos em propriedades familiares de produção mista, sob padrões de biossegurança limitados (FAO/OIE/WB, 2010). Em resposta ao aumento da demanda por proteína animal, a produção de suínos passou de currais abertos para instalações fechadas com altos níveis de organização e integração entre os diferentes setores da cadeia de produção de alimentos suínos. Essa produção intensiva tornou-se o padrão para a indústria e apenas é possível com esforços restritos de biossegurança (LEVIS; BAKER, 2011). Nos Estados Unidos, a maioria dos rebanhos de suínos são criados em ambientes comerciais modernos. Entretanto, a criação de suínos de exposição para participar em eventos agrícolas também é uma atividade importante, principalmente na região Centro-Oeste dos Estados Unidos (KEY; MCBRIDE, 2007). Os suínos de exposição são geralmente criados em pequenos rebanhos em ambientes não comerciais para participar de eventos agrícolas. Esses suínos são comumente submetidos a treinamento, entrando em contato próximo com humanos e, possivelmente, com outros animais (KIRCHER; CARLSON, 2018). Durante os eventos agrícolas, animais de diferentes origens são misturados, aumentando ainda mais os riscos de transmissão de doenças. Independentemente do tipo de produção, os agentes virais são um risco constante para a indústria suína.

Os equinos são regularmente usados como doadores de sangue para a produção de lotes de soro equino comercial. Logo, esse produto biológico é uma opção ao soro fetal bovino (*fetal bovine serum, FBS*) utilizado como suplemento para cultivo celular e, conseqüentemente, para produção de vacinas (FRANKE *et al.*, 2014; SCHEEL *et al.*, 2015a; POSTEL *et al.*, 2016a). Além do mais, o soro equino também é aplicado na produção de anti-soros contra a toxina tetânica, difteria, veneno de cobra, raiva e outros patógenos onde a imunização passiva é necessária. Todavia, considerando que agentes virais transmitidos pelo sangue podem ser carregados pelos equinos doadores, a inocuidade deste produto biológico é relevante (CHANDRIANI *et al.*, 2013; RAMSAY *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2017; DIVERS *et al.*, 2018). Novos agentes virais como o EqHV, EPgV e o EqPV foram detectados em soro equino e ainda são investigados como uma suposta causa de doença hepática em equinos (POSTEL *et al.*, 2016a; DIVERS *et al.*, 2018). O EqHV é de particular interesse, pois é o mais relacionado geneticamente ao vírus da hepatite C humana (*hepatitis C virus*,



*HCV*), que é um dos agentes virais de humanos mais importantes associados à doença hepática (BURBELO *et al.*, 2012; SHEPARD; FINELLI; ALTER, 2005). O vírus associado à doença de Theiler (EPgV-D) pode ser o agente causador de uma hepatite aguda em equinos, associada à administração de hemoderivados de origem equina (CHANDRIANI *et al.*, 2013). O EPgV-E é geneticamente semelhante aos pegivírus de humanos, símios, morcegos e foi associado à viremia persistente em equinos (QUAN *et al.*, 2013; SIBLEY *et al.*, 2014). Esse vírus também pode ser uma causa ou fator contributivo a hepatopatia equina (KAPOOR *et al.*, 2013a).

O soro de bovino comercial é frequentemente empregado na pesquisa como suplemento para manutenção de cultivo celulares. Lotes desse produto biológico de diferentes categorias estão disponíveis no mercado, como o FBS, soro de bovino recém-nascido (*newborn calf serum, NCS*), soro de bezerro bovino (*bovine calf serum, BCS*) e soro de bovinos doadores (GSTRAUNTHALER & LINDL, 2013). Inicialmente, o FBS foi introduzido para estimular a propagação celular *in vitro* (PUCK; CIECIURA; ROBINSON, 1958). Posteriormente, o FBS vêm sendo amplamente utilizado como um suplemento universal em meios de cultivo celulares de humanos, animais, insetos na pesquisa e produção de vacinas (VAN DER VALK *et al.*, 2018). Contudo, considerando que os agentes virais podem ser transmitidos através do sangue de animais doadores, a qualidade dos produtos biológicos de origem bovina é indispensável. Investigações conduzidas em FBS, NCS, BCS e soro de bovinos doadores encontraram sequências relacionadas principalmente para o vírus da diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhoea virus, BVDV*) e parvovírus de bovino (*bovine parvovirus, BPV; Bosavirus, BosaV*) (GAGNIEUR *et al.*, 2014; SADEGHI *et al.*, 2017; TOOHEY-KURTH; SIBLEY; GOLDBERG, 2017). O BVDV tem sido associado principalmente a doença respiratória, digestiva e reprodutiva de bovinos (KHODAKARAM-TAFTI; FARJANIKISH, 2017). Os parvovírus de bovinos causam particularmente disfunção reprodutiva em bovinos prenhes e doenças respiratórias e digestivas em animais com poucos dias de idade (WANG *et al.*, 2019).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o viroma do soro de suínos de exposição aparentemente saudáveis criados em Oklahoma nos Estados Unidos e lotes de soro equino e bovino comerciais de diferentes origens. Os dados produzidos por este estudo agregam informações para suprir a carência de trabalhos que determinem a biossegurança de produtos biológicos de origem equina e bovina. Além disso, análises metagenômicas foram realizadas para a caracterização dos genomas virais recuperados dos soros de suínos, equinos e bovinos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Metagenômica viral

A metagenômica é definida como a análise genética direta de genomas contidos em uma amostra (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012). Em virtude disso, o viroma é definido como a população total de vírus presente na amostra. Dessa forma, a detecção de viromas tem sido usada para identificar agentes virais causadores de doenças em medicina veterinária (BELÁK *et al.*, 2013; TEMMAM *et al.*, 2014). Análises metagenômicas virais de ambientes complexos geralmente requerem etapas de pré-tratamento, como purificação viral e enriquecimento de ácido nucléico, antes do sequenciamento (DE BRUIJN, 2011). Normalmente, a preparação do viroma baseia-se na filtração, precipitação através da ultracentrifugação, digestão por nucleases de células virais e hospedeiras não protegidas, seguida de extração de ácido nucléico (THURBER *et al.*, 2009; HALL *et al.*, 2014). Estas estratégias adotadas têm por objetivo de purificar os vírus de suas matrizes complexas (STANG *et al.*, 2005).

Os principais passos para o estudo dos viromas são o enriquecimento de partículas virais de uma amostra e o desempenho da amplificação aleatória, se o material de partida precisar ser enriquecido antes da preparação da biblioteca do HTS (REYES *et al.*, 2012; PARRAS-MOLTÓ *et al.*, 2018). A baixa quantidade de material genético de uma amostra geralmente requer uma etapa de amplificação (CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2015). Assim, a amplificação aleatória de material genético viral é crucial na metagenômica viral para obter material de entrada suficiente para o HTS (THURBER *et al.*, 2009).

Os métodos HTS são complementares aos métodos diagnósticos convencionais e são usados para aplicações em nichos, consistindo em uma ferramenta poderosa para enfrentar os desafios de infecções virais (BARZON *et al.*, 2013). À medida que novas tecnologias HTS continuam a surgir, a área da metagenômica se adaptou aos novos tipos de dados recuperados do sequenciamento (SCHOLZ; LO; CHAIN, 2012; BRAGG & TYSON, 2014). No entanto, cada tecnologia HTS tem vantagens e desvantagens que devem ser abordadas para permitir o uso adequado de dados de sequenciamento de metagenoma (HAKEEM; TOMBULOĞLU; TOMBULOĞLU, 2016).

O HTS tem permitido a identificação de agentes conhecidos e desconhecidos em vários tipos de amostras de diversas espécies de animais. Inclusive, através dessa tecnologia foi possível

realizar um levantamento de vírus nas fezes de suínos sob sistema de criação intensiva, revelando coinfeções com conjunto altamente diversificado de vírus (kobuvírus, astrovírus, enterovírus, sapovírus, sapelovírus, coronavírus, bocavírus e teschovírus) (SHAN *et al.*, 2011a). Outro estudo utilizando esta abordagem em amostras de soro suíno, detectou o vírus da peste suína africana, torque teno vírus, retrovírus e o vírus Ndumu em suínos domésticos na Uganda (MASEMBE *et al.*, 2012). Além disso, o emprego dessa ferramenta demonstrou a presença do parvovírus suíno 4 (*porcine parvovirus 4, PPV-4*) em amostras de soro suíno africano selvagem (BLOMSTRÖM *et al.*, 2012). Amostras fecais de javalis da Hungria, foram analisadas por meio de metagenômica viral e foi verificado que o kobuvírus suíno (*porcine kobuvirus, PKV*) estava circulando nos javalis selvagens (REUTER *et al.*, 2013). Do mesmo modo, foi realizada a identificação do APPV em amostras de soro suínos nos Estados Unidos (HAUSE *et al.*, 2015).

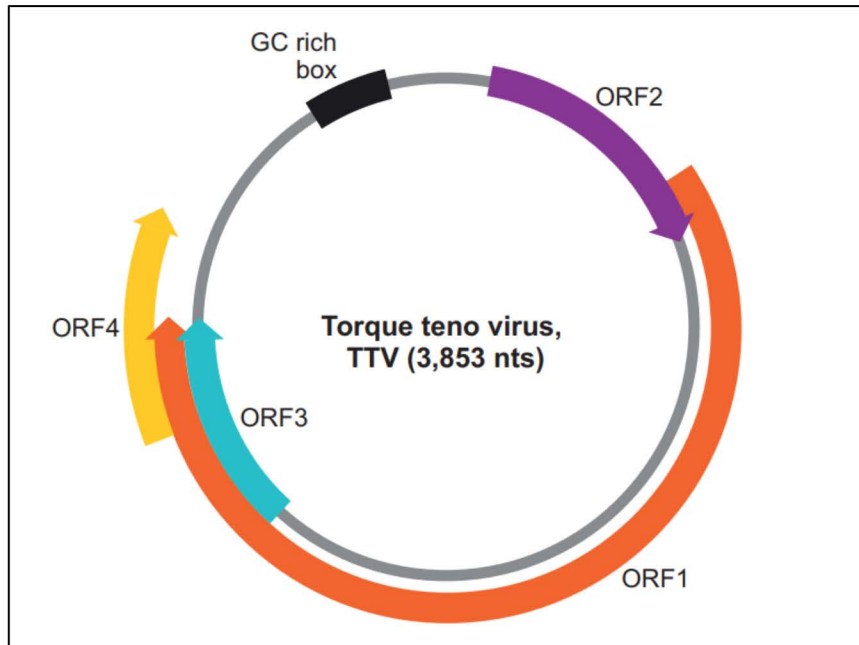
A metagenômica viral também foi utilizada para caracterizar hepacivírus, herpesvírus e um novo parvovírus em líquido cefalorraquidiano de equinos com sinais neurológicos (LI *et al.*, 2015). Igualmente, o uso desse método permitiu a descoberta do ortobuniavírus denominado de vírus Schmallerberg (*Schmallerberg virus, SBV*) em amostras de sangue de bovinos leiteiros com sinais clínicos na Alemanha (HOFFMANN *et al.*, 2012). Também, através da aplicação de metagenômica viral para tecido cerebral de bovino, foi possível recuperar o genoma completo de um novo astrovírus associado a doença neurológica em bovinos (LI *et al.*, 2013). Da mesma forma, a utilização do sequenciamento metagenômico viral para explorar o viroma de amostras de suabe nasal de bovinos, revelou a presença de vírus da rinite bovina A e B (*bovine rhinitis A virus, BRAV*; *bovine rhinitis B virus, BRBV*) do vírus influenza D (*Influenza D virus, IDV*), BVDV, herpesvírus bovino 1 (*bovine herpesvirus 1, BoHV-1*), vírus sincicial respiratório bovino (*bovine respiratory syncytial virus, BRSV*) e o vírus da parainfluenza bovina 3 (*bovine parainfluenza type 3 virus, BPI3V*) associados a doença respiratória bovina (*bovine respiratory disease, BRD*) (MITRA *et al.*, 2016; NG *et al.*, 2015). Além do mais, o emprego da metagenômica viral permitiu descrever vários novos vírus da influenza A (*Influenza A virus, IAV*) em amostras de fezes de morcegos na China (ZHENG *et al.*, 2018). Portanto, o desenvolvimento dos métodos moleculares de sequenciamento, sua aplicação e aprimoramento têm possibilitado a identificação de sequências genômicas dos mais diversos agentes virais.

## 2.2 Agentes virais comumente identificados em soro suíno, equino e bovino

### 2.2.1 Torque teno vírus suíno

O torque teno vírus suíno também conhecido como *torque teno sus virus* (TTSuV) é membro da família *Anelloviridae*, dividido em dois gêneros: *Iotatorquevirus* que compreende as espécies de *Torque teno sus virus 1a* (TTSuV-1a) e *Torque teno sus virus 1b* (TTSuV-1b) e o gênero *Kappatorquevirus* que compreende as espécies de *Torque teno sus virus k2a* (TTSuV-k2a) e *Torque teno sus virus k2b* (TTSuV-k2b) (LEFKOWITZ *et al.*, 2018). As espécies de TTSuV-1 e TTSuV-2 possuem vírions esféricos com aproximadamente 30 nanômetros (nm) de diâmetro e não apresentam envelope. O genoma consiste de uma molécula de DNA circular de fita simples de polaridade negativa de aproximadamente 2,9 quilobases (*kilobases, kb*) de tamanho (KING *et al.*, 2012a; OKAMOTO *et al.*, 2002). O genoma possui uma região não codificadora (*untranslated region, UTR*) e uma região codificadora constituída por fases de leitura aberta (*open reading frame, ORF*) (OKAMOTO *et al.*, 2002). A UTR do genoma apresenta uma região rica em G+C curta, que forma uma estrutura em alça (*stem loop*), importante na regulação da replicação e transcrição e *enhancers* e *promoters* que possuem diferentes atividades transcricionais dependendo da linhagem celular em que o vírus se replica (OKAMOTO *et al.*, 2002; KAMADA *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2004). A região codificadora do genoma é formada principalmente pela ORF-1, sobreposta parcialmente a ORF-2, ORF-1/1 e ORF-2/2. A ORF-1/1 e 2/2 são transcritas em mRNA que sofre *splicing*. A ORF-1/1 compartilha N- e C-terminal idênticos a ORF-1, ao passo que a ORF-2/2 compartilha o mesmo códon de iniciação da ORF-2 e permanece na mesma ORF após *splicing* (HUANG *et al.*, 2010a). Acredita-se que ORF1 codifica para proteína do capsídeo putativa e replicase associada. A ORF-2 codifica uma proteína com característica de tirosina fosfatase e a ORF-2/2, conhecida anteriormente como ORF-3 codifica para uma proteína não estrutural de função desconhecida (BIAGINI, 2009; KEKARAINEN & SEGALÉS, 2012). A estrutura e organização genômica dos TTSuVs está demonstradas na Figura 1.

**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura e organização genômica de TTSuVs. O tamanho do genoma circular é dado em nucleotídeos. As setas fechadas representam a ORF-1 (laranja), ORF-2 (roxo), ORF-3 (azul), ORF-4 (amarelo) e a região rica em G+C representada pelo retângulo (preto).



Fonte: Adaptado de KING *et al.*, (2012a).

A variabilidade genética é encontrada principalmente na ORF-1 dos anellovírus. Esta região codificadora apresenta regiões hipervariáveis caracterizadas por várias inserções, deleções e diversidade de aminoácidos entre isolados de TTSuV maior que 70% foram relatados (MANZIN *et al.*, 2015). Análise das sequências de nucleotídeos da ORF-1 demonstrou ser um representante adequado do genoma para investigação da variabilidade genética de anellovírus que infectam suínos. Logo, esta região codificadora tem sido amplamente utilizada para classificação genotípica dos TTSuVs (BIAGINI, 2009; HUANG *et al.*, 2010; CORNELISSEN-KEIJSERS *et al.*, 2012). Segundo a proposta taxonômica do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV*), TTSuVs podem ser classificados como membros da mesma espécie se suas ORFs-1 compartilharem mais de 35% de identidade de sequência de nucleotídeos. Esses vírus podem ser atribuídos no mesmo gênero se suas sequências de nucleotídeos agruparem como uma linhagem monofilética robusta com base em sua sequência de nucleotídica completa da ORF-1 para à família *Anelloviridae*. Além do mais, a ORF-1 de membros do mesmo gênero devem possuir mais de 56% de identidade de sequência de nucleotídeos entre os

membros. Inclusive, os isolados de TTSuVs pertencentes à genótipos homólogos ou heterólogos, demonstram vários sítios de recombinação, grande parte localizados na UTR (WOROBNEY, 2000). A coinfeção com isolados de genótipos diferentes é muito frequente em humanos, assim como, a coinfeção com TTSuVs em suínos (DE ARRUDA LEME *et al.*, 2013; MAGGI *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2013). Desse modo, é possível que a transmissão interespecie de TTVs entre humanos e animais possa contribuir para à variabilidade genética do vírus (OKAMOTO, 2009).

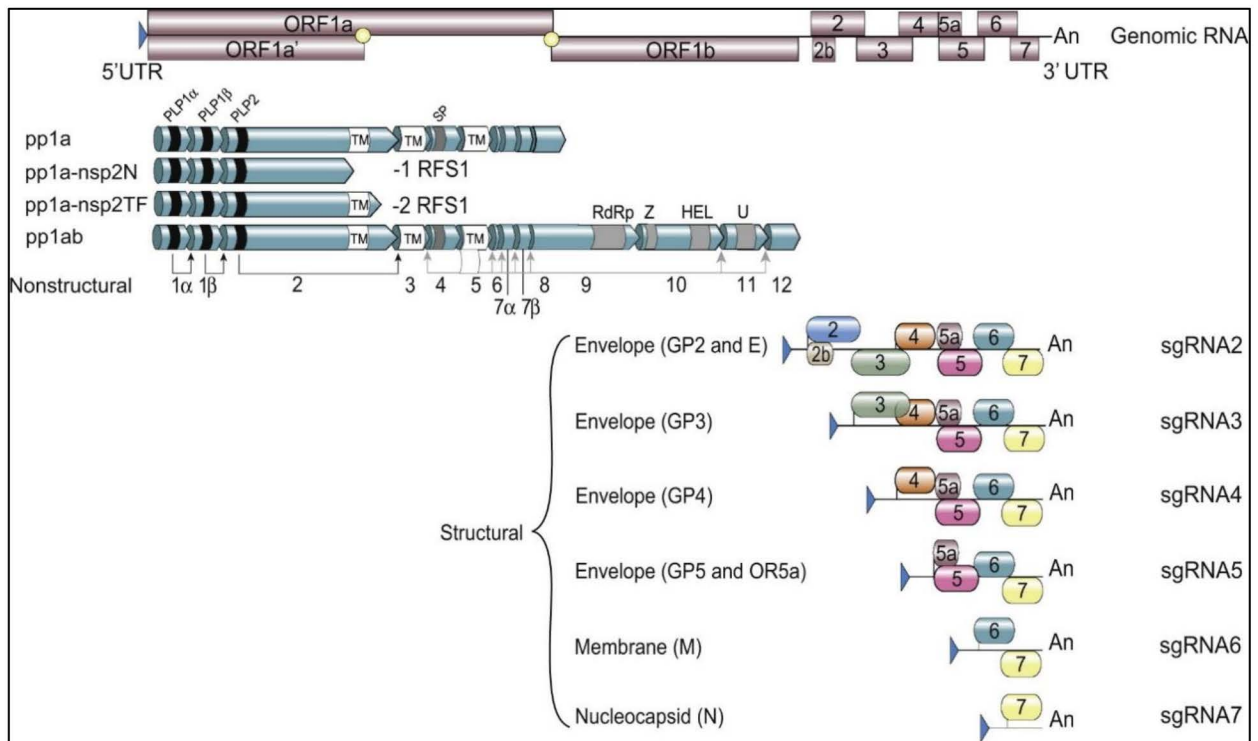
O relato da primeira infecção pelo TTV foi em humano que desenvolveu hepatite pós-transfusão sanguínea, de etiologia desconhecida (NISHIZAWA *et al.*, 1997). Posteriormente, em 2002 o genoma do TTSuV foi isolado de soro suíno e sequenciado pela primeira vez no Japão (OKAMOTO *et al.*, 2002). Desde então, a presença do TTSuV tem sido encontrada no soro de suínos em todo o mundo com taxas de prevalência variando de 11% a 100% (MCKEOWN *et al.*, 2004; BIGARRÉ *et al.*, 2005; KEKARAINEN; SIBILA; SEGALÉS, 2006; TAIRA *et al.*, 2009; GALLEI *et al.*, 2010; BLOIS *et al.*, 2014), em animais de várias idades, localizações geográficas e granjas com diferentes *status* sanitário, comprovando que se trata de um vírus ubíquo amplamente distribuído nos rebanhos suínos.

Embora a principal forma de transmissão do TTSuV seja aparentemente a via horizontal (fecal-oral), o modo vertical (transplacentário/intra-uterino) também se mostrou importante na disseminação do vírus (POZZUTO *et al.*, 2009; MARTÍNEZ-GUINÓ; KEKARAINEN; SEGALÉS, 2009; MARTÍNEZ-GUINÓ *et al.*, 2010). O TTSuV tem sido detectado em diversos tecidos, incluindo fígado, cérebro, soro, sêmen, secreção nasal, linfonodo, coração, fígado, medula óssea, pulmão e baço (ROGERS *et al.*, 2017). Além do mais, o TTSuV também foi identificado em amostras da bile de suínos (MONINI *et al.*, 2016). Esse vírus pode infectar uma proporção relativamente alta de animais suscetíveis (SIBILA *et al.*, 2009). Apesar disso, não houve correlação direta entre a infecção pelo TTSuV e a manifestação de doença clínica específica. Entretanto, foi relatada a coinfeção com outros patógenos virais, principalmente o circovírus suíno 2 (*porcine circovirus*, PCV-2). Provavelmente, o TTSuV contribua para o desenvolvimento e aumento da gravidade das doenças que acometem os suínos (NIETO *et al.*, 2015). Além disso, outro estudo demonstrou que o TTSuV pode desencadear o processo de patogênese da síndrome do deprimimento multissistêmica pós-desmame (*post-weaning multisystemic wasting syndrome*, PMWS) causada pelo PCV-2 (ZHENG *et al.*, 2018). No entanto, ainda não foi esclarecido se a coinfeção contribui para a PMWS (OZAWA *et al.*, 2015).

### 2.2.2 Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos

O vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína (*porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, *PRRSV*) é um membro da Família *Arteriviridae*, subfamília *Variarterivirinae*, gênero *Betaarterivirus*. O gênero está dividido em dois subgêneros, *Eurpobartevirus* que compreende as espécies de *Betaarterivirus suidae 1* (PRRSV-1) e o subgênero *Ampobartevirus* que inclui as espécies de *Betaarterivirus suidae 2* (PRRSV-2) (ZHANG *et al.*, 2019). Os viriões são relativamente pequenos, esféricos, icosaédricos e envelopados, com aproximadamente 60 nm de diâmetro. O genoma consiste de uma molécula de RNA de fita simples, de sentido positivo, com cerca de 15 kb de comprimento (DOKLAND, 2010). O genoma possui pelo menos dez ORFs flanqueadas por uma região líder na extremidade 5' e uma região UTR na extremidade 3' seguida por uma cauda poliadenilada (poli-A). Na extremidade 5', as proteínas não-estruturais codificadas pela ORF-1a e ORF-1b, possuem funções de protease, replicase e modulação do gene hospedeiro. A extremidade 3' do genoma codifica pelo menos oito proteínas estruturais que são produzidas pela tradução de um grupo de RNA mensageiros subgenômicos (mRNAsg), gerados pela transcrição da cópia de RNA de sentido antígenômico, uma característica marcante do gênero. As principais proteínas estruturais são a glicoproteína 5 (GP5), matriz (M) e nucleocapsídeo (N) codificadas pela ORF-5, ORF-6 e ORF-7, respectivamente. A glicoproteína 2 (GP2), glicoproteína 3 (GP3) e a glicoproteína 4 (GP4) são proteínas de superfície menores derivadas da ORF-2a, ORF-3 e ORF-4, respectivamente. Duas proteínas não glicosiladas muito pequenas, E e 5a são traduzidas da ORF-2b e ORF-5a, respectivamente (WU *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 2011). A estrutura e organização genômica do PRRSV está demonstrada na Figura 2.

**Figura 2.** Representação esquemática da estrutura e organização genômica de PRRSV. A expressão da ORF-1a e ORF-1b produz poliproteínas (pp1a, pp1a-nsp2N, pp1a-nsp2TF e pp1ab) por meio de dois *ribosomal frameshift* (RFS) (retângulo em preto). As poliproteínas são co- e pós-a tradução processadas em 16 proteínas não estruturais (nsps) de replicase (accessória) por quatro proteases codificadas pelo vírus PLP1 $\alpha$ , PLP1 $\beta$ , PLP2 e SP. *Motifs* de polimerase reconhecidos em pp1b são à RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), o domínio de zinco (Z), helicoidal (HEL) e o da endoribonuclease específica do uridilato de nidovírus (NendoU, U). Proteínas estruturais são expressas por meio de um conjunto de RNAs subgenômicos (sgRNA, 2-7) por meio de uma estratégia de transcrição co-terminal através de intermediário de fita de sentido negativo.



Fonte: Adaptado de KAPPES; FAABERG, (2015).

A alta diversidade genética é uma característica significativa do PRRSV (GUO *et al.*, 2018a). Os genótipos de PRRSV compartilham identidade de sequência em torno de 55-70% a nível de nucleotídeos e 50-80% de similaridade de aminoácidos em seus vários genes (SUÁREZ *et al.*, 1996; NELSEN; MURTAUGH; FAABERG, 1999). Para o PRRSV, análise da diversidade genética mais comumente aplicada é baseada na ORF-5 do genoma (KAPUR *et al.*, 1996; WESLEY *et al.*, 1998). A ORF-5 codifica a principal proteína do envelope (GP5), que desempenha um papel importante na indução de anticorpos neutralizantes de vírus e na proteção cruzada entre as variantes de PRRSV (DEA *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2013). Além disso, a ORF-5 é frequentemente utilizada em análises de diversidade genética devido a sua alta variabilidade (DORTMANS *et al.*, 2019; PAPLOSKI *et al.*, 2019). Em vista disso, foi elaborado um sistema de



investigação da diversidade genética de PRRSV com base na análise filogenética abrangente de sequência da ORF-5. De acordo com as análises genéticas, o genótipo de PRRSV-1 pode ser segregado em 4 subtipos (1-4) e o PRRSV-2 em 9 linhagens (1-9) com várias sub-linhagens (1.1-1.9, 5.1-5.2, 8.1-8.9 e 9.1-9.17) (SHI *et al.*, 2010a, SHI *et al.*, 2010b).

O PRRSV foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos em 1987 e, posteriormente, na Europa em 1990. De modo geral, os isolados de PRRSV-1 são restritos ao continente Europeu, enquanto que os isolados de PRRSV-2 a América do Norte (WENSVOORT *et al.*, 1991; KEFFABER, 1989). Porém, os isolados de PRRSV-1 já foram identificados na América do Norte e Ásia e os isolados de PRRSV-2 na Europa e na Ásia (RAEV *et al.*, 2020). Atualmente, o PRRSV tem ocorrido na maioria das principais áreas de produção de suínos em todo o mundo (HOLTKAMP *et al.*, 2013).

Aparentemente, os suínos domésticos e selvagens são os únicos hospedeiros naturalmente susceptíveis a infecção pelo PRRSV (MURTAUGH *et al.*, 2010). O vírus é transmitido principalmente por contato direto, mas também pode ocorrer através do contato indireto (WILLS *et al.*, 1997). Inclusive, também existe a possibilidade da transmissão do vírus por meio de fômites, vetores e até mesmo pela propagação aérea em curtas distâncias (CHO; DEE, 2006). Os suínos infectados podem excretar o vírus através da saliva, secreções nasais, urina, sêmen, secreções mamárias e fezes (ROSSOW *et al.*, 1994; WILLS *et al.*, 1997). A doença é caracterizada por duas síndromes associadas ao PRRSV. A primeira, síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos, caracterizada principalmente por falhas reprodutivas em matrizes suínas e doenças respiratórias em animais de todas as idades (LI *et al.*, 2011). A segunda, falhas reprodutivas, caracterizada por infertilidade, mumificação fetal, abortos, natimortos, nascimento de suínos fracos, doença respiratória e infecções secundárias (LUDEMANN; LAGER, 2008). A síndrome respiratória é reconhecida por respiração difícil, febre, perda de apetite, descoloração vermelha do corpo e orelhas azuis (DIETZE *et al.*, 2011). As orelhas azuis são apenas um sinal transitório da doença em decorrência da restrição de suprimento sanguíneo (OIE, 2018). Os suínos mais jovens são mais afetados do que os animais mais velhos. De modo frequente, a mortalidade é alta porém, na maioria dos casos, a infecção pode passar despercebida do ponto de vista clínico (PRIETO; CASTRO, 2005).

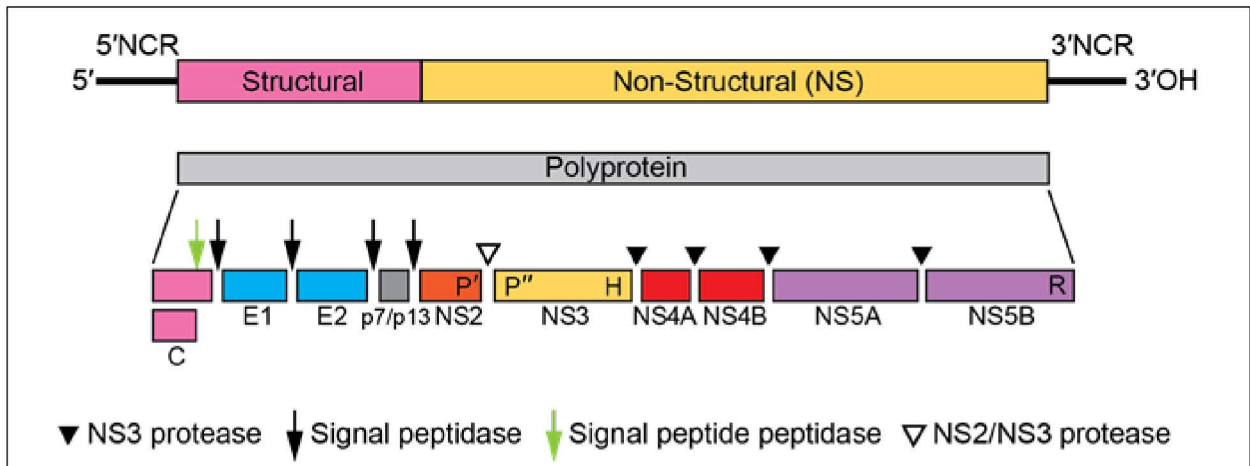
### 2.2.3 Hepacivírus equino

O EqHV também conhecido como hepacivírus de não primatas (*non-primate hepacivirus*, *NPHV*) e *Hepacivirus A (HVA)* é membro da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*. Todos os membros do gênero possuem vírions esféricos com aproximadamente 40 a 60 nm de diâmetro com um envelope. O genoma consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva, que varia entre 8,9 a 10,5 kb. Esta molécula de RNA apresenta duas regiões não codificantes próximas as extremidades 5' e 3' e possui uma única grande ORF que codifica uma poliproteína. As proteínas estruturais são codificadas no terço próximo a extremidade 5', enquanto que as proteínas não estruturais localizam-se nos dois terços da extremidade 3' do genoma viral (SIMMONDS *et al.*, 2017a). O início da tradução ocorre através de um sítio interno de entrada no ribossomo (*internal ribosome entry site, IRES*) situado na extremidade 5'. Dessa forma, a ORF é traduzida em uma longa poliproteína de aproximadamente três mil aminoácidos, clivada em proteínas individuais a medida que é produzida. Por ação de proteases celulares e virais, essa poliproteína é clivada durante e após a tradução, originando as proteínas estruturais e proteínas não estruturais (SIMMONDS *et al.*, 2017a). Como o genoma do HCV, o genoma do EqHV contém três proteínas estruturais (C, E1 e E2) e sete proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (BURBELO *et al.*, 2012).

As proteínas estruturais (C, E1 e E2) são utilizadas na montagem e construção da progênie viral. As proteínas não estruturais (NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) auxiliam no processo de clivagem da poliproteína e atuam na replicação do genoma. A proteína adicional p7 do canal iônico é importante para montagem viral, sendo parcialmente clivada de um precursor de E2 para produzir E2-p7 e p7 (SHANMUGAM; YI, 2013). No GB vírus B (GBV-B), a proteína correspondente p13, é clivada para proteínas p7 e p6 (TAKIKAWA *et al.*, 2006). Com exceção da clivagem peptidase sinal p7-NS2, as proteases virais clivam todas as proteínas não estruturais (NEDDERMANN *et al.*, 1997; GOFFARD; DUBUISSON, 2003; CARRÈRE-KREMER *et al.*, 2004). A proteína não estrutural NS2 faz parte da protease de cisteína dependente de Zn que liga NS2 e NS3. Além disso, atua na clivagem autocatalítica da ligação NS2-NS3, participa na montagem e liberação do vírus (WELBOURN *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2007). A NS3 apresenta atividade adicional de serina protease, helicase e nucleosídeo trifosfatase. NS4A é um cofator importante para atividade da serina protease NS3. Já, a proteína NS4B induz o complexo de replicação membranoso no retículo

endoplasmático (GOUTTENOIRE; PENIN; MORADPOUR, 2010; MORIKAWA *et al.*, 2011). NS5A é uma fosfoproteína serina de função específica desconhecida, mas contribui para replicação e montagem viral. E a proteína não estrutural NS5B possui atividade de RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) (MOTTOLA *et al.*, 2002; MURRAY; JONES; RICE, 2008). Além disso, recentemente foi determinada a extremidade 3' completa de HVA e consiste em tratos homopoliméricos intercalados e uma cauda poli-A na extremidade 3' do tipo HCV. A tradução do HVA é estimulada pelo miR-122 e pela 3' similar ao HCV (SCHEEL *et al.*, 2015a). A estrutura e organização genômica dos hepacivírus está apresentada na Figura 3.

**Figura 3.** Estrutura, organização do genoma e processamento de poliproteínas de membros do gênero *Hepacivirus*. Retângulos em coloridos abaixo do genoma indicam proteínas virais geradas pelo processamento proteolítico. As proteases hospedeiras e virais envolvidas na clivagem da poliproteína estão indicadas. A clivagem pela peptidase peptídica sinal hospedeira é indicada por uma seta verde. As clivagens por peptidase sinal hospedeira são indicadas por setas cheias. As localizações da protease NS2-3, protease NS3, helicase NS3 RNA e NS5B RdRP são indicadas por P', P'', H e R, respectivamente. Região não codificante (NCR), capsídeo (C), glicoproteínas do envelope (E1 e E2), proteínas adicionais (p7/p13), protease (NS2), helicase (NS3), proteínas não estruturais (NS4A, NS4B e NS5A) e RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) (NS5B).



Fonte: Adaptado de ICTV ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/Flaviviridae/362/genus-hepacivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/Flaviviridae/362/genus-hepacivirus)).

O conhecimento da diversidade genética dos hepacivírus tem aumentado nos últimos anos, através da descoberta de vírus relacionados ao HCV em morcegos, bovinos, equinos, primatas e roedores (THÉZÉ *et al.*, 2015). Desse modo, as espécies do gênero *Hepacivirus* são atribuídas com base na divergência das regiões codificadoras para NS3 e NS5B (SMITH *et al.*, 2016). Em vista disso, análises filogenéticas tem sido realizadas principalmente com porções dessas ORFs

(KAPOOR *et al.*, 2011; THÉZÉ *et al.*, 2015). Assim, as relações filogenéticas observadas para essas duas regiões do genoma são consistentes com a divisão do gênero *Hepacivirus* em quatorze espécies, denominadas de *Hepacivirus A* a *N* (SMITH *et al.*, 2016) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Espécies virais pertencentes ao gênero *Hepacivirus* de acordo com a classificação designada pelo ICTV.

<b>Espécie</b>	<b>Nome</b>	<b>Sigla</b>	<b>Referência</b>
<i>Hepacivirus A</i>	Hepacivírus de não primata	NPHV	(SCHEEL <i>et al.</i> , 2015)
<i>Hepacivirus B</i>	GB virus B	GBV-B	(SIMONS <i>et al.</i> , 1995)
<i>Hepacivirus C</i>	Genótipo 1a do vírus da hepatite C	HCV-1a	(CHOI; XU; OU, 2003)
<i>Hepacivirus D</i>	Hepacivírus de guereza	GHV	(LAUCK <i>et al.</i> , 2013)
<i>Hepacivirus E</i>	Hepacivírus de roedor	RHV-E	(KAPOOR <i>et al.</i> , 2013b)
<i>Hepacivirus F</i>	Hepacivírus de roedor	RHV-F	(DREXLER <i>et al.</i> , 2013)
<i>Hepacivirus G</i>	Hepacivírus 1 de rato da Noruega	NRHV-1	(PFAENDER <i>et al.</i> , 2014)
<i>Hepacivirus H</i>	Hepacivírus 2 de rato da Noruega	NRHV-2	
<i>Hepacivirus I</i>	Hepacivírus de roedor	RHV-I	(DREXLER <i>et al.</i> , 2013)
<i>Hepacivirus J</i>	Hepacivírus de roedor	RHV-J	
<i>Hepacivirus K</i>	Hepacivírus de morcego	BHV-K	
<i>Hepacivirus L</i>	Hepacivírus de morcego	BHV-L	(QUAN <i>et al.</i> , 2013)
<i>Hepacivirus M</i>	Hepacivírus de morcego	BHV-M	
<i>Hepacivirus N</i>	Hepacivírus de bovino	BoHV	(BAECHLEIN <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Adaptada de ICTV ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/Flaviviridae/362/genus-hepacivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/Flaviviridae/362/genus-hepacivirus)).

No entanto, a baixa diversidade genética de EqHV implica na infecção relativamente recente de hepacivírus em equinos, tornando improvável uma derivação de EqHV do HCV. Além disso, os equinos são geneticamente relacionados aos asnos (*Equus asinus*), e o EqHV pode ter coevoluído com essa espécie hospedeira. Em contraste, o EqHV é altamente conservado e foi classificado em três subtipos com base na análise genética do genoma parcial (5'NCR, NS3 e

NS5B) ou completo (poliproteína) (PRONOST *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2019). Em vista disso, as investigações filogenéticas de EqHV são conduzidas com base nessas regiões codificadoras, consideradas mais conservadas em relação a outras partes do genoma.

Além das diferenças na organização genômica, os hepacivírus diferem de outros membros da família *Flaviviridae* pela sua capacidade limitada de propagação em cultivo celular. Poucas cepas adaptadas de HCV infectam eficazmente uma única linhagem celular de hepatoma humano (Huh7) (SAINZ *et al.*, 2012; TEIMOURPOUR *et al.*, 2015). Desde o primeiro relato da infecção pelo EqHV nos Estados Unidos (BURBELO *et al.*, 2012), a presença do vírus tem sido detectada no soro de equinos no Reino Unido (LYONS *et al.*, 2012), Brasil (GEMAQUE *et al.*, 2014), Japão (TANAKA *et al.*, 2014), Alemanha (PFAENDER *et al.*, 2015), China (LU *et al.*, 2016a), França (PRONOST *et al.*, 2017) e África (BADENHORST *et al.*, 2018). Além do mais, o EqHV tem sido frequentemente detectado em lotes comerciais de soro equino (SCHEEL; SIMMONDS; KAPOOR, 2015b; POSTEL *et al.*, 2016a). O EqHV possui tropismo e capacidade de produzir doença hepática após infecção natural e experimental em equinos (REUTER *et al.*, 2014; RAMSAY *et al.*, 2015; GATHER *et al.*, 2016a; GATHER *et al.*, 2016b; PFAENDER *et al.*, 2015; PFAENDER *et al.*, 2017; WALTER *et al.*, 2017). Infecções experimentais conduzidas em equinos, permitiram analisar o curso clínico da infecção causada por EqHV, demonstrando evidências de quadros agudos e crônicos da infecção (RAMSAY *et al.*, 2015). Análises de fígado equino infectado não demonstraram evidências de doença grave. Embora, a presença de vírus em animais com infecção aguda tenha sido relacionada ao aumento transitório nos níveis de enzimas hepáticas específicas do sangue, sugerindo inflamação hepática. Além disso, amostras dos tecidos de equinos infectados com EqHV analisadas tiveram o RNA viral detectado apenas em hepatócitos. Igualmente, outro achado mostrou que a inoculação experimental de equino com EqHV causou o desenvolvimento de doença hepática aguda e sinais de inflamação hepática (SCHEEL; SIMMONDS; KAPOOR, 2015b). Do mesmo modo, a infecção experimental de equinos produziu doença hepática aguda e crônica, associada a níveis elevados de enzimas hepáticas e sinais de lesão hepatocelular (RAMSAY *et al.*, 2015). Portanto, esses achados sugerem que a ocorrência natural da infecção e o tropismo tecidual de EqHV em equinos são muito similares aos do HCV em humanos (PARK; REHERMANN, 2014). Ao que tudo indica, os humanos são os hospedeiros naturais e reservatório de HCV, ainda que o vírus seja transmitido experimentalmente aos chimpanzés (PFAENDER *et al.*, 2014). Entre humanos, o HCV é transmitido principalmente pela exposição a sangue

contaminado, sendo as vias de transmissão de outros hepacivírus pouco compreendidas mas, é provável que sejam parenterais (SIMMONDS, 2013). Não há nenhum vetor invertebrado conhecido para HCV ou qualquer outro hepacivírus (MOREIRA-SOTO *et al.*, 2020).

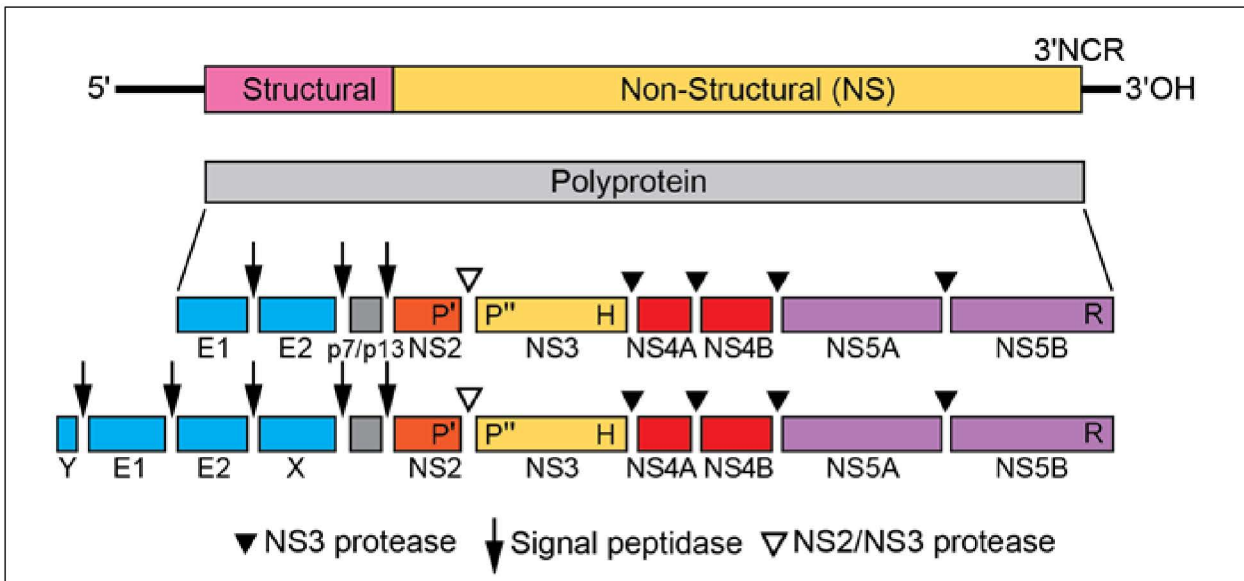
A hepatite do soro, também conhecida como doença de Theiler, hepatite pós-vacinal ou hepatite aguda idiopática, é uma das causas mais comuns de hepatite aguda e insuficiência hepática em equinos (PANCIERA, 1969; MESSER; JOHNSON, 1994; GUGLICK *et al.*, 1995; STURGEON, 2017). Considerada uma doença grave frequentemente fatal de equinos adultos descrita inicialmente na África do Sul, após a vacinação com vírus vivo e antissoro equino contra a peste equina africana (THEILER, 1919). Os primeiros casos de hepatite do soro em equinos foram descritos nos Estados Unidos durante uma epidemia de encefalomielite equina ocidental (MEYER, 1933; MARSH, 1937b). Posteriormente, surtos e mais casos foram identificados na América do Norte e Europa (CHANDRIANI *et al.*, 2013; TOMLINSON *et al.*, 2018; TOMLINSON *et al.*, 2019). Apesar da causa da hepatite do soro ainda não esteja esclarecida (BERGERO; NERY, 2008), a doença tem sido associada a administração de produtos biológicos derivados do soro sanguíneo de equinos (CHANDRIANI *et al.*, 2013; DIVERS *et al.*, 2018; TOMLINSON *et al.*, 2019). Recentemente, o EqHV foi proposto como um dos agentes virais potencialmente envolvido na causa da hepatite do soro equino (TOMLINSON *et al.*, 2018).

O desenvolvimento da hepatite do soro em equinos, exibem um rápido início de sinais indicativos de insuficiência hepática aguda. As manifestações clínicas incluem letargia, anorexia, icterícia, depressão, febre, fotodermatite, sinais neurológicos (cegueira cortical, ataxia, comportamento agressivo ou coma), cólica e aborto (THEILER, 1919; PANCIERA, 1969; GUGLICK *et al.*, 1995; ALEMAN *et al.*, 2005; CHANDRIANI *et al.*, 2013; KOPPER *et al.*, 2018; TOMLINSON *et al.*, 2018). Casos exibindo enzimas hepáticas elevadas mas, sem sinais clínicos evidentes de hepatite, também foram observados. O achado *post-mortem* de casos da doença mais significativo é atrofia macroscópica do fígado, caracterizada microscopicamente por degeneração hepatocelular e necrose (GUGLICK *et al.*, 1995; CHANDRIANI *et al.*, 2013; DIVERS *et al.*, 2018; TOMLINSON *et al.*, 2018; TOMLINSON *et al.*, 2019).

#### 2.2.4 Pegivírus equino

O EPgV é membro do gênero *Pegivirus*, pertencente à família *Flaviviridae* (SIMMONDS *et al.*, 2017a). As espécies de EPgV são classificadas como PgV-D e PgV-E (CHANDRIANI *et al.*, 2013; KAPOOR *et al.*, 2013a). Os vírions dos pegivírus não foram visualizados sob microscopia eletrônica e a ausência da proteína do capsídeo sugere que esses vírus podem ser estruturalmente distintos de outros membros da família *Flaviviridae* (STAPLETON *et al.*, 2011). O tamanho do vírion do pegivírus humano foi estimado em 50-100 nm com base na filtração sequencial através de filtros de tamanhos de poros decrescentes (GOMARA *et al.*, 2019). O EPgV apresenta um genoma linear composto por uma molécula de RNA fita simples de sentido positivo de aproximadamente 11,2 kb de tamanho (KAPOOR *et al.*, 2013a). O genoma codifica uma poliproteína que é traduzida e clivada por proteases virais e celulares (SIMMONDS *et al.*, 2017a). A estrutura, organização genômica e processamento de poliproteína dos pegivírus é apresentada na Figura 4.

**Figura 4.** Estrutura, organização genômica e processamento de poliproteína dos pegivírus. O genoma codifica uma poliproteína que é clivada de forma co- e pós-tradução em proteínas virais individuais. Retângulos em coloridos abaixo do genoma indicam proteínas virais geradas pelo processamento proteolítico. As proteases hospedeiras e virais envolvidas na clivagem da poliproteína estão indicadas. A clivagem por peptidase sinal hospedeira é indicada por seta preta. As localizações da protease NS2-3, protease NS3, helicase NS3 e NS5B são indicadas por P', P'', H e R, respectivamente. Região não codificante (NCR), proteínas estruturais adicionais (X e Y), glicoproteínas do envelope (E1 e E2), protease (NS2), helicase (NS3), proteínas não estruturais (NS4A, NS4B e NS5A), RNA polimerase RNA-dependente (NS5B).



Fonte: Adaptado de ICTV (<https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv-online-report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/363/genus-pegivirus>).

As espécies de pegivírus são classificadas com base em sua divergência genética, em vez de sua gama de hospedeiros (STAPLETON *et al.*, 2011). Dessa maneira, os parâmetros são baseados na divergência de sequências de nucleotídeos ou aminoácidos das regiões conservadas de NS3 e NS5B. Os pegivírus que demonstram distância a nível de nucleotídeo e aminoácido maiores entre regiões homólogas de NS3 e NS5B são consideradas de espécies diferentes. Em decorrência disso, os estudos filogenéticos de EPgV-D e EPgV-E tem sido realizados particularmente através das regiões codificadoras de NS3, NS5B e/ou poliproteína (LU *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2018; TOMLINSON *et al.*, 2020). Logo, os pegivírus podem ser agrupados em onze diferentes espécies de *Pegivirus A* a *K* (SMITH *et al.*, 2016) (Tabela 2).



**Tabela 2.** Espécies virais pertencentes ao gênero *Pegivirus* de acordo com a classificação designada pelo ICTV.

<b>Espécie</b>	<b>Nome</b>	<b>Sigla</b>	<b>Referência</b>
<i>Pegivirus A</i>	Vírus-A de GB; Pegivírus símio	GBV-A; SPgV	(SIMONS et al., 1996)
<i>Pegivirus B</i>	GB virus-D	GBV-D	(EPSTEIN et al., 2010)
<i>Pegivirus C</i>	Genótipo 2 de pegivírus humano	HPgV	(LINNEN et al., 1996)
<i>Pegivirus D</i>	Vírus associado à doença de Theiler	TDAV	(CHANDRIANI et al., 2013)
<i>Pegivirus E</i>	Pegivírus equino	EPgV	(KAPOOR et al., 2013)
<i>Pegivirus F</i>	Morcego pegivírus F	BPgV-F	(QUAN et al., 2013)
<i>Pegivirus G</i>	Morcego pegivírus G	BPgV-G	
<i>Pegivirus H</i>	Hepegivírus humano; Pegivírus humano 2	HHPgV	(KAPOOR et al., 2015)
<i>Pegivirus I</i>	Morcego pegivírus I	BPgV-I	(QUAN et al., 2013)
<i>Pegivirus J</i>	Pegivírus de roedor	RPbV	(KAPOOR et al., 2013)
<i>Pegivirus K</i>	Pegivírus suíno	PPgV	(BAECHLEIN et al., 2016)

Fonte: Adaptada de ICTV ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/363/genus-pegivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/363/genus-pegivirus)).

O EPgV-D foi identificado durante um surto de hepatite aguda em equinos, seis semanas após a administração profilática de antitoxina botulínica derivada de equino (CHANDRIANI *et al.*, 2013). Subsequentemente, o EPgV-E foi detectado em amostras de soro de equinos infectados naturalmente, apresentando níveis elevados de enzimas hepáticas (KAPOOR *et al.*, 2013a). Após o relato de EPgV-D nos Estados Unidos (CHANDRIANI *et al.*, 2013), o vírus também foi identificado na Alemanha (POSTEL *et al.*, 2016a), China (LU; HUANG; LI, 2018) e Brasil (FIGUEIREDO *et al.*, 2019). Da mesma forma, o EPgV-E foi descrito nos Estados Unidos (KAPOOR *et al.*, 2013a), Brasil (DE SOUZA *et al.*, 2015), Alemanha (POSTEL *et al.*, 2016a) e China (TANG *et al.*, 2018). Além desses países, o EPgV-E também foi reportado no Reino Unido

(LYONS *et al.*, 2014). A infecção com EPgV-D está associada à doença de Theiler em equinos (CHANDRIANI *et al.*, 2013), com exceção dos animais infectados após a administração de hemoderivados de equinos, nenhuma evidência de viremia sistêmica ou transmissão horizontal foi identificada para o EPgV-D (LYONS *et al.*, 2014). No entanto, a infecção com EPgV-E não está relacionada a doença em equinos (KAPOOR *et al.*, 2013a). Além do mais, inoculação experimental de amostras de soro contaminada com EPgV-E, não produziu sinais de doença (RAMSAY *et al.*, 2015). Todavia, foi demonstrado que a infecção por EPgV-E pode ser generalizada e enzoótica em população de equinos, suportada pela elevada soroprevalência de 66,5% em amostras de soro equino investigadas (LYONS *et al.*, 2014). Além disso, taxas de contaminação de soros equinos usados em produtos biológicos comerciais e meios de cultivo celulares foram de 71,4 e 100% (POSTEL *et al.*, 2016a).

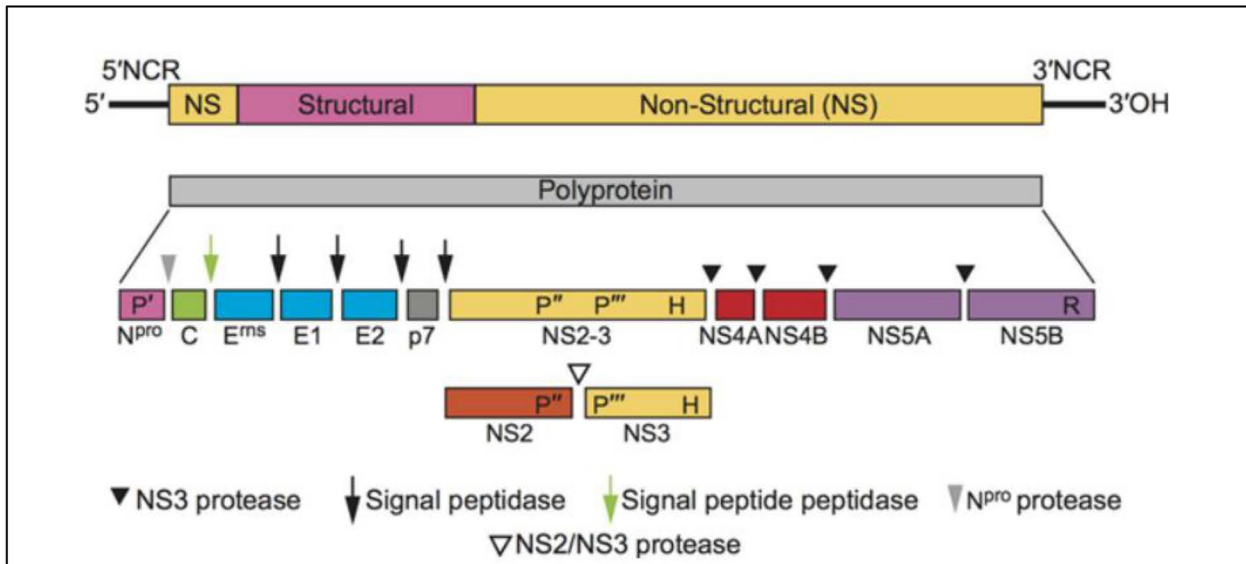
A hepatite do soro é uma das causas mais comuns de hepatite aguda e insuficiência hepática em equinos (BERGERO; NERY, 2008; RAMSAY, 2017; STURGEON, 2017). Considerada uma doença grave frequentemente fatal de equinos adultos descrita na África do Sul, após a vacinação com vírus vivo e antissoro equino contra a peste equina africana (THEILER, 1919). Os primeiros casos de hepatite do soro em equinos foram descritos nos Estados Unidos durante uma epidemia de encefalomielite equina ocidental (HOWITT, 1932; MARSH, 1937b). Embora a causa da hepatite do soro ainda não esteja elucidada (BERGERO; NERY, 2008), a doença foi relacionada a administração de produtos biológicos derivados do soro sanguíneo de equinos (CHANDRIANI *et al.*, 2013). Os equinos exibem um rápido início de sinais indicativos de insuficiência hepática aguda. Os sinais clínicos incluem letargia, anorexia, icterícia, depressão, febre, fotodermatite, sinais neurológicos, cólica e aborto (THEILER, 1919; PANCIERA, 1969; ALEMAN *et al.*, 2005; KOPPER *et al.*, 2018). Casos assintomáticos demonstrando enzimas hepáticas elevadas, também foram observados (GUGLICK *et al.*, 1995). O achado *post-mortem* de casos da doença mais relevante foi atrofia macroscópica do fígado, caracterizada microscopicamente pela degeneração hepatocelular e necrose (CHANDRIANI *et al.*, 2013).

### **2.2.5 Pestivírus de bovino e suíno**

BVDV-1, BVDV-2 e o APPV são membros do gênero *Pestivirus*, pertencente à família *Flaviviridae* (SMITH *et al.*, 2017). Os membros do gênero *Pestivirus* são vírions relativamante

pequenos de aproximadamente 40 a 60 nm de diâmetro de tamanho, esféricos e possuem um capsídeo icosaédrico revestido externamente por um envelope. O genoma consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva com cerca de 9 a 12,3 kb. Esta molécula de RNA apresenta duas UTRs próximas as extremidades 5' e 3'. Uma única ORF é traduzida em uma longa poliproteína, que é clivada em proteínas estruturais e não estruturais individuais à medida que é produzida. As proteínas estruturais são codificadas próximas a extremidade 5' e as proteínas não estruturais localizam-se próximas a extremidade 3' (SIMMONDS *et al.*, 2017a). A primeira proteína viral traduzida é a proteína não estrutural N<sup>pro</sup>, que apresenta atividade autoprotease. A proteína estrutural do capsídeo (C) é produzida através da clivagem da N<sup>pro</sup> (STARK *et al.*, 1993). As outras proteínas estruturais consistem em três glicoproteínas do envelope (E<sup>ms</sup>, E1 e E2). Proteína E<sup>ms</sup> possui atividade de RNase (HULST; MOORMANN, 2001), as proteínas E1 e E2 formam heterodímeros que são fundamentais para interagir com receptores de superfície e penetrar na célula hospedeira (RONECKER *et al.*, 2008). A proteína não estrutural p7 desempenha um papel na maturação do vírus (HARADA; TAUTZ; THIEL, 2000); NS2 possui a função de autoprotease (LACKNER; THIEL; TAUTZ, 2006); NS3 atuar como protease e RNA helicase no início das etapas de replicação viral (WARRENER; COLLETT, 1995; TAUTZ *et al.*, 1997); a proteína NS4A exerce papel de cofator para atuação da protease NS3 (TAUTZ; KAISER; THIEL, 2000); a função das proteínas NS4B e NS5A na replicação de RNA e morfogênese dos vírions ainda necessita de investigação (TAUTZ; TEWS; MEYERS, 2015), e a proteína NS5B demonstra atividade de RNA polimerase RNA-dependente (RpRd), responsável pela replicação do genoma (LI *et al.*, 2018). A estrutura, organização genômica e processamento da poliproteína dos pestivírus é apresentada na Figura 5.

**Figura 5.** Estrutura, organização genômica e processamento de poliproteína dos pestivírus. Região não codificante da extremidade 5' (5'NCR), proteínas não estruturais (NS), região não codificante da extremidade 3' (3'NCR). Retângulo em cinza, poliproteína que é clivada de forma co- e pós- tradução em proteínas virais individuais. Retângulos em coloridos abaixo do genoma indicam proteínas virais geradas pelo processamento proteolítico. auto-protease não estrutural N-terminal (N<sup>pro</sup>), capsídeo (C), glicoproteínas do envelope (E<sup>ns</sup>, E1, e E2), proteína adicional (p7), protease (NS2), helicase (NS3), proteínas não estruturais (NS4A, NS4B e NS5A), RNA polimerase RNA-dependente (RdRP) (NS5B). Os símbolos P', P'', P''', H e R indicam a localização da protease N<sup>pro</sup>, protease NS2, protease NS3, RNA helicase NS3 e RdRP NS5B, respectivamente. As proteases e etapas proteolíticas envolvidas na geração de proteínas individuais são indicadas.



Fonte: Adaptado de ICTV ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus)).

Os parâmetros para o estabelecimento de espécies no gênero *Pestivirus* incluem, relações das sequências de nucleotídeos, aminoácidos, antigênicas e hospedeiro de origem. Dessa forma, os pestivírus foram atribuídos a onze espécies diferentes com base na análise filogenética de sequências de aminoácidos conservadas, principalmente através do emprego das regiões NS3 e NS5B. Recentemente, a nomenclatura atribuída aos vírus do gênero *Pestivirus* foi complementada com uma designação no formato de espécies de *Pestivirus A* a *K* (SMITH *et al.*, 2017). Os soros de animais convalescentes gerados contra membros de uma dada espécie geralmente mostram um título de neutralização várias vezes maior contra vírus da mesma espécie do que contra vírus de outras espécies (BECHER *et al.*, 2003; POSTEL *et al.*, 2015). Finalmente, as diferenças na origem do hospedeiro e na doença podem auxiliar na divisão das espécies. Espécies de *Pestivirus A* e *C* são considerados diferentes pois, seus membros possuem sequências de aminoácidos que são filogeneticamente distintas em três regiões genômicas (5'UTR, N<sup>pro</sup> e E2) (LIU *et al.*, 2009a); pelo

menos dez vezes de diferença no título de neutralização em testes de neutralização cruzada com soros imunes policlonais, e gama de hospedeiros. Além disso, em condições naturais os membros do *Pestivirus A* infectam bovinos, bem como suínos, enquanto os membros do *Pestivirus K* infectam apenas suínos. Os genótipos de espécies de *Pestivirus A* e *B* podem ser divididos em subgenótipos. Membros da espécie *Pestivirus A* e *B* podem ser subdivididos em pelo menos 21 e 4 subgenótipos, respectivamente. Enquanto 4 subgenótipos e 3 genótipos podem ser observados entre os membros do *Pestivirus K* (YEŞILBAĞ et al., 2014; NEILL et al., 2019; XIE et al., 2019). As propostas para outras espécies de pestivirus devem ser baseadas na sequência completa do genoma de pelo menos um isolado de vírus, enquanto os dados sobre a relação antigênica e a faixa de hospedeiros também devem ser considerados. A classificação de acordo com o formato proposto para às espécies virais pertencentes ao gênero *Pestivirus* é apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3.** Espécies virais pertencentes ao gênero *Pestivirus* de acordo com a classificação designada pelo ICTV.

<b>Espécie</b>	<b>Nome</b>	<b>Sigla</b>	<b>Referência</b>
<i>Pestivirus A</i>	Vírus da diarreia viral bovina 1	BVDV-1	(DENG; BROCK, 1993)
<i>Pestivirus B</i>	Vírus da diarreia viral bovina 2	BVDV-2	FJ527854
<i>Pestivirus C</i>	Vírus da peste suína clássica	CSFV	(RUGGLI et al., 1996)
<i>Pestivirus D</i>	Vírus da doença de fronteira	BDV	(BECHER et al., 1998)
<i>Pestivirus E</i>	Pestivirus de antílope Pronghorn	PAPeV	(NEILL et al., 2014)
<i>Pestivirus F</i>	Pestivirus de suíno	PPeV	NC023176
<i>Pestivirus G</i>	Pestivirus de girafa	GPeV	(AVALOS-RAMIREZ et al., 2001)
<i>Pestivirus H</i>	Pestivirus HoBi-like	HoBiPeV	(LIU et al., 2009)
<i>Pestivirus I</i>	Pestivirus Aydin-like	AydinPeV	(BECHER et al., 2012)
<i>Pestivirus J</i>	Pestivirus de rato	RPeV	(FIRTH et al., 2014)
<i>Pestivirus K</i>	Pestivirus atípico de suíno	APPV	(HAUSE et al., 2015)

Fonte: Adaptada de ICTV ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/Flaviviridae/361/genus-pestivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/Flaviviridae/361/genus-pestivirus)).

### 2.2.6 Vírus da diarreia viral bovina

O BVDV apresenta distribuição mundial e praticamente todos os países produtores de bovinos já relataram a sua presença (MOENNIG; HOUE; LINDBERG, 2005). De acordo com a variabilidade genética, os isolados podem ser divididos em BVDV-1 e BVDV-2 (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994). BVDV-1 compreende a maioria das cepas de referência e os vírus utilizados em vacinas. Já, os isolados de BVDV-2 tem sido associados principalmente à surtos de síndrome hemorrágica (VILCEK *et al.*, 2000). Ambos os genótipos 1 e 2 incluem isolados de virulência baixa, moderada e alta (KHODAKARAM-TAFTI; FARJANIKISH, 2017). O BVDV possui a capacidade de infectar diversas espécies de ruminantes domésticos e selvagens, além de suínos, sendo os bovinos considerados seus hospedeiros naturais (BECHER *et al.*, 1997, BECHER *et al.*, 1999; AGUIRRE; FUENTES; CELEDÓN, 2014). Esse vírus tem sido detectado em casos de doença respiratória, gastrentérica, reprodutiva, doença das mucosas, em lotes comerciais de soro bovino e bovinos persistentemente infectados (PI). Os bovinos PI se constituem na principal fonte de disseminação do vírus, excretando o vírus em secreções e/ou excreções. O vírus pode ser transmitido por contato direto e indireto (secreções, excreções, feto abortado e placenta) entre bovinos e de forma iatrogênica (agulhas, luvas de palpação, tatuadores e aplicadores de brinco). Além do mais, a transmissão vertical aos fetos é uma causa frequente da infecção de bovinos prenhes e a transmissão horizontal pode ocorrer através do sêmen coletado de reprodutores PI, transmitindo o vírus para outros bovinos pela inseminação artificial (KHODAKARAM-TAFTI; FARJANIKISH, 2017).

A infecção com BVDV em bovinos pode acometer animais não prenhes e prenhes. A infecção de bovinos não prenhes geralmente é subclínica mas, sinais clínicos respiratórios, gastroentéricos e hemorrágicos podem ser observados (RIDPATH, 2003; RIDPATH *et al.*, 2013). Entretanto, a infecção de bovinos prenhes é regularmente seguida de transmissão transplacentária do vírus ao concepto. Os efeitos da infecção do concepto dependem do período de gestação em que ocorre a infecção, do biótipo e da cepa do vírus. Dessa forma, a infecção no início da gestação pode causar falha da fertilização, retorno ao estro, aborto, malformações congênitas, natimortos ou o nascimento de bovinos PI. Além disso, os fetos infectados no estágio final da gestação frequentemente nascem normais e livres do vírus (RIDPATH *et al.*, 2010; DUBOVI, 2013).

### 2.2.7 Pestivirus atípico de suíno

O APPV foi identificado no ano de 2015 em amostras de soro suíno nos Estados Unidos (HAUSE *et al.*, 2015). Posteriormente, APPV tem sido detectado na América do Norte (HAUSE *et al.*, 2015; DESSUREAULT *et al.*, 2018), América do Sul (MÓSENA *et al.*, 2018), Europa (BLOMSTRÖM *et al.*, 2016; DE GROOF *et al.*, 2016; POSTEL *et al.*, 2016b; SCHWARZ *et al.*, 2017; DÉNES *et al.*, 2018) e Ásia (KIM *et al.*, 2017; POSTEL *et al.*, 2017; YUAN *et al.*, 2017). Em vista de todas essas descrições, o APPV parece possuir ampla distribuição mundial, sendo os suínos domésticos e selvagens as espécies suscetíveis a infecção pelo APPV (POSTEL *et al.*, 2016b; CAGATAY *et al.*, 2018). Esse vírus já foi detectado de diversas origens, incluindo amostras de soro (POSTEL *et al.*, 2017), tecido (tonsila, rim e pulmão) (MÓSENA *et al.*, 2018), fluido preucial (DE GROOF *et al.*, 2016), sêmen (SCHWARZ *et al.*, 2017) e cerebelo (POSTEL *et al.*, 2016b). O APPV é difícil de isolar em cultivo de células, o que dificulta significativamente o estudo desse agente viral (REN *et al.*, 2020). Assim, estão disponíveis informações limitadas sobre a rota de transmissão, patogênese, disseminação e epidemiologia do APPV. No entanto, o APPV é capaz de causar distúrbios neurológicos, reduzir o desempenho reprodutivo e aumentar a mortalidade pré-desmame (ARRUDA *et al.*, 2016). Diferentes etiologias podem estar envolvidas na mortalidade pré-desmame de suínos, incluindo tremor congênito (*Congenital tremor, CT*) associado ao APPV (DE GROOF *et al.*, 2016; SCHWARZ *et al.*, 2017; GATTO *et al.*, 2018).

O CT em suínos recém-nascidos, também conhecido como mioclonia congênita, “porcos agitadores” ou “porcos dançantes”, foi descrito pela primeira vez em 1922 (KINSLEY, 1922). Os sinais clínicos característicos abrangem tremores de cabeça e membros que agravam em situações de estresse mas, quase desaparecem durante o sono. Embora, a maioria dos suínos estejam clinicamente saudáveis no momento do desmame, o tremor pode impossibilitar sua capacidade de se alimentar, aumentando assim o risco de ingestão inadequada de colostro, retardo de crescimento ou até morte por inanição (DONE *et al.*, 1986). O CT é dividido com base em sua doença em tipo A e B, o primeiro demonstra lesões morfológicas no sistema nervoso central e o segundo não apresenta lesões morfológicas visíveis (DONE, 1968). Em relação as causas da síndrome, o tipo A foi ainda classificado em cinco subtipos. O tipo A-I está associado ao vírus da peste suína clássica (*classical swine fever virus, CSFV*), é caracterizado por hipoplasia cerebelar em suínos afetados (BRADLEY *et al.*, 1983). No entanto, existem evidências de que o APPV seja o agente etiológico da síndrome do CT tipo A-II que acomete principalmente suínos com poucas semanas de idade. O

CT A-II é caracterizado por tremores na cabeça, membros e corpo, variando em gravidade e intensidade (VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1989; ARRUDA *et al.*, 2016; DE GROOF *et al.*, 2016); os tipos A-III e A-IV estão relacionados a defeitos genéticos em que se observa hipomielinização do cérebro e da medula espinhal (BLAKEMORE; HARDING; DONE, 1974; PATTERSON *et al.*, 1973) e o tipo V, assim como o tipo A-I, também está relacionado com hipoplasia cerebelar, causada pela intoxicação alimentar com triclorfom em suínos prenhes (KNOX *et al.*, 1978).

### 2.2.8 Parvovírus

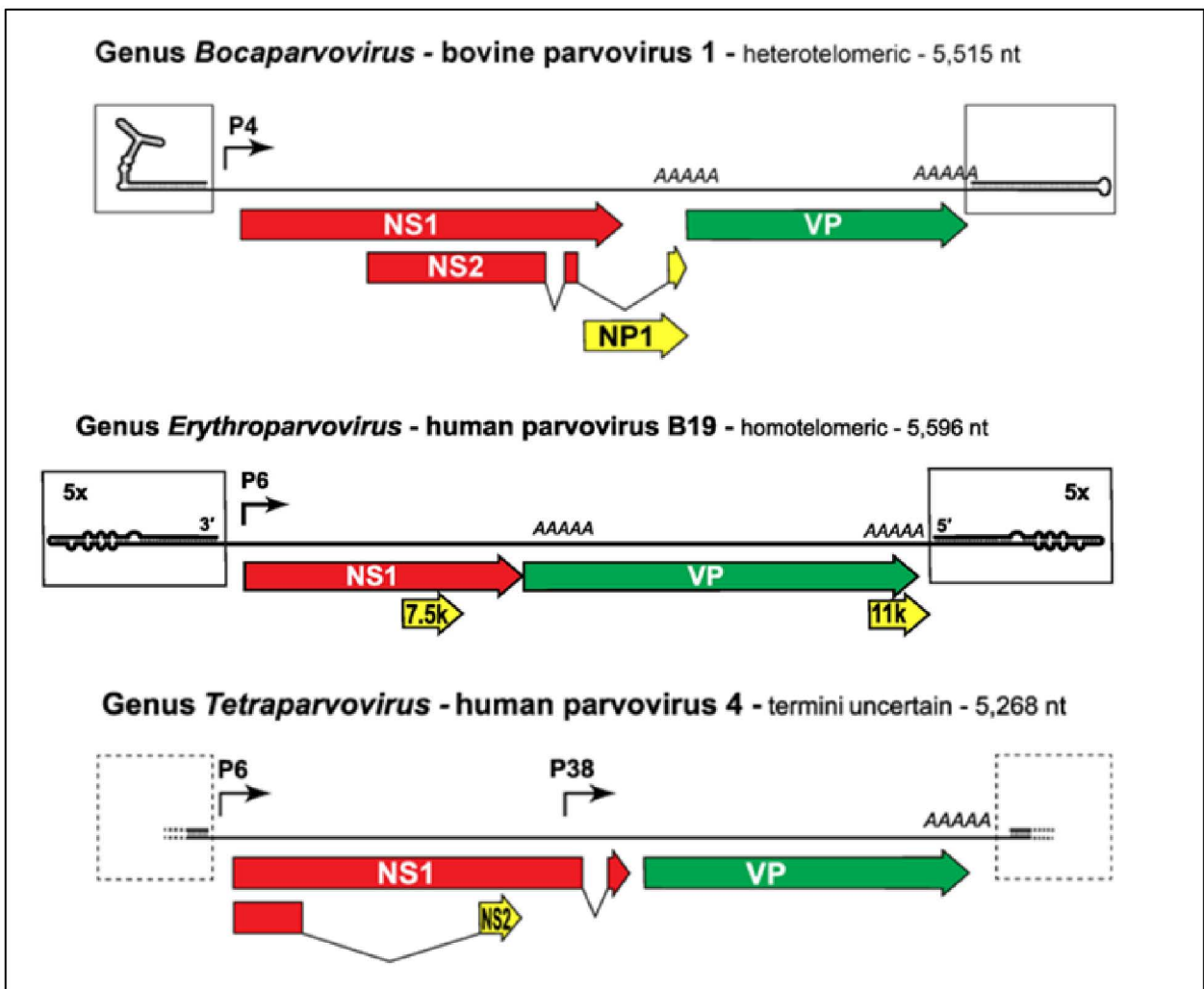
Os parvovírus são membros da família *Parvoviridae*, vírus pequenos, esféricos, com capsídeo icosaédrico, desprovidos de envelope e com aproximadamente 23 a 28 nm de diâmetro. Apresentam um genoma de DNA linear de fita simples, com aproximadamente 4 a 6 kb (COTMORE *et al.*, 2019). O termo parvovírus deriva do latim *parvus* ou *parvum*, que significa pequeno ou minúsculo, referindo-se ao pequeno tamanho dos vírions do parvovírus em comparação com a maioria dos outros vírus (FONSECA, 2018). Segundo o ICTV, a família *Parvoviridae* é composta por três subfamílias: *Densovirinae*, *Hamaparvovirinae* e *Parvovirinae*. A primeira compreende os parvovírus que infectam invertebrados, atualmente insetos, crustáceos e equinodermos. A segunda contém parvovírus que infectam invertebrados e vertebrados, presentemente crustáceos, insetos, peixes, roedores, mamíferos e aves. A terceira agrupa os parvovírus que infectam vertebrados, no momento atual mamíferos, aves, répteis (PÉNZES *et al.*, 2020).

A subfamília *Parvovirinae* é dividida em dez gêneros: *Amdoparvovirus*, *Artiparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Loriparvovirus*, *Protoparvovirus* e *Tetraparvovirus* (COTMORE *et al.*, 2019; PÉNZES *et al.*, 2020). A estrutura genômica é semelhante entre os parvovírus da subfamília *Parvovirinae*. O genoma dos parvovírus possuem apenas duas ORFs, que codificam quatro proteínas, sendo duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e duas ou três proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3). As proteínas não estruturais NS1 e NS2 são produzidas pela tradução de mRNAs que apresentam *splicing* alternativo. A NS1 é fundamental para a replicação do genoma viral, a NS2 está relacionada com a composição dos capsídeos, regulação da expressão gênica e também está envolvida na replicação do genoma. As proteínas geradas a partir da ORF estrutural VP (VP1 e



VP2) constituem parte da estrutura do capsídeo viral (KING *et al.*, 2012b). As proteínas VP1 e VP2 são traduzidas com base em um mesmo mRNA (TATTERSALL; COTMORE, 2001), subsequentemente ao processo de *splicing* e compartilham a maior parte de sua sequência de aminoácidos. A diferença entre a VP1 e VP2, é uma consequência da aplicação de diferentes códons de iniciação pelos ribossomos. A VP3 é formada por uma sequência de aminoácidos da região N-terminal da VP2. Os mRNAs são resultantes da transcrição do genoma, contêm 5' cap e são poli-A na extremidade 3'. O genoma viral apresenta de 6 a 10 sequências palindrômicas, que propiciam a criação de estruturas em forma de grampo de cabelo (*hairpin*) nas regiões terminais (TIJSEN *et al.*, 2011). Os *hairpins* são indispensáveis para a replicação e encapsidação do genoma da progênie viral (KING *et al.*, 2012b). A estrutura e organização genômica de três representantes da subfamília *Parvovirinae* estão demonstradas na Figura 6.

**Figura 6.** Estrutura e organização genômica de três representantes da subfamília *Parvovirinae*. Gêneros: *Bocaparvovirus* (parvovírus bovino 1, BPV-1), *Erythroparvovirus* (parvovírus humano B19, B19V) e *Tetraparvovirus* (parvovírus humano 4, PARV4), respectivamente. Os genomas de BPV-1, B19V e PARV-4 são mostrados como uma linha terminando em estruturas de *hairpin* (caixas) nas extremidades da esquerda e direita. As principais ORFs que codificam proteínas são demonstradas como setas vermelhas e verdes, ligadas por *splicing* para codificar proteínas auxiliares. As proteínas iniciadoras de replicação (NS1) estão em vermelho; proteínas do capsídeo (VP) estão em verde; proteínas auxiliares estão em amarelo (NP1 e NS2); setas em preto (P4, P6 e P38) representam o promotores transcricionais e locais de poli-A (AAAAA).



Fonte: Adaptado de ICTV ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae/1038/subfamily-parvovirinae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae/1038/subfamily-parvovirinae)).

Os parvovírus são distinguidos principalmente pela sua capacidade de infectar hospedeiros vertebrados ou invertebrados. Esses vírus podem ser considerado membros da mesma espécie se suas proteínas NS1 compartilharem mais de 85% de identidade de sequência de aminoácidos. Inclusive, os parvovírus podem ser classificados no mesmo gênero se suas sequências de proteínas

se agruparem como uma linhagem monofilética robusta com base na sequência de proteína NS1 completa a nível de subfamília. Além disso, as proteínas NS1 de membros do mesmo gênero devem compartilhar pelo menos 35 a 40% de identidade de sequência de aminoácidos com uma cobertura de mais 80% entre os membros. Na ausência dos critérios baseados em identidade de sequência, afiliação de gênero comum também pode ser comprovada com base em uma organização de genoma semelhante, como a presença ou ausência de genes codificadores de proteínas auxiliares, comprimento do genoma ou estratégia de transcrição (PÉNZES *et al.*, 2020). Particularmente, os parvovírus devem ter sido isolados ou suas sequências de nucleotídeos determinadas. Todavia, na falta disso, o vírus pode ter sido sequenciado de tecidos, secreções, excreções do hospedeiro de origem e suportado por evidências de sua distribuição nos hospedeiros em um padrão compatível com disseminação da infecção. O genoma de codificação completo deve ser uma única sequência *contig*, incluir todas as regiões de codificação não estruturais, estruturais, corresponder as características de tamanho, padrões de sequências (*motifs*) e estruturas típicas da família. Esses parâmetros não requerem inteiramente o isolamento de um vírus viável, desde que uma causa infecciosa seja apoiada pela estrutura e organização do genoma, sorologia e outros dados biológicos (COTMORE *et al.*, 2014; PÉNZES *et al.*, 2020). Os parâmetros são estabelecidos para permitir a introdução de vírus identificados através de ferramentas de detecção viral, como o HTS, que regularmente necessitam de sequências confiáveis (*Refence Sequence, RefSeq*), evitando fragmentos de sequências virais integradas ao genoma do hospedeiro ou dados metagenômicos que requerem de atribuição de hospedeiro.

### 2.2.9 Parvovírus de suínos

Os parvovírus suínos são classificados em quatro diferentes gêneros dentro da subfamília *Parvovirinae*: *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Protoparvovirus* e *Tetraparvovirus*. O gênero *Bocaparvovirus* possui quatro espécies de bocavírus suínos (*porcine bocavirus, PBoV*): *Bocaparvovirus ungulado 2* (PBoV-1, PBoV-2 e PBoV-6), *Bocaparvovirus ungulado 3* (PBoV-5), *Bocaparvovirus ungulado 4* (PBoV-7) e *Bocaparvovirus ungulado 5* (PBoV-3, PBoV-4.1 e PBoV-4.2). Já, o gênero *Copiparvovirus* apresenta duas espécies de copiparvovírus suíno: *Copiparvovirus ungulado 2* (*porcine parvovirus 4, PPV-4*) e o *Copiparvovirus ungulado 4* (*porcine parvovirus 6, PPV-6*). Da mesma forma, o gênero *Protoparvovirus* também contém apenas duas espécies de

protoparvovírus suíno: *Protoparvovirus ungulado 1* (*porcine parvovirus 1, PPV-1*) e o *Protoparvovirus ungulado 2* (*porcine bufavirus, P BuV*). Por fim, o gênero *Tetraparvovirus* apresenta duas espécie de tetraparvovírus suíno: *Tetraparvovirus ungulado 2* (*porcine parvovirus 3, PPV-3*) e o *Tetraparvovirus ungulado 3* (*porcine parvovirus 2, PPV-2*) (COTMORE *et al.*, 2014; PÉNZES *et al.*, 2020). Nos últimos anos, alguns outros novos parvovírus suínos foram identificados mas, ainda não foram classificados em espécies e gêneros no último relatório do ICTV. Os vírus foram provisoriamente denominados como parvovírus suínos dos tipos 5 e 7 (*porcine parvovirus 5 e 7, PPV-5 e PPV-7*) (XIAO; HALBUR; OPRIESSNIG, 2013a; XIAO *et al.*, 2013b; PALINSKI; MITRA; HAUSE, 2016). Os parvovírus suínos pertencentes à subfamília *Parvovirinae* são demosntrados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Espécies de parvovírus suínos pertencentes à subfamília *Parvovirinae* de acordo com a classificação designada pelo ICTV.

<b>Espécie</b>	<b>Nome</b>	<b>Sigla</b>	<b>Referência</b>
<i>Bocaparvovirus</i>			
<i>Bocaparvovirus ungulado 2</i>	Bocavírus suíno 1	PBoV-1	(CHENG et al., 2010)
<i>Bocaparvovirus ungulado 3</i>	Bocavírus suíno SX	PBoVsx	(ZENG et al., 2011)
<i>Bocaparvovirus ungulado 4</i>	Bocavírus suíno H18	PBoVh18	(SHAN et al., 2011b)
<i>Bocaparvovirus ungulado 5</i>	Bocavírus suíno 3	PBoV-3	(LAU et al., 2011)
<i>Copiparvovirus</i>			
<i>Copiparvovirus ungulado 2</i>	Parvovírus suíno 4	PPV-4	(CHEUNG et al., 2010)
<i>Copiparvovirus ungulado 4</i>	Parvovírus suíno 6	PPV-6	(NI et al., 2014)
<i>Protoparvovirus</i>			
<i>Protoparvovirus ungulado 1</i>	Parvovírus suíno	PPV	(BERGERON; MENEZES; TIJSSEN, 1993)
<i>Protoparvovirus ungulado 2</i>	Bufavírus suíno	PBuV	(HARGITAI et al., 2016)
<i>Tetraparvovirus</i>			
<i>Tetraparvovirus ungulado 2</i>	Parvovírus suíno 3	PPV-3	(LAU et al., 2008)

Fonte: Adaptada de ICTV ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae/1041/1042/1045/1046/genus-bocaparvovirus/copiparvovirus/protoparvovirus/tetraparvovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae/1041/1042/1045/1046/genus-bocaparvovirus/copiparvovirus/protoparvovirus/tetraparvovirus)).

Os parvovírus suínos estão amplamente distribuídos na população suína de todo o mundo. Espécies representantes de bocavírus, copiparvovírus, protoparvovírus e tetraparvovírus suínos foram identificadas em países da Europa (CARTWRIGHT; HUCK, 1967; HARGITAI *et al.*, 2016), Ásia (HIJIKATA *et al.*, 2001; LAU *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2010; SHAN *et al.*, 2011a; ZENG *et al.*,

2011; NI *et al.*, 2014) e América do Norte (CHEUNG *et al.*, 2010). Esses vírus tem sido detectados em vários tipos de tecido, incluindo cultivo de células, amostras de soro, linfonodos, fígado, suabe nasofaríngeo e retal, fezes, fluido pulmonar, pulmão e fetos abortados (AFOLABI *et al.*, 2019). A transmissão dos parvovírus de suínos pode ocorrer pela via oronasal, transplacentária ou pelo contato com fezes. As principais fontes de infecção, para os animais susceptíveis dentro de uma unidade de criação intensiva de suínos, são as instalações contaminadas. Os parvovírus suínos são muito resistente a variações de temperatura e a vários desinfetantes. Em vista disso, esses vírus podem permanecer infeccioso em excreções e secreções de suínos infectados por um longo período de tempo (MORAIS; COSTA, 2007).

Nos últimos anos, com os avanços das técnicas moleculares, muitos genomas de parvovírus suínos foram caracterizados. O PBoV-1 e PBoV-2 foram identificados em 2010 por amplificação de *primer* único independente de sequência em amostras de fezes de suínos aparentemente saudáveis (CHENG *et al.*, 2010). Sequências dos genótipos de PBoV-3 e PBoV-4 foram recuperados por reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction, PCR*) em amostras de fezes e nasofaríngeas de suínos que vieram a óbito, respectivamente (LAU *et al.*, 2011). Já, a sequência de PBoV-5 foi detectada por PCR em amostras de soro de suínos assintomáticos (ZENG *et al.*, 2011). Por fim, uso de amplificação por PCR aleatória seguida de clonagem e sequenciamento de DNA, permitiu identificar sequências de PBoV-6 e PBoV-7 em amostras de fezes de suínos sem sinais clínicos evidentes (SHAN *et al.*, 2011a). Aplicação do HTS possibilitou recuperar a sequência do PPV-4 de fluido pulmonar de suíno doente, coinfectado com PCV-2 nos Estados Unidos em 2005 (CHEUNG *et al.*, 2010). Usando amplificação de *primer* único independente de sequência, o PPV-6 foi identificado de fetos suínos abortados na China (NI *et al.*, 2014). Da mesma forma, a sequência de PPV-5 foi detectada em amostras de tecido pulmonar de suínos nos Estados Unidos (XIAO; HALBUR; OPRIESSNIG, 2013a; XIAO *et al.*, 2013b). O emprego de metagenômica viral para amostras de suabe retal de suínos, possibilitou a descoberta do PPV-7, um novo parvovírus altamente divergente, prevalente nos suínos dos Estados Unidos (PALINSKI; MITRA; HAUSE, 2016).

Parvovírus suínos tem sido associados particularmente a casos de distúrbios reprodutivos e a coinfeções com PRRSV e PCV-2 em suínos (AFOLABI *et al.*, 2019). Os parvovírus suínos tem sido encontrados em animais sintomáticos e assintomáticos, e muitas perguntas sobre o mecanismo patogênico da infecção ainda necessitam ser esclarecidos (CHEUNG *et al.*, 2010; GUNN *et al.*,

2015; SAEKHOW; IKEDA, 2015; AFOLABI *et al.*, 2019). Embora, os suínos demonstrem sintomas clínicos como tremores, febre e atrofia testicular, aborto ou morte aparentam ser mais suscetíveis a infecções por parvovírus suíno, além do mais o papel das coinfeções na patogênese ainda é indefinido (ZHOU; SUN; WANG, 2014). As coinfeções geralmente descritas incluem, TTsuV, CSFV, vírus da diarreia epidêmica suína (*porcine epidemic diarrhea virus, PEDV*), PKoV, rotavírus suíno A (*Porcine rotavirus group A, PRVA*) e vírus da gastroenterite transmissível (*transmissible gastroenteritis virus, TGEV*) (ZHANG *et al.*, 2011; ZHAI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2013; CSÁGOLA *et al.*, 2012).

### 2.2.10 Parvovírus de bovinos

Os BPVs são classificados em quatro diferentes gêneros dentro da subfamília *Parvovirinae*: *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Erythroparvovirus* e *Tetraparvovirus*. O gênero *Bocaparvovirus* possui duas espécies de bocaparvovírus bovino: *Bocaparvovirus unguado 1* (*bovine parvovirus 1, BPV-1*) e o *Bocaparvovirus unguado 6* (*bovine bocaparvovirus 2, BBoV-2*). O gênero *Copiparvovirus* apresenta duas espécies de copiparvovírus bovino: *Copiparvovirus unguado 1* (*bovine parvovirus 2, BPV-2*) e o *Copiparvovirus unguado 5* (*bosavirus, BosaV*). O gênero *Erythroparvovirus* demonstra apenas uma espécie de erythroparvovírus bovino: *Erythroparvovirus unguado 1* (*bovine parvovirus 3, BPV-3*). Por último, o gênero *Tetraparvovirus* também contém somente uma espécie de tetraparvovírus bovino: *Tetraparvovirus unguado 1* (*bovine hokovirus 1, BHoV-1*) (PÉNZES *et al.*, 2020). Os parvovírus bovinos pertencentes a subfamília *Parvovirinae* são demonstrados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Espécies de parvovírus bovinos pertencentes a subfamília *Parvovirinae* de acordo com a classificação designada pelo ICTV.

<b>Espécie</b>	<b>Nome</b>	<b>Sigla</b>	<b>Referência</b>
<i>Bocaparvovirus</i>			
<i>Bocaparvovirus ungulado 1</i>	Parvovírus bovino 1	BPV-1	(QIU et al., 2007)
<i>Bocaparvovirus ungulado 6</i>	Bocaparvovírus bovino 2	BBoV-2	(MITRA et al., 2016a)
<i>Copiparvovirus</i>			
<i>Copiparvovirus ungulado 1</i>	Parvovírus bovino 2	BPV-2	(ALLANDER et al., 2001b)
<i>Copiparvovirus ungulado 5</i>	Bosavírus	BosaV	(SADEGHI et al., 2017)
<i>Erythroparvovirus</i>			
<i>Erythroparvovirus ungulado 1</i>	Parvovírus bovino 3	BPV-3	(ALLANDER et al., 2001b)
<i>Tetraparvovirus</i>			
<i>Tetraparvovirus ungulado 1</i>	Hokovírus bovino 1	BPARV4	(LAU et al., 2008)

Fonte: Adaptada de ICTV ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae/1041/1042/1044/1046/genus-bocaparvovirus/copiparvovirus/erythroparvovirus/tetraparvovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae/1041/1042/1044/1046/genus-bocaparvovirus/copiparvovirus/erythroparvovirus/tetraparvovirus)).

Os BPVs possuem distribuição mundial, são encontrados em todos os países onde os rebanhos bovinos foram investigados (HUCK; WOODS; ORR, 1975; WOSU *et al.*, 1979; BARNES *et al.*, 1982; SANDALS; POVEY; MEEK, 1995; DE SOUZA *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2019). As sequências de espécies representativas de bocaparvovírus, copiparvovírus, erythroparvovírus e tetraparvovírus bovinos foram detectadas especialmente nos Estados Unidos (ALLANDER *et al.*, 2001; QIU *et al.*, 2007; MITRA *et al.*, 2016; SADEGHI *et al.*, 2017) e Hong Kong (LAU *et al.*, 2008).



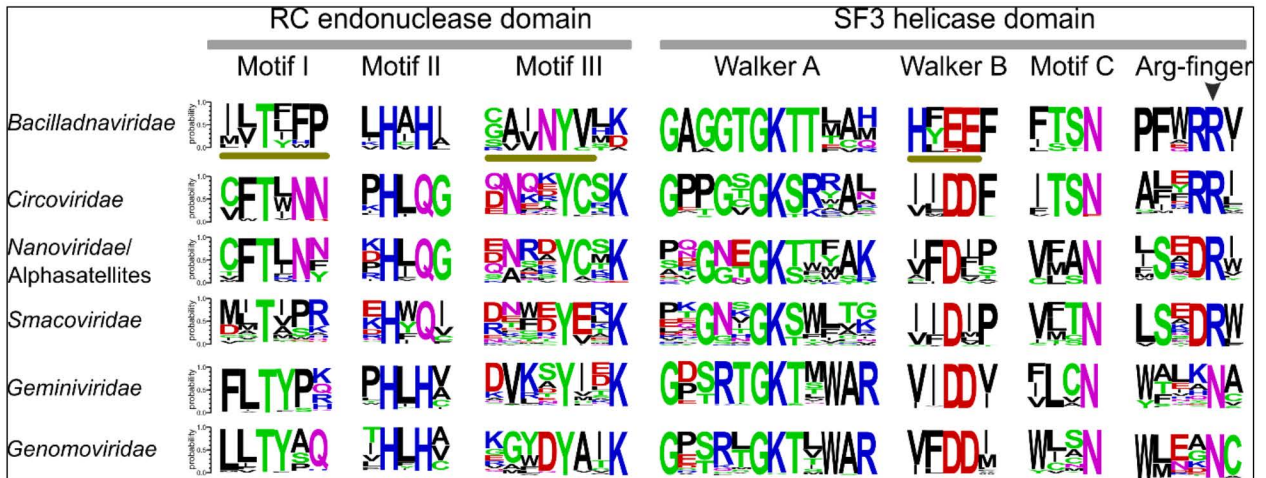
O BPV-1 foi identificado pela primeira vez há cerca de seis décadas nos Estados Unidos em bovinos jovens com sintoma clínico de diarreia (ABINANTI; WARFIELD, 1961). Emprego da metagenômica viral permitiu a detecção do BBoV-2 em amostras de suabe nasal obtidas de bovinos com doença respiratória bovina aguda e animais assintomáticos mantidos em confinamentos nos Estados Unidos em 2015 (MITRA *et al.*, 2016). Durante avaliação de um método para investigar vírus em amostras de soro, BPV-2 e BPV-3, até então desconhecidos foram detectados em lotes comerciais de soro bovino. As sequências genômicas de cada um desses vírus foram determinada e classificadas provisoriamente como *Copiparvovirus ungulado 1* e *Erythroparvovirus ungulado 1*, respectivamente. BPV-2 e BPV-3 são considerados contaminantes frequentes de soro bovino comercial (ALLANDER *et al.*, 2001). Já, o BosaV foi identificado em uma análise do viroma de soros bovinos nos Estados Unidos, e também foi encontrado em bovinos PI com pestivírus (SADEGHI *et al.*, 2017; WEBER *et al.*, 2018). Além do mais, um novo BPV intimamente relacionado ao parvovírus humano 4 (PARV4), denominado BHoV-1 foi detectado em amostras de baço bovino adquiridas em supermercados de alimentos em Hong Kong (LAU *et al.*, 2008).

A infecção pelo BPV está associada principalmente a casos de doença respiratória e digestiva em bovinos com poucas semanas de idade e a falhas reprodutivas em animais adultos (BARNES *et al.*, 1982). A transmissão do vírus pode ocorrer principalmente pela via oral-fecal e eliminado pelas fezes (WANG *et al.*, 2019). Embora, os BPVs sejam frequentemente isolado de fezes de bovinos assintomáticos, existem evidências da associação do BPV com doença gastroentérica em animais jovens. Além disso, existem indícios de hipoplasia cerebelar congênita relacionada com a infecção por BPV (MORAIS; COSTA, 2007). O vírus pode destruir as células epiteliais intestinais, resultando em atrofia das vilosidades e sinais clínicos de diarreia, desidratação e dor abdominal (DELANO; MISCHLER; UNDERWOOD, 2002). A dificuldade em compreender a patogenia desse vírus pode estar associada a outros fatores, tais como: manejo, falha da imunidade passiva e a presença de coinfeções. Pode-se considerar que a alta prevalência de anticorpos contra o BPV em bovinos pode dificultar o aparecimento de casos clínicos subsequente a infecção por esse agente viral (MORAIS; COSTA, 2007).

### 2.2.11 *Circular Rep-encoding single-stranded (CRESS) DNA viruses*

Os vírus ssDNA eucarióticos são classificados em dez famílias, embora muitos vírus ssDNA não cultivados continuem sem classificação (SIMMONDS *et al.*, 2017b). Os vírus de sete dessas famílias, *Bacilladnaviridae*, *Circoviridae*, *Geminiviridae*, *Genomoviridae*, *Nanoviridae*, *Smacoviridae* e *Redondoviridae*, possuem pequenos genomas circulares, muitos codificando apenas duas proteínas, uma para a iniciação da replicação do genoma (Rep) e a outra para o capsídeo (Cap) (ABBAS *et al.*, 2019). Os genomas são conhecidos por serem replicados pelo mecanismo de círculo rolante, que é iniciado pela proteína Rep codificada pelos vírus da superfamília de endonucleases, caracterizada pela assinatura do *motif* HUH, em que dois aminoácidos, uma histidina ou glutamina, são separados por um resíduo hidrofóbico (Figura 7) (ILYINA; KOONIN, 1992; KOONIN; ILYINA, 1993; ROSARIO; DUFFY; BREITBART, 2012; CHANDLER *et al.*, 2013; KRUPOVIC, 2013). Em vírus ssDNA eucarióticos, o domínio da endonuclease HUH é seguido por um domínio da superfamília da endonuclease III, que não é encontrado em vírus bacteriano ou *Arquea*, sugerindo uma relação evolutiva mais próxima entre os vírus ssDNA eucarióticos. De modo informal, esses vírus são usualmente designados coletivamente como vírus circulares DNA fita simples codificadores de replicase (*circular Rep-encoding single-stranded DNA, CRESS-DNA*) (ROSARIO; DUFFY; BREITBART, 2012; ZHAO *et al.*, 2019). Os vírus das sete famílias infectam hospedeiros do domínio eucariótico, incluindo plantas (*Nanoviridae* e *Geminiviridae*), fungos (*Genomoviridae*), animais (*Circoviridae*) e algas (*Bacilladnaviridae*). Ao passo que, membros das famílias *Smacoviridae* e *Redondoviridae* foram identificados por metagenômica e supõe-se que infectem animais, ainda que associação de smacovírus com *Arqueas* metanogênicas também tenha sido proposta (DÍEZ-VILLASEÑOR; RODRIGUEZ-VALERA, 2019).

**Figura 7.** *Motifs* de sequência de proteínas Rep de vírus CRESS-DNA. Os *motifs* específicos do bacilladnavirus estão sublinhados. Os resíduos são coloridos de acordo com suas propriedades químicas (polar, verde; básico, azul; ácido, vermelho; hidrofóbico, preto; neutro, roxo).



Fonte: Adaptado de KAZLAUSKAS et al., (2017).

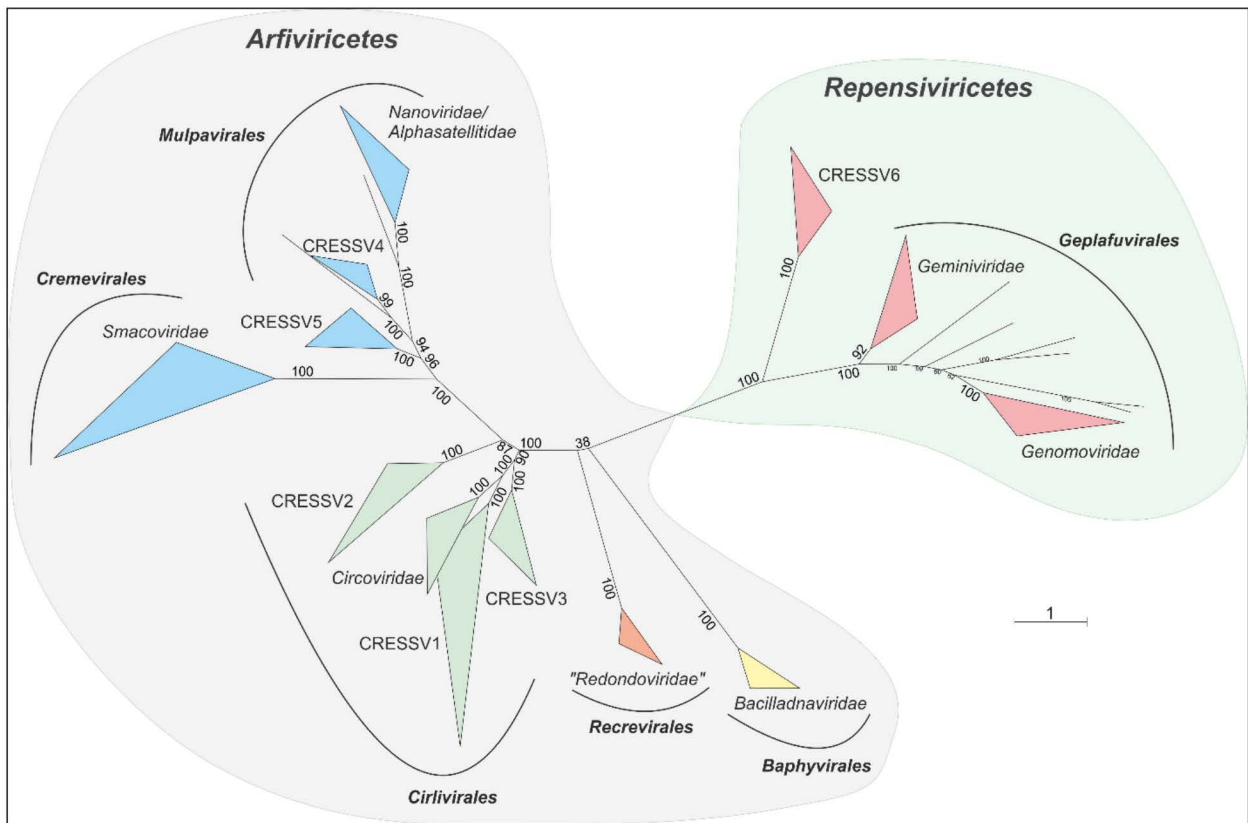
Atualmente, tem sido recuperada uma quantidade expressiva de sequências de nucleotídeos intimamente relacionadas ao grupo de vírus CRESS-DNA. Para determinar a qual família viral as sequências nucleotídicas de CRESS-DNA vírus pertencem, é realizada comparação entre as suas sequências de nucleotídeos e proteínas. Em vista disso, o ICTV estabeleceu critérios para classificação de sequências nucleotídicas candidatas a uma das famílias que formam o grupo de vírus CRESS-DNA. De acordo com os parâmetros estipulados, as espécies pertencentes a este grupo de vírus podem ser classificadas com base na sequência de genoma completo e/ou proteína Rep. Assim, espécies da família *Bacilladnaviridae* devem possuir mais de 75% de identidade entre suas proteínas Rep (KAZLAUSKAS *et al.*, 2017); espécies putativas a família *Genomoviridae* devem demonstrar mais de 78% de identidade entre suas proteínas Rep (VARSANI; KRUPOVIC, 2017); espécies para família *Redondoviridae* devem conter mais de 50% de identidade entre suas proteínas Rep e as espécies da família *Smacoviridae* devem apresentar mais de 40% de identidade entre suas proteínas Rep (VARSANI; KRUPOVIC, 2018). No entanto, as espécies previstas para famílias de *Circoviridae*, *Geminiviridae* e *Nanoviridae*, são atribuídas com base na sequências de nucleotídeo do genoma completo. Dessa forma, as espécies de circovírus devem mostrar mais de 80% (BREITBART *et al.*, 2017), geminivírus devem possuir mais de 77% (ZERBINI *et al.*, 2017) e os nanovírus devem exibir mais de 75% de identidade de nucleotídeos a nível de genoma

completo (KING *et al.*, 2012c). Ao contrário da Rep, as proteínas do Cap dos vírus CRESS-DNA possuem funções distintas, mas foram indicadas terem sido obtidas de vírus de RNA em vários momentos independentes (KRUPOVIC; RAVANTTI; BAMFORD, 2009; DIEMER; STEDMAN, 2012; ROUX *et al.*, 2013; KAZLAUSKAS *et al.*, 2017; KRUPOVIC; KOONIN, 2017). A proteína Rep de dois domínios característicos dos vírus de CRESS-DNA é o único gene universalmente conservado nesse grupo de vírus e pode auxiliar como uma estrutura apropriada para rastrear eventos evolutivos, muito semelhante com a polimerase de RNA dirigida por RNA para vírus de RNA, ou genes de RNA ribossomal são para organismos celulares (KOONIN *et al.*, 2008, KOONIN; DOLJA; KRUPOVIC, 2015; WOLF *et al.*, 2018). Dessa forma, o uso da proteína Rep tem sido amplamente proposto para classificar os vírus CRESS-DNA (ZHAO *et al.*, 2019).

A análise filogenética de vírus CRESS-DNA classificados e não atribuídos mostrou treze clados, seis desses clados correspondem a vírus CRESS-DNA não classificados, representados como CRESSV-1 a 6 (KAZLAUSKAS; VARSANI; KRUPOVIC, 2018). A filogenia se divide em dois grandes clados, o primeiro compreende membros das famílias *Geminiviridae* e *Genomoviridae* e vírus CRESSV-6 e o segundo abrange todos os outros vírus CRESS-DNA (Figura 8). As proteínas Repls do primeiro clado compartilham o *motif* GRS localizado entre os *motifs* II e III, que não é encontrado em Repls de vírus CRESS-DNA do segundo clado, mas é considerado importante para o arranjo apropriado dos *motifs* II e III (NASH *et al.*, 2011; VARSANI; KRUPOVIC, 2017). Além do mais, os geminivírus e genomovírus, mas não o CRESSV-6, não demonstram o resíduo de arginina no *motif* da helicase (Figura 7). Dessa forma, foi sugerido agrupar as famílias *Geminiviridae* e *Genomoviridae* na ordem *Geplafuvirales* (*ge*-para gemini/genomo; *pla*-para plantas; *fu*-para fungos). Mais adiante, espera-se que CRESSV-6 seja agrupado com geplafuvírus a nível de classe, incluindo a proposta da denominação de *Repensiviricetes*, uma junção de *Rep-encoding single strand* e o sufixo: *viricetes* para a taxonomia de classe. Já, o segundo clado inclui as famílias *Bacilladnaviridae*, *Circoviridae*, *Smacoviridae*, *Nanoviridae* e a *Redondoviridae*, assim como grupos de vírus não classificados CRESSV-1 e 5 (Figura 8). Ao contrário dos membros da classe proposta *Repensiviricetes*, os vírus nesse grupo codificam Repls sem o *motif* GRS. Além disso, as Repls dos membros do segundo clado possuem um resíduo de arginina conservado no domínio helicase, ausente nos geminivírus e genomovírus. Em conjunto, essas particularidades suportam a monofilia das Repls no segundo clado. Entretanto, as famílias de vírus estabelecidas ou propostas incluem vírus que são diferentes entre si, e de vírus

na ordem proposta *Geplafuvirales*, impossibilitando sua unificação em uma única ordem. As diferenças se prolongam além das relações filogenéticas de suas Reps e envolvem proteínas do capsídeo, comprimento e organização dos genomas. É importante destacar que os circovírus se agrupam com CRESSV-1 e 3, enquanto que os nanovírus se agrupam com CRESSV 4 e 5, indicando que a classificação taxonômica de ordem será necessária para esses grupos (KRUPOVIC *et al.*, 2020).

**Figura 8.** Árvore filogenética de máxima verossimilhança não enraizada de proteínas Rep de vírus CRESS-DNA. Grupos de sequência intimamente relacionadas são comprimidos em triângulos, cujos comprimentos laterais são proporcionais às distâncias entre os nós mais próximos e mais distantes. A árvore filogenética foi construída usando o programa PhyML com seleção automática do modelo de substituição de melhor ajuste para um determinado alinhamento. A barra de escala representa o número de substituições por sítio.



Fonte: Adaptado de KRUPOVIC *et al.*, (2020).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Contribuir para a ampliação do conhecimento sobre o viroma do soro de suínos de exposição, lotes de soros de equinos e bovinos comerciais.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Aplicar análise metagenômica viral em amostras de soro de suínos de exposição, lotes de soros de equinos e bovinos comerciais.

Caracterizar o viroma do soro de suínos de exposição, lotes de soros de equinos e bovinos comerciais.

Analisar os genomas virais recuperados e compará-los com sequências presentes em bancos de dados públicos.

#### **4 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

Os resultados, bem como os materiais e métodos empregados para a realização dos experimentos que compõem esta tese, serão apresentados a seguir na forma de três artigos científicos. O material suplementar correspondente ao terceiro trabalho será apresentado na mesma sessão do respectivo estudo da presente tese.

#### **4.1 Capítulo 1: Caracterização do viroma em soro de suínos de exposição saudáveis criados em Oklahoma demonstrou grande diversidade de vírus ssDNA**

O experimento com o objetivo de caracterizar o viroma do soro de suínos de exposição pela primeira vez em Oklahoma nos Estados Unidos já foi concluído e o artigo científico “*Virome characterization in serum of healthy show pigs raised in Oklahoma demonstrated great diversity of ssDNA viruses*” foi aceito e publicado em 30 de janeiro de 2021 no periódico *Virology*. O artigo é de acesso restrito e por razões de direitos autorais não será incluído neste documento, podendo ser encontrado em <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.01.006>. O resumo disponibilizado encontra-se abaixo:

##### *Abstract*

*In the United States, show pigs are raised to compete in agricultural events. These animals are usually raised in small herds with extensive human, domestic, and wild animal contact. Therefore, pathogen monitoring in this animal category is critical for improved disease surveillance and preparedness. This study characterized the virome of healthy show pigs using high-throughput sequencing using pooled serum samples from 2018 or 2019 (200 samples each pool). Results demonstrated the presence of DNA viral families (Parvoviridae, Circoviridae, and Herpesviridae) and RNA families (Arteriviridae, Flaviviridae, and Retroviridae). Twenty-three viral species were identified, including the first detection of porcine bufavirus in the US. Moreover, important swine pathogens identified included porcine reproductive and respiratory syndrome virus, atypical porcine pestivirus, and porcine circovirus (PCV). Additionally, complete coding genomes of 17 viruses from the Parvoviridae, Anelloviridae, and Circoviridae families were retrieved and included the first near full-length genomes of US Ungulate bocaparvovirus 3 species.*

*Keywords: High-throughput sequencing, Metagenomics, Swine, Viral community.*



## 4.2 Capítulo 2: Caracterização dos genomas virais presentes em lotes comerciais de soro equino obtidos por sequenciamento de alto rendimento

O presente artigo descreve a caracterização dos genomas virais presentes em lotes comerciais de soro equino pela primeira vez no Brasil. Este trabalho já foi concluído e o artigo científico “*Characterization of the viral genomes present in commercial batches of horse serum obtained by high-throughput sequencing*” foi aceito e publicado em 23 de agosto de 2019 no periódico *Biologicals*. O artigo é de acesso restrito e por razões de direitos autorais não será incluído neste documento, podendo ser encontrado no seguinte endereço eletrônico <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.08.005>. O resumo disponibilizado encontra-se abaixo:

### *Abstract*

*Horses are often used as blood donors for commercial horse serum (HS) production and to manufacture biologicals. HS is an alternative for fetal bovine serum (FBS) used as a supplement for cell culture and vaccine production. Furthermore, HS is also frequently obtained in order to produce antisera toxins and pathogens. The advent of high-throughput sequencing (HTS) has promoted changes in virus detection since previous knowledge of targets is not required. Thus, the present study aimed to describe the virome of five different batches of commercial HS from New Zealand (three batches) and Brazil and the United States (one batch each) using HTS. Each HS pool were processed and sequenced using an Illumina MiSeq platform. Sequences-related to viruses belonging to the Flaviviridae, Herpesviridae, and Parvoviridae families were detected. Particularly, equine hepacivirus (EqHV), equine pegivirus (EPgV), and Theiler's disease-associated virus (TDAV) were more frequent found in the batches analyzed. The presence of viral genomes in cell culture sera illustrates that these commercial sera can contain a mixture of different viruses and, therefore, can be regarded as potentially infectious for susceptible hosts. Moreover, the innocuity of commercial HS is important for the efficiency and security of diagnostics and the production of biological products.*

*Keywords: Equine, Cell culture, Hepacivirus, Pegivirus, Theiler's disease.*

### **4.3 Capítulo 3: Virome characterization in commercial batches of bovine serum from North America and New Zealand**

O presente experimento já foi concluído e o artigo científico está em fase de preparação.

## **Virome characterization in commercial batches of bovine serum from North America and New Zealand**

Willian P. Paim <sup>1,2</sup>, Matheus N. Weber <sup>3</sup>, Mayara F. Maggioli <sup>1</sup>, Cláudio W. Canal <sup>2</sup>, Fernando V. Bauermann <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Oklahoma State University (OSU), Stillwater, OK, 74078, USA.

<sup>2</sup>Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil.

\* Corresponding Author: Dr. Fernando Bauermann, Department of Veterinary Pathobiology, Oklahoma State University (OSU), 250 McElroy Hall, Stillwater, OK, 74078, USA.  
Fernando.vicosa\_bauermann@okstate.edu

## Abstract

Cattle are often used as blood donors for commercial bovine serum production that is used as a supplement for cell culture and manufacture of biological products. Since cattle serum can be the source of known and unknown viruses for biological products, the knowledge of their virus content is important estimate the risk of its use. The advent of high-throughput sequencing (HTS) has promoted changes in virus detection since previous knowledge of targets is not required. Thus, the present study aimed to describe the virome of seven commercial batches of bovine serum from New Zealand (two batches), Mexico (one batch) and the United States (four batches) using HTS. Each bovine serum pool was processed and sequenced using an Illumina iSeq 100 system. Sequences-related with single-stranded DNA (ssDNA) (*Parvoviridae*), double-stranded DNA (dsDNA) (*Polyomaviridae*, *Adenoviridae* and *Poxviridae*), circular Rep-encoding single-stranded (CRESS) DNA (*Genomoviridae*, *Circoviridae* and *Smacoviridae*), single-stranded RNA (ssRNA) (*Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Pneumoviridae* and *Retroviridae*) and double-stranded RNA (dsRNA) (*Reoviridae*) were observed. Complete coding genomes most close-related to bovine parvovirus 2 (BPV-2), bovine parvovirus 3 (BPV-3), bosavirus (BosaV), bovine hokovirus 1 (BHoV-1), yak hokovirus 1 (YHoV-1) and bovine polyomavirus 1 (BPyV-1) were found. Moreover, the present work reports the detection of crAssphage, human gut-associated bacteriophage and suggested as potential indicator of environmental human fecal contamination. The presence of viral genomes illustrates that commercial bovine sera may contain a mixture of different viruses that may present damage to the assays and biological products prepared from the sera. In addition, the innocuity of commercial bovine serum is important for the efficiency and security of diagnostics and production of biological products.

Keywords: Cattle, Serum, Cressdnaviricota, CrAssphage, Biological product, Metagenomics.

## Introduction

Cattle is often used as blood donors for commercial bovine serum production and manufacture of biological products. Although bovine sera from different categories are available, such as newborn bovine serum (NCS), bovine calf serum (BCS) and donor bovine serum (DBS), fetal bovine serum (FBS) is more widely used as a supplement for cell culture (GSTRAUNTHALER; LINDL, 2013). Initially, FBS was employed to stimulate cell propagation in cell and tissue culture (PUCK; CIECIURA; ROBINSON, 1958). Subsequently, FBS has been used as an universal supplement in cell culture media of human, animal and insect in research and manufacture of biological products (VAN DER VALK *et al.*, 2018).

Bovine origin products used for the manufacture of biologicals are currently tested for some known adventitious viruses due to the contamination risk of bovine serum (MARCUS-SEKURA *et al.*, 2011). The tests for adventitious viruses of cattle are performed in compliance with the United States Department of Agriculture (USDA) regulations for biologics products as specified in the title 9 of the code of federal regulations (CFR9), part 113 and section 53. In USDA, regulations require bovine serum testing to bovine viral diarrhea virus (BVDV), parainfluenza virus 3 (PI3), bovine parvovirus (BPV), rabies virus (RABV), infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), blue tongue virus (BTV), bovine adenovirus (BAV) and vesicular stomatitis virus (VSV). They are tested through immunofluorescence, hemadsorption or cytopathic effect after exposure and amplification in susceptible cells (CFR9).

The availability, application and enhancement of high-throughput sequencing (HTS) technologies, combined with the rapid development of computational tools has facilitated the detection of known and unknown viruses (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; WEBER *et al.*, 2018; PAIM *et al.*, 2021). The ability of HTS to unbiased detection of viruses suggests its potential value in the screening of the adventitious viruses, supporting the quality and safety of biological products (NG *et al.*, 2018). HTS has been applied explore FBS, NCS, BCS and DBS virome, consequently, BVDV-1, BVDV-2, BPV-2, and BPV-3 have been the viruses more frequently found in samples from Australia, Europe, New Zealand, South America and USA (GAGNIEUR *et al.*, 2014; SADEGHI *et al.*, 2017; TOOHEY-KURTH; SIBLEY; GOLDBERG, 2017). However, reports of the application of HTS in FBS batch from Mexico remain scarce.

Bacteriophages or phages are the most abundant microorganisms in the biosphere (CLOKIE *et al.*, 2011). Recently, crAssphage a new bacteriophage was identified by computational analysis of publicly accessible human fecal metagenomics data and was considered the most abundant human gut phage (DUTILH *et al.*, 2014; GUERIN *et al.*, 2018). The crAssphage presence has been strongly associated with human feces and sewage and has also been detected in feces of non-human primates and non-primate mammals (EDWARDS *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2021). To date, the detection of crAssphage has not been associated with any clinical disease (EDWARDS *et al.*, 2019). However, crAssphage has been suggested as a potential indicator of environmental human fecal contamination (GARCÍA-ALJARO *et al.*, 2017; STACHLER *et al.*, 2017, STACHLER *et al.*, 2018; AHMED *et al.*, 2018; PARK *et al.*, 2020).

Commercial bovine serum must be obtained under conditions that maintain biological properties viable and prevent contamination by adventitious viruses. Thereby, the present study aimed to detect and characterize the virome that can be present in commercial bovine serum. The data generated herein adds information to fill the lack of data studies the virome of non-irradiated commercial bovine serum, animals of different ages, categories, and countries.

## **Materials and Methods**

### **Samples of the commercial bovine serum**

Seven commercial batches of bovine serum were purchased from three different manufacturers from New Zealand (NZ, two batches), Mexico (MX, one batch), and United States of America (USA, four batches), including two FBS, four NCS, and one BCS. According to the manufacturers, all commercial batches of bovine serum were subjected to standard sterilization treatment through filtration. The commercial batches of bovine serum were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , processed and sequenced using HTS individually.

### **Viral metagenomics and HTS**

A total of 50 mL of each commercial batch bovine serum was centrifuged at  $2,000\times g$  during 30 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  and supernatants were passed through a  $0.45\ \mu\text{m}$  membrane filter (Millipore).

Subsequently, samples were ultracentrifuged on a 25% sucrose cushion at  $100,000 \times g$  for 3 hours at  $4^{\circ}\text{C}$  in a Sorvall AH629 rotor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The pellet containing the viral particles was incubated for 1.5 hour with DNase and RNase enzymes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as previously described (THURBER *et al.*, 2009). Viral RNA was isolated using TRIzol™ LS Reagent (Thermo Fisher Scientific) whereas the DNA extraction employed a phenol-chloroform protocol (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Viral DNA was enriched through multiple displacement amplification (MDA), using GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Viral RNA was reverse-transcribed and further enriched using the SeqPlex RNA Amplification Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), following the manufacturer's recommendations. The enriched DNA products were pooled in equimolar amounts and purified using the PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Thermo Fisher Scientific). The quality and quantity of the DNA were assessed through spectrophotometry and fluorometry performed with NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) and Qubit™ 4 (Thermo Fisher Scientific), respectively. The viral libraries were prepared with 1 ng of purified DNA using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit and sequenced using the Illumina iSeq 100 System conducted with the Illumina i1 reagent kit ( $2 \times 150$  paired-end reads).

### **Bioinformatic analysis**

The quality of the sequences generated was evaluated using the FastQC tool. High quality sequences (Phred score  $\geq Q30$ ) were trimmed at the time the FASTQ was generated on the Illumina iSeq 100 System. The data was *de novo* assembled on BaseSpace Cloud (Illumina) with the metaSPAdes genome assembler (Version 3.0). All assemblies were confirmed by mapping reads to contigs as described in Weber *et al.* (2020) using Geneious Prime software (Version 2020.2.1). The assembled contigs were examined in search for similarities to known sequences with BLASTN software using MegaBLAST (MORGULIS *et al.*, 2008). Sequences with  $E$ -values of  $\leq 10^{-5}$  were classified as likely originating from a eukaryotic virus, bacteria, phages, eukaryote or unknown, based on the taxonomic origin of the sequence with the best  $E$ -value as described by Caesar *et al.* (2019). Open reading frames (ORF) predictions and genome annotations of the complete near-full-length genomes were performed with the aid of Geneious Prime software. Gene and protein

comparisons were performed with BLASTN and BLASTP programs (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequences representative of viruses belonging to circular Rep-encoding single-stranded (CRESS) DNA viruses and the families *Parvoviridae* and *Polyomaviridae* were obtained from GenBank and aligned with the sequences identified in the present study with MUSCLE software (EDGAR, 2004). Phylogenetic trees were constructed using MEGA6 (TAMURA *et al.*, 2013).

### **Polymerase chain reaction (PCR) and Sanger sequencing**

The seven commercial batches of bovine serum were subjected to additional PCRs to BosaV, BPV-2, BVDV-1, and BRV-A. PCR using specific primers designed based on the generated assembled HTS sequences (Supplementary Table 3) were selected using Primer3 software (UNTERGASSER *et al.*, 2007). PCR were performed using Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA). PCR amplicons were purified using the PureLink<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) and subjected to Sanger sequencing. Sequences were then assemble using Geneious Prime software. All amplification products from PCR were submitted for Sanger sequencing to confirm the specificity of the tests. Furthermore, overlapping fragments were aligned and assembled using Geneious Prime software.

## **Results**

### **Overview**

Approximately 11,492,156 reads sequences were generated by metagenomic sequencing. After assembly, a total of 639,902 contig sequences were obtained. The exogenous eukaryotic virus-related sequences comprised 12.63% (1,452,044/11,492,156) of the read sequences and 2.53% (16,232/639,902) of the contig sequences; 3.37% (21,566/639,902) contig sequences were assigned to bacteriophages. A taxonomic classification, including the numbers of read sequences for each eukaryotic exogenous virus-related sequence recovered in this study, is provided in Table 1. Eukaryotic exogenous virus-related sequences with single-stranded DNA (ssDNA) (*Parvoviridae*) and double-stranded DNA (dsDNA) (*Polyomaviridae*, *Adenoviridae* and



*Poxviridae*) genomes belonging to four viral families and circular Rep-encoding single-stranded (CRESS) DNA (*Genomoviridae*, *Circoviridae* and *Smacoviridae*) viruses were observed, as well as with single-stranded RNA (ssRNA) (*Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Pneumoviridae* and *Retroviridae*) and double-stranded RNA (dsRNA) (*Reoviridae*) genomes belonging to five viral families (Table 1). Complete coding genomes were obtained to bovine parvovirus 2 (BPV-2), bovine parvovirus 3 (BPV-3), bosavirus (BosaV), bovine hokovirus 1 (BHoV-1), yak hokovirus 1 (YHoV-1) and bovine polyomavirus 1 (BPyV-1). Most of the viral sequences obtained shared a high degree of identity with the known animal viruses. Furthermore, sequences closely related to CrAssphage were detected (Table 2). Information regarding the sequences obtained is described in the following sections.

### ***Parvoviridae, Polyomaviridae, Adenoviridae and Poxviridae***

High diversity of sequences matching members of *Parvoviridae* were retrieved, including sequences representing four parvovirus genera: *Erythroparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Tetraparvovirus* and *Bocaparvovirus*. In the present work, 16,154 contig sequences closely related to family *Parvoviridae* were observed in all lots (FBS1/MX, FBS2/USA, NCS1/USA, NCS2/NZ, NCS3/NZ, NCS4/USA, and BCS1/USA) (Table 1). The pooled bovine serum lots submitted for HTS, showed the presence of 11,287 contig sequences related to BPV-3 (*Ungulate erythroparvovirus 1*) in lots FBS1/MX, FBS2/USA, NCS1/USA, NCS2/NZ, and BCS1/USA (Table 1). The contigs ranged between 100 and 2574 nucleotides in length. The nucleotide BLAST search revealed that the contig sequences were related to BPV-3, with over 76.3 to 100% nucleotide identity with the Chinese isolate ujs1794 identified in plasma samples of cattle from Northeast China (GenBank accession number NC037053). Two complete coding genome *Erythroparvovirus* sequences were recovered, BPV-3 NCS2/NZ and BPV-3 BCS1/USA. The genomes displayed a typical *Parvoviridae* organization comprised of a linear ssDNA genome containing 5100 nucleotides and 50.9 and 51.1% G+C content. To analyze the sequences detected in the present study and representative sequences within the *Erythroparvovirus* genus, a complete coding genome phylogenetic reconstruction was performed (Figure 1). BPV-3 NCS2/NZ and BPV-3 BCS1/USA were related to BPV-3 identified in bovine serum (GenBank accession number AF406967).

A total of 4,342 contigs closely related to BPV-2 (*Ungulate copiparvovirus 1*) were obtained from the lots FBS2/USA, NCS1/USA, NCS2/NZ, NCS3/NZ, NCS4/USA, and BCS1/USA (Table 1). The nucleotide BLAST search revealed that the contig sequences were related to BPV-2. Contig sequences showed 76.3 to 100% identity with BPV-2 sequence detected from bovine sera from USA (GenBank accession number NC006259). Five complete coding genomes of *Copiparvovirus* were obtained, BPV-2 FBS2/USA, BPV-2 NCS1/USA, BPV-2 NCS3/NZ, BPV-2 NCS4/USA and BPV-2 BCS1/USA. The genomes were 5334, 5613, 5559, 5260 and 5613 nucleotides in length and a G+C content of 43.9, 44.1, 43.8, 44 and 40.7% that were similar to the characteristics of BPV-2. The genomes were aligned with representative *Copiparvovirus* sequences retrieved from GenBank, and a phylogenetic tree was constructed showing that the recovered genomes clustered with a BPV-2 sequence isolate BSRI detected in the United States (Figure 1). In addition, one positive sample was subjected to an additional PCR assay to amplify a fragment of BPV-2 followed by Sanger sequencing to confirm the specificity of the test. Application of the specific PCR protocol to BPV-2 revealed a fragment with 83.16% nucleotide identity with BPV-2 strain QQHE16 identified in bovine serum samples from China (GenBank accession number MG972981).

The lots NCS1/USA, NCS2/NZ and NCS3/NZ presented 403 contig sequences closely related to BosaV (*Ungulate copiparvovirus 5*) (Table 1). In the nucleotide BLAST search, the contig sequences detected in this study presented 80.4 to 100% identity with BosaV MS-2016a sequence (GenBank accession number NC031959) detected in bovine serum samples collected from calves in the USA (SADEGHI *et al.*, 2017). Two complete *Copiparvovirus* genome sequences were detected, BosaV NCS1/USA and BosaV NCS3/NZ. BosaV genomes were 5222 and 5371 nucleotides in length and presented a G+C content of 40.7 and 40.8%. Phylogenetic analysis of the genomic sequences of BosaV NCS1/USA and BosaV NCS3/NZ showed that the sequences clustered with BosaV MS-2016a (GenBank accession number KY019139) (Figure 1). In addition, one positive sample was subjected to an additional PCR assay to amplify a fragment of BosaV followed by Sanger sequencing to confirm the specificity of the test. In the search for the BLAST nucleotide, the sequence showed 100% identity with BosaV strain VRI\_1 detected in commercial fetal bovine serum from the United States (GenBank accession numbers MN180054).

Three lots (NCS1/USA, NCS4/USA, and BCS1/USA) showed 105 contig sequences closely related to *Ungulate tetraparvovirus 1* (Table 1). In the nucleotide BLAST search, 87 contig

sequences detected in this study presented 86.1 to 98.6% identity with BHoV-1 strain HK1 detected in cattle from China (GenBank accession number NC038898), while 18 contig sequences were closely related to *Ungulate tetraparvovirus 1* isolate Yak hokovirus GS1 (87.2-95.5% identity), identified in domestic yaks (*Bos grunniens*) also in China (GenBank accession number NC028136). Two complete coding genome *Tetraparvovirus* sequences were identified, BHoV-1 BCS1a/USA and YHoV BCS1b/USA. BHoV-1 and YHoV genomes were 5097 and 5111 nucleotides in length and presented a G+C content of 48.7 and 48.6%. In phylogenetic analysis, the genomes obtained from the batch BCS1 clustered with BHoV-1 strain HK1 supported by a 100% bootstrap value (Figure 1). The BHoV-1 BCS1a/USA and YHoV BCS1b/USA with USA origin, clustered in the same terminal node, and both were related to one genome sequence reported in China (GenBank accession numbers EU200669).

The application of HTS revealed the presence 17 contigs sequences closely related to BBoV-2 (*Ungulate bocaparvovirus 6*) in NCS1/USA and NCS3/NZ (Table 1). The contig sequences ranged between 122 and 3110 nucleotides in length. In the nucleotide BLAST search, the contig sequences presented highest identity with BBoV-2 (92.8-100%) detected in nasal swab samples obtained from feedlot cattle with acute bovine respiratory disease (BRD) (GenBank accession number NC030402).

Twenty-six contigs sequences were closely related to the *Polyomaviridae* family in batches FBS1/MX, FBS2/USA, NCS3/NZ, and NCS4/USA (Table 1). The contig sequences ranged between 106 to 2250 nucleotide in length and showed a nucleotide identity of 93 to 100% with the reference sequence BPyV-1 (GenBank accession number NC001442). One complete coding genome of BPyV-1 was detected in the batch FBS2/USA from the United States. The BPyV-1 complete genome was 4697 nucleotides in length, arranged in a circular form, with a G+C content of 41.3%, and displayed the archetypal genome organization of the PyVs. The average coverage was 19.4×.

Four contig sequences were closely related to the *Adenoviridae* family (Table 1). The batch NCS3/NZ showed two contig sequences of 103-147 nucleotides in length and 97.09-99.32% nucleotide identity with bovine adenovirus 4 (BAdV-4) strain THT/62 detected in Hungary (GenBank accession number AF036092). The other two contig sequences were detected in the batch BCS1/USA. The contig sequences were 280-282 nucleotides in length and were related to

bovine adenovirus 6 (BAdV-6) strain 671130 from Netherlands with 98.93-97.87% nucleotide identity (GenBank accession number JQ345700).

Four contig sequences closely related to the swinepox virus (SWPV) (Order *Chitovirales*; Family *Poxviridae*; Subfamily *Chordopoxvirinae*; Genus *Suipoxvirus*), were observed in the batches FBS2/USA and NCS1/USA (Table 1). The contig sequences ranged between 124-172 nucleotides in length. One contig displayed 97.58% of nucleotide identity with respect to the hypothetical protein (SPV147) of SWPV (GenBank accession number AF410153) from batch NCS1/USA. In batch FBS2/USA, three contig sequences showed 99.42-100% of nucleotide identity with MHC class 1  $\alpha$  chain-like protein (SPV003), virion core protein P4a (SPV098) and ankyrin repeat protein (SPV142) from SWPV (GenBank accession number AF410153).

#### ***Flaviviridae, Reoviridae, Picornaviridae, Pneumoviridae and Retroviridae***

A low number of sequences related to RNA viruses were identified in commercial batches of bovine serum. Four contig sequences were closely related to members of the *Flaviviridae* family, the bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1 and 2 (Table 1). Two contig sequences 129-180 nucleotide in length showed 88.6-96% nucleotide identity with the BVDV-1 strain NADL (GenBank accession number NC001461). Other two contig sequences 151-224 nucleotide in length presented 89.7-94.7% nucleotide identity with the BVDV-2 isolate 890 (GenBank accession number NC039237). To verify the specificity of the test, a sample was also positive in the additional PCR assay to BVDV-1. The amplification product was subjected to Sanger sequencing. The sequence obtained by the primers designed in the present study (Complementary Table 3) allowed the identification of a 67 nt fragment with 98.77% nucleotide identity to BVDV-1 strain TR-2007-A-1500MS identified in cattle from Turkey (GenBank accession number EU716145).

A total of four contig sequences were closely related to the *Reoviridae* family (Table 1). Three contig sequences were related to segments 1 and 8 (VP1 and NSP2) of BRV. Two contig sequences showed 95.30-97.37% nucleotide identity with VP1 gene of the isolate CIT-A21 and strain RVA/Cow-t/JPN/AzuK-7/2007/G10P [11] from Ireland and Japan (GenBank accession number HQ714473 and LC553628). One contig sequence showed 94.24% nucleotide identity with NSP2 of the strain RVA/Bovine-tc/KOR/KJ19-2/2006/G6P [7] from South Korea (GenBank accession number MF940677). Another contig sequence was 96.12% nucleotide identity to

segment 3 (VP3) of the human rotavirus strain RVA/Human-wt/AUS/V585/2011/G10P [14] detected in Australia (GenBank accession number JX567762). The contig sequences related to BRV were used to select primers used in the PCR assay. BRV positive sample was submitted to Sanger sequencing. The amplified product of the positive sample shared 97.16% nucleotide identity with BRV isolated CIT-A21 detected in Ireland (GenBank accession number HQ714473).

Three contig sequences closely related to the bovine kobuvirus (BKV; species *Aichivirus B*, genus *Kobuvirus*, family *Picornaviridae*), were observed in batches NCS1/USA and NCS4/USA (Table 1). The contig sequences varied between 151-207 nucleotides in length; showed 93.1-95.4% nucleotide identity with the BKV U-1 strain detected in Japan (GenBank accession number NC004421).

For the *Pneumoviridae* family, one contig sequence of 201 nucleotides was closely related to the bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in batch FBS1/MX from Mexico (Table 1). In the nucleotide BLAST search, the contig sequence had 99% nucleotide identity with the BRSV strain ATCC51908 (GenBank accession number NC038272). One contig sequence closely related to *Retroviridae* family also was observed in batch FBS1/MX from Mexico (Table 1). In mapping to reference sequence, the contig sequence of 206 nucleotides was related to gag-pol polyprotein gene. It presented 100% nucleotide identity with respect to gag-pol polyprotein from moloney murine leukemia virus (MoMLV) (GenBank accession number NC001501).

### ***Genomoviridae, Circoviridae and Smacoviridae***

#### ***Circular rep-encoding single-stranded (CRESS) DNA viruses***

A total of 30 contig sequences closely related to CRESS-DNA viruses were detected by HTS in the present work. Fifteen contig sequences were related to ten different CRESS-DNA viruses belonging to the *Genomoviridae* family. The contig sequences ranged between 119-571 nucleotides in length and 79-99.6% nucleotide identity (Table 1). Thirteen contig sequences were related to *Circoviridae* family, for six different CRESS-DNA viruses with 103-482 nucleotides in length and 85.3-100% nucleotide identity (Table 1). The *Smacoviridae* family showed one contig sequence of 151 nucleotides and 88.7% nucleotide identity to porcine associated porprismacovirus 10 isolate 49-Fec25-pig detected in New Zealand (GenBank accession number NC030126).

## Bacteriophages

### CrAssphage

Viruses from *Myoviridae*, *Siphoviridae* and *Podoviridae* families represented the majority of the phage sequences recovered (Supplementary Figure 3). A total of 21,566 contig sequences were assembled that were closely related to bacteriophages. Three thousand three hundred sixty-one contig sequences were related to *Podoviridae* family. Of these, 242 contig sequences were closely related to CrAssphage. The contig sequences ranged between 64-721 nucleotides in length. In the nucleotide BLAST search, the samples detected in this study presented 75.6-100% nucleotide identity with crAssphage (GenBank accession number NC024711) detected in fecal samples from humans in United States (Table 2).

## Discussion

Commercial bovine serum is widely used as a supplement for cell cultures in research, biotechnology, and pharmaceutical manufacturing (VAN DER VALK *et al.*, 2018). Regulation in biological products of bovine origin, specially to avoid adventitious viruses infection, is documented and mandated in the “Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products” in order to improve the safety of biological products in humans and animals (European Medicines Agency; 9 CFR – Code of Federal Regulations - 113.53). Tests to adventitious viruses are performed in compliance with United States Department of Agriculture (USDA) regulation 9 CFR. The virome of bovine serum samples or commercial bovine serum from different categories and origins have been accessed previously through HTS (GAGNIEUR *et al.*, 2014; SADEGHI *et al.*, 2017; TOOHEY-KURTH; SIBLEY; GOLDBERG, 2017). However, there is a lack of data studying the virome of non-irradiated commercial bovine serum, animals of different ages, categories, and countries. Thus, the present work monitored commercial bovine serum from different manufacturers and found the viral members related to *Parvoviridae*, *Polyomaviridae*, *Adenoviridae*, *Poxviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Picornaviridae*, *Pneumoviridae* and *Retroviridae* families; CRESS-DNA viruses (*Genomoviridae*, *Circoviridae* and *Smacoviridae*) (Table 1) and crAssphage (Table 2). Bacteriophage from

*Myoviridae*, *Siphoviridae* and *Podoviridae* families represented the majority of the phage sequences recovered (Supplemental Figure 3). The presence of adventitious virus in raw-blood-derived products requires a thorough evaluation of potential risks regarding the contamination of biological products.

Bovine parvoviruses include BPV-3, BPV-2, BHoV-1, and the recently described BBoV-2 and BosaV belonging to four different genera of the *Parvoviridae* family (ALLANDER et al., 2001; LAU et al., 2008; MITRA et al., 2016; SADEGHI et al., 2017). The BPV-3 and BPV-2 were identified in 2001 as contaminants of commercial bovine serum (ALLANDER et al., 2001). Subsequently, BPV-3 and BPV-2 were reported in Brazil (DE SOUZA et al., 2018; CIBULSKI et al., 2016) and in China (WANG et al., 2018). The presence of BPV-2 has also been described in bovine serum samples in the United States (SADEGHI et al., 2017), and BHoV-1 in bovine blood samples in Brazil (DE SOUZA et al., 2018). BBoV-2 was detected in nasal swab samples obtained from feedlot cattle in Mexico and the United States, while BosaV was found in bovine serum samples in the United States (MITRA et al., 2016; SADEGHI et al., 2017). In the present study, BPV-2 was found in six out of the seven batches of bovine serum from New Zealand and the United States; BPV-3 in five out of seven batches of bovine serum from Mexico, New Zealand, and the United States; BHoV-1 (United States) and BosaV (New Zealand and United States) in three out of seven batches of bovine serum; BBoV-2 was detected in two out of the seven batches of bovine serum tested from New Zealand and the United States. BPV-3, BPV-2, BosaV and BHoV-1 reported in the present study were closely related to BPV-3, BPV-2, American BosaV and Chinese BHoV-1 (Figure 1). Our work reinforces the presence of bovine parvovirus genomes in the commercial batches of bovine serum (GAGNIEUR et al., 2014; TOOHEY-KURTH; SIBLEY; GOLDBERG, 2017).

BPyV-1 was described as a contaminant of FBS used in cell culture (REISSIG et al., 1976; SCHUURMAN et al., 1991). Afterwards, BPyV-1 has been detected in commercial batches of bovine serum available in the Europe (SCHUURMAN et al., 1991), New Zealand (WANG; HORNER; O'KEEFE, 2005) and the United States (KAPPELER et al., 1996; TOOHEY-KURTH; SIBLEY; GOLDBERG, 2017). Our data corroborate previous studies that described the presence of BPyV-1 in commercial batches of FBS from the United States, NCS from New Zealand and the United States. To the best of our understanding, this is the first time that FBS from Mexico has been screened for adventitious viruses through HTS (Table 1). BPyV-1 is prevalent in the bovine

population, and has already been detected in urine, feces, and environmental samples. This suggests that BPyV-1 can be eliminated in the excreta of cattle, contaminating the environment. In view of this, BPyV-1 has been used as an indicator of environmental contamination (HUNDESA *et al.*, 2006; HUNDESA *et al.*, 2010). The BPyV-1 complete coding genome retrieved of FBS from United States was closely related to the BPyV-1 reported in the Netherlands (Figure 2).

BPyV-1 infection usually results in diseases of the digestive or respiratory tract. However, infection does not always result in disease, then BPyV-1 can be detected in samples from apparently healthy cattle (FULTON, 2009). In addition, BAdV was suggested as potential indicator of contamination from microbial source (MALUQUER DE MOTES *et al.*, 2004; WONG; XAGORARAKI, 2010). Several studies have detected BAdV in bovine waste samples and manure using traditional molecular tools (HUNDESA *et al.*, 2006; SIBLEY *et al.*, 2011; WONG; XAGORARAKI, 2010; WONG; XAGORARAKI, 2011). Our study detected closely related sequences for BAdV-4 and BAdV-6 in batch of NCS and BCS from New Zealand and the United States (Table 1). The excretion of BAdV-4 and BAdV-6 through urine or feces by cattle supports targeting BAdVs as indicators of the presence of viral contamination in environmental samples (HUNDESA *et al.*, 2006; MALUQUER DE MOTES *et al.*, 2004; SIBLEY *et al.*, 2011; WONG; XAGORARAKI, 2010). To the best of our knowledge, this is the first report of BAdV in NCS and BCS samples from New Zealand and the United States. Considering that BAdV can be eliminated through urine and/or feces, the possibility that contamination with BAdV may have occurred in the initial processing steps of commercial batches of bovine serum cannot be ruled out. However, it may be that BAdV infection is widespread in cattle herds in New Zealand and the United States. In New Zealand, BAdV-10 was detected in an outbreak of fatal digestive infection in young dairy cattle (VAATSTRA *et al.*, 2016). United States most strains BAdV have been detected through serum neutralizing or isolated from diseased cattle (LEHMKUHL; BRIGGS; CUTLIP, 1998; LEHMKUHL; CUTLIP; DEBEY, 1999; FENT *et al.*, 2002).

Our work also detected sequences closely related to *Suipoxvirus* member (Table 1). The transmission of the swinepox virus (SWPV) is generally associated with poor hygiene conditions and the presence of insects, mainly lice (*Haematopinus suis*) and domestic flies (*Musca domestica*) that act as mechanical vectors (MUNZ; DUMBELL, 1994). The detection of SWPV-like sequences may be a source of knowledge for further studies, aiding an understanding of their presence and



genetic characterization. It is important to reinforce that pigs are apparently the only host species for SWPV in the nature (DELHON *et al.*, 2007), and not cattle until now.

BVDV is one of the most important viral pathogens of cattle associated with gastrointestinal, respiratory, reproductive diseases, causes economic losses for the livestock industry and has worldwide distribution (KHODAKARAM-TAFTI; FARJANIKISH, 2017). According to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), BVDV is classified into two species, *Pestivirus A* (BVDV-1) and *Pestivirus B* (BVDV-2) (SMITH *et al.*, 2017). BVDV-1 and BVDV-2 were detected in commercial batches of FBS and NCS from Australia, Europe, New Zealand and the United States (GAGNIEUR *et al.*, 2014; TOOHEY-KURTH; SIBLEY; GOLDBERG, 2017). Here, only the batch of FBS from the United States presented sequences related to BVDV-1 and BVDV-2, reinforcing the presence of these viruses in batches of FBS from North America. However, the batches of FBS (Mexico), NCS (New Zealand and the United States) and BCS (United States) did not present sequences related to pestivirus (Table 1).

Rotaviruses are an important viral pathogen responsible for causing gastrointestinal disease in humans and animals (RAMIG, 2004). Currently, rotaviruses are classified into nine species denominated *Rotavirus A* to *J* (ICTV, 2019). *Rotavirus A* appears to be the species most commonly associated with outbreaks of neonatal diarrhea in calves from several countries (PAPP *et al.*, 2013). We found sequences related to BRV-A in two commercial batches of NCS from New Zealand. In addition, one of these commercial batches of NCS from New Zealand also had a closely related sequence to human rotavirus A (HRV-A). Rotaviruses can be transmitted via the fecal-oral route, via contact with contaminated hands, surfaces, and respiratory propagation (DENNEHY, 2000). Rotaviruses often infect the gastrointestinal tract, but there is evidence in humans and animal models of viremia, indicating that infection and viremia can occur in the absence of diarrhea and that detection of rotavirus in the blood may be a more sensitive measure of infection than diarrhea (CRAWFORD *et al.*, 2006). The animals can act as potential reservoirs of rotavirus or genetic material for diversification of HRV (MARTELLA *et al.*, 2010). There is evidence that animal rotaviruses can infect humans through direct transmission or contributing with RNA segments to reassortment with HRV (COOK *et al.*, 2004; MÜLLER; JOHNE, 2007; DÓRÓ *et al.*, 2015). Therefore, our data highlight the presence of BRV-A and a sequence more related to HRV-A in commercial batches of NCS from New Zealand.

BKV was first reported as contaminant in cell culture medium in the Japan (YAMASHITA *et al.*, 2003). Subsequently, BKV was also described in Thailand (KHAMRIN *et al.*, 2008), Hungary (REUTER; EGYED, 2009), Brazil, Netherlands (BARRY *et al.*, 2011), Korea (JEOUNG *et al.*, 2011), Italy (DI MARTINO *et al.*, 2012), China (CHANG *et al.*, 2014) and Egypt (MOHAMED *et al.*, 2018). We found sequences related to BKV in two commercial batches of NCS from the United States (Table 1). Recently, BKV identification in calves with diarrhea has also been reported in the United States (WANG *et al.*, 2020). Our results corroborates with previous study that detected BKV in calves from 10 to 14 days of old (WANG *et al.*, 2020). Commercial batches of NCS that presented related sequences related to BKV also came from calves of the same age (10 to 14 days of old), according to the manufacturers.

BRSV has been one of the most important viral pathogens associated with respiratory disease in cattle (PEEK; OLLIVETT; DIVERS, 2018) and has a worldwide distribution (SACCO *et al.*, 2014). We detected a sequence closely related to BRSV in the commercial batch of FBS from Mexico (Table 1). A previous study detected 80.6% of BRSV in whole blood and nasal swab samples in feedlot cattle from Northwest of the Mexico states, involved in a case of BRD complex (RODRÍGUEZ-CASTILLO *et al.*, 2017).

In the present study, sequences related to replication associated protein (Rep) and capsid protein (Cap) of different circular ssDNA viruses were detected in five out the seven bovine serum batches (NCS and BCS) tested from New Zealand and United States. CRESS-DNA viruses are a group of circular DNA viruses with small genomes that code to Rep and Cap proteins (FONTENELE *et al.*, 2019), classified as members of the *Bacilladnaviridae*, *Circoviridae*, *Geminiviridae*, *Genomoviridae*, *Nanoviridae* and *Smacoviridae* families (ZHAO *et al.*, 2019). These viruses have been identified in samples of different sources, including samples from humans (ALTAN *et al.*, 2017), other mammals (CHEUNG *et al.*, 2013; GE *et al.*, 2011; HANSEN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2013), birds (FEHÉR *et al.*, 2017), fishes (LÖRINCZ *et al.*, 2011), insects (DAYARAM *et al.*, 2015), and environment (BISTOLAS *et al.*, 2017). A recently published work found CRESS-DNA genome fragments in commercial bovine serum (TOOHEY-KURTH; SIBLEY; GOLDBERG, 2017). Here, sequences related to twenty-two species of CRESS-DNA viruses from the *Genomoviridae*, *Circoviridae* and *Smacoviridae* families were detected (Table 1). Sequences related to CRESS-DNA viruses belonging to the *Circoviridae* and *Genomoviridae* families were also identified in plasma samples from cattle in Northeast China (WANG *et al.*,

2018). Furthermore, sequences from CRESS-DNA viruses have been found in serum samples from persistently infected calves affected by mucosal diseases (WEBER *et al.*, 2018). Our study demonstrates the presence of sequences related to CRESS-DNA viruses in commercial batches of NCS and BCS from New Zealand and the United States (Table 1).

Bacteriophages or phages are a group of viruses that specifically infect bacteria (MOINEAU, 2013). CrAssphage is a bacteriophage recently identified through computational analysis of human fecal metagenomic data in the United States (DUTILH *et al.*, 2014). Subsequently, crAssphage was isolated and confirmed to infect *Bacteroides intestinalis* (SHKOPOROV *et al.*, 2018). CrAssphage has been found in the feces of human, non-human primate, non-primate mammal and environmental samples (BROWN *et al.*, 2021; EDWARDS *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2021; AHMED *et al.*, 2018; STACHLER *et al.*, 2018; MALLA *et al.*, 2019). In the present study, closely related sequences to CrAssphage were detected in six out seven bovine serum batches (FBS, NCS and BCS) tested from New Zealand and United States. To date, there is no evidence of the association of crAssphage with disease (LIANG *et al.*, 2016). However, crAssphage has been suggested as a potential tool or indicator to detect human fecal contamination on environmental surfaces and people's hands (PARK *et al.*, 2020). Until now, no reports of crAssphage in commercial batches of bovine serum were available in literature. However, a study detected positive PCR signals in 2/12 cattle abattoir wastewater samples (AHMED *et al.*, 2018). Cattle abattoir wastewater samples probably contain residues of blood, feces, and urine bovines. This fact suggests that the crAssphages may be circulating in the blood of cattle. The sequences detected in the present study were closely related to crAssphage reported in South Africa, Japan, Russia, and the United States (Supplementary Table 3). Only the FBS batch from Mexico did not show sequences related to crAssphage. This may be related to a high hygiene standard in the manufacturing of Mexican FBS batches or with an inefficient methodology to converting DNA into material compatible with the sequencing platform used. However, whole genome of crAssphage was detected in the human gut microbiome. Furthermore, presence of the crAssphage genome was detected on 28.5% from fecal samples of Mexicans (CERVANTES-ECHEVERRÍA *et al.*, 2018). However, crAssphage has not yet been described in bovine serum samples in Mexico. Thus, bovine sera of this country need to be investigated for the presence of crAssphage. To the best of our knowledge, our work report for the first time the detection of sequences closely related to crAssphage in commercial batches of bovine serum of different origin and categories.

In the present study, it was demonstrated through HTS that the commercial batches of bovine serum used as supplement for cell culture contained multiple virus genomes. The presence of DNA viruses (*Parvoviridae*, *Polyomaviridae*, *Adenoviridae*, *Poxviridae*), CRESS-DNA (*Genomoviridae*, *Circoviridae* and *Smacoviridae*) and RNA (*Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Pneumoviridae*, *Retroviridae* and *Reoviridae*) were observed. In addition, sequences related to crAssphage were observed, a bacteriophage recently associated with human fecal contamination. Different viral sequences were found, regardless of the geographical origin and category of the bovine serum. Regarding biosafety, presence of the viral genomes in cell culture sera illustrates that commercial bovine sera may contain multiple viruses that can be considered as potentially infectious for susceptible hosts.

### **Acknowledgments/Funding**

Thanks to OSU and the Department of Veterinary Pathobiology for the technical assistance. Financial support in Brazil was supplied by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)-Finance Code 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Propesq/UFRGS).

### **Conflicts of interest/Competing interests**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## REFERENCES

- AHMED, W. *et al.* Novel crAssphage marker genes ascertain sewage pollution in a recreational lake receiving urban stormwater runoff. **Water research**, v. 145, p. 769–778, nov. 2018.
- ALLANDER, T. *et al.* A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11609–11614, 2001.
- ALTAN, E. *et al.* Small Circular Rep-Encoding Single-Stranded DNA Genomes in Peruvian Diarrhea Virome. **Genome announcements**, v. 5, n. 38, p. 1–2, set. 2017.
- BARRY, A. F. *et al.* First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 11, n. 7, p. 1811–1814, out. 2011.
- BISTOLAS, K. S. I. *et al.* Distribution of circular single-stranded DNA viruses associated with benthic amphipods of genus *Diporeia* in the Laurentian Great Lakes. **Freshwater Biology**, v. 62, n. 7, p. 1220–1231, 2017.
- BROWN, B. P. *et al.* crAssphage genomes identified in fecal samples of an adult and infants with evidence of positive genomic selective pressure within tail protein genes. **Virus Research**, v. 292, p. 1–13, 2021.
- CAESAR, L. *et al.* The virome of an endangered stingless bee suffering from annual mortality in Southern Brazil. **Journal of General Virology**, v. 100, n. 7, p. 1153–1164, 2019.
- CERVANTES-ECHEVERRÍA, M. *et al.* Whole-genome of Mexican-crAssphage isolated from the human gut microbiome. **BMC research notes**, v. 11, n. 1, p. 902–904, dez. 2018.
- CHANG, J. *et al.* Prevalence and genetic diversity of bovine kobuvirus in China. **Archives of virology**, v. 159, n. 6, p. 1505–1510, jun. 2014.
- CHEUNG, A. K. *et al.* A divergent clade of circular single-stranded DNA viruses from pig feces. **Archives of virology**, v. 158, n. 10, p. 2157–2162, out. 2013.
- CIBULSKI, S. P. *et al.* Ungulate copiparvovirus 1 (bovine parvovirus 2): characterization of a new genotype and associated viremia in different bovine age groups. **Virus Genes**, v. 52, n. 1, p. 134–137, 2016.
- CLOKIE, M. R. *et al.* Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 31–45, jan. 2011.
- CODE OF FEDERAL REGULATIONS (CFR) Requirements for ingredients of animal origin used for production of biologics. **9 CFR – Code of Federal Regulations - 113.53**. 2012. <https://www.govinfo.gov/app/details/CFR-2012-title9-vol1/CFR-2012-title9vol1-sec113-53/>, Accessed date: 29 January 2021.

COOK, N. *et al.* The zoonotic potential of rotavirus. **The Journal of infection**, v. 48, n. 4, p. 289–302, maio 2004.

CRAWFORD, S. E. *et al.* Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. **Journal of virology**, v. 80, n. 10, p. 4820–4832, maio 2006.

DAYARAM, A. *et al.* Identification of diverse circular single-stranded DNA viruses in adult dragonflies and damselflies (Insecta: Odonata) of Arizona and Oklahoma, USA. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 30, p. 278–287, mar. 2015.

DE SOUZA, W. M. *et al.* Novel parvoviruses from wild and domestic animals in Brazil provide new insights into parvovirus distribution and diversity. **Viruses**, v. 10, n. 4, 2018.

DELHON, G. A. *et al.* Genus *Suipoxvirus*. In: Poxviruses. **Birkhäuser Basel**, 2007. p. 203-215.

DENNEHY, P. H. Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 19, n. 10, p. 103-105, out. 2000.

DI MARTINO, B. *et al.* Molecular detection of bovine kobuviruses in Italy. **Archives of virology**, v. 157, n. 12, p. 2393–2396, dez. 2012.

DÓRÓ, R. *et al.* Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 11, p. 1337–1350, 2015.

DUTILH, B. E. *et al.* A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. **Nature communications**, v. 5, n.1, p. 1–11, jul. 2014.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

EDWARDS, R. A. *et al.* Global phylogeography and ancient evolution of the widespread human gut virus crAssphage. **Nature microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1727–1736, out. 2019.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. EMA/CHMP/BWP/457920/2012. Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products. **Committee for Medicinal Products for Human Use**. 2013. <https://www.ema.europa.eu/en/usebovine-serum-manufacture-human-biologi>. v. EMA/CHMP/B, n. 2013, p. 1–8, Accessed date: 29 January 2021.

FEHÉR, E. *et al.* Genome sequence of a mallard duck origin cyclovirus, DuACyV-1. **Archives of virology**, v. 162, n.12, p.3925-3929, jun. 2017.

FENT, G. M. *et al.* Bovine adenovirus serotype 7 infections in postweaning calves. **American journal of veterinary research**, v. 63, n. 7, p. 976–978, jul. 2002.

FONTENELE, R. S. *et al.* Single Stranded DNA Viruses Associated with Capybara Faeces Sampled in Brazil. **Viruses**, v. 11, n. 8, p.710–727, ago. 2019.

- FULTON, R. W. Viral Diseases of the Bovine Respiratory Tract. **Food Animal Practice**, v. 42, p. 171–191, 2009.
- GAGNIEUR, L. *et al.* Unbiased analysis by high throughput sequencing of the viral diversity in fetal bovine serum and trypsin used in cell culture. **Biologicals**, v. 42, n. 3, p. 145–152, 2014.
- GARCÍA-ALJARO, C. *et al.* Determination of crAssphage in water samples and applicability for tracking human faecal pollution. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1775–1780, nov. 2017.
- GE, X. *et al.* Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. **The Journal of general virology**, v. 92, n. 11, p. 2646–2653, nov. 2011.
- GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature reviews. Genetics**, v. 17, n. 6, p. 333–351, maio 2016.
- GSTRAUNTHALER, G; LINDL, T. Zell-und Gewebekultur. **Zell-und Gewebekultur**, v. 10, p. 978–983, 2013.
- GUERIN, E. *et al.* Biology and Taxonomy of crAss-like Bacteriophages, the Most Abundant Virus in the Human Gut. **Cell host & microbe**, v. 24, n. 5, p. 653–664, nov. 2018.
- HANSEN, T. A. *et al.* New Type of Papillomavirus and Novel Circular Single Stranded DNA Virus Discovered in Urban *Rattus norvegicus* Using Circular DNA Enrichment and Metagenomics. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. 1–11, 2015.
- HUNDESA, A. *et al.* Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7886–7893, dez. 2006.
- HUNDESA, A. *et al.* Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. **Journal of virological methods**, v. 163, n. 2, p. 385–389, fev. 2010.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy. Release: international committee on taxonomy of viruses. 2020. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Accessed date: 29 January 2021.
- JEOUNG, H. Y. *et al.* Three clusters of bovine kobuvirus isolated in Korea, 2008-2010. **Virus genes**, v. 42, n. 3, p. 402–406, jun. 2011.
- KAPPELER, A. *et al.* Detection of bovine polyomavirus contamination in fetal bovine sera and modified live viral vaccines using polymerase chain reaction. **Biologicals**, v. 24, n. 2, p. 131–135, jun. 1996.
- KHAMRIN, P. *et al.* Bovine kobuviruses from cattle with diarrhea. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 6, p. 985–986, 2008.

- KHODAKARAM-TAFTI, A.; FARJANIKISH, G. H. Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 3, p. 154–163, 2017.
- LAU, S. K. P. et al. Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 8, p. 1840–1848, 2008.
- LEHMKUHL, H. D.; BRIGGS, R. E.; CUTLIP, R. C. Survey for antibodies to bovine adenoviruses in six- to nine-month-old feedyard cattle. **American journal of veterinary research**, v. 59, n. 12, p. 1579–1580, dez. 1998.
- LEHMKUHL, H. D.; CUTLIP, R. C.; DEBEY, B. M. Isolation of a bovine adenovirus serotype 10 from a calf in the United States. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 11, n. 6, p. 485–490, nov. 1999.
- LI, L. *et al.* Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 4, p. 534–541, abr. 2013.
- LI, Y. *et al.* CrAssphage and its bacterial host in cat feces. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 815, jan. 2021.
- LIANG, Y. Y. *et al.* crAssphage is not associated with diarrhoea and has high genetic diversity. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 16, p. 3549–3553, 2016.
- LŐRINCZ, M. *et al.* First detection and analysis of a fish circovirus. **The Journal of general virology**, v. 92, n. Pt 8, p. 1817–1821, ago. 2011.
- MALLA, B. *et al.* Performance Evaluation of Human-Specific Viral Markers and Application of Pepper Mild Mottle Virus and CrAssphage to Environmental Water Samples as Fecal Pollution Markers in the Kathmandu Valley, Nepal. **Food and environmental virology**, v. 11, n. 3, p. 274–287, set. 2019.
- MALUQUER DE MOTES, C. *et al.* Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1448–1454, mar. 2004.
- MARCUS-SEKURA, C. *et al.* Evaluation of the human host range of bovine and porcine viruses that may contaminate bovine serum and porcine trypsin used in the manufacture of biological products. **Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 39, n. 6, p. 359–369, nov. 2011.
- MARTELLA, V. *et al.* Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 246–255, jan. 2010.
- MITRA, N. *et al.* Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D



- virus. **The Journal of general virology**, v. 97, n. 8, p. 1771–1784, ago. 2016.
- MOHAMED, F. F. *et al.* Detection and genetic characterization of bovine kobuvirus from calves in Egypt. **Archives of virology**, v. 163, n. 6, p. 1439–1447, jun. 2018.
- MOINEAU, S. Bacteriophage. *In*: MALOY, S.; HUGHES, K. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2013. p. 280–283.
- MORGULIS, A. *et al.* Database indexing for production MegaBLAST searches. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 24, n. 16, p. 1757–1764, ago. 2008.
- MÜLLER, H.; JOHNE, R. Rotaviruses: diversity and zoonotic potential a brief review. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 120, n. 3–4, p. 108–112, 2007.
- MUNZ E.; DUMBELL K. Swinepox. *In*: COETZER J.A.W.; T. G. R.; T. R. C. (ed). **Infectious Diseases of Livestock**. Oxford University Press, New York, 1994. p. 627–629.
- NG, S. H. *et al.* Current perspectives on high-throughput sequencing (HTS) for adventitious virus detection: Upstream sample processing and library preparation. **Viruses**, v. 10, n. 10, 2018.
- PAIM, W. P. *et al.* Virome characterization in serum of healthy show pigs raised in Oklahoma demonstrated great diversity of ssDNA viruses. **Virology**, v. 556, p. 87–95, jan. 2021.
- PAPP, H. *et al.* Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. **Veterinary microbiology**, v. 165, n. 3–4, p. 190–199, ago. 2013.
- PARK, G. W. *et al.* CrAssphage as a Novel Tool to Detect Human Fecal Contamination on Environmental Surfaces and Hands. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 8, p. 1731–1739, ago. 2020.
- PEEK, S. F.; OLLIVETT, T. L.; DIVERS, T. J. 4 - Respiratory Diseases. *In*: PEEK, S. F.; DIVERS, T. J. **Rebhun's Diseases of Dairy Cattle**. 3. ed. Elsevier, 2018. Part. II, chap. 4, p. 94–167.
- PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J.; ROBINSON, A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. **The Journal of experimental medicine**, v. 108, n. 6, p. 945–956, dez. 1958.
- RAMIG, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of virology**, v. 78, n. 19, p. 10213–10220, out. 2004.
- REISSIG, M. *et al.* Identification of the stump-tailed macaque virus as a new papovavirus. **Infection and immunity**, v. 14, n. 1, p. 225–231, jul. 1976.
- REUTER, G.; EGYED, L. Bovine kobuvirus in Europe. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 5, p. 822–823, may. 2009.

- RODRÍGUEZ-CASTILLO, J. L. *et al.* Detection and economic impact related to bovine respiratory disease, shrink, and traveling distance in feedlot cattle in northwest Mexico. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 41, n. 2, p. 294–301, 2017.
- RUSIÑOL, M. *et al.* Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. **Water research**, v. 59, p. 119–129, ago. 2014.
- SACCO, R. E. *et al.* Respiratory syncytial virus infection in cattle. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 2, p. 427–436, mar. 2014.
- SADEGHI, M. *et al.* Virome of US bovine calf serum. **Biologicals**, v. 46, p. 64–67, 2017.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3th ed. USA: Cold Spring Harbor, 2001.
- SCHUURMAN, R. *et al.* Frequent detection of bovine polyomavirus in commercial batches of calf serum by using the polymerase chain reaction. **The Journal of general virology**, v. 72, n. 11, p. 2739–2745, nov. 1991.
- SHKOPOROV, A. N. *et al.* ΦCrAss001 represents the most abundant bacteriophage family in the human gut and infects *Bacteroides intestinalis*. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1–8, nov. 2018.
- SIBLEY, S. D. *et al.* Detection of Known and Novel Adenoviruses in Cattle Wastes via Broad-Spectrum Primers. v. 77, n. 14, p. 5001–5008, 2011.
- SMITH, D. B. *et al.* Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 8, p. 2106–2112, 2017.
- STACHLER, E. *et al.* Quantitative CrAssphage PCR Assays for Human Fecal Pollution Measurement. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 16, p. 9146–9154, ago. 2017.
- STACHLER, E. *et al.* Correlation of crAssphage qPCR Markers with Culturable and Molecular Indicators of Human Fecal Pollution in an Impacted Urban Watershed. **Environmental science & technology**, v. 52, n. 13, p. 7505–7512, jul. 2018.
- TAMURA, K. *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- THURBER, R. V. *et al.* Laboratory procedures to generate viral metagenomes. **Nature Protocols**, v. 4, n. 4, p. 470–483, 2009.
- TOOHEY-KURTH, K.; SIBLEY, S. D.; GOLDBERG, T. L. Metagenomic assessment of adventitious viruses in commercial bovine sera. **Biologicals**, v. 47, p. 64–68, 2017.
- UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic acids**

**research**, v. 35, p. 71-74, jul. 2007.

VAATSTRA, B. L. *et al.* Clinicopathological features of 11 suspected outbreaks of bovine adenovirus infection and development of a real-time quantitative PCR to detect bovine adenovirus type 10. **New Zealand veterinary journal**, v. 64, n. 5, p. 308–313, set. 2016.

VAN DER VALK, J. *et al.* Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. **ALTEX**, v. 35, n. 1, p. 99–118, 2018.

WANG, J.; HORNER, G. W.; O’KEEFE, J. S. Detection and molecular characterisation of bovine polyomavirus in bovine sera in New Zealand. **New Zealand veterinary journal**, v. 53, n. 1, p. 26–30, fev. 2005.

WANG, H. *et al.* Plasma virome of cattle from forest region revealed diverse small circular ssDNA viral genomes. **Virology journal**, v. 15, n. 1, p. 11–18, jan. 2018.

WANG, L. *et al.* Bovine Kobuvirus in Calves with Diarrhea, United States. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 1, p. 176–178, jan. 2020.

WEBER, M. N. *et al.* Evaluation of the serum virome in calves persistently infected with Pestivirus A, presenting or not presenting mucosal disease. **Virus Genes**, v. 54, n. 6, p. 768–778, 2018.

WEBER, M. N. *et al.* Virome of crab-eating (*Cerdocyon thous*) and pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) from southern Brazil and Uruguay. **Infection, Genetics and Evolution journal**, v. 85, p. 1–12, jan. 2020.

WONG, K.; XAGORARAKI, I. Quantitative PCR assays to survey the bovine adenovirus levels in environmental samples. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 2, p. 605–612, ago. 2010.

WONG, K.; XAGORARAKI, I. Evaluating the prevalence and genetic diversity of adenovirus and polyomavirus in bovine waste for microbial source tracking. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1521–1526, maio 2011.

YAMASHITA, T. *et al.* Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. **The Journal of general virology**, v. 84, p. 3069–3077, nov. 2003.

ZHAO, L. *et al.* Eukaryotic Circular Rep-Encoding Single-Stranded DNA (CRESS DNA) Viruses: Ubiquitous Viruses With Small Genomes and a Diverse Host Range. **Advances in virus research**, v. 103, p. 71–133, 2019.

Fig. 1. Genetic characterization of members of the *Parvoviridae* family detected in the present study. Nucleotide phylogenetic tree constructed with Neighbor-joining (NJ) method based on p-distance model using the full coding genome. Analyses were conducted with 1000 bootstrap replicates. Complete coding genomes obtained are indicated by the color's dots (GenBank accession numbers).

Fig. 2. A. Schematic diagram showing the genome organization of bovine polyomavirus 1 (BPyV-1). Putative coding regions for VP1, VP2, VP3, small T antigen (Small Tag), and large T antigen (Large Tag) are marked by arrows. B. Phylogenetic tree based on the complete nucleotide LTag region. MEGA6 was used for phylogeny inference under the maximum likelihood (ML) method based on General Time Reversible (GTR) model. Analyses were conducted with 1000 bootstrap replicates. The isolate representing the new BPyV-1 species is indicated with orange dot (GenBank accession number). PyVs ICTV reference sequences were retrieved from the GenBank database. GenBank accession numbers are available for the phylogenetic tree.

Sup. Fig. 3. Taxonomic classification of bacteriophage reads. Bar charts of reads based on BLASTn,  $E$ -value  $< 1 \times 10^{-5}$  against the GenBank non-redundant database (nr). (FBS) Fetal bovine serum, (NCS) Newborn calf serum and (BCS) bovine calf serum. (M) Mexico, (NZ) New Zealand and (USA0 United States America.

Fig.1

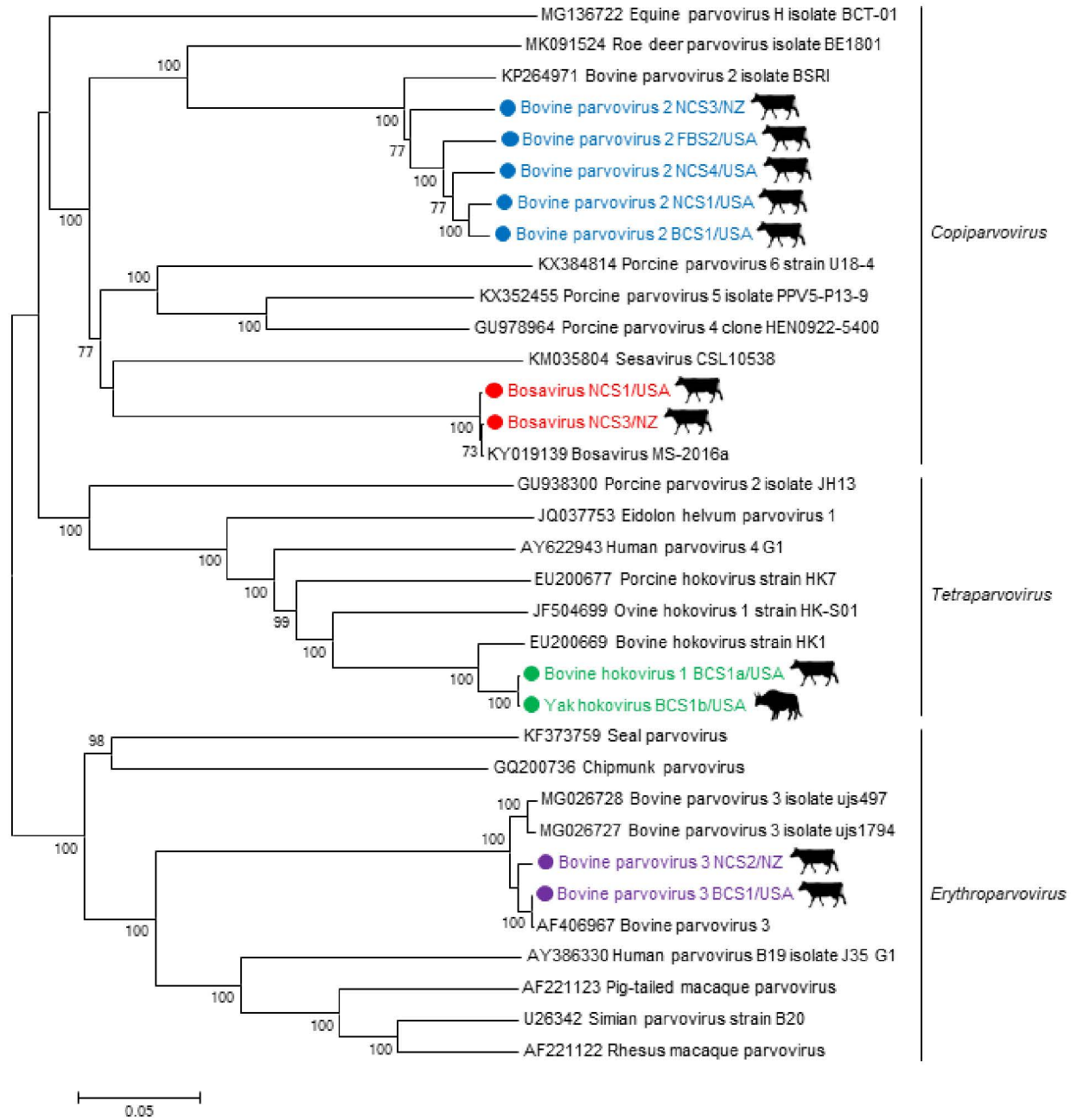
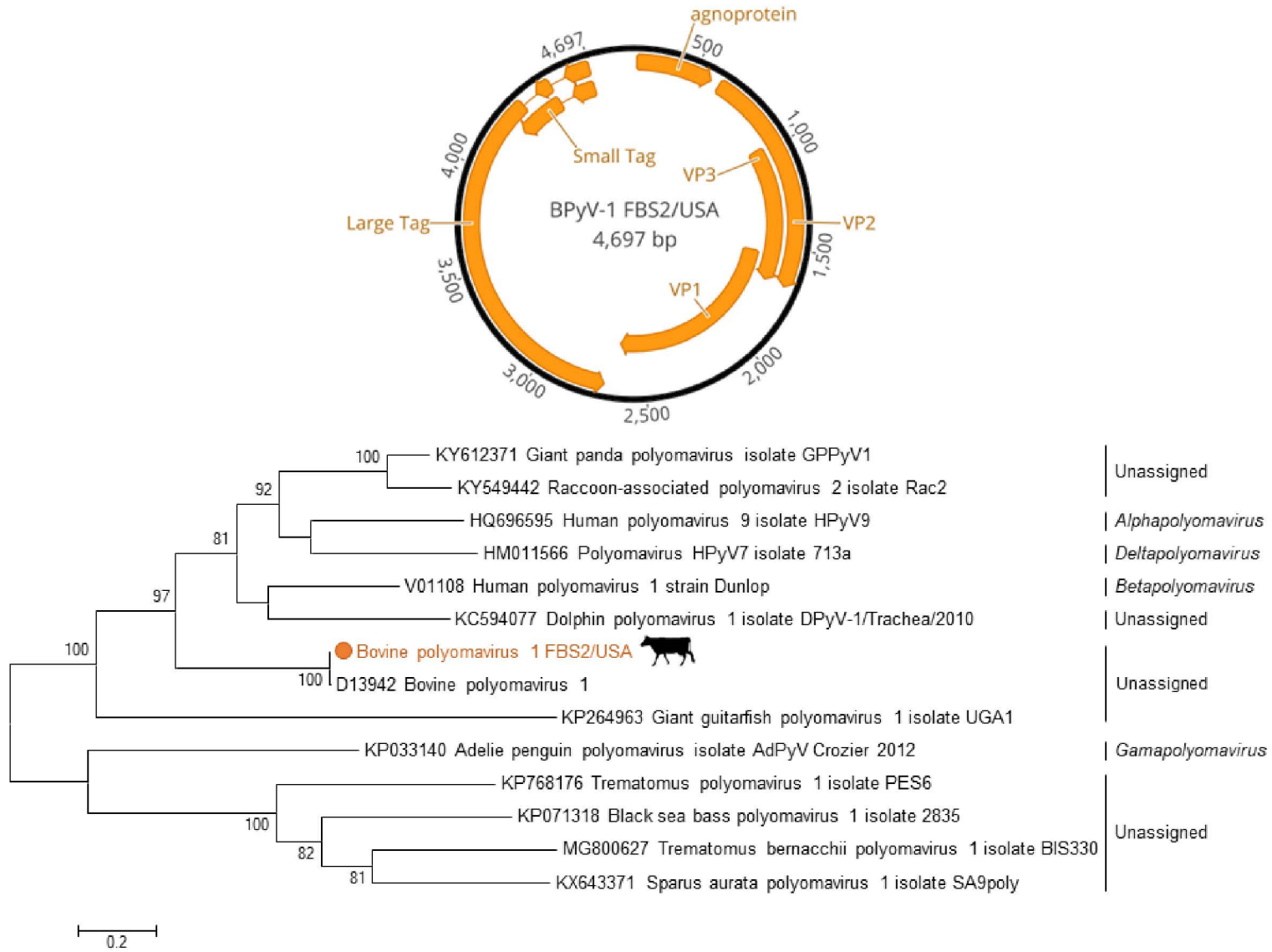
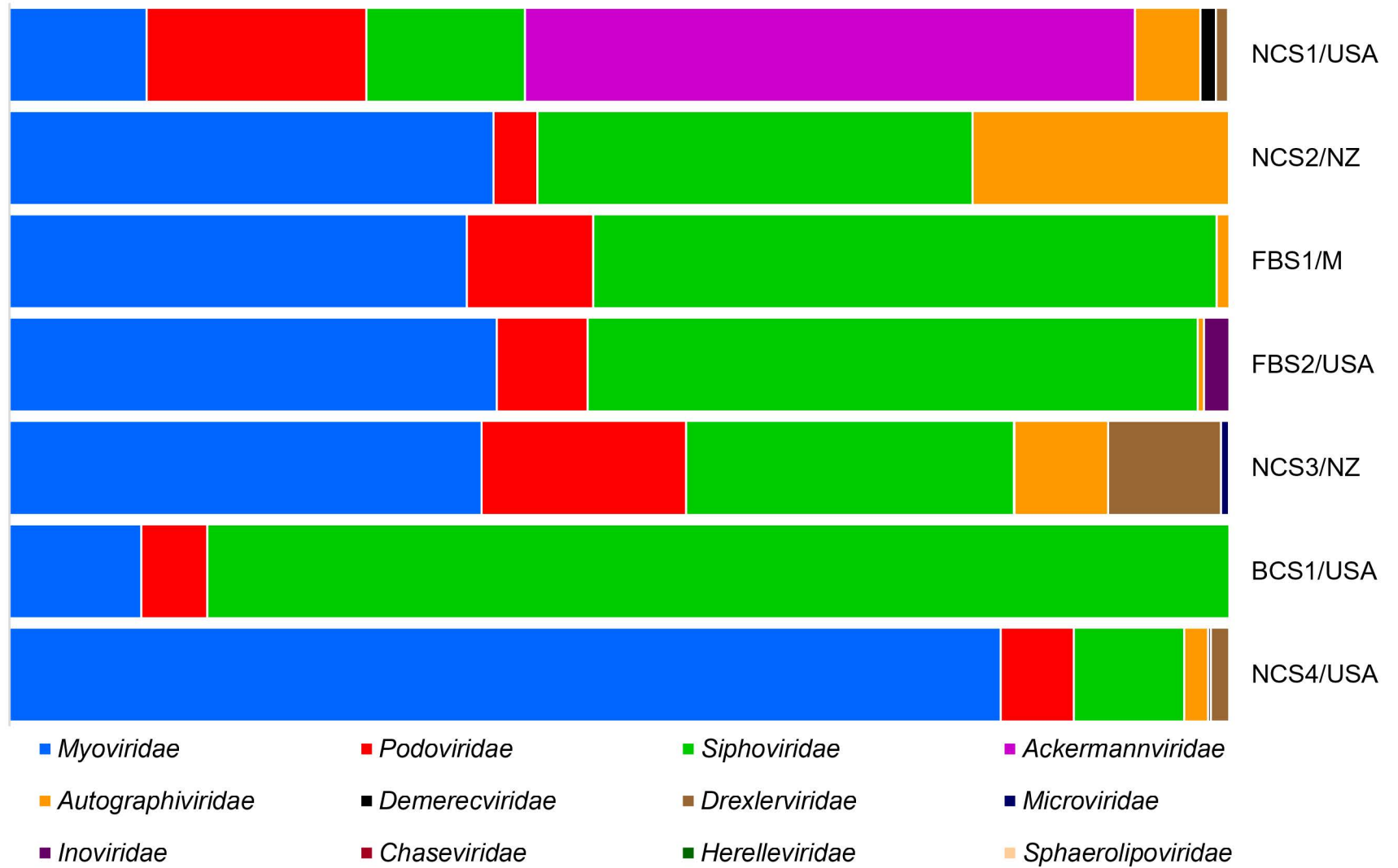


Fig. 2



Sup. Fig. 3



Sample <sup>a</sup>	Best blast hit (BLASTN, $E$ -value $< 1 \times 10^{-5}$ ) <sup>b</sup>	No. of reads <sup>c</sup>	No. of hits	Contigs lengths	Nucleotide identity range <sup>d</sup>
FBS1 MX	Bovine parvovirus 3	18	4	181-311	89.1-93.7%
	Bovine polyomavirus 1	2	1	205	99%
	Bovine respiratory syncytial virus	2	1	201	99%
	Moloney murine leukemia virus	12	1	206	100%
FBS2 USA	Bovine parvovirus 2	1138	43	107-1904	81.4-97.7%
	Bovine parvovirus 3	3	1	219	89%
	Bovine polyomavirus 1	660	21	106-2250	93-100%
	Bovine viral diarrhea virus 1	5	2	129-180	88.6-93%
	Bovine viral diarrhea virus 2	6	2	151-224	89.7-94.7%
	Swinepox virus	6	3	157-172	99.7-100%
NCS1 USA	Bovine bocaparvovirus 2	878	16	122-3110	92.8-100%
	Bosavirus	1806	34	101-3021	85.1-100%
	Bovine hokovirus 1	63	5	120-2179	87.2-95.5%
	Bovine kobuvirus	4	2	151-207	93.1-95.4%
	Bovine parvovirus 1	8	1	420	96%
	Bovine parvovirus 2	11470	297	101-2552	79-100%
	Bovine parvovirus 3	67	13	113-623	85.4-97.7%
	Cyclovirus Equ1	4	2	103-209	92.2-100%
	Faeces associated gemycircularvirus 14	2	1	192	97.4%
	Gopherus associated genomovirus 1	2	1	181	82.3%
	Mongoose feces-associated gemycircularvirus b	2	1	181	86.2%
	Po-Circo-like virus 21	2	1	246	93.3%
	Porcine associated porprismacovirus 10	2	1	151	88.7%
Swinepox virus	2	1	124	97.6%	



NCS2 NZ	Bosavirus	18	4	157-411	98.6-100%
	Bovine parvovirus 2	44	11	281-1951	77.4-86%
	Bovine parvovirus 3	989123	7700	100-2471	76.3-100%
	Bovine rotavirus A	5	2	113-157	94.24-97.37%
	Starling circovirus	2	1	188	95.2%
NCS3 NZ	Bovine bocaparvovirus 2	4	1	245	100%
	Bosavirus	20458	365	100-2050	80.4-100%
	Bovine adenovirus 4	4	2	103-147	97.1-99.3%
	Bovine parvovirus 2	2002	232	101-1370	76.3-96.6%
	Bovine polyomavirus 1	10	2	141-221	98.2-100%
	Faeces associated gemycircularvirus 14	10	3	190-238	97.9-99.6%
	Faeces associated gemycircularvirus 16	2	1	140	92.1%
	Gopherus associated genomovirus 1	2	1	200	79%
	Mongoose feces-associated gemycircularvirus a	2	1	176	80.7%
	Mongoose feces-associated gemycircularvirus b	22	4	387-571	92.2-99.2%
	Bovine rotavirus A	4	1	298	95.30%
	Human rotavirus A	4	1	103	96.12%
Sewage-associated gemycircularvirus 3	2	1	162	98.8%	
NCS4 USA	Bovine hokovirus 1	2	1	233	88.6%
	Bovine kobuvirus	2	1	203	94.1%
	Bovine parvovirus 2	217	26	149-1679	79.3-98.4%
	Bovine polyomavirus	6	2	115-233	97.3-97.6%
	Bovine serum-associated circular virus	4	1	370	92%
	Genomoviridae sp. ctca367	2	1	119	96.6%

Table 1. Continuation					
BCS1 USA	Bovine adenovirus 6	6	2	280-282	97.9-98.9%
	Bovine hokovirus 1	5661	99	107-1426	86.1-98.6%
	Bovine parvovirus 2	149979	3733	100-2888	74.8-100%
	Bovine parvovirus 3	268265	3569	100-2574	77.6-100%
	Bo-Circo-like virus CH	6	1	149	100%
	Circovirus sp. PoCirV VIRES YN02 C2	3	1	334	91.3%
	Po-Circo-like virus 21	12	3	132-252	85.3-95.5%
	Po-Circo-like virus 22	13	1	192	88.5%
	Po-Circo-like virus 41	3	1	191	93.6%
	Po-Circo-like virus S20	7	1	262	96.5%
Po-Circo-like virus GX19	11	1	480	90.2%	
<sup>a</sup> FBS (Fetal bovine serum), (NCS) Newborn calf serum and (BCS) Bovine calf serum. <sup>b</sup> Analysis performed in BLASTN ( $E$ -value < $1 \times 10^{-5}$ ). <sup>c</sup> Number of reads sequences obtained by mapping to virus RefSeq database (NCBI Reference Sequence Database). <sup>d</sup> Nucleotide identity based on the reference strain on the virus RefSeq database (NCBI Reference Sequence Database).					

Table 2. Summary of sequences that matched with crAssphage present in the commercial batches of bovine serum analyzed by HTS.					
Sample	Origin	No. of reads <sup>a</sup>	No. of hits <sup>b</sup>	Contigs lengths	Nucleotide identity range <sup>c</sup>
FBS1	Mexico	NA	NA	NA	NA
FBS2	United States	6	1	80	86.3%
NCS1	United States	364	69	76-625	81.9-100%
NCS2	New Zealand	197	56	108-409	79.5-100%
NCS3	New Zealand	450	107	64-721	75.6-100%
NCS4	United States	18	8	100-241	86.2-100%
BCS1	United States	2	1	74	82.4%

<sup>a</sup>Reads based on the length of the reference strain included on the bacteriophage RefSeq database (NCBI Reference Sequence Database). <sup>b, c</sup>Identity level based on the reference strain on the bacteriophage RefSeq database (NCBI Reference Sequence Database). Analysis performed using BLASTN ( $E$ -value  $<1 \times 10^{-5}$ ). NCS: Newborn calf serum; FBS: Fetal bovine serum; BCS: Bovine calf serum. NA: Not analyzed.

Supplemental Table 3. Contigs sequences with significant BLASTn hits to crAssphage obtained from commercial bovine serum samples.						
<b>Sample/Country</b>	<b>Best BLASTn hit</b>	<b>Country</b>	<b>Query cover</b>	<b>E-value</b>	<b>Nucleotide identity</b>	<b>GenBank</b>
<b>Contig name</b>						
<b>FBS1/Mexico</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>FBS2/United States</b>	Uncultured crAssphage	USA	100%	1e-15	86.08%	NC024711
Contig/56847*						
<b>NCS1/United States</b>	CrAssphage FA1-2_000172F	Japan	100%	0.0	99.20%	MK415404
Contig/35359*						
<b>NCS2/New Zealand</b>	CrAssphage YS1-2_2437	Japan	100%	0.0	98.78%	MK415410
Contig/15306*						
<b>NCS3/New Zealand</b>	CrAssphage LMMB	Russia	100%	0.0	94.59%	MT006214
Contig/5260*						
<b>NCS4/United States</b>	CrAssphage sp. C0531BW4	South Africa	100%	4e-112	97.93%	MW067003
Contig/37523*						
<b>BCS1/United States</b>	CrAssphage YS1-2_2437	Japan	100%	4e-10	82.43%	MK415410
Contig/20843*						
*Longest contig sequence representative of each batch of bovine serum that match to crAssphage. (FBS) Fetal bovine serum, (NCS) Newborn calf serum and (BCS) Bovine calf serum. (NA) Not analyzed.						

Supplemental Table 4. Primers designed in the present study.			
<b>Primer name</b>	<b>Sequence (5' - 3')</b>	<b>Virus target</b>	<b>Product size (bp)</b>
BosaV 181 F	CCTGATATGTCCATTATACCAG	BosaV	395 bp
BosaV 573 R	GTTAGTAGTGCTCCAAGAACC		
BPV-2 3286 F	ATGACCCTAACAACACACACC	BPV-2	396 bp
BPV-2 3679 R	GTTGTGTGTCCAAGAAATACC		
BVDV-1 255 F	ACAGCACATCTTAGCCTGG	BVDV-1	124 bp
BVDV-1 378 R	GTACAGCAGAGATTTTTAGTAGC		
BRV-A 302 F	GTAAGCCGTTAGAAGCAGATC	BRV-A	191 bp
BRV-A 492 R	TTCAGCAACATCATTTTCATG		

## 5 CONCLUSÕES

- A utilização da metagenômica permitiu caracterizar do viroma presente no soro de suínos de exposição aparentemente saudáveis, lotes comerciais de soro equino e bovino.
- No soro dos suínos foram identificadas novas espécies virais pertencentes as famílias *Anelloviridae* (TTSuV1a, TTSuV-1b, TTSuV-k2a e TTSuV-k2b), *Circoviridae* (PCV-2d) e *Parvoviridae* (PPV-2, PPV-4, PPV-5, PPV-6, PPV-7 e PBoV)
- No soro de equinos foram detectadas sequências intimamente relacionadas para as famílias *Flaviviridae*, *Herpesviridae* e *Parvoviridae*. Particularmente, EqHV, PgV-E e PgV-D foram os mais frequentemente encontrados nos lotes comerciais de soro equino analisados.
- No soro de bovinos foram identificadas novas espécies virais classificadas nos gêneros *Copiparvovirus* (BPV-2 e BosaV), *Tetraparvovirus* (BHoV) e *Erythroparvovirus* (BPV-3) pertencentes a família *Parvoviridae* e BPyV-1 da família *Polyomaviridae*.
- Também, no soro de bovinos foram detectadas sequências relacionadas para vírus que apresentam o genoma *circular Rep-encoding single-stranded (CRESS) DNA* das famílias *Genomoviridae*, *Circoviridae* and *Smacoviridae*.
- Interessantemente, no soro de bovinos foram recuperadas sequências relacionadas para CrAssphage, um bacteriófago descoberto em metagenomas fecais humanos e sugerido como um indicador potencial de contaminação humana fecal.
- A metagenômica aplicada para caracterização do viroma de amostras de soro suíno, equino e bovino, possibilitou a detecção de sequências das mais variadas famílias virais de importância econômica para indústria de animais domésticos.
- Portanto, o presente estudo contribui para o conhecimento do viroma em soros de suínos, equinos e bovinos, buscando auxiliar no esclarecimento de possíveis causas de doenças de etiologia infecciosa nesses animais.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. A. *et al.* Redondoviridae, a Family of Small, Circular DNA Viruses of the Human Oro-Respiratory Tract Associated with Periodontitis and Critical Illness. **Cell host & microbe**, v. 25, n. 5, p. 719- 729.e4, 8 maio 2019.
- ABINANTI, F. R.; WARFIELD, M. S. Recovery of a hemadsorbing virus (HADEN) from the gastrointestinal tract of calves. **Virology**, v. 14, p. 288–289, jun. 1961.
- AFOLABI, K. O. *et al.* Increasing diversity of swine parvoviruses and their epidemiology in African pigs. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 73, n. April, p. 175–183, 2019.
- AGUIRRE, I. M.; FUENTES, R.; CELEDÓN, M. O. Genotypic characterization of Chilean llama (*Lama glama*) and alpaca (*Vicugna pacos*) pestivirus isolates. **Veterinary microbiology**, v. 168, n. 2–4, p. 312–317, jan. 2014.
- ALEMAN, M. *et al.* Serum hepatitis associated with commercial plasma transfusion in horses. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 19, n. 1, p. 120–122, 2005.
- ALLANDER, T. *et al.* A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11609–11614, set. 2001.
- ARRUDA, B. L. *et al.* Identification of a divergent lineage porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–12, 2016.
- AVALOS-RAMIREZ, R. *et al.* Evidence for the presence of two novel pestivirus species. **Virology**, v. 286, n. 2, p. 456–465, ago. 2001.
- BADENHORST, M. *et al.* First detection and frequent occurrence of Equine Hepacivirus in horses on the African continent. **Veterinary Microbiology**, v. 223, n. July, p. 51–58, 2018.
- BAECHLEIN, C. *et al.* Identification of a Novel Hepacivirus in Domestic Cattle from Germany. **Journal of virology**, v. 89, n. 14, p. 7007–7015, jul. 2015.
- BAECHLEIN, C. *et al.* **Pegivirus Infection in Domestic Pigs, Germany.** **Emerging infectious diseases**, jul. 2016.
- BARNES, M. A. *et al.* Frequency of bluetongue and bovine parvovirus infection in cattle in South Carolina dairy herds. **American journal of veterinary research**, v. 43, n. 6, p. 1078–1080, jun. 1982.
- BARZON, L. *et al.* Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 58, n. 2, p. 346–350, out. 2013.

- BECHER, P. *et al.* Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. **The Journal of general virology**, v. 78 ( Pt 6), p. 1357–1366, jun. 1997.
- BECHER, P.; ORLICH, M.; THIEL, H. J. Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. **Journal of virology**, v. 72, n. 6, p. 5165–5173, jun. 1998.
- BECHER, P. *et al.* Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. **Virology**, v. 262, n. 1, p. 64–71, set. 1999.
- BECHER, P. *et al.* Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**, v. 311, n. 1, p. 96–104, jun. 2003.
- BECHER, P. *et al.* Complete genome sequence of a novel pestivirus from sheep. **Journal of virology**, v. 86, n. 20, p. 11412, out. 2012.
- BELÁK, S. *et al.* New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches. **Veterinary microbiology**, v. 165, n. 1–2, p. 95–101, jul. 2013.
- BERGERO, D.; NERY, J. Hepatic diseases in horses. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 92, n. 3, p. 345–355, jun. 2008.
- BERGERON, J.; MENEZES, J.; TIJSSEN, P. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 86–98, nov. 1993.
- BIAGINI, P. Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). **Current topics in microbiology and immunology**, v. 331, p. 21–33, 2009.
- BIGARRÉ, L. *et al.* Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. **The Journal of general virology**, v. 86, n. Pt 3, p. 631–635, mar. 2005.
- BLAKEMORE, W. F.; HARDING, J. D.; DONE, J. T. Ultrastructural observations on the spinal cord of a Landrace pig with congenital tremor type AIII. **Research in veterinary science**, v. 17, n. 2, p. 174–178, set. 1974.
- BLOIS, S. *et al.* High prevalence of co-infection with multiple torque teno sus virus species in italian pig herds. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–7, 2014.
- BLOMSTRÖM, A. L. *et al.* Viral metagenomic analysis of bushpigs (*Potamochoerus larvatus*) in Uganda identifies novel variants of Porcine parvovirus 4 and Torque teno sus virus 1 and 2. **Virology journal**, v. 9, p. 192, set. 2012.
- BLOMSTRÖM, A. L. *et al.* Viral metagenomic analysis displays the Co-infection situation in healthy and PMWS affected pigs. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–11, 2016.



BRADLEY, R. *et al.* Congenital tremor type AI: light and electron microscopical observations on the spinal cords of affected piglets. **Journal of comparative pathology**, v. 93, n. 1, p. 43–59, jan. 1983.

BRAGG, L.; TYSON, G. W. Metagenomics using next-generation sequencing. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1096, p. 183–201, 2014.

BREITBART, M. *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 8, p. 1997–1998, 2017.

BURBELO, P. D. *et al.* Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. **Journal of virology**, v. 86, n. 11, p. 6171–6178, 2012.

CAGATAY, G. N. *et al.* Frequent infection of wild boar with atypical porcine pestivirus (APPV). **Transboundary and emerging diseases**, v. 65, n. 4, p. 1087–1093, ago. 2018.

CARRÈRE-KREMER, S. *et al.* Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 40, p. 41384–41392, 2004.

CARTWRIGHT, S. F.; HUCK, R. A. Viruses isolated in association with herd infertility abortions and stillbirths in pigs. **Veterinary Record**, v. 81, n. 8, p. 196–197, 1967.

CHANDLER, M. *et al.* Breaking and joining single-stranded DNA: the HUH endonuclease superfamily. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 525–538, ago. 2013.

CHANDRIANI, S. *et al.* Identification of a previously undescribed divergent virus from the Flaviviridae family in an outbreak of equine serum hepatitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 15, p. E1407–E1415, 2013.

CHANG, J. *et al.* Potent neutralization activity against type O foot-and-mouth disease virus elicited by a conserved type O neutralizing epitope displayed on bovine parvovirus virus-like particles. **The Journal of general virology**, v. 100, n. 2, p. 187–198, fev. 2019.

CHENG, W. *et al.* Identification and nearly full-length genome characterization of novel porcine bocaviruses. **PloS one**, v. 5, n. 10, p. e13583, out. 2010.

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

CHEUNG, A. K. *et al.* A divergent clade of circular single-stranded DNA viruses from pig feces. **Archives of virology**, v. 158, n. 10, p. 2157–2162, out. 2013.

CHEVAL, J. *et al.* Evaluation of high-throughput sequencing for identifying known and unknown viruses in biological samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3268–3275, 2011.

- CHO, J. G.; DEE, S. A. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 655–662, ago. 2006.
- CHOI, J.; XU, Z.; OU, J. Triple decoding of hepatitis C virus RNA by programmed translational frameshifting. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 5, p. 1489–1497, mar. 2003.
- CONCEIÇÃO-NETO, N. *et al.* Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. **Scientific reports**, v. 5, p. 16532, nov. 2015.
- CORNELISSEN-KEIJSERS, V. *et al.* Discovery of a novel Torque teno sus virus species: genetic characterization, epidemiological assessment and disease association. **The Journal of general virology**, v. 93, n. Pt 12, p. 2682–2691, dez. 2012.
- COTMORE, S. F. *et al.* The family Parvoviridae. **Archives of virology**, v. 159, n. 5, p. 1239–1247, maio 2014.
- COTMORE, S. F. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. **The Journal of general virology**, v. 100, n. 3, p. 367–368, mar. 2019.
- CSÁGOLA, A. *et al.* Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. **Archives of virology**, v. 157, n. 6, p. 1003–1010, jun. 2012.
- DE ARRUDA LEME, R. *et al.* Simultaneous infection with distinct strains of torque teno sus virus (TTSuV) in healthy slaughter-age pigs. **Veterinary research communications**, v. 37, n. 2, p. 183–186, jun. 2013.
- DE BRUIJN, F. J. **Handbook of Molecular Microbial Ecology II**. Wiley-blackwell, 2011. 640 p.
- DE GROOF, A. *et al.* Atypical porcine pestivirus: A possible cause of congenital tremor type A-II in newborn piglets. **Viruses**, v. 8, n. 10, p. 1–13, 2016.
- DE SOUZA, A. J. S. *et al.* First report of equine Pegivirus in South America, Brazil. **Acta Tropica**, v. 152, p. 56–59, 2015.
- DE SOUZA, W. M. *et al.* Novel Parvoviruses from Wild and Domestic Animals in Brazil Provide New Insights into Parvovirus Distribution and Diversity. **Viruses**, v. 10, n. 4, mar. 2018.
- DEA, S. *et al.* Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. **Archives of virology**, v. 145, n. 4, p. 659–688, 2000.
- DELANO, M. L.; MISCHLER, S. A.; UNDERWOOD, W. J. Biology and Diseases of Ruminants: Sheep, Goats, and Cattle. **Laboratory Animal Medicine**, p. 519–614, 2002.

DÉNES, L. et al. Detection and phylogenetic characterization of atypical porcine pestivirus strains in Hungary. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 6, p. 2039–2042, 2018.

DENG, R.; BROCK, K. V. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. **Nucleic acids research**, v. 21, n. 8, p. 1949–1957, abr. 1993.

DESSUREAULT, F. G. *et al.* First report of atypical porcine pestivirus in piglets with congenital tremor in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 4, p. 429–432, 2018.

DIEMER, G. S.; STEDMAN, K. M. A novel virus genome discovered in an extreme environment suggests recombination between unrelated groups of RNA and DNA viruses. **Biology direct**, v. 7, p. 13, jun. 2012.

DIETZE, K. *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). **Rome: FAO's Emergency Prevention System**, v. 1, p. 1–8, 2011.

DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; RODRIGUEZ-VALERA, F. CRISPR analysis suggests that small circular single-stranded DNA smacoviruses infect Archaea instead of humans. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 294, jan. 2019.

DIVERS, T. J. *et al.* A new parvovirus associated with serum hepatitis in horses following inoculation of a common equine biological. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 303–310, 2018.

DOKLAND, T. The structural biology of PRRSV. **Virus research**, v. 154, n. 1–2, p. 86–97, dez. 2010.

DONE, J. T. Congenital Nervous Diseases of Pigs: A Review. **Laboratory Animals**, v. 2, n. 2, p. 207–218, 1968.

DONE, J. T. *et al.* Porcine congenital tremor type AII: spinal cord morphometry. **The British veterinary journal**, v. 142, n. 2, p. 145–150, 1986.

DORTMANS, J. C. F. M. *et al.* Molecular characterization of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV) isolated in the Netherlands from 2014 to 2016. **PLoS one**, v. 14, n. 6, p. e0218481, 2019.

DREXLER, J. F. et al. Evidence for Novel Hepaciviruses in Rodents. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 41, n. 1, p. 8–13, jan. 2013.

EPSTEIN, J. H. et al. Identification of GBV-D, a novel GB-like flavivirus from old world frugivorous bats (*Pteropus giganteus*) in Bangladesh. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 7, p. e1000972, jul. 2010.

FAO/OIE/WB. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Organisation for Animal Health/World Bank. Good practices for biosecurity in the pig sector - Issues and options in developing and transition countries. **FAO Animal Production and Health Paper No. 169. Rome, FAO., 2010.**

FIGUEIREDO, A. S. *et al.* First description of Theiler's disease-associated virus infection and epidemiological investigation of equine pegivirus and equine hepacivirus coinfection in Brazil. **Transboundary and emerging diseases**, v. 66, n. 4, p. 1737–1751, jul. 2019.

FIRTH, C. *et al.* Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. **mBio**, v. 5, n. 5, p. e01933-14, out. 2014.

FONSECA, E. K. U. N. Etymologia: Parvovirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 293, fev. 2018.

FRANKE, J. *et al.* Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. **BMC veterinary research**, v. 10, p. 119, maio 2014.

GAGNIEUR, L. *et al.* Unbiased analysis by high throughput sequencing of the viral diversity in fetal bovine serum and trypsin used in cell culture. **Biologicals**, v. 42, n. 3, p. 145–152, 2014.

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

GATHER, T. *et al.* Vertical transmission of hepatitis C virus-like nonprimate hepacivirus in horses. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 10, p. 2540–2551, 2016a.

GATHER, T. *et al.* Acute and chronic infections with nonprimate hepacivirus in young horses. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 1–5, 2016b.

GATTO, I. R. H. *et al.* Detection of atypical porcine pestivirus in Brazil in the central nervous system of suckling piglets with congenital tremor. **Transboundary and emerging diseases**, v. 65, n. 2, p. 375–380, abr. 2018.

GATTO, I. R. H.; SONÁLIO, K.; DE OLIVEIRA, L. G. Atypical Porcine Pestivirus (APPV) as a New Species of Pestivirus in Pig Production. **Frontiers in veterinary science**, v. 6, p. 35, 21 fev. 2019.

GEMAQUE, B. S. *et al.* Hepacivirus infection in domestic horses, Brazil, 2011-2013. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 12, p. 2180–2182, 2014.

GILBERT, M. *et al.* Global distribution data for cattle, buffaloes, horses, sheep, goats, pigs, chickens and ducks in 2010. **Scientific data**, v. 5, p. 180227, out. 2018.

GOFFARD, A.; DUBUISSON, J. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. **Biochimie**, v. 85, n. 3–4, p. 295–301, 2003.

GOMARA, M. J. *et al.* Peptide Assembly on the Membrane Determines the HIV-1 Inhibitory Activity of Dual-Targeting Fusion Inhibitor Peptides. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3257, 2019.

GOUTTENOIRE, J.; PENIN, F.; MORADPOUR, D. Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. **Reviews in medical virology**, v. 20, n. 2, p. 117–129, mar. 2010.

GSTRAUNTHALER, G; LINDL, T. Zell-und Gewebekultur. **Zell-und Gewebekultur**, v. 10, p. 978–983, 2013.

GUGLICK, M. A. *et al.* Hepatic disease associated with administration of tetanus antitoxin in eight horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 206, n. 11, p. 1737–1740, jun. 1995.

GUNN, L. *et al.* Detection and characterisation of novel bocavirus (genus Bocaparvovirus) and gastroenteritis viruses from asymptomatic pigs in Ireland. **African Journal of Disability**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2015.

GUO, Z. *et al.* The prevalent status and genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China: a molecular epidemiological perspective. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, p. 2, 2018a.

GUO, Z. *et al.* Identification and genomic characterization of a novel CRESS DNA virus from a calf with severe hemorrhagic enteritis in China. **Virus research**, v. 255, p. 141–146, ago. 2018b.

HAKHEEM, K. R.; TOMBULOĞLU, H.; TOMBULOĞLU, G. **Plant omics: Trends and applications**. 1. ed. Basel, Switzerland: Springer, 2016. 514 p.

HALL, R. J. *et al.* Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. **Journal of virological methods**, v. 195, p. 194–204, jan. 2014.

HARADA, T.; TAUTZ, N.; THIEL, H. J. E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. **Journal of virology**, v. 74, n. 20, p. 9498–9506, out. 2000.

HARGITAI, R. *et al.* Detection and genetic characterization of a novel parvovirus distantly related to human bufavirus in domestic pigs. **Archives of Virology**, v. 161, n. 4, p. 1033–1037, 2016.

HAUSE, B. M. *et al.* Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 10, p. 2994–2998, 2015.

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

HOFFMANN, B. *et al.* Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 3, p. 469–472, mar. 2012.

HOLTKAMP, D. J. *et al.* Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. **Journal of Swine Health and Production**, v. 21, n. 2, p. 72–84, 2013.

HOWITT, B. F. Equine encephalomyelitis. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 493–510, 1932.

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

HUCK, R. A.; WOODS, D. W.; ORR, J. P. Isolation of a bovine parvovirus in the United Kingdom. **The Veterinary record**, v. 96, n. 7, p. 155–156, fev. 1975.

HULST, M. M.; MOORMANN, R. J. Erns protein of pestiviruses. **Methods in enzymology**, v. 342, p. 431–440, 2001.

ILYINA, T. V; KOONIN, E. V. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 13, p. 3279–3285, jul. 1992.

JOHNSON, C. R. *et al.* Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses. **The Journal of general virology**, v. 92, n. Pt 5, p. 1107, 2011.

JONES, C. T. *et al.* Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. **Journal of virology**, v. 81, n. 16, p. 8374–8383, ago. 2007.

KAMADA, K. *et al.* Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. **Virology**, v. 321, n. 2, p. 341–348, abr. 2004.

KAPOOR, A. *et al.* Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. v. 108, n. 28, p. 1–6, 2011.

KAPOOR, A. *et al.* Identification of a Pegivirus (GB Virus-Like Virus) That Infects Horses. **Journal of Virology**, v. 87, n. 12, p. 7185–7190, 2013a.

KAPOOR, A. *et al.* Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. **mBio**, v. 4, n. 2, p. e00216-13, abr. 2013b.

- KAPOOR, A. et al. Virome Analysis of Transfusion Recipients Reveals a Novel Human Virus That Shares Genomic Features with Hepaciviruses and Pegiviruses. **mBio**, v. 6, n. 5, p. e01466-15, set. 2015.
- KAPPES, M. A.; FAABERG, K. S. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. **Virology**, v. 479–480, p. 475–486, 2015.
- KAPUR, V. et al. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. **Journal of General Virology**, v. 77, n. 6, p. 1271–1276, 1996.
- KAZLAUSKAS, D. et al. Evolutionary history of ssDNA bacilladnaviruses features horizontal acquisition of the capsid gene from ssRNA nodaviruses. **Virology**, v. 504, p. 114–121, abr. 2017.
- KAZLAUSKAS, D.; VARSANI, A.; KRUPOVIC, M. Pervasive Chimerism in the Replication-Associated Proteins of Uncultured Single-Stranded DNA Viruses. **Viruses**, v. 10, n. 4, abr. 2018.
- KEFFABER, K. K. Reproduction failure of unknown etiology. **Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.**, v. 1, p. 1–9, 1989.
- KEKARAINEN, T.; SIBILA, M.; SEGALÉS, J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 4, p. 833–837, 2006.
- KEKARAINEN, T.; SEGALÉS, J. Torque teno virus infection in the pig and its potential role as a model of human infection. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 180, n. 2, p. 163–168, maio 2009.
- KEKARAINEN, T.; SEGALÉS, J. Torque teno sus virus in pigs: an emerging pathogen? **Transboundary and emerging diseases**, v. 59 Suppl 1, p. 103–108, mar. 2012.
- KEY, N.; MCBRIDE, W. The Changing Economics of U.S. Hog Production. **United States Department of Agriculture and Economic Research Service**, v. ERR-52, 2007.
- KHODAKARAM-TAFTI, A.; FARJANIKISH, G. H. Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 3, p. 154–163, 2017.
- KIM, W. I. et al. Significance of genetic variation of PRRSV ORF5 in virus neutralization and molecular determinants corresponding to cross neutralization among PRRS viruses. **Veterinary microbiology**, v. 162, n. 1, p. 10–22, fev. 2013.
- KIM, S. et al. Detection of atypical porcine pestivirus (APPV) from a case of congenital tremor in Korea. **Korean Journal of Veterinary Service**, v. 40, n. 3, p. 209–213, 2017.

KING, A. M. Q. *et al.* (EDS.). Family - Anelloviridae. In: San Diego: Elsevier, 2012a. p. 331–341.

KING, A. M. Q. *et al.* (EDS.). Family - Parvoviridae. In: San Diego: Elsevier, 2012b. p. 405–425.

KING, A. M. Q. *et al.* Virus taxonomy. **Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 486–487, 2012c.

KINSLEY, A. T. Dancing pigs. **Vet Med**, v. 17, p. 123, 1922.

KIRCHER, P.; CARLSON, M. Swine Care, Selection and Showmanship. Outreach & Extension University of Missouri Columbia, 2018.

KNOX, B. *et al.* Congenital ataxia and tremor with cerebellar hypoplasia in piglets borne by sows treated with Neguvon vet. (metrifonate, trichlorfon) during pregnancy. **Nordisk veterinærmedicin**, v. 30, n. 12, p. 538–545, dez. 1978.

KOONIN, E. V.; ILYINA, T. V. Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication. **Bio Systems**, v. 30, n. 1–3, p. 241–268, 1993.

KOONIN, E. V. *et al.* The Big Bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 925–939, dez. 2008.

KOONIN, E. V.; DOLJA, V. V.; KRUPOVIC, M. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. **Virology**, v. 479–480, p. 2–25, maio 2015.

KOPPER, J. J. *et al.* Theiler's disease associated with administration of tetanus antitoxin contaminated with nonprimate (equine) hepacivirus and equine parvovirus-hepatitis virus. **Equine Veterinary Education**, p. 1–5, 2018.

KRUPOVIC, M.; RAVANTTI, J. J.; BAMFORD, D. H. Geminiviruses: a tale of a plasmid becoming a virus. **BMC evolutionary biology**, v. 9, p. 112, maio 2009.

KRUPOVIC, M. Networks of evolutionary interactions underlying the polyphyletic origin of ssDNA viruses. **Current opinion in virology**, v. 3, n. 5, p. 578–586, out. 2013.

KRUPOVIC, M.; KOONIN, E. V. Multiple origins of viral capsid proteins from cellular ancestors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 12, p. E2401–E2410, mar. 2017.

KRUPOVIC, M. *et al.* *Cressdnaviricota*: a Virus Phylum Unifying Seven Families of Rep-Encoding Viruses with Single-Stranded, Circular DNA Genomes. **Journal of virology**, v. 94, n. 12, p. 1–4, jun. 2020.

LACKNER, T.; THIEL, H. J.; TAUTZ, N. Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1510–1515, jan. 2006.



- LAMBERT, C. *et al.* Considerations for optimization of high-throughput sequencing bioinformatics pipelines for virus detection. **Viruses**, v. 10, n. 10, 2018.
- LAU, S. K. P. *et al.* Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 8, p. 1840–1848, 2008.
- LAU, S. K. P. *et al.* Co-existence of multiple strains of two novel porcine bocaviruses in the same pig, a previously undescribed phenomenon in members of the family Parvoviridae, and evidence for inter- and intra-host genetic diversity and recombination. **The Journal of general virology**, v. 92, n. Pt 9, p. 2047–2059, set. 2011.
- LAUCK, M. *et al.* A novel hepacivirus with an unusually long and intrinsically disordered NS5A protein in a wild Old World primate. **Journal of virology**, v. 87, n. 16, p. 8971–8981, ago. 2013.
- LEFKOWITZ, E. J. *et al.* Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D708–D717, jan. 2018.
- LEVIS, D. G.; BAKER, R. B. Biosecurity of Pigs and Farm Security. University of Nebraska--Lincoln, Extension, 2011.
- LI, B. *et al.* Epidemiology and evolutionary characteristics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China between 2006 and 2010. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3175–3183, set. 2011.
- LI, L. *et al.* Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 9, p. 1385–1392, 2013.
- LI, L. *et al.* Exploring the virome of diseased horses. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 9, p. 2721–2733, 2015.
- LI, W. *et al.* Crystal Structure of Classical Swine Fever Virus NS5B Reveals a Novel N-Terminal Domain. **Journal of Virology**, v. 92, n. 14, p. e00324-18, 15 jul. 2018.
- LINNEN, J. *et al.* Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5248, p. 505–508, jan. 1996.
- LIU, J. *et al.* Three new emerging subgroups of Torque teno sus viruses (TTSuVs) and co-infection of TTSuVs with porcine circovirus type 2 in China. **Virology journal**, v. 10, p. 189, jun. 2013.
- LIU, L. *et al.* Maximum likelihood and Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic characterization of a novel pestivirus, SVA/cont-08. **Archives of virology**, v. 154, n. 7, p. 1111–1116, 2009a.
- LIU, L. *et al.* Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04\_KhonKaen. **Veterinary microbiology**, v. 138, n. 1–2, p. 62–68, jul. 2009b.

- LIU, L. *et al.* Identification of a novel bufavirus in domestic pigs by a viral metagenomic approach. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 7, p. 1592–1596, 2016.
- LU, G. *et al.* First description of hepacivirus and pegivirus infection in domestic Horses in China: A study in guangdong province, heilongjiang province and Hong Kong district. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–12, 2016.
- LU, G. *et al.* Identification and genetic characterization of hepacivirus and pegivirus in commercial equine serum products in China. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–11, 2017.
- LU, G.; HUANG, J.; LI, S. Genomic sequencing and characterization of Theiler's disease-associated virus identified in commercial equine sera in China. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 9, p. 1221–1226, 2018.
- LU, G. *et al.* Natural recombination of equine hepacivirus subtype 1 within the NS5A and NS5B genes. **Virology**, v. 533, p. 93–98, 2019.
- LUDEMANN, L.; LAGER, K. M. Porcine reproductive and respiratory syndrome. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, p. 1116–1127, 2008.
- LYONS, S. *et al.* Nonprimate hepaciviruses in domestic horses, United kingdom. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 12, p. 1976–1982, dez. 2012.
- LYONS, S. *et al.* Viraemic frequencies and seroprevalence of non-primate hepacivirus and equine pegiviruses in horses and other mammalian species. **The Journal of general virology**, v. 95, n. Pt 8, p. 1701–1711, ago. 2014.
- MAGGI, F. *et al.* Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4807–4810, set. 2005.
- MANZIN, A. *et al.* Global impact of Torque teno virus infection in wild and domesticated animals. **Journal of infection in developing countries**, v. 9, n. 6, p. 562–570, jul. 2015.
- MARSH, H. Supplementary note to article on equine encephalomyelitis. **J Am Vet Med Assoc**, v. 81, p. 330–331, 1937a.
- MARSH, H. Losses of undetermined cause following an outbreak of equine encephalomyelitis. **J Am Vet Med Assoc**, v. 91, p. 88–93, 1937b.
- MARTÍNEZ-GUINÓ, L.; KEKARAINEN, T.; SEGALÉS, J. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1390–1395, jun. 2009.
- MARTÍNEZ-GUINÓ, L. *et al.* Torque teno sus virus (TTV) detection in aborted and slaughterhouse collected fetuses. **Theriogenology**, v. 74, n. 2, p. 277–281, jul. 2010.
- MASEMBE, C. *et al.* Viral metagenomics demonstrates that domestic pigs are a potential reservoir for Ndumu virus. **Virology journal**, v. 9, p. 218, set. 2012.

- MASUDA, T. *et al.* Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. **Veterinary microbiology**, v. 171, n. 1–2, p. 66–73, jun. 2014.
- MCGLONE, J. J. The future of pork production in the world: Towards sustainable, welfare-positive systems. **Animals**, v. 3, n. 2, p. 401–415, 2013.
- MCKEOWN, N. E. *et al.* Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. **Veterinary microbiology**, v. 104, n. 1–2, p. 113–117, nov. 2004.
- MESSER, N. T. 4th; JOHNSON, P. J. Idiopathic acute hepatic disease in horses: 12 cases (1982-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 12, p. 1934–1937, jun. 1994.
- MEYER, K. F. A Summary of Recent Studies on Equine Encephalomyelitis. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 78, n. 2, p. 196, 1933.
- MITRA, N. *et al.* Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. **The Journal of general virology**, v. 97, n. 8, p. 1771–1784, ago. 2016.
- MOENNIG, V.; HOUE, H.; LINDBERG, A. BVD control in Europe: current status and perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 63–74, 2005.
- MONINI, M. *et al.* Detection of Torque Teno Sus Virus in Pork Bile and Liver Sausages. **Food and environmental virology**, v. 8, n. 4, p. 283–288, dez. 2016.
- MORAIS, M. P.; COSTA, P. R. Parvoviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p 388–392.
- MOREIRA-SOTO, A. *et al.* Cross-order host switches of hepatitis C-related viruses illustrated by a novel hepacivirus from sloths. **Virus Evolution**, v. 6, n. 2, 1 jul. 2020.
- MORIKAWA, K. *et al.* Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. **Journal of viral hepatitis**, v. 18, n. 5, p. 305–315, maio 2011.
- MÓSENA, A. C. S. *et al.* Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 1, p. 22–26, 2018.
- MOTTOLA, G. *et al.* Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. **Virology**, v. 293, n. 1, p. 31–43, fev. 2002.
- MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. **Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis.** *Nature reviews. Microbiology*, set. 2008.

- MURTAUGH, M. P. *et al.* The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Virus research**, v. 154, n. 1–2, p. 18–30, dez. 2010.
- NASH, T. E. *et al.* Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. **Journal of virology**, v. 85, n. 3, p. 1182–1192, fev. 2011.
- NEDDERMANN, P. *et al.* The nonstructural proteins of the hepatitis C virus: structure and functions. **Biological chemistry**, v. 378, n. 6, p. 469–476, jun. 1997.
- NEILL, J. D. *et al.* Complete genome sequence of pronghorn virus, a pestivirus. **Genome announcements**, v. 2, n. 3, jun. 2014.
- NEILL, J. D. *et al.* Identification of BVDV2b and 2c subgenotypes in the United States: Genetic and antigenic characterization. **Virology**, v. 528, p. 19–29, 2019.
- NELSEN, C. J.; MURTAUGH, M. P.; FAABERG, K. S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. **Journal of virology**, v. 73, n. 1, p. 270–280, 1999.
- NG, T. F. F. *et al.* A metagenomics and case-control study to identify viruses associated with bovine respiratory disease. **Journal of virology**, v. 89, n. 10, p. 5340–5349, maio 2015.
- NI, J. *et al.* Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in china. **Virology Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2014.
- NIETO, D. *et al.* Development of an indirect ELISA assay for the detection of IgG antibodies against the ORF1 of Torque teno sus viruses 1 and 2 in conventional pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 180, n. 1, p. 22–27, 2015.
- NISHIZAWA, T. *et al.* A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 241, n. 1, p. 92–97, dez. 1997.
- OIE. World Organisation for Animal Health. *In*: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. **Terrestrial Manual**, 2018. Chapter 3.8.6., p. 1579–1593.
- OKAMOTO, H. *et al.* Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. **The Journal of general virology**, v. 83, n. Pt 6, p. 1291–1297, jun. 2002.
- OKAMOTO, H. TT viruses in animals. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 331, p. 35–52, 2009.
- OZAWA, M. *et al.* Full genome sequences of torque teno sus virus strains that coinfect a pig with postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan: implications for genetic diversity. **Archives of virology**, v. 160, n. 12, p. 3067–3074, dez. 2015.

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

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

PANCIERA, R. J. Serum hepatitis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 2, p. 408–410, jul. 1969.

PAPLOSKI, I. A. D. *et al.* Temporal Dynamics of Co-circulating Lineages of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2486, 1 nov. 2019.

PARK, S. H.; REHERMANN, B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 13–24, jan. 2014.

PARRAS-MOLTÓ, M. *et al.* Evaluation of bias induced by viral enrichment and random amplification protocols in metagenomic surveys of saliva DNA viruses. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 119, jun. 2018.

PATTERSON, D. S. *et al.* Neurochemistry of the spinal cord in British Saddleback piglets affected with congenital tremor, type A-IV, a second form of hereditary cerebrosplinal hypomyelinogenesis. **Journal of neurochemistry**, v. 21, n. 2, p. 397–406, ago. 1973.

PÉNZES, J. J. *et al.* Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. **Archives of Virology**, v. 165, n. 9, p. 2133–2146, 2020.

PFAENDER, S. *et al.* Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. **Emerging microbes & infections**, v. 3, n. 3, p. e21, mar. 2014.

PFAENDER, S. *et al.* Clinical course of infection and viral tissue tropism of hepatitis C virus-like nonprimate hepaciviruses in horses. **Hepatology**, v. 61, n. 2, p. 447–459, 2015.

PFAENDER, S. *et al.* Immune protection against reinfection with nonprimate hepacivirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 12, p. E2430–E2439, mar. 2017.

POSTEL, A. *et al.* Improved strategy for phylogenetic analysis of classical swine fever virus based on full-length E2 encoding sequences. **Veterinary research**, v. 43, n. 1, p. 50, jun. 2012.

POSTEL, A. *et al.* Close relationship of ruminant pestiviruses and classical Swine Fever virus. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 4, p. 668–672, abr. 2015.

POSTEL, A. *et al.* Frequent presence of hepaciviruses and pegiviruses in commercial equine serum pools. **Veterinary Microbiology**, v. 182, p. 8–14, 2016a.

POSTEL, A. *et al.* Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–9, 2016b.

POSTEL, A. *et al.* High Abundance and Genetic Variability of Atypical Porcine Pestivirus in Pigs from Europe and Asia. **Emerg Infect Dis.**, v. 23, n. 12, p. 2104–2107, 2017.

POZZUTO, T. *et al.* In utero transmission of porcine torqueto virus. **Veterinary microbiology**, v. 137, n. 3–4, p. 375–379, jun. 2009.

PRIETO, C.; CASTRO, J. M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 1–16, 2005.

PRONOST, S. *et al.* Prevalence of Equine Hepacivirus Infections in France and Evidence for Two Viral Subtypes Circulating Worldwide. **Transboundary and emerging diseases**, v. 64, n. 6, p. 1884–1897, dez. 2017.

PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J.; ROBINSON, A. Genetics of somatic mammalian cells: III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. **The Journal of experimental medicine**, v. 108, n. 6, p. 945, 1958.

QIU, J. *et al.* The transcription profile of the bocavirus bovine parvovirus is unlike those of previously characterized parvoviruses. **Journal of virology**, v. 81, n. 21, p. 12080–12085, nov. 2007.

QUAN, P. L. *et al.* Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 20, p. 8194–8199, maio 2013.

RAEV, S. *et al.* An Outbreak of a Respiratory Disorder at a Russian Swine Farm Associated with the Co-Circulation of PRRSV1 and PRRSV2. **Viruses**, v. 12, n. 10, out. 2020.

RAMSAY, J. D. *et al.* Experimental transmission of equine hepacivirus in horses as a model for hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 61, n. 5, p. 1533–1546, 2015.

RAMSAY, J. D. Science-in-brief: Equine viral hepatitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 49, n. 2, p. 138–140, 2017.

REN, X. *et al.* An alternative strategy for studying emerging atypical porcine pestivirus. **Journal of Vaccines and Immunology**, v. 6, n. 1, p. 22–25, 2020.

REUTER, G. *et al.* Porcine kobuvirus in wild boars (*Sus scrofa*). **Archives of virology**, v. 158, n. 1, p. 281–282, jan. 2013.

REUTER, G. *et al.* Non-primate hepacivirus infection with apparent hepatitis in a horse — Short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 62, n. 3, p. 422–427, 2014.

REYES, A. *et al.* Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 607–617, set. 2012.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 66–74, nov. 1994.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 31, n. 2, p. 127–131, jun. 2003.

RIDPATH, J. F. *et al.* Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 22, n. 2, p. 184–191, mar. 2010.

RIDPATH, J. F. *et al.* Comparison of acute infection of calves exposed to a high-virulence or low-virulence bovine viral diarrhea virus or a HoBi-like virus. **American journal of veterinary research**, v. 74, n. 3, p. 438–442, mar. 2013.

ROGERS, A. J. *et al.* Prevalence of the Novel Torque Teno Sus Virus Species k2b from Pigs in the United States and Lack of Association with Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome or Mulberry Heart Disease. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 6, p. 1877–1883, 2017.

RONECKER, S. *et al.* Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. **The Journal of general virology**, v. 89, n. Pt 9, p. 2114–2121, set. 2008.

ROSARIO, K.; DUFFY, S.; BREITBART, M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. **Archives of virology**, v. 157, n. 10, p. 1851–1871, out. 2012.

ROSSOW, K. D. *et al.* Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 6, n. 1, p. 3–12, jan. 1994.

ROUX, S. *et al.* Chimeric viruses blur the borders between the major groups of eukaryotic single-stranded DNA viruses. **Nature communications**, v. 4, p. 2700, 2013.

RUGGLI, N. *et al.* Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. **Journal of virology**, v. 70, n. 6, p. 3478–3487, jun. 1996.

SADEGHI, M. *et al.* Virome of US bovine calf serum. **Biologicals**, v. 46, p. 64–67, 2017.

SAEKHOW, P.; IKEDA, H. Prevalence and genomic characterization of porcine parvoviruses detected in Chiangmai area of Thailand in 2011. **Microbiology and Immunology**, v. 59, n. 2, p. 82–88, 2015.

SAINZ, B. *et al.* Permissiveness of human hepatoma cell lines for HCV infection. **Virology Journal**, v. 9, p. 1–16, 2012.

SANDALS, W. C.; POVEY, R. C.; MEEK, A. H. Prevalence of bovine parvovirus infection in Ontario dairy cattle. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire**, v. 59, n. 2, p. 81–86, abr. 1995.

SCHEEL, T. K. H. *et al.* Characterization of nonprimate hepacivirus and construction of a functional molecular clone. v. 112, n. 7, p. 7–12, 2015a.

SCHEEL, T. K. H.; SIMMONDS, P.; KAPOOR, A. Surveying the global virome: Identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses. **Antiviral Research**, v. 115, p. 83–93, 2015b.

SCHOLZ, M. B.; LO, C. C.; CHAIN, P. S. G. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 9–15, fev. 2012.

SCHWARZ, L. *et al.* Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 1–14, 2017.

SHAN, T. *et al.* Genomic characterization and high prevalence of bocaviruses in swine. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. 1–7, 2011a.

SHAN, T. *et al.* The Fecal Virome of Pigs on a High-Density Farm. **Journal of Virology**, v. 85, n. 22, p. 11697–11708, 2011b.

SHANMUGAM, S.; YI, M. Efficiency of E2-p7 processing modulates production of infectious hepatitis C virus. **Journal of virology**, v. 87, n. 20, p. 11255–11266, out. 2013.

SHEPARD, C. W.; FINELLI, L.; ALTER, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 5, n. 9, p. 558–567, set. 2005.

SHI, M. *et al.* Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. **Virus Research**, v. 154, n. 1–2, p. 7–17, 2010a.

SHI, M. *et al.* Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. **Journal of virology**, v. 84, n. 17, p. 8700–8711, set. 2010b.



- SIBILA, M. *et al.* Torque teno virus (TTV) infection in sows and suckling piglets. **Veterinary microbiology**, v. 137, n. 3–4, p. 354–358, jun. 2009.
- SIBLEY, S. D. *et al.* Discovery and characterization of distinct simian pegiviruses in three wild African Old World monkey species. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e98569, 2014.
- SIMMONDS, P. The Origin of Hepatitis C Virus BT - Hepatitis C Virus: From **Molecular Virology to Antiviral Therapy**. In: BARTENSCHLAGER, R. (Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 1–15.
- SIMMONDS, P. *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017a.
- SIMMONDS, P. *et al.* Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. **Nature reviews. Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 161–168, mar. 2017b.
- SIMONS, J. N. *et al.* Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 8, p. 3401–3405, abr. 1995.
- SIMONS, J. N. *et al.* Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genome organization. **Journal of virology**, v. 70, n. 9, p. 6126–6135, set. 1996.
- SMITH, D. B. *et al.* Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 11, p. 2894–2907, 2016.
- SMITH, D. B. *et al.* Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 8, p. 2106–2112, 2017.
- STANG, A. *et al.* Characterization of virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 2, p. 716–720, fev. 2005.
- STAPLETON, J. T. *et al.* The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. **The Journal of general virology**, v. 92, n. Pt 2, p. 233–246, fev. 2011.
- STARK, R. *et al.* Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. **Journal of virology**, v. 67, n. 12, p. 7088–7095, dez. 1993.
- STURGEON, B. Theiler's disease. **Veterinary Record**, v. 180, n. 1, p. 14–15, 2017.
- SUÁREZ, P. *et al.* Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. **Virus research**, v. 42, n. 1–2, p. 159–165, 1996.

SUZUKI, T. *et al.* Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. **Journal of virology**, v. 78, n. 19, p. 10820–10824, out. 2004.

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

TAKIKAWA, S. *et al.* Functional analyses of GB virus B p13 protein: development of a recombinant GB virus B hepatitis virus with a p7 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 9, p. 3345–3350, fev. 2006.

TANAKA, T. *et al.* Hallmarks of Hepatitis C Virus in Equine Hepacivirus. v. 88, n. 22, p. 13352–13366, 2014.

TANG, W. *et al.* Identification and genetic characterization of equine Pegivirus in China. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 6, p. 768–776, 2018.

TATTERSALL, P.; COTMORE, S. F. Parvoviruses. **e LS**, 2001.

TAUTZ, N. *et al.* Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. **Journal of virology**, v. 71, n. 7, p. 5415–5422, jul. 1997.

TAUTZ, N.; KAISER, A.; THIEL, H. J. NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. **Virology**, v. 273, n. 2, p. 351–363, ago. 2000.

TAUTZ, N.; TEWS, B. A.; MEYERS, G. The Molecular Biology of Pestiviruses. **Advances in virus research**, v. 93, p. 47–160, 2015.

TEIMOURPOUR, R. *et al.* Viral load analysis of hepatitis C virus in Huh7.5 cell culture system. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 5–8, 2015.

TEMMAM, S. *et al.* Viral metagenomics on animals as a tool for the detection of zoonoses prior to human infection? **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 6, p. 10377–10397, jun. 2014.

THEILER, A. Acute Liver-Atrophy and Parenchymatous Hepatitis in Horses. **Union of South Africa, 5th and 6th Reports of the Director of Veterinary Research**, p. 7-165, 1919.

THÉZÉ, J. *et al.* Evolutionary and phylogenetic analysis of the hepaciviruses and pegiviruses. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 11, p. 2996–3008, 2015.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial informatics and experimentation**, v. 2, n. 1, p. 3, fev. 2012.

THURBER, R. V. *et al.* Laboratory procedures to generate viral metagenomes. **Nature Protocols**, v. 4, n. 4, p. 470–483, 2009.

- TIJSSSEN, P. *et al.* Family parvoviridae. **ICTV Report**, v. 2011, p. 405–425, 2011.
- TOMLINSON, J. E. *et al.* Viral testing of 18 consecutive cases of equine serum hepatitis - a prospective study (2014-2018). **J Vet Int Med**, n. October 2018, p. 251–257, 2018.
- TOMLINSON, J. E. *et al.* Viral testing of 10 cases of Theiler's disease and 37 in-contact horses in the absence of equine biologic product administration: A prospective study (2014-2018). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 33, n. 1, p. 258–265, jan. 2019.
- TOMLINSON, J. E. *et al.* Equine pegiviruses cause persistent infection of bone marrow and are not associated with hepatitis. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 7, p. e1008677, jul. 2020.
- TOOHEY-KURTH, K.; SIBLEY, S. D.; GOLDBERG, T. L. Metagenomic assessment of adventitious viruses in commercial bovine sera. **Biologicals**, v. 47, p. 64–68, 2017.
- USDA. Livestock and poultry: world markets and trade. **United States Department of Agriculture and Foreign Agricultural Service**, n. January, p. 31, 2016.
- VAN DER VALK, J. *et al.* Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. **ALTEX**, v. 35, n. 1, p. 99–118, 2018.
- VANDEKERCKHOVE, P. *et al.* Type A2 congenital tremor in piglets. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A**, v. 36, n. 10, p. 763–771, dez. 1989.
- VARSANI, A.; KRUPOVIC, M. Sequence-based taxonomic framework for the classification of uncultured single-stranded DNA viruses of the family Genomoviridae. **Virus evolution**, v. 3, n. 1, p. vew037, jan. 2017.
- VARSANI, A.; KRUPOVIC, M. Correction to: Smacoviridae: a new family of animal-associated single-stranded DNA viruses. **Archives of virology**, v. 163, n. 11, p. 3213–3214, nov. 2018.
- VILCEK, S. *et al.* Typing of pestiviruses from eland in Zimbabwe. **Journal of wildlife diseases**, v. 36, n. 1, p. 165–168, jan. 2000.
- WALTER, S. *et al.* Differential Infection Patterns and Recent Evolutionary Origins of Equine Hepaciviruses in Donkeys. **Journal of Virology**, v. 91, n. 1, p. e01711-16, 2017.
- WANG, M. *et al.* Simultaneous Detection of Bovine Rotavirus, Bovine Parvovirus, and Bovine Viral Diarrhea Virus Using a Gold Nanoparticle-Assisted PCR Assay With a Dual-Priming Oligonucleotide System. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2884, 12 dez. 2019.
- WARRENER, P.; COLLETT, M. S. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. **Journal of virology**, v. 69, n. 3, p. 1720–1726, mar. 1995.
- WEBER, M. N. *et al.* Evaluation of the serum virome in calves persistently infected with Pestivirus A, presenting or not presenting mucosal disease. **Virus Genes**, v. 54, n. 6, p. 768–778, 2018.

WELBOURN, S. *et al.* Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 33, p. 29604–29611, 2005.

WENSVOORT, G. *et al.* Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. **The veterinary quarterly**, v. 13, n. 3, p. 121–130, jul. 1991.

WESLEY, R. D. *et al.* Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 5. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 2, p. 140–144, 1998.

WHO. Expert Committee on Biological Standardization, Geneva, 17 to 21 October 2016 Human Challenge Trials for Vaccine Development: regulatory considerations Technical Report Series. **WHO Tech Rep Ser.**, 2016.

WILLS, R. *et al.* Transmission of PRRSV by direct, close, or indirect contact. **Journal of Swine Health and Production**, v. 5, 1 jan. 1997.

WOLF, Y. I. *et al.* Origins and Evolution of the Global RNA Virome. **mBio**, v. 9, n. 6, nov. 2018.

WOROBAY, M. Extensive homologous recombination among widely divergent TT viruses. **Journal of virology**, v. 74, n. 16, p. 7666–7670, ago. 2000.

WOSU, L. O. *et al.* Isolation of bovine parvovirus type 1 in Australia. **Australian veterinary journal**, v. 55, n. 4, p. 199–200, abr. 1979.

WU, W. H. *et al.* A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. **Virology**, v. 287, n. 1, p. 183–191, ago. 2001.

XIAO, C.T.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Parvovirus (PPV) Provisionally Designated PPV5. **Genome announcements**, v. 1, n. 1, p. e00021-12, jan. 2013a.

XIAO, C. T. *et al.* Characterization of a Novel Porcine Parvovirus Tentatively Designated PPV5. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–11, 2013b.

XIE, Y. *et al.* Detection and Genetic Characterization of Atypical Porcine Pestivirus in Piglets With Congenital Tremors in Southern China. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1406, 2019.

YEŞILBAĞ, K. *et al.* Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. **Veterinary microbiology**, v. 169, n. 1–2, p. 42–49, fev. 2014.

YU, J. M. *et al.* Detection of novel viruses in porcine fecal samples from China. **Virology Journal**, v. 10, p. 1–6, 2013.

YUAN, J. *et al.* Atypical porcine pestivirus as a novel type of pestivirus in pigs in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–6, 2017.

ZENG, S. *et al.* Complete coding sequences and phylogenetic analysis of porcine bocavirus. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 4, p. 784–788, 2011.

ZERBINI, F. M. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. **The Journal of general virology**, v. 98, n. 2, p. 131–133, fev. 2017.

ZHAI, S. *et al.* High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China. **Archives of virology**, v. 155, n. 8, p. 1313–1317, ago. 2010.

ZHANG, H. B. *et al.* Porcine bocaviruses: genetic analysis and prevalence in Chinese swine population. **Epidemiology and infection**, v. 139, n. 10, p. 1581–1586, out. 2011.

ZHANG, Q. *et al.* Occurrence and investigation of enteric viral infections in pigs with diarrhea in China. **Archives of virology**, v. 158, n. 8, p. 1631–1636, ago. 2013.

ZHANG, J. *et al.* Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Equine Arteritis Virus. Elsevier, 2019.

ZHAO, L. *et al.* Eukaryotic Circular Rep-Encoding Single-Stranded DNA (CRESS DNA) Viruses: Ubiquitous Viruses With Small Genomes and a Diverse Host Range. **Advances in virus research**, v. 103, p. 71–133, 2019.

ZHENG, X. Y. *et al.* Viral metagenomics of six bat species in close contact with humans in southern China. **Archives of virology**, v. 163, n. 1, p. 73–88, jan. 2018.

ZHENG, S. *et al.* Presence of Torque teno sus virus 1 and 2 in porcine circovirus 3-positive pigs. **Transboundary and emerging diseases**, v. 65, n. 2, p. 327–330, abr. 2018.

ZHOU, F.; SUN, H.; WANG, Y. Porcine bocavirus: achievements in the past five years. **Viruses**, v. 6, n. 12, p. 4946–4960, 10 dez. 2014.