

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Francielle Liz Monteiro

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE PESTIVÍRUS DE
BOVINOS**

Santa Maria, RS

2018

Francielle Liz Monteiro

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE PESTIVÍRUS DE
BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, da Universidade Federal
de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para obtenção do título de **Doutor em**
Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores

Santa Maria, RS

2018

Francielle Liz Monteiro

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE PESTIVÍRUS DE BOVINOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, da Universidade Federal
de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para obtenção do título de **Doutor em**
Ciência Animal

Aprovado em 30 de novembro de 2018:

Eduardo Furtado Flores, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Juliana Felipetto Cargnelutti, Dra. (UFSM)

Marcelo de Lima, Dr. (UFPel)

Sérgio Abreu Machado, Dr. (UNOESC)

Mário Celso Sperotto Brum, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS

2018

AGRADECIMENTOS

A realização deste sonho foi possível pelo auxílio e dedicação de várias pessoas, que fizeram parte diretamente da execução deste trabalho ou indiretamente, como parte fundamental da minha caminhada. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desta tese, em especial:

À minha mãe Nivia T. Monteiro e minha irmã Greice Ane Monteiro, por não medirem esforços para que eu alcançasse os meus objetivos, e por sempre acreditarem neles; e a todos os familiares que auxiliaram nessa jornada;

Aos professores Eduardo F. Flores e Rudi Weiblen pela orientação durante os anos de mestrado e doutorado, pelas oportunidades e por todos os ensinamentos;

Aos colegas do Setor de Virologia, em especial ao Bruno Martins, José Conrado dos S. Jardim e Rafael C. Ebling, pela convivência diária e companheirismo, e aos estagiários, por toda dedicação e conhecimento compartilhado;

Aos professores Luiz Carlos Rodrigues Júnior, Michele R. Sagrillo e Rodrigo de A. Vaucher pelas oportunidades e incentivo à pesquisa durante a graduação em Biomedicina na Universidade Franciscana; vocês foram essenciais para que eu optasse por realizar a pós-graduação e pelo desejo de seguir a carreira acadêmica;

Aos amigos, Adriano Carlos dos S. Araújo, Diego B. Borin, Eduardo P. Barreto, Jéssica Tatiane Sauthier, Letícia M. Augusti, Raquel Weis (e à Lúcia), por todos os momentos compartilhados e pela amizade verdadeira ao longo de tantos anos;

Ao Dr. Rafael Silveira, pela confiança e ensinamentos desde o estágio curricular no Laboratório Oswaldo Cruz e por todas as oportunidades;

Ao projeto Eureka! da ONG Infância-Ação e aos nossos “pequenos cientistas”, pelo grande aprendizado com o trabalho voluntário e com as crianças;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela oportunidade de realizar pós-graduação e pelo suporte financeiro.

*“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas
ninguém nasce pronto. A vida é para quem é
corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o
bastante para aprender.”*

(Clarice Lispector)

RESUMO

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE PESTIVÍRUS DE BOVINOS

AUTORA: Francielle Liz Monteiro

ORIENTADOR: Eduardo Furtado Flores

O gênero *Pestivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, compreende três espécies virais que infectam bovinos: vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV-1)/*Pestivirus A*, BVDV-2/*Pestivirus B* e *pestivirus HoBi-like* (*HoBiPeV*)/*Pestivirus H*. As duas espécies de BVDV e o HoBiPeV – assim como genótipos/subgenótipos - são identificados com base na comparação da região 5' não-traduzida do genoma (5'UTR), que ainda permite agrupar os isolados nos 21 subgenótipos de BVDV-1 (-1a a -1u), quatro subgenótipos de BVDV-2 (-2a a -2d) e quatro do HoBiPeV (-3a a -3d). A região 5'UTR também é utilizada para a detecção molecular de pestivírus em amostras clínicas, pois é muito conservada. Em um primeiro estudo, descreve-se a detecção e identificação genética de pestivírus de 73 lotes de soro fetal bovino (SFB) de origem brasileira, produzidos entre os anos de 2006 e 2014. Trinta e nove lotes de SFB (53,4%) foram positivos na RT-PCR para pestivírus. Trinta e quatro lotes (46,6%) continham RNA do BVDV-1, sendo 23 -1a, oito -1b e três -1d. Seis lotes (8,2%) continham BVDV-2, sendo dois -2a, três -2b e um de subgenótipo indeterminado. Quatro lotes de SFB (5,5%) estavam contaminados com o vírus HoBiPeV e cinco lotes (6,8%) continham mais de um pestivírus. Estes resultados demonstram a contaminação de SFB de origem brasileira com RNA de pestivírus. O segundo estudo, relata a caracterização de 90 pestivírus obtidos de amostras de soro de bovinos no estado do Rio Grande do Sul, destinados à exportação no de 2017, sendo 38 BVDV-1 (42,2%), 31 BVDV-2 (34,4%) e 21 HoBiPeV (23,4%). Das amostras de BVDV-1, apenas os subgenótipos -1a (n = 28, 31,1%) e -1b (n = 10, 11,1%) foram identificados. Todos os 30 isolados de BVDV-2 pertenciam ao subgenótipo -2b e os 21 HoBiPeV foram agrupados no subgrupo 3a. O terceiro estudo, descreve a utilização de um novo par de *primers* (BP189-389) para detecção das três espécies de pestivírus de bovinos (BVDV-1, -2 e HoBiPeV). A RT-PCR com o *primer* 324 - 326 detectou 110 amostras positivas, sendo 62 para BVDV-1, 38 para BVDV-2 e 10 para HoBiPeV; e o *primer* 90 - 368 detectou 97 amostras positivas (64 BVDV-1; 33 BVDV-2). O primer específico para BVDV-2 detectou 45 amostras positivas (incluindo 38 detectadas pelo 324 - 326 e 33 pelo 90 - 368); enquanto que a RT-PCR utilizando o primer específico para HoBiPeV detectou 26 amostras positivas (incluindo 10 detectadas com o 324 - 326). A RT-PCR utilizando o *primer* BP189-389 detectou todas as 135 amostras, incluindo os 26 HoBiPeV detectados pelo N2-R5. Assim, o primer BP189 – 389 demonstrou alta sensibilidade e especificidade na detecção de BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV, e pode ser uma alternativa no diagnóstico de pestivírus de bovinos. Em resumo, o presente trabalho apresenta contribuições para o diagnóstico de pestivírus bovino e acrescenta informações acerca do perfil genético dos pestivírus circulantes em bovinos no RS.

Palavras-chave: BVDV. Vírus HoBi-like. Soro fetal bovino. Bovino de corte. Diagnóstico.

ABSTRACT

DETECTION AND GENETIC IDENTIFICATION OF BOVINE PESTIVIRUSES

AUTHOR: Francielle Liz Monteiro

ADVISOR: Eduardo Furtado Flores

The genus *Pestivirus*, belonging to the family *Flaviviridae*, comprises three viral species that infect cattle: *bovine viral diarrhea virus 1* (BVDV-1)/*Pestivirus A*, BVDV-2/*Pestivirus B* and *pestivirus HoBi-like* (HoBiPeV)/*Pestivirus H*. The two BVDV species and HoBiPeV – as well as the respective subgenotypes – may be identified based on the comparison of sequences within the 5' non-translated region (5'UTR) of the viral genome, which allows to group the isolates in twenty-one subgenotypes of BVDV-1 (1a-1u), four genotypes of BVDV-2 (2a-2d) and four of HoBi-like (-3a to -3d). The 5'UTR is also a target for molecular detection of pestiviruses due to its high conservation. In a first study, we describe the detection and genetic identification of pestiviruses present in 73 lots of fetal bovine serum (FBS) of Brazilian origin, produced between 2006 and 2014. Thirty-nine FBS batches (53.4%) were positive for pestivirus RNA. Thirty-four (46.6%) contained BVDV-1, being 23 -1a, eight -1b and three -1d. Six batches (8.2%) contained BVDV-2, two of them being -2a, three -2b and one of undetermined subgenotype. Four batches of FBS (5.5%) were contaminated with HoBiPeV and five batches (6.8%) contained more than one pestivirus. These results demonstrate the contamination of Brazilian origin FBS with pestivirus RNA. The second study reports the characterization of 90 pestiviruses obtained from serum samples from cattle in the state of Rio Grande do Sul for export in 2017, of which 38 BVDV-1 (42.2%), 31 BVDV-2 (34.4%) and HoBiPeV (23.4%). Of the BVDV-1 samples, only the 1a ($n = 28$, 31.1%) and -1b ($n = 10$, 11.1%) subgenotypes were identified. All 30 BVDV-2 isolates belonged to the -2b subgenotype and the 21 HoBiPeV viruses were grouped into subgroup 3a. The third study describes a new primer pair (BP189-389) for the detection of three bovine pestivirus species (BVDV-1, -2 and HoBiPeV). RT-PCR with primer 324-326 detected 110 positive samples, 62 for BVDV-1, 38 for BVDV-2 and 10 for HoBiPeV; and primer 90-368 detected 97 positive samples (64 BVDV-1; 33 BVDV-2). Primer specific for BVDV-2 detected 45 positive samples (including 38 detected by 324-326 and 33 by 90-368); while RT-PCR using the primer specific for HoBiPeV detected 26 positive samples (including 10 detected with 324-326). RT-PCR using primer BP189-389 detected all 135 samples, including the 26 HoBiPeV detected by N2-R5. Thus, primer BP189-389 demonstrated high sensitivity and specificity in the detection of BVDV-1, BVDV-2 and HoBiPeV and may be an alternative in the diagnosis of bovine pestiviruses. Summarizing, the present study presents contributions for the diagnosis of bovine pestiviruses and adds new information on the genetic profile of pestiviruses circulating in cattle from RS.

Keywords: BVDV. HoBi-like pestivirus. Fetal bovine serum. Beef cattle. Diagnostic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação da organização genômica do gênero <i>Pestivirus</i>	16
Figura 2 –	Representação do ciclo replicativo do BVDV	19
Figura 3 –	Frequência de espécies/genótipos e subgenótipos de pestivírus de bovinos no Brasil (1998 – 2018)	24

ARTIGO 1

Figura 1 –	(Figure 1) Phylogenetic tree based on the 5'UTR region of the pestivirus genome	38
-------------------	---	----

ARTIGO 2

Figura 1 –	(Figure 1) Phylogenetic tree of 5'UTR sequences amplified of pestivirus detected using primer 90-368	54
-------------------	--	----

Figura 2 –	(Figure 2) Phylogenetic tree of 5'UTR sequences amplified of pestivirus detected using primers 90-368 and BVDV-2#3	55
-------------------	--	----

Figura 3 –	(Figure 3) Phylogenetic tree of 5'UTR sequences amplified of pestivirus detected using primer N2-R5	56
-------------------	---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 –** Espécies do gênero *Pestivirus*, conforme classificação do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), 2018 14

ARTIGO 1

- Tabela 1 –** (Table 1) Primer sequences and PCR amplification of pestiviruses present in Brazilian batches of fetal bovine serum (FBS) collected from 2006 to 2014. 36

- Tabela 2 –** (Table 2) Detection of pestiviruses by RT-PCR in Brazilian lots of FBS collected from 2006 to 2014 37

ARTIGO 2

- Tabela 1 -** (Table 1) Primers used for 5'UTR amplification, sequencing and phylogenetic analysis of pestiviruses from beef calves in Southern Brazil 53

ARTIGO 3

- Tabela 1 –** (Table 1) Primer data and sensitivity of the 5'UTR-based RT-PCRs used for detection of pestiviruses in sera of calves 64

- Tabela 2 –** (Table 2) Pestivirus detection in sera of beef calves by RT-PCRs using different sets of pestivirus primers 65

- Tabela 3 –** (Table 3) Detection of HoBiPeV in various clinical specimens by RT-PCRs using different sets of primers 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
ADAR	Adenosina desaminase de RNA
APPV	Pestivírus atípico suíno (<i>Atypical porcine pestivirus</i>)
Aydin	<i>Aydin-like pestivirus</i>
BVD	Diarreia viral bovina (<i>Bovine viral diarrhea</i>)
BDV	Vírus da doença da fronteira (<i>Border disease virus</i>)
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina (<i>Bovine viral diarrhea virus</i>)
Bungo	<i>Bungowannah</i>
CCP	Proteína de controle do complemento
cp	Citopático
CSFV	Vírus da peste suína clássica (<i>Classical swine fever virus</i>)
DM	Doença das Mucosas
dsRNA	RNA fita dupla (<i>double stranded RNA</i>)
eEF1a	Fator de elongação eucariótico 1A (<i>eukaryotic translation elongation fator 1A</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
HoBiPeV	Pestivirus HoBi-like (<i>HoBi-like pestivirus</i>)
ICC	Isolamento em cultivo celular
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (<i>International Committe on Taxonomy of Viruses</i>)
IFA	Imunofluorescência
IPX	Imunoperoxidase
IRES	Sítio interno para o reconhecimento do ribossomo (<i>internal ribossome entry site</i>)
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
mAB	Anticorpo monoclonal (<i>monoclonal antibody</i>)
MDBK	<i>Madin-Darby bovine kidney</i>
MA	Maranhão
ncp	Não-citopático

nm	Nanômetro
NTPase	Nucleosídeo 5'-trifosfatase
ORF	Fase aberta de leitura (<i>open reading frame</i>)
pb	Pares de basees
PB	Paraíba
PI	Persistentemente infectado
PR	Paraná
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (<i>quantitative PCR</i>)
RdRp	Polimerase de RNA dependente de RNA (<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RS	Rio Grande do Sul
RT	Transcrição reversa (<i>reverse transcription</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SN	Soroneutralização
SP	São Paulo
ssRNA	RNA fita simples (<i>single strand RNA</i>)
UTR	Região não traduzida (<i>untranslated region</i>)
VN	Vírus-neutralização

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	PESTIVÍRUS DE BOVINOS	14
2.2	ORGANIZAÇÃO DO GENOMA	15
2.3	CICLO REPLICATIVO	18
2.4	PATOGENIA E APRESENTAÇÕES CLÍNICAS	20
2.5	DIAGNÓSTICO DE PESTIVÍRUS DE BOVINOS	22
2.5.1	Diagnóstico molecular	22
2.6	EPIDEMIOLOGIA E DIVERSIDADE GENÉTICA	23
2.7	PROFILAXIA E CONTROLE	25
3	ARTIGO 1 – DETECTION AND GENETIC IDENTIFICATION OF PESTIVIRUSES IN BRAZILIAN LOTS OF FETAL BOVINE SERUM COLLECTED FROM 2006 TO 2014	27
4	ARTIGO 2 – GENETIC IDENTIFICATION OF PESTIVIRUSES FROM BEEF CATTLE IN SOUTHERN BRAZIL	39
5	ARTIGO 3 – DETECTION OF BOVINE PESTIVIRUSES IN SERA OF BEEF CALVES BY A RT-PCR BASED ON A NEWLY DESIGNED SET OF PAN-BOVINE PESTIVIRUS PRIMERS	57
6	DISCUSSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Pestivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, compreende três espécies que infectam bovinos: vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV-1) ou *Pestivirus A*, BVDV-2 ou *Pestivirus B* e pestivírus HoBi-like ou *Pestivirus H* (HoBiPeV) (ICTV, 2018). Os vírions possuem envelope e o genoma consiste de uma fita simples de RNA de cadeia positiva, com aproximadamente 12,3 kilobases (kb), o qual é diretamente traduzido em uma longa poliproteína, clivada por proteases virais e celulares em 11 ou 12 proteínas funcionais, dependendo do biotipo do vírus (citopático/cp ou não-citopático/ncp) (NEILL et al., 2013).

A diarreia viral bovina (BVD), doença causada por esses pestivírus, gera perdas econômicas significativas para a bovinocultura, as quais estão associadas aos problemas respiratórios, gastrointestinais, e principalmente, reprodutivos (RIDPATH, BAUERMANN & FLORES, 2017). O vírus está distribuído mundialmente, sendo que vários estudos já demonstraram a sua ampla distribuição em rebanhos bovinos brasileiros (GIL, 1998; CANAL et al., 1998; FLORES et al., 2002; CORTEZ et al., 2006; LUNARDI et al., 2008; BIANCHI et al., 2011; OTONEL et al., 2014; WEBER et al., 2014; BIANCHI et al., 2017; MÓSENA et al. 2017a, b; SILVEIRA et al., 2017). O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com estimativas superiores a 211 milhões de cabeças de gado, e além disso, é um dos principais fornecedores mundiais de soro fetal bovino (SFB) (IBGE, 2014).

A caracterização genética de isolados é um processo contínuo que tem se mostrado relevante e útil para o diagnóstico e controle de pestivírus no Brasil. Os dois genótipos de BVDV e o HoBiPeV são identificados com base na comparação da região 5' não traduzida (*untranslated region*, UTR), que permite agrupar os isolados nos seus respectivos genótipos/espécies e subgenótipos, tendo em vista que é a região mais conservada desses vírus (PELLERIN et al., 1994). De acordo com o sequenciamento de nucleotídeos dessa região, os isolados de BVDV-1 são alocados em pelo menos 21 subgenótipos (denominados -1a a -1u) e BVDV-2 em quatro subgenótipos (-2a a -2d) (GIANGASPERO et al., 2008; YESILBAG, ALPAY & BECHER, 2017). Para os HoBiPeV tem sido proposta a classificação também em quatro subgenótipos (-3a a -3d) (GIAMMARIOLI et al., 2015).

A identificação inicial do BVDV-2 no Brasil abriu caminho para a introdução de cepas de BVDV-2 em vacinas atuais e também levou a avaliação e adaptação de métodos moleculares e imunodiagnósticos para a detecção de pestivírus (CANAL et al., 1998; GIL et al., 1998; FLORES et al., 2002). Mais recentemente, a identificação do HoBiPeV em rebanhos bovinos brasileiros tem chamado a atenção para a necessidade de nova avaliação dos métodos

diagnósticos e da necessidade de inclusão em vacinais comerciais (BAUERMANN et al., 2013; SILVEIRA et al., 2017).

O presente estudo descreve a identificação e caracterização de pestivírus de bovinos em lotes de SFB de origem brasileira, bem como em amostras de soro de bovinos do estado do Rio Grande do Sul (RS) destinados à exportação; e descreve a construção e teste de um novo par de *primer* para a detecção das três espécies de pestivírus de bovinos (BVDV-1, -2 e HoBiPeV) por RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa). Assim, a tese é composta pelos três estudos apresentados sob a forma de artigos científicos:

- ARTIGO 1: Detection and genetic identification of pestivirus in Brazilian lots of fetal bovine serum collected from 2006 to 2014;
- ARTIGO 2: Genetic identification of pestiviruses from beef cattle in Southern Brazil;
- ARTIGO 3: Detection of bovine pestivirus in sera of beef calves by a RT-PCR based on a newly designed set of pan-bovine pestivirus primers.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PESTIVÍRUS DE BOVINOS

O gênero *Pestivirus* pertence à família *Flaviviridae*, juntamente com os gêneros *Flavivirus* (53 espécies), *Hepacivirus* (14 espécies) e *Pegivirus* (11 espécies). Possui onze espécies, classificadas do *Pestivirus A* ao *K* (Tabela 1), sendo três espécies de bovinos: *Pestivirus A* (BVDV-1), *Pestivirus B* (BVDV-2) e *Pestivirus H* (HoBiPeV) (ICTV, 2018).

Tabela 1 - Espécies do gênero *Pestivirus*, conforme classificação do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), 2018.

Espécie	Exemplar		
	Número de acesso	Nome do vírus	Abreviatura/Isolado
<i>Pestivirus A</i>	M31182	<i>Bovine viral diarrhea virus 1</i>	BVDV-1/NADL
<i>Pestivirus B</i>	U18059	<i>Bovine viral diarrhea virus 2</i>	BVDV-2/890
<i>Pestivirus C</i>	X87939	<i>Classical swine fever virus</i>	CSFV/A187
<i>Pestivirus D</i>	AF037405	<i>Border disease virus</i>	BDV/X818
<i>Pestivirus E</i>	AY781152	<i>Pronghorn antelope pestivirus</i>	-
<i>Pestivirus F</i>	EF100713	<i>Bungowannah</i>	Bungo
<i>Pestivirus G</i>	AF144617	<i>Giraffe pestivirus</i>	-
<i>Pestivirus H</i>	FJ040215	<i>HoBi-like pestivirus</i>	HoBiPeV
<i>Pestivirus I</i>	JX428945	<i>Aydin-like pestivirus</i>	Aydin/04-TR
<i>Pestivirus J</i>	KJ950914	<i>Rat pestivirus</i>	-
<i>Pestivirus K</i>	KR011347	<i>Atypical porcine pestivirus</i>	APPV/000515

Adaptado de: ICTV, 2018 (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

O BVDV foi relatado pela primeira vez em 1946 em um surto de diarreia e lesões erosivas no trato digestivo de bovinos nos Estados Unidos (EUA) e no Canadá, o que resultou na sua nomenclatura no ano de 1957, após o isolamento do agente. A primeira identificação foi feita por pesquisadores da Universidade de Cornell (Ithaca, Nova Iorque, EUA) e a doença foi caracterizada por hipertermia, anorexia, gastroenterite severa e ulcerações nas mucosas oral e nasal (CHILDS, 1946; OLAFSON, MCCALLUM & FOX et al., 1946; BAKER, 1995).

No Brasil, o primeiro relato de BVDV foi em 1968 de um caso de doença gastrointéríca, contudo, o primeiro isolamento (Gravataí V-80) ocorreu somente em 1974, a partir do sangue

de um feto coletado de um matadouro; mesma década em que iniciaram os estudos sorológicos no estado do RS (CORRÊA, NETO & BARROS, 1968; WIZIGMANN, VIDOR & RICCI, 1971; VIDOR, 1974). Estudos posteriores confirmaram a presença do agente no rebanho brasileiro, com o isolamento a partir de fetos abortados, bezerros e rebanhos com problemas reprodutivos e doença gastrointestinal (FLORES et al., 2005).

A classificação do BVDV em duas espécies (1 e 2) foi baseada na análise filogenética da região 5'UTR e na análise fenotípica utilizando anticorpos monoclonais (*monoclonal antibody*, mAb) contra a glicoproteína E2/gp53 (RIDPATH, BOLIN & DUBOVI, 1994; PELLERIN et al., 1994). O BVDV-1 representa a maioria dos isolados de campo encontrados na América, Europa e Austrália; enquanto que o BVDV-2 foi identificado primeiramente em um surto de doença gastrointestinal na América do Norte, mas já está disseminado em vários continentes (PELLERIN et al., 1994; BECHER et al. 2003; RIDPATH et al., 2010; MINAMI et al., 2011).

Em 2004, um novo grupo de vírus com similaridade genética e antigênica ao BVDV, nomeado de HoBi (D32/00_HoBi) foi isolado na Alemanha a partir de um lote de SFB importado do Brasil (SCHIRRMEIER et al., 2004). Posteriormente, vírus geneticamente semelhantes (*HoBi-like*), nomeado por alguns autores de BVDV-3, foram detectados em lotes de SFB comerciais de diferentes fontes, principalmente da América do Sul, sendo também associado à infecção e à doença em bovinos em vários países (LIU et al., 2009; DECARO et al., 2011; PELETTI et al., 2012; BAUERMANN et al., 2013; GIAMMARIOLI et al., 2015).

2.2 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

Os pestivírus possuem 40 a 60 nanômetros (nm) de diâmetro, nucleocapsídeo icosaédrico e envelope, o que torna estes vírus sensíveis à solventes orgânicos e detergentes, mas altamente resistentes à pH ácido. O genoma consiste de uma molécula de RNA fita simples de polaridade positiva (*single strand, ssRNA+*) de 12,3kb, sendo infeccioso ao ser introduzido em células permissivas. Na porção terminal 5' possuem uma região não traduzida (5'UTR), que contém duas estruturas em forma de grampo e um sítio interno para o reconhecimento dos ribossomos (*internal ribosome entry site*, IRES), assim, a tradução ocorre independente do *cap* (NEILL et al., 2013).

O genoma apresenta uma única fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) traduzida em uma longa poliproteína de aproximadamente 4.000 aminoácidos (aa), que é clivada por proteases virais e celulares, paralelamente ao processo de tradução, gerando 11 ou 12 proteínas funcionais, dependendo do biotipo do vírus (Figura 1). Na região 3'UTR estão

presentes estruturas primárias e secundárias que atuam para iniciar a síntese da fita antigenômica durante a replicação viral (NEILL et al., 2013).

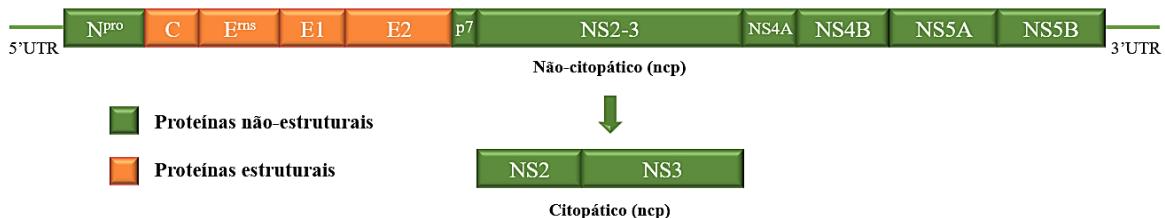


Figura 1 - Representação da organização genômica do gênero *Pestivirus*. Adaptado de: Ridpath, Bauermann & Flores, 2017.

A primeira proteína traduzida é uma não-estrutural de 20 kDa (kiloDaltons), exclusiva do gênero *Pestivirus*. A proteína N-terminal codificada pelo genoma do vírus é uma cisteína protease (N^{pro}), responsável pela autoclavagem entre o terminal N e a proteína do capsídeo (C/p14), sendo que esta clivagem ocorre em um sítio bem conservado – entre uma cisteína e uma serina (STARK, 1993). Em seguida, são traduzidas as proteínas estruturais, sendo a primeiras delas a C de 14 kDa, a qual reveste o RNA genômico; e as três glicoproteínas que compõem o envelope viral: E^{rns} (E0/gp48), E1 (gp25) e E2 (gp53) (NEILL et al., 2013).

A E^{rns} possui atividade de ribonuclease (RNase), podendo inibir a produção de interferon tipo I e auxiliar no desenvolvimento de infecções persistentes (IQBAL et al., 2004). A capacidade da E^{rns} de bloquear a sinalização induzida pela presença de RNA de fita dupla (*double stranded, dsRNA*) desempenha papel importante na capacidade do BVDV de sustentar uma infecção persistente, onde a resposta imune inata é, provavelmente, a defesa antiviral predominante. Durante a infecção em um estágio inicial do feto, a E^{rns} secretada pode agir para neutralizar qualquer *dsRNA* liberado por apoptose das células infectadas, e assim, o feto não conseguiria montar uma resposta antiviral inata por essa via (WANG et al., 2015).

As glicoproteínas E1 e E2 estão relacionadas com a alta eficiência da ligação do vírus aos receptores celulares. A E1 parece influenciar positivamente a infectividade viral, sendo que a E2 possui papel predominante na ligação à célula, pois interage com os receptores da superfície celular e induz resposta de anticorpos neutralizantes e linfócitos T citotóxicos (DONIS, 1995; RONECKER et al., 2008). A porção amino-terminal da E2 concentra a maior parte dos epítopenos/ determinantes antigênicos (LIANG et al., 2003). Variações nos aminoácidos e nas estruturas antigênicas, na formação da ligação dissulfeto, na glicosilação e na atividade da RNase podem afetar a virulência dos pestivírus nos animais. Juntamente com as mutações

que são impulsionadas pela pressão de seleção, as diferenças antigênicas nas glicoproteínas influenciam a eficácia e adequação das vacinas que estão sendo utilizadas atualmente no campo (WANG et al., 2015).

Os genes que codificam as proteínas E2 e NS2-3 são separados por uma pequena sequência que codifica um polipeptídeo hidrofóbico de aproximadamente 7 kDa. Tem sido demonstrado que a clivagem entre E2 e p7 é incompleta, resultando em proteínas E2-p7, E2 e p7. A clivagem incompleta é dispensável não só para a replicação do RNA, como também para a formação de vírus infeccioso *in vitro*. Entretanto, p7 é essencial para a produção de progénie viral (HARADA, TAUTZ & THIEL, 2000). Várias proteínas capazes de modular a permeabilidade da membrana mostraram desempenhar um papel crucial na liberação de vírions, sendo denominadas de viroporinas (LARGO et al., 2014). A exemplo, a p7 do vírus da peste suína clássica (CSFV) foi classificada como uma viroporina de classe II (GLADUE et al., 2012; ZHAO et al., 2017). Algumas viroporinas englobam um pequeno trecho de aminoácidos básicos flanqueados por domínios que interagem com a membrana, auxiliando na sua permeabilização. Assim, é possível especular que a p7 do BVDV representa um grupo de viroporina, com função na liberação de progénie viral infecciosa (HARADA et al., 2000).

Em seguida, são produzidas as proteínas NS2-3 (p125), NS4A (p10), NS4B (p32), NS5A (p58) e NS5B (p75) (NEILL et al., 2013). As proteínas NS2-3 (120kDa) tem função regulatória na síntese de RNA e morfogênese de vírions maduros. A NS2 (p54) apresenta função de cisteína protease, sendo responsável pelo processamento da NS2-3. A proteína NS3 (p80) é detectada apenas na fase inicial da infecção com BVDV não-citopático (ncp), e detectada continuamente após infecção com cepas de BVDV citopáticas (cp) (AGAPOV et al., 2004; LACKNER et al., 2005). Assim, essa proteína é considerada um marcador para o biotipo deste vírus (DONIS et al., 1995). É uma proteína multifuncional com atividade de serina protease, ligação ao RNA, nucleosídeo 5-trifosfatase (NTPase) e helicase. Devido à atividade de serina protease, a NS3 catalisa a clivagem que ocorre no seu próprio carboxi(C)-terminal. É altamente conservada e imunogênica, mas não induz resposta imune protetora (GU et al., 2000; TAUTZ, KAISER & THIEL, 2000).

A NS4A atua como cofator da atividade de protease da NS3 (GRASSMANN et al., 2001), e interage com a adenosina desaminase de RNA (ADAR). O dsRNA estendido durante a replicação do RNA viral pode ser editado pela ação da ADAR que catalisa a troca de adenosina (A) para inosina (I), seguida por clivagem direcionada por endonucleases citoplasmáticas. A ligação do domínio N-terminal da NS4A ao ADAR impede essa edição, favorecendo a replicação do vírus (MOHAMED et al., 2014). A NS4B é uma proteína integral

de membrana associada principalmente ao aparelho de Golgi. Além disso, sua presença já foi descrita na mitocôndria, sugerindo seu papel na replicação do genoma e/ou na citopatogenicidade; e juntamente com as proteínas NS5A e NS5B, aumentando a possibilidade desta proteína ser um componente do complexo de replicação do vírus (QU, MCMULLAN & RICE, 2001; WEISKIRCHER et al. 2009).

A NS5A é uma fosfoproteína hidrofílica com atividade de ligação ao RNA e um componente crítico da replicase viral, interagindo com a subunidade alfa do fator de elongação eucariótico 1A (*eukaryotic translation elongation factor 1A*, eEF1A) (JOHNSON et al., 2001); enquanto que a NS5B é a polimerase de RNA dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp), que catalisa a replicação do RNA viral (ZHONG et al., 1998).

2.3 CICLO REPLICATIVO

A ligação e penetração dos vírions na célula é o primeiro passo da infecção viral. A E1 e E2 formam um heterodímero, localizado no envelope viral, que permite a ligação e entrada do vírus na célula alvo, determinando o tropismo celular dos pestivírus (LIANG et al., 2003; REIMANN et al. 2004; RONECKER et al., 2008; ASFOR et al., 2014).

O principal receptor dos pestivírus de bovinos é o CD46, uma proteína reguladora do complemento presente em todas as células (KREY et al., 2006; ZEZAFOUN, DECREUX & DESMECHT, 2011). A função do CD46 é modulada pela proteína de controle do complemento 1 (CCP1), que promove a entrada do vírus, sendo que variantes genéticas e *splicing* do CCP1 determinam a permissividade celular. Os locais de ligação do vírus ao receptor CD46 foram mapeados para dois peptídeos 66-EQIV-69 e 82-GQLAL-87, que estão localizados nas estruturas β-folha do CCP1. Estes dois peptídeos constituem uma região crucial de ligação que interage com o vírus. Os potenciais locais de ligação dos pestivírus às células hospedeiras são as regiões 101-LAEGPPVKECAVTCRYDKDADINVVTQARN-130 da E0 e 141-AVSPTTL RTEVVKT FRRDKPFPHRMDCVTT-170 da E2 (LI et al., 2011).

A penetração do vírions requer a fusão entre o envelope viral e a membrana celular. A E2 é caracterizada como uma proteína de fusão de classe II que abriga um peptídeo de fusão 129-CPIGWTGVIEC-139, contendo uma sequência consenso constituída por dois resíduos de cisteína (GARRY et al., 2003). A entrada dos pestivírus é dependente de endocitose mediada por clatrina, seguida de acidificação do endossomo. O baixo pH desencadeia alterações conformacionais que resultam na inserção do peptídeo de fusão na membrana alvo, e consequente liberação do genoma no citoplasma (Figura 2). Nas proteínas de fusão, acredita-se

que a histidina desempenha um papel fundamental nas alterações conformacionais induzidas pelo pH (KAMPMANN et al., 2006).

Ao ser liberado no citoplasma, o genoma é diretamente traduzido em uma longa poliproteína de aproximadamente 4.000 aa, clivada concomitantemente em proteínas funcionais (estruturais e não-estruturais). O reconhecimento pelos ribossomos é mediado pelo IRES na extremidade 5' e a tradução direta ocorre devido ao genoma ser cadeia positiva, possuindo o mesmo sentido e sendo reconhecido com um RNA mensageiro celular (NEILL et al., 2013).

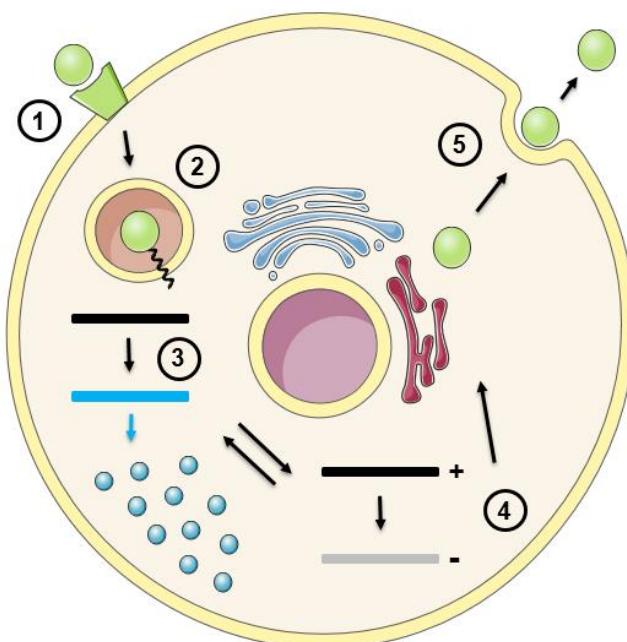


Figura 2 - Representação do ciclo replicativo do BVDV. 1) Ligação das proteínas virais ao receptor. 2) Endocitose mediada por clatrina e acidificação do endossomo. 3) Tradução em poliproteína e clivagem em proteínas funcionais. 4) Replicação (fita antigenômica). 5) Morfogênese e egresso. Adaptado de: Lindenbach et al., 2013. Figuras: *Servier Medical Art* (www.servier.com/powerpoint-image-bank).

As proteínas não-estruturais sintetizadas recrutam o genoma viral para o complexo de replicação, que é montado na extremidade 3'. O RNA de cadeia negativa (antigenômico) sintetizado é utilizado como molde para a síntese de RNA de cadeia positiva, que será traduzido em proteínas funcionais ou utilizado na montagem das partículas virais (GU et al., 2000). A síntese das fitas é assimétrica, sendo que o RNA genômico pode ser encontrado em quantidade até dez vezes maior que o RNA antigenômico. A morfogênese tem início com a associação dos dímeros da proteína C com o RNA genômico, seguido pelo brotamento em membranas do

retículo endoplasmático. Os vírions sofrem mutação e são fusionados à membrana plasmática e liberados via exocitose (GRUMMER et al., 2001; LINDENBACK et al., 2013).

A ruptura da célula não é um pré-requisito para a liberação dos vírions, e as consequências da replicação para a integridade celular variam de acordo com o vírus e a célula hospedeira, ocorrendo desde infecções inaparentes, como no BVDVncp, em que os isolados causam pouca ou nenhuma mudança na morfologia celular; até infecções que provocam extensos danos em linhagens celulares de bovinos (BVDVcp), como vacuolização citoplasmática e destruição/lise celular completa entre 48 e 72 horas (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH, 2010). Os isolados ncp são responsáveis pela maioria das infecções naturais e pelas infecções fetais persistentes, enquanto que os isolados cp se constituem em uma minoria e não são capazes de produzir infecções persistentes, sendo encontrados quase que exclusivamente de animais com a Doença das Mucosas (DM) (RIDPATH, BAUERMANN & FLORES, 2017).

2.4 PATOGENIA E APRESENTAÇÕES CLÍNICAS

A transmissão do BVDV ocorre principalmente por contato direto pela inalação/ingestão de partículas virais ou pela via sexual; e também indireto através do contato com secreções/excreções, materiais contaminados (transmissão iatrogênica) e sêmen contaminado/inseminação artificial. A transmissão vertical é uma consequência frequente da infecção de fêmeas prenhas, e dependendo do período gestacional que ocorre pode acarretar no nascimento de animais persistentemente infectados (PI) (GIVENS et al., 2003; LINDBERG & HOUÉ, 2005). A prevalência desses animais é de 0,5 a 2% em um rebanho com BVDV, e se constituem nos principais mantenedores e disseminadores do vírus (HOUÉ, LINDEBERG & MOENNIG et al., 2006).

As consequências e a severidade da infecção aguda pelo BVDV dependem de uma série de fatores, que incluem a cepa viral e o biotipo, o *status* imunológico e reprodutivo do animal e a ocorrência de infecções secundárias, uma vez que o BVDV é também imunossupressor, predispondo os animais infectados a outros patógenos. O período de incubação varia entre três e sete dias e é seguido de hipertermia transitória e leucopenia, sendo que o vírus pode ser detectado no sangue entre quatro e seis dias após a infecção, podendo permanecer por até 15 dias (RIDPATH, BAUERMANN & FLORES, 2017).

De maneira geral, a infecção de machos e fêmeas não prenhas é subclínica ou com sinais brandos nos casos de alguns isolados de maior virulência, podendo provocar um período febril curto, acompanhado de sialorreia, descarga nasal, tosse e diarreia, com recuperação clínica em torno de três semanas. É descrito que 70 a 90% dessas infecções ocorrem sem manifestação de

sinais clínicos (BOLIN & GROOMS, 2004; LANYON et al., 2014). Cepas altamente virulentas podem provocar sinais mais severos, como trombocitopenia, úlceras e hemorragia intensa, caracterizando uma forma distinta de BVD, denominada de BVD aguda hemorrágica ou síndrome hemorrágica; contudo, corresponde a minoria das infecções (NEWCOMER & GIVENS, 2013; BRODERSEN, 2014).

Embora identificado originalmente de casos de doença gastrointestinal, o BVDV é um vírus frequentemente associado com perdas reprodutivas (BAKER, 1995). As consequências da transmissão vertical estão relacionadas ao biotipo (ncp/cp) e cepa viral e a fase gestacional que ocorre a infecção, podendo ocorrer reabsorção embrionária (com retorno ao cio), abortos, mumificação fetal, natimortos, nascimento de bezerros fracos que apresentam retardamento no crescimento ou o nascimento de animais PI (CARMAN et al., 1998).

Aborto ocorre com maior frequência a partir dos 40 dias até o final da gestação. As malformações fetais geralmente são observadas entre os 100 e 150 dias, podendo ocorrer atrofia ou displasia da retina, hipoplasia cerebelar e microcefalia (RIDPATH, BAUERMANN & FLORES, 2017). A infecção entre os 40 e 120 dias de gestação com a cepa ncp pode gerar os animais PI, pois o sistema imunológico não está completamente desenvolvido e o organismo do feto não possui mecanismos para responder à infecção; assim, o animal desenvolve imunotolerância e é geralmente soronegativo, podendo apresentar retardamento no crescimento, malformações congênitas ou ser aparentemente saudável (PETERHANS et al., 2010; LANYON et al., 2014). Os fetos infectados no terço final da gestação geralmente nascem saudáveis e soropositivos (RIDPATH, BAUERMANN & FLORES, 2017).

A DM é desencadeada quando um animal PI (portador de um BVDVncp) é infectado com um BVDVcp antigenicamente semelhante. O BVDVcp que determina a DM geralmente se origina por mutações da ncp no próprio animal, e em casos raros, após a vacinação com vírus de vacinas vivas modificadas ou transmissão de cepas cp entre animais PI. Vários tipos de mutações têm sido descritas na geração de cepa cp, sendo que todos os mecanismos resultam na expressão da proteína NS3 (SCHWEIZER & PETERHANS, 2014). É uma doença gastrointestinal fatal, com ocorrência maior em animais com seis meses a dois anos de idade e se caracteriza por febre, leucopenia, diarreia, anorexia, desidratação e lesões erosivas nas narinas e na boca, sendo que a letalidade é próxima de 100% (BROWNLIE, CLARKE & HOWARD, 1984).

2.5 DIAGNÓSTICO DE PESTIVÍRUS DE BOVINOS

A suspeita de infecção pelo BVDV ocorre em propriedades que apresentam principalmente problemas reprodutivos, tais como, perdas embrionárias, abortos, malformações fetais, nascimento de animais fracos ou morte perinatal. Além disso, casos de doença entérica e/ou respiratória com componentes hemorrágicos, erosões e ulcerações no trato digestivo também são sugestivos de infecção. As manifestações clínicas podem surgir em animais de qualquer idade, mas os bovinos jovens são os principais afetados (RIDPATH, BAUERMANN & FLORES, 2017).

O método padrão para o diagnóstico do BVDV é o isolamento em cultivo celular (ICC), seguido pela imunofluorescência (IFA) ou imunoperoxidase (IPX), uma vez que a maioria dos isolados são ncp (PELLERIN et al., 1994). A principal célula utilizada para o isolamento deste vírus é uma linhagem de rim bovino, a MDBK (*Madin-Darby bovine kidney*), mas os cultivos primários de bovinos são os mais susceptíveis. Para os isolados cp, a vacuolização citoplasmática, degeneração celular, enrugamento do tapete, desprendimento e lise celular são os principais achados (RIDPATH, BAUERMANN & FLORES, 2017). De maneira geral, o isolamento requer um período de tempo prolongado (dias a semanas), o que não ocorre em outros métodos de detecção de抗ígenos virais, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), RT-PCR e RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) (WEBER et al., 2014; MARQUES et al., 2016; RIDPATH, BAUERMANN & FLORES, 2017).

Métodos de diagnóstico indireto são utilizados com frequência para o monitoramento do rebanho, uma vez que a identificação de soropositividade de um animal indica apenas exposição prévia ao agente, seja pelo contato com um vírus de campo, cepa vacinal ou imunidade materna/passiva. Animais infectados de forma aguda geralmente soroconvertem de 10 a 14 dias após a infecção inicial, assim, a sorologia pareada pode confirmar a infecção (RIDPATH, BAUERMANN & FLORES, 2017). Em propriedades que aderem a vacinação, métodos para a detecção de anticorpos anti-BVD, como ELISA e soroneutralização (SN) ou vírus-neutralização (VN), podem ser importantes para identificação inicial de animais PI, que geralmente são soronegativos (HOWARD, CLARKE & BROWNIE, 1985; DEZEN et al., 2013). A baixa reatividade sorológica entre os isolados dificulta o diagnóstico e a prevenção por vacinação (BIANCHI et al., 2011).

2.5.1 Diagnóstico molecular

Métodos de detecção de ácidos nucleicos, como a RT-PCR e suas variações, possuem vantagens sobre o isolamento viral tanto em sensibilidade quanto em especificidade. Com esses

métodos é possível obter grande quantidade de uma região específica do RNA viral, além da possibilidade de detecção de vírus inviáveis, que não replicariam em cultivo celular. De maneira geral, as técnicas moleculares são mais rápidas, principalmente na identificação de cepas ncp, quando comparado aos métodos de isolamento e IFA/IPX (ALANSARI et al., 1993).

Para a caracterização inicial de isolados por métodos moleculares comumente é realizada a análise com base na N^{pro}, permitindo diferenciar os *Pestivirusus*, uma vez que esta protease está presente apenas neste gênero (RÜMENAPF et al., 1998; RIDPATH et al., 2010). Os dois genótipos de BVDV e o HoBiPeV são identificados com base na comparação da 5'UTR, que permite agrupar os isolados nos seus respectivos genótipos e subgenótipos, tendo em vista que é a região mais conservada desses vírus (PELLERIN et al., 1994). Modelos estruturais e bioquímicos demonstraram que estruturas *stem-loops* presentes nessa região servem para posicionar a subunidade ribossomal sobre o códon AUG (metionina),, sendo que sua extensão é de aproximadamente 385 pares de bases (pb) (GOYAL & RIDPATH, 2005). Para demonstrar diferenças genéticas, a glicoproteína do envelope E2 é muito utilizada, pois está submetida à intensa pressão de seleção (VILCEK et al., 2001; FLORES et al., 2002; LIU et al., 2010; PELETTI et al., 2012).

2.6 EPIDEMIOLOGIA E DIVERSIDADE GENÉTICA

O BVDV possui distribuição mundial, sendo que vários estudos já demonstraram a sua ampla distribuição em rebanhos bovinos brasileiros (GIL, 1998; CANAL et al., 1998; FLORES et al., 2002; CORTEZ et al., 2006; LUNARDI et al., 2008; BIANCHI et al., 2011; OTONEL et al., 2014; WEBER et al., 2014; BIANCHI et al., 2017; MÓSENA et al. 2017a, b; SILVEIRA et al., 2017). Causa perdas econômicas significativas para a bovinocultura, as quais estão associadas aos problemas respiratórios, gastrointestinais, e principalmente, reprodutivos (RIDPATH, BAUERMANN & FLORES, 2017).

As espécies de pestivírus são definidas por vários critérios que incluem os hospedeiros de origem, comparações de sequências de nucleotídeos e títulos de neutralização cruzada (BECHER et al., 2003). O sequenciamento e a comparação da 5'UTR, além das sequências N^{pro} e E2 são empregados para a filogenia e genotipagem de pestivírus de bovinos (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH et al. 1994; LIU et al., 2009). De acordo com esses critérios, os isolados de BVDV-1 são alocados em pelo menos 21 subgenótipos (denominados -1a a -1u) e BVDV-2 em quatro subgenótipos (-2a a -2d) (GIANGASPERO et al., 2008; YESILBAG, ALPAY & BECHER, 2017). Para o HoBiPeV tem sido proposta a classificação também em quatro subgenótipos (-3a a -3d) (GIAMMARIOLI et al., 2015).

De acordo com Yesilbag, Alpay e Becher (2017), o BVDV-1a é o subgenótipo predominante nas Américas e também em todo o mundo (31,6%), seguido pelo BVDV-1b (20,8%); enquanto que o BVDV-2 é responsável por aproximadamente 11,8% das sequências de BVDV genotipadas mundialmente, sendo o -2a o mais prevalente em todos os continentes. O BVDV-2c foi detectado apenas na Europa e nas Américas, e uma única cepa de BVDV contaminante na Argentina foi classificada como BVDV-2d (GIANGASPERO et al., 2008).

Nas duas últimas décadas (1998 - 2018), 307 pestivírus de bovinos foram parcialmente ou totalmente sequenciados no Brasil (Figura 3), incluindo vírus de diferentes regiões e origens epidemiológicas e associados a diversas apresentações clínicas. A análise filogenética desses vírus demonstrou predomínio do BVDV-1 (54,4%), sendo o subgenótipo -1a (32,9% do total) o mais frequente, seguido pelo -1b (16,3%), -1d (4,6%), -1c e -1i (0,3%). A frequência de BVDV-2 foi de 25,7%, predominando o subgenótipo -2b (84,8% do BVDV-2), seguido pelo -2a (8,86%) e o HoBiPeV foi responsável por 19,9% (61/307) dos vírus genotipados (FLORES et al., 2018).

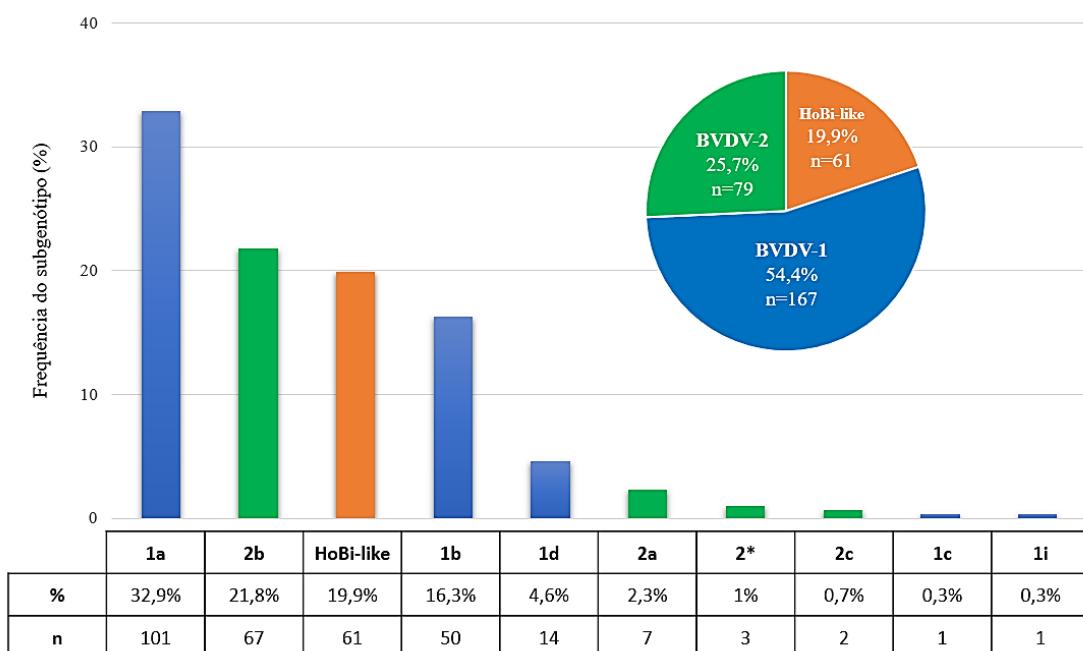


Figura 3 – Frequência de espécies/genótipos e subgenótipos de pestivírus de bovinos no Brasil (1998 – 2018). Adaptado de: Flores et al., 2018.

No estado do Paraná (PR), o BVDV-1b foi descrito causando um surto de doença gastrointestinal, no qual seis novilhas desenvolveram sinais clássicos de BVD aguda e faleceram de 24 horas a 15 dias após o aparecimento dos sinais clínicos (LUNARDI et al., 2008). No

mesmo estado, a triagem de rebanhos bovinos leiteiros vacinados e com problemas reprodutivos, revelou a presença dos subgenótipos -1a, -1b e -1d (OTONEL et al., 2014). Também na região sul, o BVDV-1d foi identificado em um surto de DM (BIANCHI et al., 2017). Na Paraíba (PB), o HoBiPeV foi associado a um caso de doença gastrointestinal aguda e fatal, sendo que a detecção por RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa) foi realizada a partir do soro de uma novilha (MARQUES et al., 2016). Também na região nordeste, dois isolados de BVDV-1b foram detectados em diferentes rebanhos de búfalos, o que possivelmente corresponde a primeira identificação de infecção ativa pelo BVDV em bubalinos no Brasil (PAIXÃO et al., 2018).

O screening e identificação genética de pestivírus presentes em soro de bovinos no estado do RS no ano de 2010 revelou a presença de BVDV-1 ($n = 19$, 58,6%), predominantemente o subgenótipo -1a ($n = 15$), seguido pelo -1b (3) e -1d (1), e alta frequência de BVDV-2, notadamente o subgenótipo -2b ($n = 14$, 42,4%) (WEBER et al., 2014). Estes resultados corroboram com os estudos de Bianchi et al. (2011), que demonstrou a alta frequência de BVDV-2 na região sul no país. Na região nordeste, o screening de pestivírus de bovinos nos estados do Maranhão (MA) e Rio Grande do Norte (RN) nos anos de 2012 e 2013, revelou a presença do HoBiPeV em pools de amostras de soro de bovinos oriundos de quinze rebanhos diferentes (SILVEIRA et al., 2017).

Além da caracterização genética de isolados através das regiões 5'UTR, N^{pro} e E2 a partir de amostras de casos clínicos e de screening de soro bovino, o sequenciamento completo de genomas de pestivírus de bovinos já foram descritos a partir de isolados brasileiros (SCHIRRMEIER et al., 2004; CORTEZ et al., 2017; MÓSENA et al., 2017a;b; YESILBAG, ALPAY & BECHER, 2017). Além de HoBi_32/00 (SCHIRRMEIER et al., 2004), pelo menos quatro sequências genômicas completas de pestivírus isolados no Brasil foram publicadas nos últimos anos, sendo três HoBiPeV e um BVDV-1i (MÓSENA et al., 2017a;b). Mósena et al. (2017) realizaram o sequenciamento genômico completo e caracterização de um BVDV-1i isolado de bovinos no sul do Brasil. Cortez et al. (2017) publicou a sequência completa do genoma de um HoBiPeV (SV757/15) isolado de uma novilha Nelore com doença gastrointestinal no estado de São Paulo (SP), sudeste do país.

2.7 CONTROLE E PROFILAXIA

As grandes diferenças antigênicas e genéticas entre as espécies/genótipos e subgenótipos de *Pestivirus* geram uma preocupação quanto ao diagnóstico e eficácia das vacinas comerciais disponíveis, uma vez que a maioria delas possui cepas europeias e

americanas em sua composição, que são antigenicamente diferentes das que circulam no Brasil (BOTTON et al., 1998) e nenhuma vacina possui cepas de HoBiPeV. Estudos já demonstraram que as vacinas brasileiras induzem baixos níveis de anticorpos neutralizantes, principalmente frente ao genótipo 2 (FLORES et al., 2002; ANZILIERO et al., 2015).

Animais imunizados com vacina contendo apenas cepas de BVDV-1 apresentam baixos títulos de anticorpos contra o BVDV-2 e HoBiPeV (RIDPATH et al., 2000; DECARO et al., 2013). Em animais imunizados com vacinas inativadas ou vivas atenuadas contendo cepas de BVDV-1 e -2, a divergência antigênica do vírus HoBiPeV com BVDV-1 e -2 é maior do que a observada entre BVDV-1 e -2 (BAUERMANN et al., 2013). Em um estudo conduzido no Brasil, vacinas BVDV inativadas induziram atividade neutralizante fraca (ou mesmo ausente) contra isolados brasileiros de vírus HoBiPeV (DIAS et al., 2017).

A vacinação tem como objetivos proteger os animais da enfermidade clínica, reduzir a circulação do vírus e, principalmente, prevenir a infecção fetal (VAN OIRSCHOT et al., 1999). É recomendada em regiões endêmicas e em fêmeas susceptíveis algumas semanas antes do período de cobertura, prevenindo, assim, a transmissão via transplacentária (MOENNIG et al., 2005). Também se preconiza a vacinação em rebanhos com alta rotatividade de animais. Dois pontos são importantes sobre a vacinação: rebanhos não vacinados podem ser monitorados pelo *status* sorológico, o que facilita o diagnóstico da enfermidade; e rebanhos soronegativos passam a ser susceptíveis à infecção, e a geração de animais PI, que correspondem à principal fonte de disseminação do BVDV em um rebanho (KELLING, 2004; FLORES et al., 2005).

A escolha da melhor estratégia para a profilaxia e controle da infecção depende das condições de cada rebanho (HOUÉ, 2003). O ponto principal é a identificação e eliminação de animais PI, bem como em minimizar o risco potencial do seu nascimento, através da separação de fêmeas prenhas ou recém-adquiridas do restante dos animais, até que sejam devidamente testadas (VAN OIRSCHOT et al., 1999). Adoção de medidas de higiene, como desinfecção das instalações, principalmente nos locais de quarentena também são fundamentais para manter os locais livres. Rebanhos não-vacinados deve ser periodicamente testados, através de testes sorológicos, ou teste de detecção direta do agente viral, principalmente nos animais suspeitos de serem PI (HOUÉ et al., 2006; LAUREYNS et al., 2010).

3 ARTIGO 1

Detection and genetic identification of pestiviruses in Brazilian lots of fetal bovine serum collected from 2006 to 2014¹

Francielle L. Monteiro², Juliana F. Cargnelutti², Patrícia Braunig², Aurea V. Folgueras-Flatschart³, Nathália C. Santos³, Edviges M. Pituco⁴, Rudi Weiblen² and Eduardo F. Flores^{2,*}

(Artigo publicado no periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38(3), p. 387-392, 2018)

¹ Received on February 14, 2017. Accept for publication on May 2, 2017.

² Setor de Virologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 63A, Parque de Exposições, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. *Corresponding author: eduardofurtadoflores@gmail.com

³ Laboratório de Bioengenharia de Tecidos (LABIO), Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida (DIMAV), Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), Av. Nossa Senhora das Graças 50, Xerém, Duque de Caxias, RJ 25250-020, Brazil.

⁴ Laboratório de Viroses de Bovídeos, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves 1.252, São Paulo, SP 04014-900, Brazil.

ABSTRACT

The present study performed a genetic identification of pestiviruses contaminating batches of fetal bovine serum (FBS) produced in Brazil from 2006 to 2014. Seventy-three FBS lots were screened by a RT-PCR targeting the 5' untranslated region (UTR) of the pestivirus genome. Thirty-nine lots (53.4%) were positive for pestivirus RNA and one contained infectious virus. Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of the 5'UTR revealed 34 lots (46.6%) containing RNA of bovine viral diarrhea virus type 1 (BVDV-1), being 23 BVDV-1a (5' UTR identity 90.8-98.7%), eight BVDV-1b (93.9-96.7%) and three BVDV-1d (96.2- 97.6%). Six lots (8.2%) contained BVDV-2 (90.3-100% UTR identity) being two BVDV-2a; three BVDV-2b and one undetermined. Four FBS batches (5.5%) were found contaminated with HoBi-like virus (98.3 to 100%). Five batches (6.8%) contained more than one pestivirus. The high frequency of contamination of FBS with pestivirus RNA reinforce the need for systematic and updated guidelines for monitoring this product to reduce the risk of contamination of biologicals and introduction of contaminating agents into free areas.

INDEX TERMS: Genetic identification, pestiviruses, fetal bovine serum, BVDV, pestivirus, contamination, cattle.

INTRODUCTION

Contamination of fetal bovine serum (FBS) with bovine pestiviruses, namely bovine viral diarrhea virus (BVDV), has been a long-time concern for the industry of biologicals. FBS is a major growth supplement for mammalian cell cultures and is a component of many biologicals of human and veterinary use, including vaccines. In addition, FBS has broad/wide applications in many areas of research and development. Moreover, international trade of FBS represents a potential risk for the introduction of exogenous agents into free countries (Stahl et al. 2007, Bauermann et al. 2013, Xia et al. 2013). These concerns were renewed upon the identification of a novel group of pestiviruses in a batch of FBS imported from Brazil (Schirrmeier et al. 2004).

The genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae*, comprises four recognized virus species, *Bovine viral diarrhea virus 1 and 2* (BVDV-1 and BVDV-2), *Border disease virus* (BDV) and *Classical swine fever virus* (CSFV) (Liu et al. 2009). Several other putative pestivirus species wait for definitive classification, including the emerging HoBi-like virus group, also denominated atypical pestiviruses or BVDV-3 (Schirrmeier et al. 2004, Liu et al. 2009, Bauermann & Ridpath 2015).

The ruminant pestivirus genome is a single stranded, positive sense RNA of 12.3kb in length containing a long open reading frame (ORF) flanked by two untranslated regions (5' and 3' UTRs), respectively. Nucleotide sequencing and comparison of the highly conserved 5' UTR has served for pestivirus phylogeny and classification into virus species and subtypes (Ridpath et al. 1994, Becher et al. 1997, Vilcek et al. 2001, Bauermann & Ridpath 2015).

The first member of this novel pestivirus group (isolate HoBi_D32/00) was identified in Germany contaminating FBS imported from Brazil (Schirrmeier et al. 2004). Subsequently, genetically similar viruses – and so called HoBi-like - have been repeatedly detected in commercial FBS from different sources, but mainly from South America (Stahl et al. 2007, Liu et al. 2009, Peletto et al. 2012, Giammarioli et al. 2015). In addition, HoBi-like viruses have been associated with cattle infection and disease in several countries (Cortez et al. 2006, Liu et al. 2009, Bianchi et al. 2011, Decaro et al. 2011, 2012, Mishra et al. 2014).

As Brazil is one of the major world suppliers of FBS, and pestiviruses - including HoBi-like - have been frequently detected in Brazilian lots of FBS, we performed an investigation on the presence and identity of pestiviruses present in FBS produced in the country between 2006 and 2014.

MATERIALS AND METHODS

The current study included aliquots from 73 lots of FBS produced in Brazil between 2006 and 2014. Forty-six lots consisted of pooled fetal sera collected in slaughterhouses between 2006 and 2011. These lots have been submitted to filtration and UV irradiation prior to submission to the diagnostic laboratory. The remaining samples (n=27) were obtained from commercial, packed and labeled batches of FBS produced in Brazil from 2009 to 2014. Pestivirus screening included three RT-PCRs using different sets of primers targeting the 5'-UTR of the genome (Table 1).

Aliquots of 100µL of each FBS batch were submitted to RNA extraction using TRIzol® Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA), according to manufacturer's instructions. After RNA extraction, complementary DNA (cDNA) was synthesized using Super Script III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA). Then, cDNA from each sample was submitted to three sequential PCR assays, using different sets of primers targeting the 5'UTR (Table 1). The first PCR used the panpestivirus primers HCV90-368 (Ridpath & Bolin, 1998). The conditions were: 94°C-5min, 35 cycles of 94°C, 50°C, 72°C, 30s each, final extension at 72°C (7min). The second PCR used primers specific for BVDV-2 (2F-2R), that was designed in Clone Manager software (http://www.scied.com/pr_cmbas.htm) using the strain 890 as standard sequence (GenBank access U18059). The obtained primers sets were analyzed in primer-BLAST tool to specificity parameters (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Conditions were: 94°C-5 min, 35 cycles of 94°C, 52°C and 72°C extension for 45s each, final extension of 7min-72°C. The third PCR used primers N2-R5 targeting the HoBi-virus 5'UTR (Bauermann et al. 2014). Conditions were 94°C – 5 min, 35 cycles of 94°C, 55°C and 72°C for 30s each, followed by an extension at 72°C – 5 min. The PCR reactions were performed in a 25 µl volume, using 2 µl of cDNA template (100 to 200ng), 0.4µM of each primer, 2mM MgCl₂, 0.8mM of dNTPs, 1x reaction buffer, 10% of reaction dimetilsulfoxide (BVDV-2) and 1.5 unit of Taq polymerase (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

Total RNA extracted from Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells infected with BVDV-1 Singer (cp), BVDV-2 890 (ncp), HoBi-like virus LV04/12 (Silveira et al. 2017) were used as controls. Ultrapure water was used as negative control. Pestivirus-free MDBK cells were grown in minimal essential medium (MEM) with 10% equine serum and supplemented with antibiotics. The sensitivity of each PCR was determining by performing 10-fold dilutions of supernatants of MDBK cells infected with each control virus, followed by RNA extraction, cDNA synthesis and PCR as described above. PCR products were resolved in a 1.5% agarose gel stained by Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, USA) and visualized under UV light after

electrophoresis (60V, 40min). For nucleotide sequencing, PCR products were purified using PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA). Positive samples were sequenced in duplicates using the BigDye kit. The sequences were analyzed by Staden program (Staden 1996) to obtain the consensus sequence. The alignment of the sequences with sequences deposited in GenBank was performed using the program BioEdit Sequence Alignment Editor Software suite, version 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). The phylogenetic analysis was conducted in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software 5.0 (Tamura et al. 2011), using the Neighbor-joining method, and the evolutionary distances were computed using the p-distance method. The bootstrap values were calculated using 1000 replicates.

FBS samples were also submitted to virus isolation in MDBK cells using standard protocols (Botton et al. 1998). Briefly, 100µL of FBS was added to the culture medium of MDBK cell monolayers grown in 6-well plates and submitted to three passages of five days each, followed by detection of viral antigens by fluorescent antibody assay (FA) at the end of the third passage.

RESULTS AND DISCUSSION

Thirty-nine FBS lots (53.4%) were found contaminated with RNA of at least one pestivirus species by the PCRs targeting the 5'UTR (Tables 1 and 2). The first PCR using the panpestivirus primers HCV90-368 (Ridpath & Bolin 1998) resulted in 35/73 positive samples (47.9%). Nucleotide sequencing of the amplicons revealed 34 samples harboring BVDV-1 (23 BVDV-1a, 8 BVDV-1b and 3 BVDV-1d) and one containing HoBi-like virus. The amplification of a HoBi-like virus out of one batch indicates a high level of contamination since these primers were shown to poorly amplify HoBi-like viruses (Bauermann et al. 2013). In any case, these results indicate the predominance of BVDV-1 among the viruses detected in the examined samples (35/45, 77.7%).

The lack of amplification of BVDV-2 by primers HCV90-368 was somehow surprising due to the wide circulation of this virus among Brazilian cattle (Cortez et al. 2006, Bianchi et al. 2011, Silveira et al. 2017). Then, a second primer set was designed to specifically amplify BVDV-2, either as a sole virus or in mixed contamination (Table 1). These primers were shown to amplify specifically BVDV-2 (at little as 10 genome copies), even in mixtures containing BVDV-1 in 100-fold higher amounts (not shown). The PCR using this set of primers resulted in the positive amplification in six batches, all confirmed as BVDV-2 by nucleotide sequencing (2 BVDV-2a; 3 BVDV-2b and one undetermined). Three of these samples also contained

BVDV-1 (detected by the HCV90-368 PCR) and one contained BVDV-2 plus HoBi-like virus (detected by the HoBi-virus-specific PCR). Thus, BVDV-2 accounted for 13.6% (6/44) of the pestiviruses detected in Brazilian FBS batches. The third PCR used primers specific for HoBi-like virus (N2-R5) and yielded four positive samples, one was the same sample detected by primers HCV90-368. The identity of HoBi-like viruses was confirmed by nucleotide sequencing. The presence of other pestiviruses in the samples seemed not to affect amplification of HoBi-like by this set of primers. Thus, HoBi-like viruses comprised 8.9% (4/44) of the pestiviruses contaminating FBS batches. Five FBS batches contained more than one viral species (3 were positive for BVDV-1 and BVDV-2; and one each contained HoBi-like virus and BVDV-1 or BVDV-2).

The obtained sequences were submitted to identity matrix based on the 5' UTR. The nucleotide identity among the BVDV-1a ranged from 90.8 to 98.7%; BVDV-1b, 93.9 to 96.7%; BVDV-1d, 96.2 to 97.6%. The 5' UTR identity among BVDV-2 ranged from 90.3% to 100% and among HoBi-like viruses varied from 98.3 to 100%. Figure 1 depicts the phylogenetic relationships among the detected pestiviruses.

A number of studies have demonstrated pestivirus contamination of FBS originated from Brazil and other South American countries (Liu et al. 2009, Xia et al. 2013, Peletto et al. 2012, Giammarioli et al. 2015). Our study reinforced these findings, detecting 53.4% batches containing pestivirus RNA. Although only one lot contained infectious virus, the high frequency of pestivirus RNA contamination should call attention to the FBS manufacturers and regulatory agencies for the need of continuous monitoring and strict application and use of updated procedures for pestivirus detection.

Contamination of FBS with pestiviruses may have important consequences, including contamination of human and veterinary vaccines (Falcone et al. 1999) and interference with virology diagnosis and research (Stahl et al. 2007). Widespread distribution of FBS may also represent a means for introduction of contaminating viruses into free countries (Stahl et al. 2007, Bauermann et al. 2013, Giammarioli et al. 2015).

In general, these results reflect the distribution and frequency of BVDV genotypes and HoBi-like viruses in Brazil reported in previous studies (Cortez et al. 2006, Bianchi et al. 2011, Silveira et al. 2017). The low frequency of BVDV-2 detection contrasts with a highest frequency detected previously, yet it might be partially explained by the preferential amplification of BVDV-1 sequences by the pestivirus primers used in the initial reactions. On the other hand, the frequency of HoBi-like virus detection confirms the wide and frequent

distribution of this novel group of pestiviruses among Brazilian cattle (Cortez et al. 2006, Bianchi et al. 2011, Silveira et al. 2017).

CONCLUSIONS

Our results showed a high frequency of pestivirus RNA contamination of FBS produced in Brazil. Interestingly, HoBi-like viruses accounted for approximately 9% of the pestivirus RNA detected in FBS and were present in 5% of the lots, confirming the widespread distribution of these viruses in Brazil. These findings reinforce the need for continuous monitoring and strict application of methods for virus inactivation as to provide a safe product for the industry and research.

Acknowledgements - F. L. Monteiro, J. F. Cargnelutti, E. F. Flores, and R. Weiblen recipients of fellowships of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) research fellows. We thank Fernando V. Bauermann for the valuable help and advices during the elaboration of the manuscript.

REFERENCES

- Bauermann F.V. & Ridpath J.F. 2015. HoBi-like viruses, the typical atypical bovine pestivirus. *Anim. Health Res. Rev.* 16(1):64-69.
<http://dx.doi.org/10.1017/S146625231500002X>. PMid:26050574.
- Bauermann F.V., Flores E.F., Falkenberg S.M., Weiblen R. & Ridpath J.F. 2014. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26(1):10-17.
<http://dx.doi.org/10.1177/1040638713518208>. PMid:24415196.
- Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R. & Flores E.F. 2013. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25(1):6-15.
<http://dx.doi.org/10.1177/1040638712473103>. PMid:23345268.
- Becher P., Orlich M., Shannon A.D., Horner G., König M. & Thiel H.J. 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* 78(Pt 6):1357-1366. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-78-6-1357>. PMid:9191930.
- Bianchi E., Martins M., Weiblen R. & Flores E.F. 2011. Genotypic and antigenic profile of bovine viral diarrhea virus isolates from Rio Grande do Sul, Brazil (2000-2010). *Pesq. Vet. Bras.* 31:649-655. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000800003>.

- Botton S.A., Gil L.H.V.G., Silva A.M., Flores E.F., Weiblen R., Pituco E.M., Roehe P.M., Moojen V. & Wendelstein A.C. 1998. Caracterização preliminar de amostras do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) isoladas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 18(2):84-92. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X1998000200008>.
- Cortez A., Heinemann M.B., Castro A.M., Soares R.M., Pinto A.M., Alfieri A.A., Flores E.F., Leite R.C. & Richtzenhain L.J. 2006. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pesq. Vet. Bras.* 26(4):211-216. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2006000400005>.
- Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Camero M., Sciarretta R., Losurdo M., Lorusso E. & Buonavoglia C. 2011. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 17(8):1549- 1552. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1708.101447>. PMid:21801648.
- Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Sciarretta R., Pinto P., Buonavoglia D., Martella V. & Buonavoglia C. 2012. HoBi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. *J. Clin. Microbiol.* 50(2):509-512. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05887-11>. PMid:22162547.
- Falcone E., Tollis M. & Conti G. 1999. Bovine viral diarrhea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine* 18(5/6):387-388. PMid:10636817.
- Giammarioli M., Ceglie L., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., Petrini S. & De Mia G.M. 2015. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. *Virus Genes* 50(1):147-151. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-014-1132-2>. PMid:25349062.
- Liu L., Kampa J., Belak S. & Baule C. 2009. Virus recovery and full-length sequence analysis of the atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen. *Vet. Microbiol.* 138(1/2):62-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.006>. PMid:19349128.
- Mishra N., Rajukumar K., Pateriya A., Kumar M., Dubey P., Behera S.P., Verma A., Bhardwaj P., Kulkarni D.D., Vijaykrishna D. & Reddy N.D. 2014. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet. Microbiol.* 174(1/2):239-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.09.017>. PMid:25301283.
- Peletto S., Zuccon F., Pitti M., Gobbi E., Marco L.D., Caramelli M., Masoero L. & Acutis P.L. 2012. Detection and phylogenetic analysis of an atypical pestivirus, strain IZSPLV_To. *Res. Vet. Sci.* 92(1):147-150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.015>. PMid:21093884.

- Ridpath J.F. & Bolin S.R. 1998. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV) by PCR. *Mol. Cell. Probes* 12(2):101-106.
<http://dx.doi.org/10.1006/mcpr.1998.0158>. PMid:9633045.
- Ridpath J.F., Bolin S.R. & Dubovi E.J. 1994. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* 205(1):66-74. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1994.1620>.
PMid:7975238.
- Schirrmeier H., Strelbelow G., Depner K., Hoffmann B. & Beer M. 2004. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 85(Pt 12):3647-3652.
<http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80238-0>. PMid:15557237.
- Silveira S., Weber M.N., Mósena A.C., da Silva M.S., Streck A.F., Pescador C.A., Flores E.F., Weiblen R., Driemeier D., Ridpath J.F. & Canal C.W. 2017. Genetic diversity of Brazilian bovine pestiviruses detected between 1995 and 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* 64(2):613-623. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12427>. PMid:26415862.
- Staden R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5(3):233-241.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02900361>. PMid:8837029.
- Ståhl K., Kampa J., Alenius S., Wadman A.P., Baule C., Aiumlamai S. & Belák S. 2007. Natural infection of cattle with an atypical ‘HoBi’-like Pestivirus: implications for BVD control and for the safety of biological products. *Vet. Res.* 38(3):517-523.
<http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2007012>. PMid:17506974.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10):2731-2739.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>. PMid:21546353.
- Vilcek S., Paton D.J., Durkovic B., Strojny L., Ibata G., Moussa A., Loitsch A., Rossmanith W., Vega S., Scicluna M.T. & Paifi V. 2001. Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146(1):99-115.
<http://dx.doi.org/10.1007/s007050170194>. PMid:11266221.
- Xia H., Larska M., Giammarioli M., De Mia G.M., Cardeti G., Zhou W., Alenius S., Belák S. & Liu L. 2013. Genetic detection and characterization of atypical bovine pestiviruses in fetal bovine sera claimed to be of Australian origin. *Transbound. Emerg. Dis.* 60(3):284-288. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01341.x>. PMid:22591445.

Table 1. Primer sequences and PCR amplification of pestiviruses present in Brazilian batches of fetal bovine serum (FBS) collected from 2006 to 2014.

Primers	Sequence	Amplicon	Positive (%)	Identification
HCV90-368	F: CCATGTGCCATGTACAG R: CATGCCCATAGTAGGAC	282pb	35/73 (47.9)	24 BVDV-1a; 8 BVDV-1b; 2 BVDV-1d; 1 HoBi-like
BVDV-2 2F and 2R	F: GCGGTAGCAGTGAGTTATTGG R: TTACTAGCGGGATAGCAGGTC	224pb	6/73 (8.2)	6 BVDV-2
N2-R5	F: TCGACGCATCAAGGAATGCCT R: TAGCAGGTCTCTGCAACACCCTAT	150pb	4/73 (5.5)	4 HoBi-like

Five fetal bovine serum (FBS) batches contained more than one viral species: 4 were positive for BVDV-1 and BVDV-2; one contained BVDV-1 and HoBi-like virus; one contained BVDV-2 and HoBi-like virus.

Table 2. Detection of pestiviruses by RT-PCR in Brazilian lots of FBS collected from 2006 to 2014.

SV Identification	Origin identification	Status ^a	Year ^b	Primers ^c		
				HCV90-368	BVDV-2 2F-2R	N2-R5
SV48/15 #66	IB-66	Pooled	2006	BVDV-1a ^d	-	-
SV48/15 #70	IB-70	Pooled	2006	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #60	IB-60	Pooled	2006	-	BVDV-2*	HoBi-like
SV48/15 #59	IB-59	Pooled	2007	BVDV-1a	BVDV-2a	-
SV48/15 #76	IB-76	Pooled	2007	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #111	IB-111	Pooled	2007	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #58	IB-58	Pooled	2007	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #69	IB-69	Pooled	2007	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #98	IB-98	Pooled	2008	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #92	IB-92	Pooled	2008	BVDV-1b	-	-
SV48/15 #1021	IB-1021	Pooled	2009	BVDV-1a	-	-
SV1003/14 #89	IN-89	Packed	2009	BVDV-1b	BVDV-2a	-
SV48/15 #1434	IB-1434	Pooled	2010	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #595	IB-595	Pooled	2010	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #606	IB-606	Pooled	2010	BVDV-1b	-	-
SV48/15 #1937	IB-1937	Pooled	2010	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #1780	IB-1780	Pooled	2011	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #1770	IB-1770	Pooled	2011	BVDV-1a	-	-
SV1003/14 #92	IN-92	Packed	2011	BVDV-1b	-	-
SV1003/14 #93	IN-93	Packed	2011	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #5835	IB-5835	Pooled	2011	HoBi-like	-	HoBi-like
SV1003/14 #87	IN-87	Packed	2012	BVDV-1b	-	-
SV1003/14 #95	IN-95	Packed	2013	BVDV-1b	-	-
SV1003/14 #98	IN-98	Packed	2013	BVDV-1d	BVDV-2b	-
SV1003/14 #90	IN-90	Packed	2014	BVDV-1b	-	HoBi-like
SV1003/14 #91	IN-91	Packed	2014	BVDV-1a	-	-
SV694/15 #80	IN-80	Packed	2014	BVDV-1a	-	-
SV694/15 #106	IN-106	Packed	2014	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #1940	IB-1940	Pooled	NI ^e	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #301	IB-301	Pooled	NI	-	-	HoBi-like
SV48/15 #1905	IB-1905	Pooled	NI	BVDV-1a	-	-
SV1003/14 #1939	IB-1939	Pooled	NI	BVDV-1d	-	-
SV1003/14 #1870	IB-1870	Pooled	NI	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #1896	IB-1896	Pooled	NI	BVDV-1a	-	-
SV48/15 #1894	IB-1894	Pooled	NI	BVDV-1a	-	-
SV1003/14 #88	IN-88	Packed	NI (valid until 2016)	BVDV-1b	-	-
SV1003/14 #101	IN-101	Packed	NI (valid until 2016)	-	BVDV-2b	-
SV1003/14 #94	IN-94	Packed	NI (valid until 2019)	BVDV-1d	-	-

^a Pooled, unpacked FBS sent for pestivirus monitoring (IB - Instituto Biológico de São Paulo); or packed/labeled commercial FBS (Inmetro, RJ), ^b Corresponds to the year of collection informed by the supplier/manufacturer, ^c Primers HCV90-368 are panpestivirus; primers 2F-2R were designed to amplify exclusively BVDV-2; primers N2-R5 are specific for HoBi-like viruses, ^d The identity of the respective virus was determined by nucleotide sequencing of the amplicons, e Date of serum collection not informed; * The BVDV-2 subgenotype could not be determined; this sequence is not shown in the phylogenetic tree.

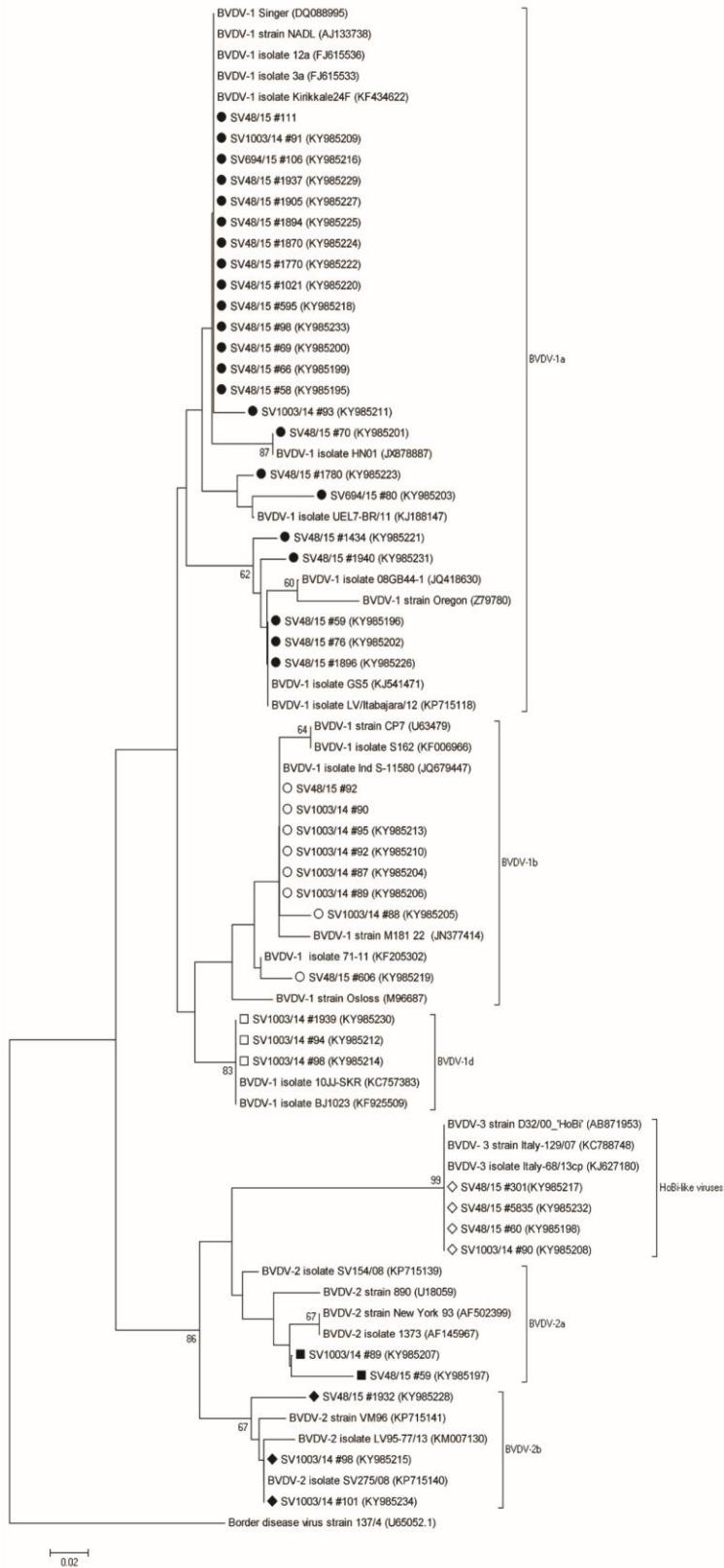


Figure 1. Phylogenetic tree based on the 5'UTR region of the pestivirus genome. The tree was built using the Neighbor-joining method and the evolutionary distances were computed using the p-distance method. The bootstrap values were calculated using 1000 replicates. The identified viruses are indicated by diamonds, circles or boxes.

4 ARTIGO 2

Genetic identification of pestiviruses from beef cattle in Southern Brazil

Francielle Liz Monteiro,¹ Bruno Martins,¹ Juliana F. Cargnelutti,¹ Jessica G. Noll,¹ Rudi Weiblen,¹ Eduardo F. Flores^{1*}

(Artigo submetido para o periódico *Brazilian Journal of Microbiology*, outubro de 2018)

¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Setor de Virologia (SV). Avenida Roraima, 1000, prédio 63A, Centro de Eventos, Santa Maria, RS. Brazil. 97105-900.

*Corresponding author: eduardofurtadoflores@gmail.com

Abstract

Bovine pestiviruses, e.g. bovine viral diarrhea virus types 1 (BVDV-1 or *Pestivirus A*), BVDV-2 (*Pestivirus B*) and HoBi-like pestiviruses (HoBiPeV or *Pestivirus H*) have been shown to circulate in Brazilian cattle in varied proportions. In this study we identified genetically pestiviruses circulating in beef cattle in Rio Grande do Sul, the southernmost Brazilian state. Screening of serum of 15.684 beef calves destined to export by an antigen capture ELISA and, subsequently, by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) revealed 135 containing pestivirus RNA. Genetic typing of these viruses based on nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of the 5' untranslated region (5'UTR) of the viral genome allowed for the identification of 90 different viruses, being 38 BVDV-1 (42.2%), 31 BVDV-2 (34.4%) and 21 HoBiPeV (23.4%). Among BVDV-1, only subtypes -1a (n=28, 31.1%) and -1b (n=10, 11.1%) were identified. All 30 BVDV-2 isolates belonged to BVDV-2b subtype and the 21 HoBiPeV viruses clustered to subgroup 3a. Thus, this study provides an approximate genetic profile of pestiviruses circulating in beef cattle in a traditional Brazilian beef cattle-raising state.

Key words: beef cattle; pestivirus; phylogeny.

Introduction

Pestiviruses comprise a genus within the family *Flaviviridae*; they are small (40-50 nm), enveloped, single-stranded positive-sense RNA viruses.¹ Bovine pestiviruses include the prototype species, bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1) and 2 (BVDV-2), and a third species classified as HoBi-like pestiviruses (HoBiPeV).^{1,2} BVDV-1, BVDV-2, and HoBi-like viruses have also been classified as *Pestivirus A*, *B*, and *H*, respectively.^{3,4} The pestivirus genome is a 12.3 kb RNA molecule that contains a long open reading frame (ORF) flanked by two untranslated regions, 5' and 3' UTRs. The ORF encodes a long polyprotein that is cleaved by viral and host proteases into 11-12 mature viral polypeptides: N^{pro}, C, E^{rns}, E1, E2, p7, NS2-3 (NS2, NS3), NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B.⁵

Pestivirus species are determined by criteria such as comparisons of the complete coding nucleotide (nt) sequences, cross-neutralization titer assays, and the strain's host of origin.^{1,4,6} Nucleotide sequencing and comparison of the highly conserved 5' UTR, N^{pro} and E2 have also served for the classification and phylogenetic analysis of *Pestivirus* into subtypes or subgenotypes.^{6,7,8,9,10,11} At least twenty-one subgenotypes (1a-1u) have been identified for BVDV-1, whereas four have been described for BVDV-2 (2a-2d). Considering only published sequences, the number of isolates described for BVDV-1 is much higher than those described for BVDV-2 (88.2% versus 11.8%); yet the relative proportions for each virus vary largely depending on the country or region of origin.¹¹

BVDV-1 and 2 are among the most important globally distributed cattle pathogens. They have been associated with a variety of clinical manifestations in their hosts.¹² HoBiPeV were initially identified as contaminants of fetal bovine serum (FBS) of Brazilian origin¹³ and were subsequently linked to several livestock diseases in South America^{14,15}, Italy^{16,17,18} and Asian countries.^{19,20,21} BVDV-1 and BVDV-2 subgenotypes have been shown to circulate in Brazilian cattle in varied proportions, yet most genetic studies have been based on a single or few isolates

or have included samples scattered over time and from different geographical origins or clinical backgrounds.^{7,14,22,23,24,25,26,27,28} The first evidence of circulation of HoBiPeV in Brazil dates from around 2002 and a number of subsequent studies indicate that these viruses are endemic among Brazilian cattle.^{7,14,15,24,25,27,29,30,31}

In this study, we genetically identified 90 bovine pestivirus strains detected in the sera of beef calves that were destined to be exported from Rio Grande do Sul (RS), the southernmost Brazilian state. Pestivirus-containing sera were detected by antigen-capture ELISA and then submitted for RT-PCR for nucleotide sequencing of the amplicons. In contrast with most studies performed to date that have examined few samples from different origins and scattered over time, this study provides a profile of bovine pestivirus species and subtypes circulating in beef cattle of Rio Grande do Sul, Brazil.

Material and Methods

A total of 15,584 samples of beef sera were taken from calves destined for export. They were examined by an antigen-capture ELISA (Idexx Inc.), and 135 were found to be positive, indicating that they contained either pestivirus RNA or the viruses themselves. Positive samples for BVDV/pestivirus antigens were then submitted to PCR, and different sets of primers were used to detect BVDV-1, BVDV-2, and HoBiPeV. The amplicons were submitted for nucleotide sequencing and phylogenetic analysis. Amplicons with a 100% nt identity were considered as belonging to the same virus, and only one representative sample was included in the analysis. Under this criterion, 90 different genomes were identified.

Aliquots of 150 µL of the 90 different sera samples were submitted for RNA extraction using TRIzol® Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA), followed by complementary DNA (cDNA) synthesis using Super Script III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA). The resulting cDNAs were used to run three PCR assays, each using different sets of

primers targeting the 5' UTR. Information regarding the primers used are presented in Table 1. PCR products were resolved in a 2% agarose gel stained by Gel Red[®] (Biotium, Hayward, CA, USA) and visualized under UV light after electrophoresis (60 V, 40 min). Total RNA extracted from Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells infected with BVDV-1 Singer (cp), BVDV-2 890 (ncp), and HoBiPeV LV04/12³¹ were used as controls. Ultrapure water was used as negative control. Pestivirus-free MDBK cells were grown in minimal essential medium (MEM) with 10% equine serum and supplemented with antibiotics.

For nucleotide sequencing, PCR products were purified using PureLink[®] Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA). Positive samples were sequenced in duplicate using the BigDye kit. Results were analyzed by the Staden program³² to obtain a consensus sequence from each duplicate. The alignment of sequences with those from GenBank was performed using the BioEdit Sequence Alignment Editor Software suite, version 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Phylogenetic analysis was conducted by the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software 6.0³³, using the neighbor-joining method, and the evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter model. The *bootstrap* values were calculated using 1000 replicates.

Results

As previously stated, among the 135 positive sera detected by the BVDV antigen-capture ELISA, 90 different genomes or viruses were identified by nucleotide sequencing and analysis of the 5' UTR amplicons. From these, we identified 38 different strains of BVDV-1 (42.2%), 31 of BVDV-2 (34.4%), and 21 of HoBiPeV (23.3%) (Table 1). Among BVDV-1, only subgenotypes BVDV-1a (n = 28, 31.1%) and BVDV-1b (n = 10, 11.1%) were found, while all 31 BVDV-2 isolates belonged to the BVDV-2b subgenotype and the 21 HoBiPeV clustered to subgroup 3a.

The nucleotide identity among the identified BVDV-1a genomes and between them and GenBank sequences ranged from 83.4% to 99.3%. The nucleotide identity among BVDV-1b genomes was from 92.1% to 96.9%, and it ranged from 92.7% to 98.1% when compared to GenBank sequences. BVDV-2b strains shared an 89.9%–99.2% identity among them and an 88.4 to 99.2% identity with deposited BVDV-2b sequences. Finally, HoBiPeV nucleotide identity varied from 82.4% to 98.2%, including the identified viruses and GenBank sequences.

Phylogenetic analysis of the thirty-eight 5' UTR sequences identified as BVDV-1, showed that they belong to two major genetic groups, subgenotypes BVDV-1a and BVDV-1b (Figure 1). These sequences were grouped together with other BVDV-1a and BVDV-1b strains from Brazil and other parts of the world and were separated from BVDV-1c, BVDV-1d, BVDV-1e, and BVDV-1i subgenotypes, which have also been previously isolated in Brazil.^{27,34} Attempts to further group these 38 sequences into additional BVDV-1 subgroups/subgenotypes by phylogenetic analysis based on N^{pro} sequences²⁷ failed, resulting in a grouping similar to that based on 5' UTR sequences (not shown). Thus, only BVDV-1a and BVDV-1b subgroups were detected among the BVDV-1 viruses present in the studied population.

Phylogenetic analysis of BVDV-2 sequences amplified by primers 90-368⁹ and BVDV2#3²⁴ grouped them in the BVDV-2b subgenotype (Figure 2). Given that no other BVDV-2 subgenotype was identified among the viruses circulating in the population tested, our data confirm the predominance - and nearly exclusive - circulation of the BVDV-2b genotype in Brazil.^{7,27,28,35} Finally, phylogenetic analysis of all 21 HoBiPeV genomes, amplified by 5' UTR primers N2-R5, grouped them together and in the same genetic group of several previously described Brazilian sequences, subgroup 3a.^{24,27,29,31}

Discussion

The high number of identical viruses identified among the positive samples, 47 out of 135, was likely due, at least in part, to virus transmission among animals during the 21-day quarantine period in which they were housed together for the completion of sanitary exams and requirements for export. During this time, opportunities for virus transmission likely abounded, mainly considering that hundreds of calves from different origins or herds were brought and housed together in collective pens. Additionally, different calves belonging from the same herd or farm would possibly harbor the same virus strain, resulting in duplicated or triplicated sampling.

A number of studies have genetically characterized bovine pestiviruses from Brazil. Canal et al. (1998)²² and Gil et al. (1998)³⁶ demonstrated that both BVDV-1a and BVDV-2 were already circulating in Southern and Southeastern Brazil by 1998, with a clear predominance of BVDV-1 (83%), mainly the subtypes BVDV-1a and BVDV-1b, over BVDV-2 (17%). Subsequently, phylogenetic analysis demonstrated that Brazilian BVDV-2 isolates clustered to a genetic group distinct from North American isolates, thus representing a distinct subgenotype, BVDV-2b³⁷. Genetic characterization of 19 BVDV isolates from aborted fetuses from different geographic regions and previously associated with varied clinical backgrounds identified 11 isolates as BVDV-1 (from which 8 were BVDV-1a), 6 as BVDV-2b, and 2 as "atypical" pestiviruses. examined the 5' UTR of BVDV isolates both from clinical cases and from cattle sera from southern Brazil and found a high frequency (45%) of BVDV-2 (3 BVDV-2a and 6 BVDV-2b), in addition to BVDV-1a ($n = 7$) and BVDV-1b ($n = 1$). Three isolates classified as "atypical pestiviruses" and subsequently classified as HoBiPeV were also identified. Weber et al. (2014)¹⁵ also used the 5' UTR and the N^{pro} to determine the pestivirus strains present in Southern Brazil and found a high frequency of BVDV-2 (42.3%, exclusively BVDV-2b), in addition to a variety of BVDV-1 subtypes, predominantly BVDV-1a but also BVDV-1b and

BVDV-1d.

Identification of BVDV-1 subgenotypes BVDV-1a, BVDV-1b, and BVDV-1d in persistently infected (PI) animals of a vaccinated dairy herd from Parana state, southern Brazil, called attention to vaccine failure.²⁶ Subsequently, Silveira et al. (2017)³¹ characterized 85 pestiviruses obtained from 1985 to 2014 from different Brazilian sources, including clinical cases, follicular fluid, PI animals, FBS, and contaminated cell lines. This study revealed the presence of BVDV-1, BVDV-2, and HoBiPeV, in a proportion of 53.9%, 33.7%, and 12.3%, respectively, with BVDV-1a (35.9% of all sequences) and BVDV-2b (31.4%) as the predominant subgenotypes, followed by BVDV-1b (10.1%) and BVDV-1d (6.7%). Most BVDV-1d isolates were obtained from contaminated cell cultures. BVDV-1e (1.1%) and BVDV-2c (2.2%) were also identified; however, the latter was detected as a contaminant of the cell culture, and thus, its geographical origin is uncertain. Weber et al. (2016)¹⁵ identified HoBiPeV associated with an outbreak of a gastro enteric condition resembling mucosal disease (MD). Mosena et al.^{25,34} reported the complete genome sequence of a BVDV-1i isolated from a cow in Southern Brazil and the complete genomic sequences of two Brazilian HoBiPeV isolates, respectively. Bianchi et al.²⁹ described the isolation and genetic identification of 22 strains involved in an unusual outbreak of mucosal disease (MD). These isolates or genomes turned out to be the same virus, BVDV-1d. Cortez et al. (2017)³⁰ published the complete genome sequence of a HoBiPeV (strain SV757/15) isolated from a heifer with gastro enteric disease in southeastern Brazil. Genetic characterization of 17 pestivirus genomes detected in pooled cattle sera from two Brazilian northeastern states also revealed the predominance of HoBiPeV. Monteiro et al. (2018)²⁴ analyzed 73 commercial FBS batches collected in Brazil from 2006 to 2014, in which 39 (53.4%) were positive for pestivirus. Among these, 34 lots (46.6%) contained BVDV-1, with 24 BVDV-1a isolates, four BVDV-1b isolates, and two BVDV-1d isolates. Six lots (8.2%) contained BVDV-2b, and four (5.5%) were contaminated

with HoBiPeV.

Altogether, these studies show that BVDV-1, BVDV-2, and HoBiPeV co-circulate in Brazilian cattle with a clear predominance of BVDV-1, followed by BVDV-2 and lastly by HoBiPeV.^{14,24,27,28,29} BVDV-1a predominates among BVDV-1 sub-genotypes, followed by BVDV-1b and BVDV-1d. BVDV-1c appears at a low frequency, and subgenotypes BVDV-1e and BVDV-1i have been rarely detected.^{27,34} A high prevalence of BVDV-2, in proportions that may reach up to 45%, has also been observed by some studies; most of them belong to the BVDV-2b group, but a few BVDV-2a strains can be found.^{7,28} A BVDV-2c isolate was also found as a contaminant of a cell culture of an uncertain origin²⁷ and BVDV-2a isolates have been rarely identified.⁷ To date, there is no description of any BVDV-2d circulation in Brazil. This high BVDV-2 prevalence (mostly BVDV-2b) seems somehow unique to Southern Brazil^{7,28}, compared to overall frequencies described elsewhere. Furthermore, our results confirm that there is an important circulation of HoBiPeV among RS cattle, encompassing 23.3% of the detected viruses, higher than previously described.^{7,31} A recent study also suggested that HoBiPeV may even be the predominant bovine pestivirus in some Northeastern Brazilian states³¹, yet these findings await confirmation.

Genetic and antigenic characterization of isolates is an ongoing process which has been proven relevant and useful for pestivirus diagnosis and control in Brazil. For instance, the initial identification of BVDV-2 in the country,^{22,35,36} paved the way for the introduction of BVDV-2 strains in current vaccines. The identification of BVDV-2 in Brazil also led to an appraisal and adaptation of molecular and immunodiagnostic tools for pestivirus detection.^{22,24,38} The identification of HoBiPeV among Brazilian cattle has called attention for the need of an evaluation of the molecular and immunodiagnostic assays for these strains.^{2,24,31,39} Whether to include these novel pestiviruses in current BVDV vaccines has also become a subject of debate.⁴⁰

Our findings add valuable information about pestivirus epidemiology in Southern Brazil and will certainly contribute to improve both the diagnostic and control techniques against these viruses in the country.

Funding

FLM, RW and EFF are recipients of CNPq fellowships (Brazilian Council for Research). JFC is recipient of PNPD/CAPES fellowship (Programa Nacional de Pós-Doutorado/ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

1. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, Muerhoff S, Pletnev A, Rico-Hesse R, Smith DB, Staplenon JT. Family *Flaviviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1st ed. London, UK: Elsevier Academic Press, p. 2011;1003-1020.
2. Bauermann FV, Flores EF, Ridpath JF. Antigenic relationships between bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: Possible impacts on diagnosis and control. *J Vet Diagn Invest* 2012;24:253-261.
3. ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses. *Flaviviridae*. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Accessed 4 June, 2018.
4. Smith DB, Meyers G, Bukh J, Gould EA, Monath T, Scott Muerhoff A, Pletnev A, Rico-Hesse R, Stapleton JT, Simmonds P, Becher P. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *J Gen Virol* 2017;98:2106-2112.
5. Tautz N, Tews BA, Meyers G. The molecular biology of Pestiviruses. In: Maramorosch K, Shatkin A, Murphy F. Advances in Virus Research. 1st ed. London, UK: Elsevier Academic Press, 2015;47-160.

6. Becher P, Avalos Ramirez R, Orlich M, Cedillo Rosales S, König M, Schweizer M, Stalder H, Schirrmeier H, Thiel HJ. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virol* 2003;311:96–104.
7. Bianchi E, Martins M, Weiblen R, Flores EF. Genetic and antigenic profile of bovine viral diarrhea virus isolates from Rio Grande do Sul state (2000-2010). *Pesq Vet Bras* 2011;31:649–655.
8. Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virol* 1994;205:66-74.
9. Ridpath JF, Bolin SR. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probes* 1998;12:101-106.
10. Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V. Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol* 2001;146:99-115.
11. Yesilbag K, Alpay G, Becher P. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses* 2017;9:128-147.
12. Houe H. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 2003;31:137-143.
13. Schirrmeier H, Strebello G, Depner K, Hoffmann B, Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species, *J Gen Virol* 2004;85:3647–3652.
14. Cortez A, Heinemann MB, De Castro AMMG, Soares RM, Pinto AMV, Alfieri AA, Flores EF, Leite RC, Richtzenhain LJ. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pesq Vet Bras* 2006;26:211–216.
15. Weber MN, Mósena AC, Simões SV, Almeida LL, Pessoa CR, Budaszewski RF, Silva TR, Ridpath JF, Riet-Correa F, Driemeier D, Canal CW. Clinical presentation resembling mucosal

- disease associated with ‘HoBi’-like pestivirus in a field outbreak. *Transboud Emerg Dis* 2016;63:92-100.
16. Decaro N, Lucente MS, Mari V, Cirone F, Cordioli P, Camero M, Sciarretta R, Losurdo M, Lorusso E, Buonavoglia C. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1549-1552.
17. Decaro N, Losurdo M, Lucente MS, Sciarretta R, Mari V, Larocca V, Elia G, Cavalieri N, Martella V, Fasanella A, Buonavoglia C. Persistent infection caused by HoBi-like pestivirus. *J Clin Microbiol* 2013;51:1241-1243.
18. Decaro N, Lavane G, Lucente MS, Mari V, Varelo K, Losurdo M, Larocca V, Bozzetta E, Cavalieri N, Martella V, Buonavoglia C. Mucosal disease-like syndrome in a calf persistently infected by HoBi-like pestivirus. *J Clin Microbiol* 2014;52:2946-2954.
19. Haider N, Rahman MS, Khan SU, Mikolon A, Gurley ES, Osmani MG, Shanta IS, Paul SK, Macfarlane-Berry L, Islam A, Desmond J, Epstein JH, Daszak P, Azim T, Luby SP, Zeidner N, Rahman MZ. Identification and epidemiology of a rare HoBi-like pestivirus strain in Bangladesh. *Transbound Emerg Dis* 2014;61:193-198.
20. Liu L, Xia H, Wahlberg N, Belák S, Baule C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virol* 2009;385:351-357.
21. Mishra N, Rajukumar K, Pateriya A, Kumar M, Dubey P, Behera SP, Verma A, Bhardwaj P, Kulkarni DD, Vijaykrishna D, Reddy ND. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet Microbiol* 2014;174:239–246.
22. Canal CW, Strasser M, Hertig C, Masuda A, Peterhans E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet Microbiol* 1998;63:85–97.

23. Lunardi, M, Headley SA, Lisbôa JAN, Amude AN, Alfieri AA. Outbreak of acute bovine viral diarrhea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. *Res Vet Sci* 2008;85:599–604.
24. Monteiro FL, Cargnelutti JF, Braunig P, Folgueras-Flatschart AV, Santos NC, Pituco EM, Weiblen R, Flores EF. Detection and genetic identification of pestiviruses in Brazilian lots of fetal bovine serum collected from 2006 to 2014. *Pesq Vet Bras* 2018;38:387-392.
25. Mósena ACS, Cibulski SP, Weber MN, Silveira S, Silva MS, Mayer FQ, Roehe PM, Canal CW. Genomic and antigenic relationships between two 'HoBi'-like strains and other members of the Pestivirus genus. *Arch Virol* 2017;162:3025-3034.
26. Otonel RA, Alfieri AF, Dezengrini S, Lunardi M, Headley SA, Alfieri AA. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. *Trop Anim Health Prod* 2014;46:87-92.
27. Silveira S, Weber MN; Silva S, Streck AF, Flores EF, Weiblen R, Canal CW. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transbound Emerg Dis* 2017;64:613–623.
28. Weber MN, Silveira S, Machado G, Groff FHS, Mósena ACS, Budaszewski RF, Dupont PM, Corbellini LG, Canal CW. High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Res* 2014;191:117–124.
29. Bianchi MV, Konradt G, Souza SO, Bassuino DM, Silveira S, Mósena AC, Canal CW, Pavarini SP, Driemeier D. Natural outbreak of BVDV-1d-induced mucosal disease lacking intestinal lesions. *Vet Pathol* 2017;254:242-248.
30. Cortez A, Araujo JP, Flores EF, Ribeiro MG, Megid H, Paes AC, Oliveira JP, Ullmann LS, Malossi SD, Heinemann MB. Complete genome sequence of a HoBi-like virus isolated from a Nelore cow with gastroenteric disease in the state of São Paulo, Brazil. *Genome Announc* 2017;5:e00767-17.

31. Silveira S, Baumbach LF, Weber MN, Mósena ACS, Silva MS, Cibulski SP, Borba MR, Maia RD, Coimbra VCS, Moraes GM, Ridpath JF, Canal CW. HoBi-like is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil. *Transbound Emerg Dis* 2017;65:113-120.
32. Staden R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* 1996;5:233-241.
33. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-2729.
34. Mósena AC, Weber MN, Cibulski SP, Silva MS, Mayer FQ, Canal CW. Genomic characterization of a bovine viral diarrhea virus subtype 1i in Brazil. *Arch Virol* 2017;162:1119-1123.
35. Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel FSF, Gil LHGV. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res* 2002;87:51–60.
36. Gil LHVG, Flores EF, Botton SA, Weiblen R, Kreutz LC, Tobias FL, Garcez DC. Antigenic and molecular characterization of newly identified Brazilian isolates of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type II. In: IX Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço. IX Encontro Nacional de Virologia 1998;43.
37. Flores EF, Gil LHGV, Botton SA, Weiblen R. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet Microbiol* 2000;77:175-183.
38. Botton SA, Silva AM, Brum MC, Weiblen R, Flores EF. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:1429-38.
40. Dias RK, Cargnelutti JF, Weber MN, Canal CW, Bauermann FV, Ridpath JF, Weiblen R, Flores, EF. Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. *Vet Microbiol* 2017;203:221-228.

Table 1. Primers used for 5'UTR amplification, sequencing and phylogenetic analysis of pestiviruses from beef calves in Southern Brazil.

Primer	Position (nt)	Target (bp)	Sequence (5'-3')	Identified subgenotypes (n)
HCV90- 368 ⁹	107-389 ^a	283	F-CATGCCCATAGTAGGAC	BVDV-1a (28)
			R-CCATGTGCCATGTACAG	BVDV-1b (10)
BVDV- 2#3 ²⁴	136 - 358 ^b	223	F-GCGGTAGCAGTGAGTTATTGG R-TTTACTAGCGGGATAGCAGGTC	BVDV-2b (31)
N2-R5 ²	186-335 ^c	150	F-TCGACGCATCAAGGAATGCCT R-TAGCAGGTCTCTGCAACACCCTAT	HoBiPeV subgroup <i>a</i> (21)

^aPosition based on BVDV-1 sequence NADL strain (M31182)

^bPosition based on BVDV-2 sequence USMARC-60765 strain (KT832818)

^cPosition based on HoBiPeV sequence SV478/07 (KY767958)

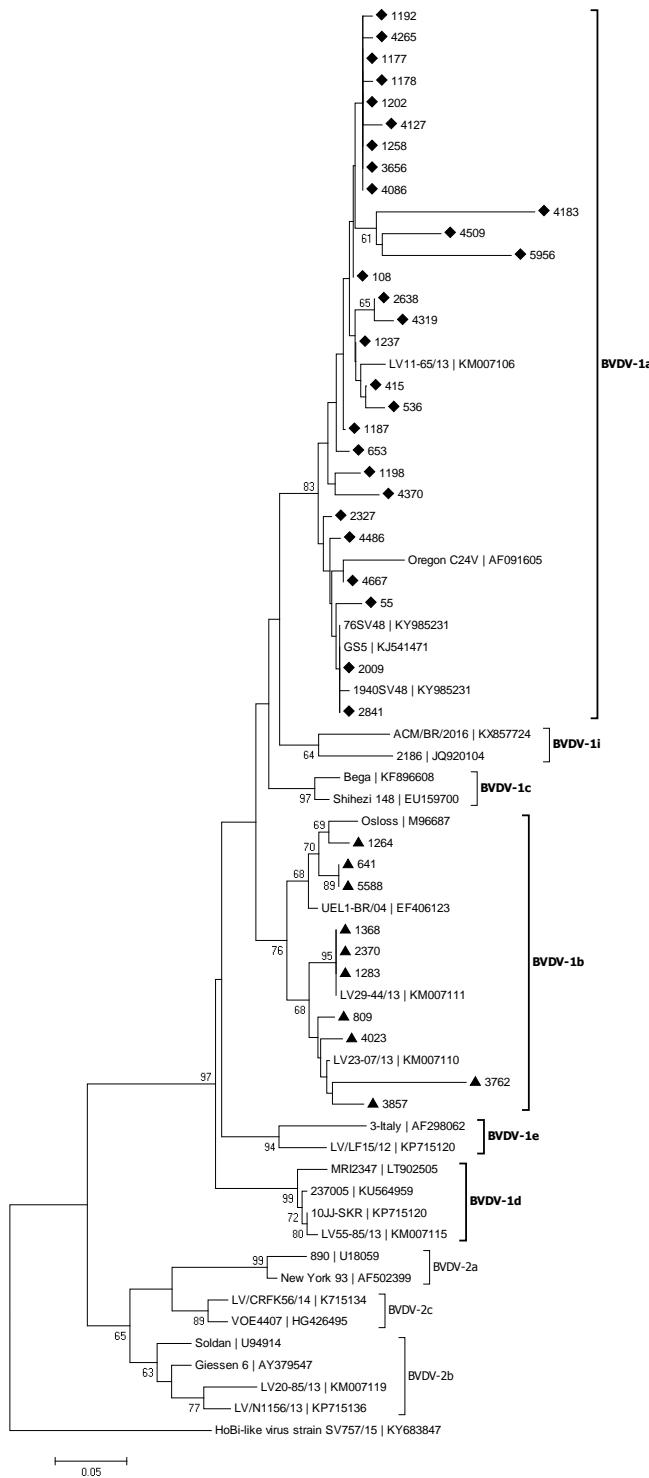


Figure 1. Phylogenetic tree of 5'UTR sequences amplified of pestivirus detected using primer 90-368. Sequences were analyzed by Neighbor-joining method and the Kimura 2-parameter model. Bootstrap (1000 replicates) values >50 are indicated at the internal nodes. Brazilian isolates detected in this study are highlighted with symbols (♦ and ▲). The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs and the scale bar represents the percentage of nucleotide differences in the rectangular tree.

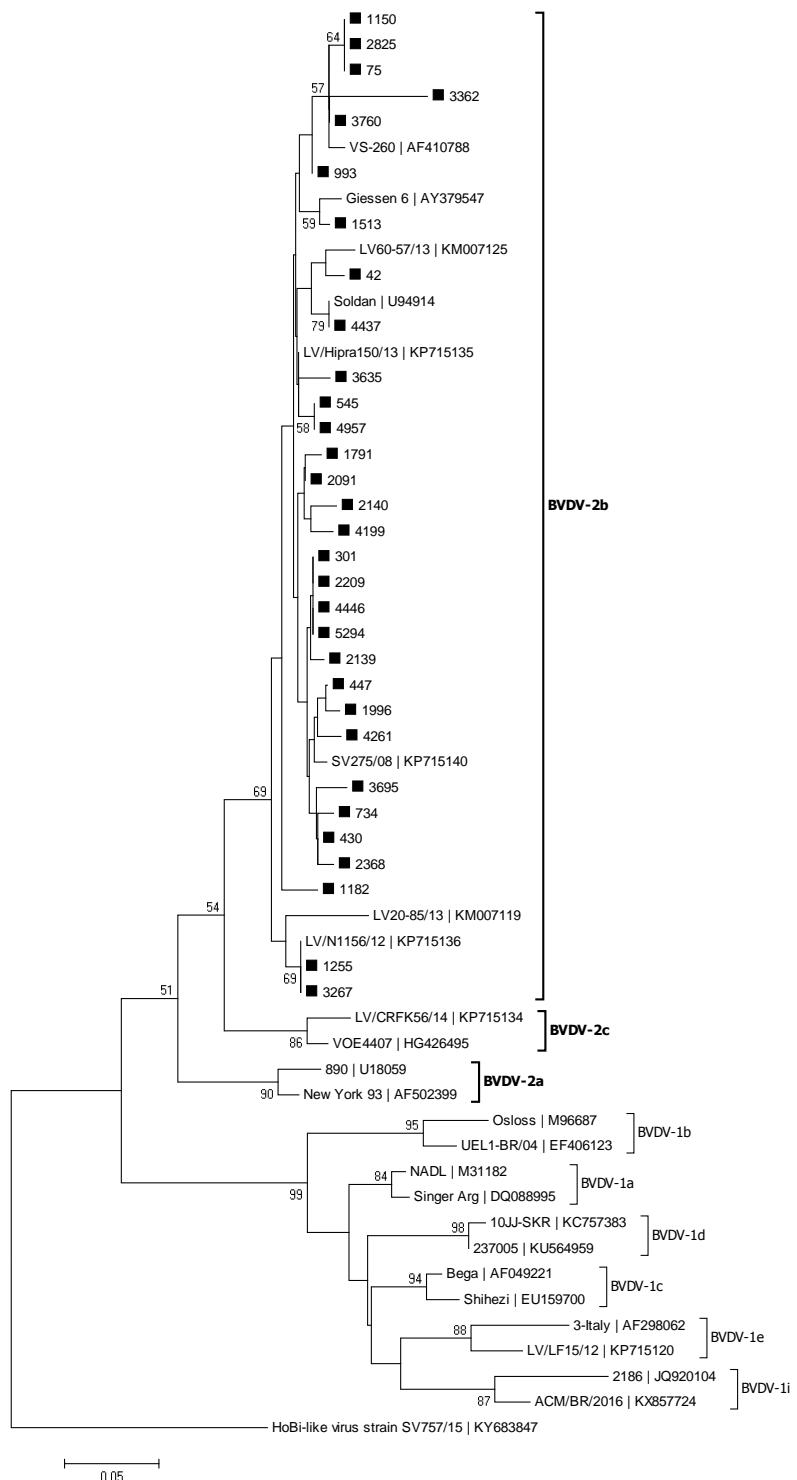


Figure 2. Phylogenetic tree of 5'UTR sequences amplified of pestivirus detected using primers 90-368 and BVDV-2#3. Sequences were analyzed by neighbor-joining method and the Kimura 2-parameter model. Bootstrap (1000 replicates) values >50 are indicated at the internal nodes. Brazilian isolates detected in this study are highlighted with symbols (■). The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs and the scale bar represents the percentage of nucleotide differences in the rectangular tree.

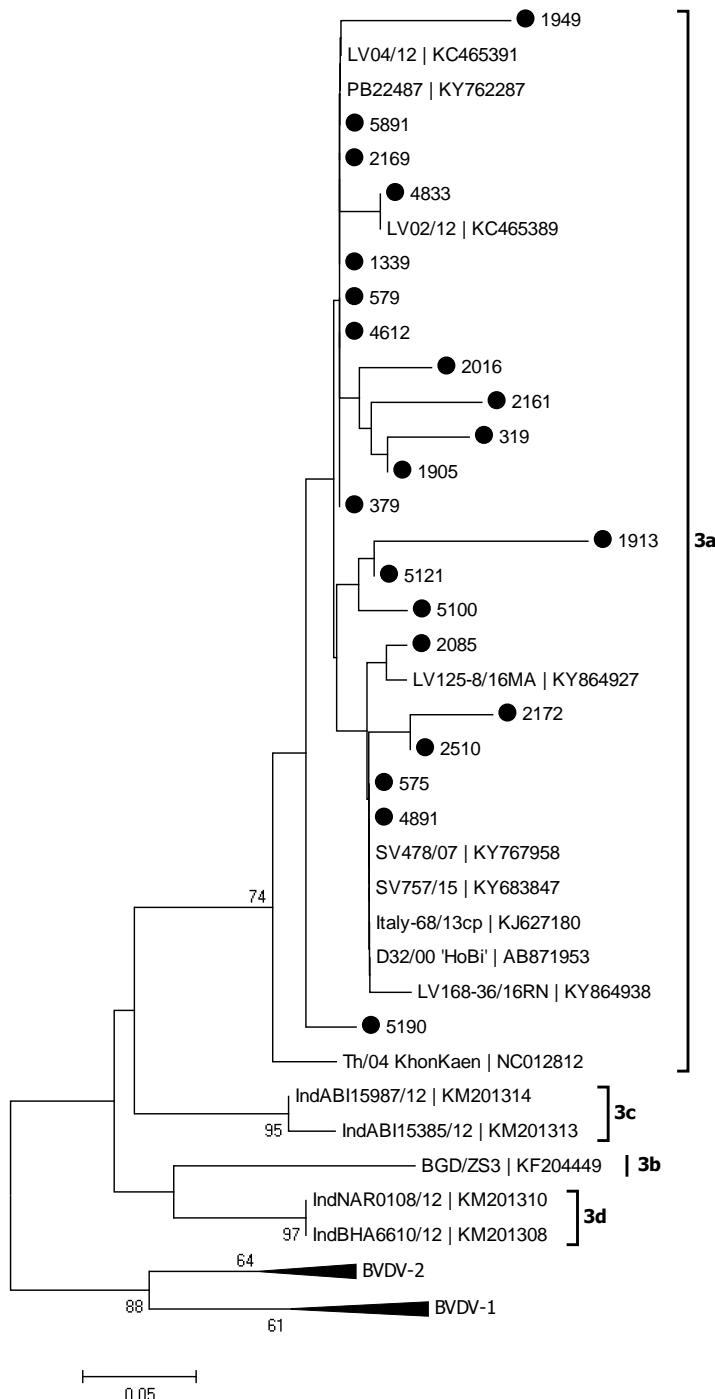


Figure 3. Phylogenetic tree of 5'UTR sequences amplified of pestivirus detected using primer N2-R5. Sequences were analyzed by neighbor-joining method and the Kimura 2-parameter model. Bootstrap (1000 replicates) values >50 are indicated at the internal nodes. Brazilian isolates detected in this study are highlighted with symbols (●). The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs and the scale bar represents the percentage of nucleotide differences in the rectangular tree.

5 ARTIGO 3

Detection of bovine pestiviruses in sera of beef calves by a RT-PCR based on a newly designed set of pan-bovine pestivirus primers

Francielle Liz Monteiro,^{1,2} Juliana F. Cargnelutti,¹ Bruno Martins,^{1,2} Jessica G. Noll,^{1,2} Rudi Weiblen,^{1,2} Eduardo F. Flores^{1,2*}

(Artigo aceito no periódico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, setembro de 2018)

¹ Setor de Virologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 63A, Parque de Exposições, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

* Corresponding author: eduardofurtadoflores@gmail.com.

Abstract. The pestiviruses bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1), BVDV-2, and HoBi-like pestivirus (HoBiPeV) are important pathogens of cattle, and a number of RT-PCR-based assays have been developed for their detection in clinical specimens. We evaluated a newly designed set of pan-bovine pestivirus primers (BP189-389) in a gel-based RT-PCR screening test for pestiviruses in the sera of beef calves destined for export from southern Brazil. Serum samples positive for BVDV antigens by an antigen ELISA ($n = 135$) were submitted to RT-PCR assays using different sets of primers, followed by nucleotide sequencing of the amplicons. RT-PCR with pestivirus primers 324-326 detected 110 positive samples BVDV-1 ($n = 62$), BVDV-2 ($n = 38$), and HoBiPeV ($n = 10$). A PCR using primers HCV90-368 detected 97 positive samples (64 BVDV-1; 33 BVDV-2). An additional RT-PCR round using BVDV-2-specific primers (2F-2R), detected 45 positive samples (including 38 detected by primers 324-326 and 33 by HCV90-368); whereas a RT-PCR using HoBiPeV-specific primers (N2-R5) detected 26 positive samples (including 10 detected by primers 324-326). The assay using the primers BP189-389 detected all 135 ELISA-positive samples, including the 26 HoBiPeV detected by primers N2-R5. These results demonstrated that primers BP189-389 compare favorably against other primer sets in the detection of bovine pestiviruses, especially HoBiPeV. This conventional PCR may be useful for efficient detection of pestiviruses in bovine sera and other specimens as well, especially in laboratories without real-time PCR equipment.

Key words: Bovine; detection; diagnostic; pestivirus; serum.

Bovine pestiviruses comprise 2 well-recognized viral species, i.e. species *Bovine viral diarrhea virus 1* (BVDV-1; *Pestivirus A*) and 2 (BVDV-2; *Pestivirus B*), and species *Pestivirus H* (*HoBiPeV, HoBi-like pestivirus*).¹⁷ Pestiviruses comprise a genus within the family *Flaviviridae* and are small (45nm), enveloped, single-stranded, positive-sense RNA viruses. The pestivirus genome is 12.3kb in length and contains a long open-reading frame (ORF) flanked by 2 untranslated regions (5' and 3' UTRs). The ORF encodes a long polyprotein that is cleaved by viral and host proteases in 11-12 mature viral polypeptides.¹⁸ Pestivirus species are determined by criteria including comparisons of the complete coding nucleotide (nt) sequences and cross-neutralization titers, in addition to the host of origin. Nucleotide sequencing and comparison of the highly conserved 5'UTR, N^{pro}, and E2 has served for pestivirus phylogeny and classification into subtypes.^{3,9,14,19}

BVDV-1 and 2 are among the most important pathogens of cattle, have a global distribution, and are associated with a variety of clinical manifestations in cattle.⁸ HoBiPeV were initially identified as contaminants of fetal bovine serum (FBS) of Brazilian origin¹⁶ and subsequently isolated in South America,²⁰ Italy,⁴ and Asia¹⁰ from FBS and from clinical conditions similar to those classically attributed to BVDV-1 and BVDV-2. HoBiPeV isolates are genetically and antigenically related to BVDV-1 and BVDV-2, yet existing genetic and antigenic differences between these groups of viruses may influence diagnostic and control strategies.¹

Reliable tests for pestivirus detection are pivotal for BVDV control, in addition to biosecurity measures, monitoring for BVDV exposure and, vaccination in some cases. Molecular detection through reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and its variations has been widely used for pestivirus detection. Most RT-PCR assays for pestivirus detection target the highly conserved 5' UTR.^{5,7,11-13,19}

We employed a newly designed set of primers (BP189-389) to screen the sera of beef calves for pestiviruses in a gel-based RT-PCR. Serum samples positive for BVDV antigens in an antigen-ELISA ($n = 135$) were submitted to RT-PCR using different sets of primers targeting the 5'UTR of the viral genome (Table 1).

BVDV-1 strain Singer, BVDV-2 strain 890, and Brazilian HoBiPeV strain SV757/15 were used as controls in RT-PCR and sensitivity tests. Brazilian HoBiPeV isolates have been described elsewhere.⁶ Viruses were amplified and quantified in pestivirus-free Madin Darby bovine kidney cells (MDBK, ATCC – CCL22) cultured in MEM (minimum essential medium, Gibco-BRL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), supplemented with 10% equine serum

and penicillin, streptomycin, and amphotericin B. Virus stocks were titrated by limiting dilution and titers were expressed as \log_{10} median tissue culture infective dose (TCID₅₀).

Aliquots of 150 μ L of ELISA-positive sera were submitted to RNA extraction (TRIzol Reagent, Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. After RNA extraction, complementary DNA (cDNA) was synthesized (SuperScript III Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific). Briefly, total RNA (~ 500 ng) was mixed with 50 ng of random primers and annealing buffer followed by incubation at 65°C for 5 min, and immediately placed on ice for 1 min. Then, 10 μ L of 2X First-Strand Reaction Mix and 2 μ L of SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix were added and incubated for 5 min at 25°C, followed by incubation at 50°C for 50 min and 85°C for 5 min. The synthesized cDNAs were submitted sequentially to 5 PCR assays, using different sets of primers targeting the 5'UTR (Table 1), with the Taq DNA polymerase, recombinant (Thermo Fisher Scientific). PCR conditions for primers 324-326¹⁹ and HCV90-368¹⁵ were: 94°C - 5min, 35 cycles of 94°C, 48°C (HCV90-368) or 50°C (324-326) and 72°C, 30s each, final extension at 72°C-10min. PCR conditions for BVDV-2-specific primer (2F-2R)¹³ were: 94°C-5 min, 35 cycles of 94°C, 58°C and 72°C, 45s each, final extension at 72°C-7min. PCR conditions for primers specific for HoBiPeV N2-R5² were: 94°C-3 min, 35 cycles of 94°C, 55°C and 72°C, 30s each, final extension at 72°C-5min. Virus identification was determined by nucleotide sequencing of the amplicons and phylogenetic analysis as described previously.¹³

The new primer set (PB189-389) was constructed based on the sequences of BVDV-1 ($n = 90$), BVDV-2 ($n = 60$), and HoBiPeV ($n = 30$) deposited in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Alignment was performed on BioEdit Sequence Alignment Editor Software suite v.7.2.6.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The obtained primers set were analyzed in primer-BLAST tool to specificity parameters (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). PCR conditions were: 94°C-5 min, 35 cycles of 94°C, 47°C and 72°C extension for 30s each, final extension of 7min-72°C.

All PCR reactions were performed in a 25 μ L volume, using 2 μ L of cDNA template (100-200 ng), 0.5 μ M of each primer, 3 mM MgCl₂, 0.8 mM of dNTPs, 1× reaction buffer, and 1U of Taq DNA polymerase. PCR products were resolved in a 1.5% agarose gel stained (Gel Red, Biotium, Fremont, CA) and visualized under UV light after electrophoresis (60 V, 40 min). Total RNA extracted from MDBK cells infected with BVDV-1 Singer, BVDV-2 890, HoBiPeV SV757/15 were used as controls.

The sensitivity of the assays was investigated by performing PCR in cDNA synthesized from RNA extracted from 150 µL of 10-fold dilutions of supernatants of MDBK cells infected with control viruses.

The range of HoBiPeV detection by primers BP189-389 was further investigated by submitting to RT-PCR 3 FBS samples contaminated with HoBiPeV,¹³ and the supernatant of MDBK cells infected with each of 8 Brazilian isolates.⁶

The design and optimization of primers BP189-389 for annealing to the highest number of available sequences required the introduction of a degenerated nucleotide in the forward primer (nucleotide 200) given the presence of a guanine in BVDV-1 and an adenine in BVDV-2 and HoBiPeV genomes. Primer BP389 (reverse) is very close to primer HCV-389, being shifted by a single nucleotide. Differentiation of the pestivirus species by the amplicon size was not possible using these primers. Unfortunately, these oligonucleotides would not anneal to the genome of pestiviruses of other species (e.g. Bungowannah virus, pronghorn virus, giraffe pestivirus, etc.), precluding their used as panpestivirus reagents. On the other hand, they would anneal to genomes of the 3 bovine pestivirus species and, thus, may be designated pan-bovine (PB) pestivirus primers.

Primers BP189-389 had a broader range of detection – including 26 HoBiPeV detected by primers N2-R5 - and higher sensitivity (even for BVDV-1 and BVDV-2) than the PCRs based on 324-326 and HCV90-368 primers (Table 2). These results confirm previous observations that pestivirus primers (HCV90-368 and 324-326) may fail to detect HoBiPeV,² mainly when their genomes are present in low amounts. The specificity of primers N2-R5 for HoBiPeV² and primers 2F-2R for BVDV-2¹³ was also confirmed.

PCR based on primers BP189-389 was also able to detect HoBiPeV in batches of FBS and in culture supernatants of MDBK cells inoculated with each of 8 Brazilian HoBiPeV (Table 3), confirming the spectrum of reactivity/detection of these primers and their ability to detect HoBiPeV in different clinical specimens.

Primers HCV90-368 did not amplify any of the 26 HoBiPeV detected with pan-bovine pestivirus primers (BP189-389) and by primers N2-R5, whereas primers 324-326 detected 10 HoBiPeV. In a previous study, primers 324-326 were able to detect some HoBiPeV genomes in a gel-based PCR,¹² similar to the findings of our study. On the other hand, in a screening of North American lots of FBS for pestiviruses, only BVDV sequences were amplified by primers 324-326 and HCV90-368, even in the presence of large amounts of HoBiPeV genomes.² In that study, HoBiPeV sequences were detected only using the specific primers N2-R5.² Molecular screening of Brazilian lots of FBS for pestiviruses using RT-PCR with different

primers/protocols reinforced these findings,¹³ e.g. HoBiPeV detection was only achieved by a RT-PCR using primers N2-R5. Primers (2F-2R) have also been shown to specifically amplify BVDV-2 with higher sensitivity than other previous described primers, even in mixtures containing a large excess of BVDV-1 genomes¹³.

Concerns about the efficacy of available BVDV tests to detect HoBiPeV viruses became especially relevant considering the risk of introduction of these novel pestiviruses into free areas.^{1,2} Given that the detection of HoBiPeV in different locations seems to be an ongoing process and their degree of genetic diversity is poorly known, it is expected that continuous surveillance and reformulation of molecular tools may be required for updated and efficient detection of these viruses. In this sense, our results are promising towards the use of primers BP189-389 in RT-PCR for pestivirus detection – including HoBiPeV- in bovine samples - because they were able to detect an equivalent number of samples detected by a combination of 3 PCRs, including sensitive detection of HoBiPeV. A conventional RT-PCR based on these primers may be especially useful for laboratories in which real-time PCR equipment is not available.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

FLM, RW and EFF are recipients of CNPq fellowships (Brazilian Council for Research). JFC is recipient of PNPD/CAPES fellowship (Programa Nacional de Pós-Doutorado/ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

1. Bauermann FV, et al. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses J Vet Diagn Invest 2013;25:6-15.
2. Bauermann FV, et al. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. J Vet Diagn Invest 2014;26:10-17.
3. Becher P, et al. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. Virology 2003;311:96-104.
4. Decaro N, et al. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves. Emerg Infect Dis 2011;17:1549-1552.

5. Decaro N, et al. A nested PCR approach for unambiguous typing of pestiviruses infecting cattle. *Mol Cell Probes* 2012;26:42-46.
6. Dias RK, et al. Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. *Vet Microbiol* 2017;203:221-228.
7. Gaede W, et al. Detection and species-specific differentiation of pestiviruses using real-time RT-PCR. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2005;118:113-120.
8. Houe H. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 2003;31:137-143.
9. Liu L, et al. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology* 2009a;385:351-357.
10. Liu L, et al. Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen, *Vet Microbiol*. 2009b; 138: 62–68.
11. Losurdo M, et al. Development of a TaqMan assay for sensitive detection of all pestiviruses infecting cattle, including the emerging Hobi-like strains. *J Virol Methods* 2015;224:77-82.
12. Mari V, et al. Multiplex real-time RT-PCR assay for bovine viral diarrhea virus type 1, type 2 and Hobi-like pestivirus. *J Virol Methods* 2016;229:1-7.
13. Monteiro FL, et al. Detection and genetic identification of pestiviruses in Brazilian lots of fetal bovine serum collected from 2006 to 2014. *Pesq Vet Bras* 2018;38:387-392.
14. Ridpath JF, et al. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* 1994;205:66-74.
15. Ridpath JF, et al. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probes* 1998;12:101-106.
16. Schirrmeier H, et al. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J Gen Virol* 2004;85:3647-3652.
17. Smith DB, et al. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus , family Flaviviridae. *J Gen Virol* 2017;98:2106–2112.
18. Tautz N, et al. The molecular biology of pestiviruses. In: Maramorosch K, et al., *Advances in Virus Research*. 1st ed. London, UK: Elsevier Academic Press, 2015:47-160.
19. Vilcek S, et al. Pestiviruses isolated from cattle, pigs and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 1994;136:309-323.
20. Weber MN, et al. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with ‘HobiPeV’- pestivirus in a field outbreak. *Transboundary Emerg Dis* 2016;63:92-100.

Table 1. Primer data and sensitivity of the 5'UTR-based RT-PCRs used for detection of pestiviruses in sera of calves.

Primer	Position (nt)	Target (bp)	Sequence (5'-3')	Sensitivity ^d		
				BVDV-1	BVDV-2	HoBiPeV
324-326	108-395 ^a	288	ATGCCW ^{A,T} TAGTAGGACTAGCA TCAACTCCATGTGCCATGTAC	10	10	>10 ³
HCV90-368	107-389 ^a	283	CATGCCCATAGTAGGAC CCATGTGCCATGTACAG	10	10 ²	10 ³
BP189-389	190-390 ^a	201	AGTCGTCAR ^{A,G} TGGTTCGAC TCCATGTGCCATGTACA	1	1	1
BVDV-2 2F-2R	143 - 365 ^b	223	GCGGTAGCAGTGAGTTATTGG TTTACTAGCGGGATAGCAGGTC	- ^e	10	- ^e
N2-R5	183-332 ^c	150	TCGACGCATCAAGGAATGCCT TAGCAGGTCTCTGCAACACCCTAT	- ^e	- ^e	1

^a Position based on BVDV-1 sequence: NADL (M31182.1).

^b Position based on BVDV-2 sequence: 890 (U18059).

^c Position based on HoBiPeV sequence: D32/00_HoBi (AB871953.1).

^d Sensitivity tests were performed using Singer (BVDV-1), 890 (BVDV-2) and SV757/15 (HoBiPeV) strains. The values are presented in TCID₅₀/reaction.

^e Not detected until 10⁴ TCID₅₀/reaction.

Table 2. Pestivirus detection in sera of beef calves by RT-PCRs using different sets of pestivirus primers.

PCR Primers	Pestivirus			Total
	BVDV-1	BVDV-2	HoBiPeV	
324-326	62 (56.4%)	38 (34.5%)	10 (9.1%)	110
HCV90-368	64 (65.9%)	33 (34.1%)	0	97
BP189-389	64 (47.4%)	45 (33.3%)	26 (19.2%)	135
BVDV-2 2F-2R	0	45 (100%)	0	45
N2-R5	0	0	26 (100%)	26

Table 3. Detection of HoBiPeV in various clinical specimens by RT-PCRs using different sets of primers.

Sample	RT-PCR based on primers			
	324-326	HCV90-368	BP189-389	N2-R5
LV01/12 ^a	(-) ^c	+	+	+
LV02/12 ^a	+	+	+	+
LV03/12 ^a	(-) ^c	+	+	+
LV04/12 ^a	+	+	+	+
LV/PB22487/12 ^a	+	+	+	+
LPV_WR_BR11 ^a	+	+	+	+
SV478/07 ^a	+	+	+	+
SV757/15 ^a	(-) ^c	+	+	+
FBS SV48/15 60 ^b	-	-	+	+
FBS SV48/15 301 ^b	-	-	+	+
FBS SV1003/15 90 ^b	-	-	+	+

^aCulture supernatants of MDBK cell inoculated with Brazilian HoBiPeV isolates, containing ~ 10^{2-3} TCID₅₀/reaction.

^bBatches of FBS composed by a pool of sera of 80-250 bovine fetuses collected in slaughterhouses in Central Brazil.

^c Only detected when the PCR templates contained cDNA synthesized out of supernatants containing $\geq 10^3$ TCID₅₀/reaction.

6 DISCUSSÃO

Nesta tese são apresentados os resultados de três estudos, sob a forma de artigos científicos. Dois deles são referentes à detecção e identificação genética de pestivírus de bovinos, sendo o primeiro em lotes de SFB de origem brasileira e o segundo, em amostras de soro de bovinos do estado do RS destinados à exportação; e um artigo descreve a construção e utilização de um par de *primers* para a detecção das três espécies de pestivírus (BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV) por RT-PCR.

O artigo 1 apresenta a detecção e identificação genética de setenta e três lotes de SFB de origem brasileira, produzidos entre os anos de 2006 e 2014. Inicialmente, foi utilizada para a amplificação da 5'UTR, o primer 90 – 368 (RIDPATH & BOLIN, 1998), em que foram detectadas apenas amostras de BVDV-1 e uma amostra de HoBiPeV. Tendo em vista que o BVDV-2 é frequentemente relatado no Brasil (CANAL et al., 1998; GIL et al., 1998; FLORES et al., 2002), e mais de um vírus poderia estar presente nas amostras, foi construído um primer específico para detecção desta espécie e testado em todas as amostras (BVDV-2#3). Além disso, como o primer panpestivírus 90 – 368 foi construído antes da primeira identificação do vírus HoBiPeV, optou-se por utilizar um primer também específico para este vírus em todas as amostras (N2 - R5).

Após o sequenciamento e análise filogenética, trinta e nove lotes (53,4%) foram positivos para RNA de pestivírus. Trinta e quatro lotes (46,6%) continham RNA do BVDV-1, sendo 23 -1a, 8 -1b e três -1d. Seis lotes (8,2%) continham BVDV-2, sendo dois -2a, três -2b e um de subgenótipo indeterminado. Quatro lotes de SFB (5,5%) estavam contaminados com o vírus HoBiPeV e cinco lotes (6,8%) continham mais de um pestivírus. Ainda, uma amostra foi positiva no ICC. Assim, a alta frequência de contaminação do SFB com RNA de pestivírus reforça a necessidade de diretrizes sistemáticas atualizadas para o monitoramento deste produto, com a finalidade de reduzir a contaminação de produtos biológicos e a introdução de agentes contaminantes em áreas livres. Além disso, demonstra que podem ocorrer falhas na detecção de RNA viral em amostras que apresentem mais de um vírus (*pools*) e que, existe a possibilidade de primers panpestivírus detectarem com menor sensibilidade amostras de BVDV-2 e HoBiPeV.

O artigo 2 relata a detecção e identificação de 135 pestivírus após RT-PCR utilizando os três pares de primers: 90 – 368 (RIDPATH & BOLIN, 1998), BVDV-2#3 e N2 - R5 (BAUERMANN et al., 2014). Inicialmente, foram testadas 15.684 amostras de soro de bovinos de corte do estado do RS destinados à exportação no ano de 2017, pelo método de ELISA de

captura de antígeno. Parte das amostras positivas no ensaio de ELISA foram testadas por RT-PCR, das quais 135 foram positivas. Após o sequenciamento e análise filogenética, 90 diferentes vírus foram identificados, sendo 38 BVDV-1 (42,2%), 31 BVDV-2 (34,4%) e 21 HoBiPeV (23,4%). Das amostras de BVDV-1, apenas os subgenótipos -1a ($n = 28$, 31,1%) e -1b ($n = 10$, 11,1%) foram identificados. Todos os 30 isolados de BVDV-2 pertenciam ao subgenótipo -2b e os 21 HoBiPeV foram agrupados no subgrupo 3a. Estes resultados demonstram a presença de infecção persistente/transitória pelo BVDV-1a, 1b, 2b e 3a em bovinos de corte do estado do RS, o que fornece um perfil genético aproximado de pestivírus circulantes em uma população de bovinos definida geograficamente, em um estado tradicional de pecuária bovina brasileira. Além disso, reforçou a hipótese que *primers* panpestivírus podem detectar com baixa sensibilidade amostras de BVDV-2, uma vez que apenas parte das amostras para este vírus foram detectadas com o primer 90 – 368; e todas as amostras de HoBiPeV foram detectadas apenas com o primer N2 – R5.

O artigo 3 descreve a utilização de um novo par de *primer* (BP189-389), construído com base no alinhamento de amostras de BVDV-1, -2 e HoBiPeV depositadas no GenBank. Foram utilizadas 135 amostras de soro de bovinos, e os resultados foram comparados com dois *primers* panpestivírus frequentemente descritos na literatura, 90 – 368 (RIDPATH & BOLIN, 1998) e 324 – 326 (VILCEK et al., 1994) e dois *primers* específicos, um deles para BVDV-2 (#3) e um para HoBiPeV, o N2 – R5 (BAUERMANN et al., 2014). A RT-PCR com o *primer* 324 - 326 detectou 110 amostras positivas, sendo 62 para BVDV-1, 38 para BVDV-2 e 10 para HoBiPeV; e o *primer* 90 - 368 detectou 97 amostras positivas (64 BVDV-1; 33 BVDV-2). O primer específico para BVDV-2 detectou 45 amostras positivas (incluindo 38 detectadas pelo 324 - 326 e 33 pelo 90 - 368); enquanto que a RT-PCR utilizando o primer específico para HoBiPeV detectou 26 amostras positivas (incluindo 10 detectadas com o 324 - 326).

A RT-PCR utilizando o *primer* BP189-389 detectou todas as 135 amostras positivas no ELISA, incluindo os 26 HoBiPeV detectados pelo N2-R5, além oito isolados deste vírus e três amostras de SFB. Estes resultados demonstram que o BP189-389 apresentou melhor sensibilidade quando comparado aos primers panpestivírus na detecção de BVDV-2 e, principalmente de HoBiPeV, e pode ser uma alternativa no diagnóstico de pestivírus de bovinos. Esta PCR convencional pode ser útil para a detecção eficiente de pestivírus em amostras de soro bovino e outros espécimes, especialmente em laboratórios sem equipamentos de PCR em tempo real. Em resumo, o presente trabalho apresentou contribuições para o diagnóstico de pestivírus bovino e acrescentou informações acerca do perfil genético dos pestivírus circulantes em bovinos no RS.

REFERÊNCIAS

- AGAPOV, E. V.; MURRAY, C. L.; FROLOV, I.; QU, L.; MYERS, T. M.; RICE, C. M. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus. **Journal of Virology**, v. 78, p. 2414 – 2425, 2004.
- ALANSARI, H.; BROCK, K. V. & POTGIETER, L. N. D. Single and double polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhea virus in tissue culture and sera. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 148 – 153, 1993.
- ANZILIERO, D.; MARTINS, M.; WEISS, M.; MONTEIRO, F. L.; ATAIDE, C. F.; WEIBLEN, R. & FLORES, E. F. Serological response to bovine herpesviruses 1 and 5 bovine viral diarrhea virus induced by commercial vaccines. **Ciência Rural**, v. 45, p. 58 – 63, 2015.
- ASFOR, A. S.; WAKELEY, P. R.; DREW, T. W.; PATON, D. J. Recombinant pestivirus E2 glycoproteins prevent viral attachment to permissive and non permissive cells with different efficiency. **Virus Research**, v. 30, p. 147 – 157, 2014.
- BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America**, v. 11, p. 425 – 446, 1995.
- BAUERMANN, F. V.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R. & FLORES, E. F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, p. 6 – 15, 2013.
- BECHER, P.; AVALOS-RAMIREZ, R.; ORLICH, M.; CEDILLO ROSALES, S.; KONIG, M.; SCHWEIZER, M.; STALDER, H.; SCHIRRMEIER, H. & THIEL, H. J. Genetic and antigenic characterization of novel *Pestivirus* genotypes: implications for classification. **Virology**, v. 311, p. 96 – 104, 2003.
- BIANCHI, E.; MARTINS, M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Genetic and antigenic profile of bovine viral diarrhea virus isolates from Rio Grande do Sul state (2000-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 649 – 655, 2011.
- BIANCHI, M. V.; KONRADT, G.; DE SOUZA, S. O.; BASSUINO, D. M.; SILVEIRA, S.; MÓSENA, A. C.; CANAL, C. W.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D. Natural outbreak of BVDV-1d-induced mucosal disease lacking intestinal lesions. **Veterinary Pathology**, v. 54, p. 242 – 248, 2017.
- BOLIN, S. R. & GROOMS, D. L. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 20, p. 51, 2004.
- BOTTON, S. A.; DA SILVA, A. M.; BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates by

- monoclonal antibodies and cross-neutralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1429 – 1438, 1998.
- BRODERSEN, B. W. Bovine viral diarrhea virus infections manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. **Veterinary Pathology**, v. 51, p. 453 – 464, 2014.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.; HOWARD, C. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. **Veterinary Record**, v. 114, p. 535 – 536, 1984.
- BUONAVOGLIA, C. Comparison of the cross-antibody response induced in sheep by inactivated bovine viral diarrhea virus 1 and HoBi-like pestivirus. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 806 - 808, 2013.
- CARMAN, S.; VAN DREUMEL, T.; RIDPATH, J.; HAZLETT, M.; ALVES, D.; DUBOVI, E.; TREMBLAY, R.; BOLIN, S.; GODKIN, A.; ANDERSON, N. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 27 – 35, 1998.
- CANAL, C. W.; STRASSER, M.; HERTIG, C.; MASUDA, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 63, p. 85 – 97, 1998.
- CHILDS, T. X. Disease of cattle - Saskatchewan. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 10, p. 316 - 319, 1946.
- CORRÊA, W. V.; NETO, L. Z. & BARROS, H. M. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 35, p. 141 – 151, 1968.
- CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; CASTRO, A. M. M. G.; SOARES, R. M.; PINTO, A. M. V.; ALFIERI, A. A.; FLORES, E. F.; LEITE, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 211 – 216, 2006.
- CORTEZ, A.; ARAÚJO, J. P.; FLORES, E. F.; RIBEIRO, M. G.; MEGID, J.; PAES, A. C.; DE OLIVEIRA FILHO, J. P.; ULLMANN, L. S.; MALOSSI, C. D.; HEINEMANN, M. B. Complete genome sequence of a HoBi-like virus isolated from a Nelore cow with gastroenteric disease in the state of São Paulo, Brazil. **Genome Announcements**, v. 5, e00767-17, 2017.
- DECARO, N.; LUCENTE, M. S.; MARI, V.; CIRONE, F.; CORDIOLI, P.; CAMERO, M.; SCIARRETTA, R.; LOSURDO, M.; LORUSSO, E. & BUONAVOGLIA, C. Atypical pestiviruses and severe respiratory disease in calves, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1549 – 1552, 2011.

- DEZEN, S.; OTONEL, R. A. A.; ALFIERI, A. F.; LUNARDI, M. & ALFIERI, A. A. Perfil da infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em um rebanho bovino leiteiro de alta produção e com programa de vacinação contra o BVDV. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 141 – 147, 2013.
- DIAS, R. K.; CARGNELUTTI, J. F.; WEBER, M. N.; CANAL, C. W.; BAUERMANN, F. V.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R. & FLORES, E. F. Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 221 – 228, 2017.
- DECARO, N.; MARI, V.; SCIARRETTA, R.; LUCENTE, M. S.; LOSURDO, M.; LAROCCA, V.; COLAO, V.; CAVALIERE, N.; LOVERO, A.; LORUSSO, E.; RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; FREY, M.; LANDGRAF, J. G. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Veterinary Microbiology**, v. 77, p. 145 - 155, 2000.
- DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the hosts. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 11, p. 393 – 423, 1995.
- FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S.; GIL, L. H. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v. 87, p. 51 – 60, 2002.
- FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A. & PITUCO, E. M. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in Brazil: history, current situation and perspectives. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 125 – 134, 2005.
- FLORES, E. F.; CARGNELUTTI, J. F.; MONTEIRO, F. L.; BAUERMANN, F. V.; RIDPATH, J.; WEIBLEN, R. A genetic profile of bovine pestiviruses circulating in Brazil. **Animal Health Research Reviews**, aceito em outubro de 2018.
- GARRY, R. F. & DASH, S. Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. **Virology**, v. 307, p. 255 – 265, 2003.
- GIAMMARIOLI, M.; CEGLIE, L.; ROSSI, E.; BAZZUCCHI, M.; CASCAIARI, C.; PETRINI, S.; DE MIA, G. M. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. **Virus Genes**, v. 50, p. 147 – 151, 2015.
- GIANGASPERO, M.; HARAWASA, R.; WEBER, L.; BELLOLI, A. Genoepidemiological evaluation of Bovine viral diarrhea virus 2 species based on secondary structures in the 5' untranslated region. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, p. 571 – 580, 2008.

- GIL, L. H. V. G. **Sequenciamento, análise filogenética e caracterização de polipeptídeos não-estruturais de amostras do vírus da diarreia viral bovina.** Dissertação do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria 1998; 69p.
- GIVENS, M. D.; HEATH, A. M.; CARSON, R. L.; EDENS, M. S.; WENZEL, J. G. & STRINGFELLOW, D. A. Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhea virus in semen samples from the Southeastern United States. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 145 – 155, 2003.
- GOYAL, S. M. & RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management and control.** First edition, Blackwell, 2005.
- GRASSMANN, C. W.; ISKEN, O.; TAUTZ, N. & BEHRENS, S. E. Genetic analysis of the pestiviruses nonstructural coding region defects in the NS5A unit can be complemented in *trans*. **Journal of Virology**, v. 75, p. 7791 – 7802, 2001.
- GRUMMER, B.; BEER, M.; LIEBLER-TENORIO, E.; GREISER-WILKE. Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhea virus. **The Journal of General Virology**, v. 82, p. 2597 – 2605, 2001.
- GU, B.; LIU, C.; LIN-GOERKE, J.; MALEY, D. R.; GUTSHALL, L. L.; FELTENBERGER, C. A. & Del Vecchio, A. M. The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhea virus NS3 protein are essential for viral replication. **Journal of Virology**, v. 74, p. 1794 – 1800, 2000.
- HARADA, T.; TAUTZ, N. & THIEL, H. E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. **Journal of Virology**, v. 74, p. 9498 – 9506, 2000.
- HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, p. 137 – 143, 2003.
- HOUE, H.; LINDBERG, A. & MOENNIG, G. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 427 – 236, 2006.
- HOWARD, C. J.; CLARKE, M. C. & BROWNLIE, J. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus (BVDV) in cattle sera. **Veterinary Microbiology**, v. 10, p. 359 – 369, 1985.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal.** Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v4.pdf, 2014.

ICTV. International Committee of Taxonomy of Viruses. Disponível em:

<http://www.ictvonline.org/>, 2018.

IGBAL, M.; POOLE, E.; GOODBOURN, S.; MCCUALEY, J W. Role for bovine viral diarrhea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. **Journal of Virology**, v. 78, p. 136 – 145, 2004.

JOHNSON, C. M.; PEREZ, D. R.; FRENCH, R.; MERRICK, W. C. & DONIS, R. O. The NS5A protein of bovine viral diarrhea virus interacts with the alpha subunit of translation elongation factor-1. **The Journal of General Virology**, v. 82, p. 2935 – 2943, 2001.

KAMPMANN, T.; MUELLER, D. S.; MARK, A. E.; YOUNG, P. R.; KOBE, B. The role of histidine residues in low-pH-mediated viral membrane fusion. **Structure**, v. 14, p. 1481 – 1487, 2006.

KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccine. **Veterinary Clinics of North America**, v. 20, p. 115 – 129, 2004.

KREY, T.; HIMMELREICH, A.; HEIMANN, M.; MENGE, C.; THIEL, H. J.; Maurer, K. & Rümenapf, T. Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1. **Journal of Virology**, v. 80, p. 3912 – 3922, 2006.

LACKNER, T.; MULLER, A.; KONIG, M.; THIEL, H. S. & TAUTZ, N. Persistence of bovine viral diarrhea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease.

Journal of Virology, v. 79, p. 9746 – 9755, 2005.

LANYON, S. R.; HILL, F. I; REICHEL, M. P. & BROWLIE, J. Bovine viral diarrhea pathogenesis and diagnosis. **The Veterinary Journal**, v. 199, p. 201 – 209, 2014.

LARGO, E.; GLADUE, D. P.; HUARTE, N.; BORCA, M. V.; NIEVA, J. L. Pore-forming activity of pestivirus p7 in a minimal model system supports genus-specific viroporin function. **Antiviral Research**, v. 101, p. 30 – 36, 2014.

LAUREYNS, J.; RIBBENS, S. & KRUIF, A. Control of bovine virus diarrhea at the herd level reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 21 – 26, 2010.

LI, X.; WANG, L.; ZHAO, D.; ZHANG, G.; LUO, J.; DENG, R.; YANG, Y. Identification of host cell binding peptide from an overlapping peptide library for inhibition of classical swine fever virus infection. **Virus Genes**, v. 43, p. 33 – 40, 2011.

LIANG, D. L.; SAINZ, I. F.; ANSARI, I. H.; GIL, L. H.; VASSILEV, V.; DONIS, R. O. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses.

Journal of General Virology, v. 84, p. 1269 – 1274, 2003.

- LINDEBERG, A. & HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 55 – 73, 2005.
- LINDENBACK, B. D.; MURRAY, C. L.; THIEL, H. J. & RICE, C. M. *Flaviviridae*, p. 712 – 746. In: Knipe, D. M. & Howley, P. M. **Fields Virology**. 6th ed. Editora Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- LIU, L.; KAMPA, J. BELAK, S. & BAULE, C. Virus recovery and full-length sequence analysis of the atypical bovine pestivírus Th/04_KhonKaen. **Veterinary Microbiology**, v. 138, p. 62 – 68, 2009.
- LUNARDI, M.; HEADLEY, S. A.; LISBÔA, J. A.; AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A. Outbreak of acute bovine viral diarrhea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 599 – 604, 2008.
- MARQUES, A. L. A.; MAIA, L. A.; AGUIAR, G. M. N.; WEBER, M. N.; SIMÕES, S. V. D.; AZEVEDO, S. S. Detecção do vírus ‘HoBi’-like (BVDV-3) em bovino no semiárido do Estado da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 1081 – 1086, 2016.
- MINAMI, F.; NAGAI, M.; ITO, M.; MATSUDA, T.; TAKAI, H.; JINKAWA, Y.; SHIMANO, T.; HAYASHI, M.; SEKI, Y.; SAKODA, Y., SUGIURA, K. & AKASHI, H. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhea virus subgenotypes. **Comparative Immunology, Microbiology and infectious diseases**, v. 34, p. 35 – 39, 2011.
- MOENNIG, V.; HOUE, E. & LINDEBERG, A. BVD control in Europe: Current status and perspectives. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, p. 63 – 74, 2005.
- MOHAMED, Y. M.; BANGPHOOOMI, N.; YAMANE, D.; SUDA, Y.; KATO, K.; HOMIROTO, T.; AKASHI, H. Physical interaction between bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 4A and adenosine deaminase acting on RNA (ADAR). **Archives of Virology**, v. 159, p. 1735 – 1741, 2014.
- MÓSENA, A. C. S.; WEBER, M. N.; CIBULSKI, S. P.; SILVEIRA, S.; SILVA, M. S., MAYER, F. Q.; CANAL, C. W. Genomic characterization of a bovine viral diarrhea virus subtype 1i in Brazil. **Archives of Virology**, v. 162, p. 1119 – 1123, 2017a.
- MÓSENA, A. C. S.; CIBULSKI, S. P.; WEBER, M. N.; SILVEIRA, S.; SILVA, M. S.; MAYER, F. Q.; ROEHE, P. M.; CANAL, C. W. Genomic and antigenic relationships between two ‘HoBi’-like strains and other members of the Pestivirus genus. **Archives of Virology**, v. 162, p. 3025 – 3034, 2017b.

- NEWCOMER, B. W. & GIVENS, M. D. Approved and experimental counter measures against pestiviral diseases: Bovine viral diarrhea, Classical swine fever and border disease. **Antiviral Research**, v. 100, p. 133 – 150, 2013.
- OLAFSON, P.; MCCALLUM, A. & FOX, F. An apparently new transmissible disease of cattle. **The Cornell Veterinarian**, v. 36, p. 205 - 213, 1946.
- OTONEL, R. A. A.; ALFIERI, A. F.; DEZEN, S.; LUNARDI, M.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A. The diversity of BVDV subgenotypes in a vaccinated dairy cattle herd in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, p. 87 – 92, 2014.
- PAIXÃO, S. F.; FRITZEN, J. T. T.; CRESPO, S. E. I.; PEREIRA, H. M.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Bovine viral diarrhea virus subgenotype 1b in water buffalos (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 2018.
- PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J. & TIJSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v. 203, p. 260 – 268, 1994.
- PELETTI, S.; ZUCCON, F.; PITTI, M.; GOBBI, E.; MARCO, L. D.; CARAMELLI, M.; MASOERO, L. & ACUTIS, P. L. Detection and phylogenetic analysis of an atypical pestivirus, strain IZSLPV_To. **Research and Veterinary Science**, v. 92, p. 147 – 150, 2012.
- PETERHANS, E.; BACHOFEN, C.; STALDER, H. & SCHWEIZER, M. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. **Veterinary Research**, v. 41, p. 44 – 59, 2010.
- QU, L.; McMULLAN, L. K. & RICE, C. M. Isolation and characterization of noncytopathic pestiviruses mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, p. 10651 – 10662, 2001.
- REIMANN, I.; DEPNER, K.; TRAPP, S.; BEER, M. An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. **Virology**, v. 25, p. 143 – 157, 2004.
- RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. & DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v. 206, p. 66 – 74, 1994.
- RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhea virus: global status. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 26, p. 105 – 121, 2010.
- RIDPATH, J. F.; BAUERMAN, V. B. & FLORES, E. F. *Flaviviridae*, p. 675 – 708. In: Flores, E. F. (Org.), **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 3th ed. Editora UFSM, Santa Maria, 2017.

- RONECKER, S.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; GRUSER-WILKE, I.; GRUMMER, B. 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, p. 2114 – 2121, 2008.
- RÜMENAPF, T. R.; STARK, M. H. & THIEL, H. J. N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. **Journal of Virology**, v. 72, p. 2544 – 2547, 1998.
- SCHIRRMEIER, H.; STREBELOU, G.; DEPNER, K.; HOFFMAN, B. & BEER, M. Genetic and antigenic characterization of an atypical *Pestivirus* isolate, a putative member of a novel *Pestivirus* species. **The Journal of General Virology**, v. 85, p. 3546 – 3652, 2004.
- SCHWEIZER, M. & PETERHAN, E. Pestiviruses. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 2, p. 141 – 163, 2014.
- SILVEIRA, S.; BAUMBACH, L. F.; WEBER, M. N.; MÓSENA, A. C. S.; DA SILVA, M. S.; CIBULSKI, S. P.; BORBA, M. R.; MAIA, R. D.; COIMBRA, V. C. S.; DE MORAES, G.; RIDPATH, J. F.; CANAL, C. W. HoBi-like is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil. **Transboundary and Emerging Disease**, v. 65, p. 113 – 120, 2017.
- STARK, R.; MEYERS, G.; RÜMENAPF, T.; THIEL, H. J. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. **Journal of Virology**, v. 67, p. 7088 – 7095, 1993.
- TAUTZ, N.; KAISER, A & THIEL, H. J. NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease cofactor interactions. **Virology**, v. 273, p. 351 – 363, 2000.
- VAN OIRSCHOT, J. T.; BRUSCHKE, C. J. & VAN RIJIN, P.A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 169 – 183, 1999.
- VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da Doença das Mucosas no Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias**, v. especial, p. 51- 58, 1974.
- VILCEK, S.; PATON, D. J.; DURKOVIC, B.; STROINY, L.; IBATA, G.; MOUSSA, A.; LOITSCH, A.; ROSSMANITH, W; VEGA, S.; SCICLUNA, M. T. & PAIFI, V. Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**, v. 146, p. 99 – 115, 2001.
- WANG F.; MING-CHUNG, D.; HUANG, Y.; CHANG, C. Structures and functions of Pestivirus glycoproteins: not simply surface matters. **Viruses**, v. 7, p. 3506 – 3529, 2015.
- NEILL, J. D. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals**, v. 41, p. 2 – 7, 2013.

- WEBER, M. N.; SILVEIRA, S.; MACHADO, G.; GROFF, F. H.; MÓSENA, A. C.; BUDASZEWSKI, R. F.; DUPONT, P. M.; CORBELLINI, L. G.; CANAL, C. W. High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. **Virus Research**, v. 191, p. 117 – 124, 2014.
- WEISKIRCHER, E.; ALIGO, J.; NING, G. & KONAN, K. V. Bovine viral diarrhea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with golgi markers and rearranged host membranes. **Virology Journal**, v. 6, p. 185 – 200, 2009.
- WIZIGMANN, G.; VIDOR, T. & RICCI, Z. M. T. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e diarreia vírus – enfermidade das mucosas no estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v. 1, p. 52 – 58, 1971.
- YESILBAG, K.; ALPAY, G.; BECHER, P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. **Viruses**, v. 9, p. 1 – 19, 2017.
- ZEZAFOUN, H.; DECREUX, A. & DESMECHT, D. Genetic and splice variations of Bos taurus CD46 shift cell permissivity to BVDV, the bovine pestiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 152, p. 315 – 317, 2011.
- ZHAO, C.; SHEN, X.; WU, R.; LI, L.; PAN, Z. Classical swine fever virus nonstructural protein p7 modulates infectious virus production. **Scientific Reports**, v. 7, p. 12995, 2017.
- ZHONG, W.; GUTSHALL, L. L. & DEL VECCHIO, A. M. Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. **Journal of Virology**, v. 72, p. 9355 – 9369, 1998.