

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

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE PESTIVÍRUS ISOLADOS ENTRE 1995 E 2014 NO
BRASIL

Autora: SIMONE SILVEIRA
Orientador: CLÁUDIO WAGECK CANAL

Porto Alegre

2015

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

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE PESTIVÍRUS ISOLADOS ENTRE 1995 E 2014 NO
BRASIL

Simone Silveira

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias, especialidade Virologia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Silveira, Simone

Análise filogenética de pestivírus isolados entre 1995 e 2014 no Brasil / Simone Silveira. -- 2015.
76 f.

Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Pestivírus. 2. BVDV. 3. Hobi-like . 4. Filogenia. 5. Bovinos. I. Wageck Canal, Cláudio, orient. II. Título.

Simone Silveira

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DE PESTIVÍRUS ISOLADOS ENTRE 1995 E 2014 NO
BRASIL**

Dissertação aprovada em 2 de março de 2015, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela comissão formada pelos doutores:

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

Dra. Juliana Felipetto Cargnelutti
Membro da Comissão

Prof. Dr. Paulo Michel Roehe
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Cláudio Wageck Canal pela orientação, conhecimento, oportunidade e incentivo.

Agradeço aos meus colegas, Matheus e André que foram fundamentais para o meu crescimento científico.

Agradeço à Ana e Mariana pelo auxílio técnico e comprometimento. E aos demais colegas do Laboratório de Virologia Veterinária da UFRGS, pelos auxílios e amizade.

Agradeço ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFRGS e aos demais parceiros pelo envio de amostras.

Aos meus pais, irmã e meu namorado, pelo amor, atenção e compreensão.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e que acreditaram em mim.

A todos que colaboraram de alguma forma para o meu crescimento pessoal e profissional, muito obrigada.

RESUMO

A bovinocultura é um dos destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial, uma vez que o País tem o maior rebanho bovino comercial do mundo e é o maior exportador de carne bovina. Para manter e melhorar a competitividade no mercado internacional é fundamental o monitoramento da sanidade animal e a aplicação de programas sanitários adequados e eficientes, especialmente em relação às doenças virais que causam grande impacto na produtividade. As infecções em bovinos causadas por pestivírus resultam em grandes perdas econômicas em todo mundo. Estas podem variar de subclínicas até fatais e pode envolver sinais clínicos respiratórios, reprodutivos e digestivos. As espécies virais pertencentes à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, que causam estas infecções são: vírus da diarreia viral bovina tipo 1 (BVDV-1), BVDV tipo 2 (BVDV-2) e vírus da doença da fronteira (BDV), além de um pestivírus atípico, o vírus *Hobi-like*. O objetivo deste trabalho foi caracterizar filogeneticamente isolados de pestivírus detectados no Brasil entre 1995 e 2014. Para isso, 89 isolados de pestivírus foram amplificadas por RT-PCR, sequenciadas e analisadas filogeneticamente em três regiões genômicas, região 5' não traduzida (5'UTR), autoprotease N terminal (N^{pro}) e glicoproteína 2 (E2). Estes isolados eram provenientes de amostras biológicas de bovinos, soro fetal bovino e de cultivos celulares contaminados, de seis estados brasileiros (PB, PR, MS, MT, RS, SC). No total, 53,9% das sequências foram identificadas como BVDV-1, 33,7% como BVDV-2 e 12,3% como vírus *Hobi-like*. Os subgenótipos predominantes foram BVDV-1a (35,9%) e BVDV-2b (31,4%), porém, BVDV-1b (10,1%), 1d (6,7%), 2c (2,2%) e 1e (1,1%) também foram identificados. O BVDV-1e e 2c foram descritos pela primeira vez no Brasil. Estes resultados poderão contribuir para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnósticos mais eficazes, visando futuros programas de controle e erradicação destes vírus no País.

Palavras-chave: bovino, BVDV, filogenia, genotipagem, *Hobi-like*, pestivírus.

ABSTRACT

The livestock is one of the highlights of Brazilian agribusiness in the world scenario. Since Brazil has the world's largest commercial cattle population and is the largest beef exporter. To maintain and improve the competitiveness in the international market, is essential to monitor the animal health and the application of appropriate and efficient disease control programs, especially in relation to viral diseases, which cause major impact on productivity. Infection caused by pestiviruses in cattle results in great economic losses worldwide. It can vary from subclinical to fatal, and may involve respiratory, reproductive and digestive clinical signs. The viral species belongs to the family *Flaviviridae*, genus *Pestivirus*, that are the bovine viral diarrhea virus type 1 (BVDV-1), BVDV type 2 (BVDV-2) and border disease virus (BDV), and one atypical pestivirus, the Hobi-like virus. The aim of this study was to phylogenetically characterize pestiviruses detected in Brazil between 1995 and 2014. For this, 89 pestivirus isolates were amplified by RT-PCR, sequencing and phylogenetically analyzed in three genomic regions, 5' untranslated region (5'UTR), N terminal autoprotease (N^{pro}) and envelope glycoprotein 2 (E2). These isolates were from biological samples of cattle, fetal bovine serum and contaminated cell cultures from six Brazilian Federal States (PB, PR, MS, MT, RS, SC). In total, 53.9% sequences were identified as BVDV-1, 33.7% as BVDV-2 and 12.3% as Hobi-like viruses. The predominant subgenotypes were BVDV-1a (35.9%) and BVDV-2b (31.4%). Furthermore, BVDV-1b (10.1%), 1d (6.7%), 2c (2.2%) and 1e (1.1%) were also identified. The BVDV-1e and 2c were described for the first time in Brazil. These results will contribute for the development of more efficient vaccines and diagnostic tests, aiming future pestivirus control and eradication programs in Brazil.

Keywords: BVDV, cattle, genotyping, Hobi-like, pestiviruses, phylogeny.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Morfologia e estrutura dos vírus do gênero <i>Pestivirus</i>	12
Figura 2. Estrutura e organização genômica de pestivírus.....	12
Figura 3. Análise filogenética de pestivírus com base nas sequências de nucleotídeos da 5'UTR	15
Figura 4. Representação esquemática das consequências da infecção de fêmeas bovinas prenhes de acordo com o estágio de gestação	23
Figura 5. Consequências da infecção de fêmeas bovinas prenhes de acordo com o biótipo do vírus.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'UTR:	Região 5' não traduzida
BDV:	Vírus da doença da fronteira
BVDV:	Vírus da diarreia viral bovina
BVDV-1:	Vírus da diarreia viral bovina tipo 1
BVDV-2:	Vírus da diarreia viral bovina tipo 2
cp:	Citopático
CSFV:	Vírus da peste suína clássica
DM:	Doença das mucosas
ELISA:	Ensaio imunoenzimático
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IHC	Imunohistoquímica
kb:	Kilo bases
KV:	Vacina com vírus inativado
MLV:	Vacina com vírus vivo modificado
nep:	Não-citopático
nm:	Nanômetros
N^{pro}:	Autoprotease N terminal
ORF:	Fase de leitura aberta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI:	Persistentemente infectado
RNA:	Ácido ribonucleico
RT-PCR:	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR:	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa
SN:	Soroneutralização
UTR:	Região não traduzida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Histórico dos Pestivírus de Ruminantes	12
2.2 Caracterização, Genoma e Replicação Dos Pestivírus	12
2.3 Classificação e Diversidade Genética	15
2.4 Diversidade Antigênica	17
2.5 Evolução	18
2.6 Epidemiologia	19
2.7 Patogenia e Sinais Clínicos	21
2.7.1 Infecção Aguda de Animais Não-prenhes.....	22
2.7.2 Infecção de Fêmeas Prenhes	23
2.7.3 Infecção Persistente.....	23
2.7.4 Doença das Mucosas	24
2.7.5 Vírus Hobi-like	25
2.8 Diagnóstico	26
2.8.1 Isolamento Viral.....	26
2.8.2 Imunohistoquímica.....	27
2.8.3 RT-PCR e RT-qPCR.....	28
2.8.4 Testes Sorológicos	29
2.8.5 Testes de ELISA para Detecção de Antígeno	30
2.9 Controle e Profilaxia	30
2.10 Situação dos Pestivírus de Ruminantes no Brasil	33
3 ARTIGO CIENTÍFICO	35
4 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. Uma vez que o país tem o maior rebanho bovino comercial do mundo, com mais de 211 milhões de animais, é o maior exportador de carne bovina e o quarto de leite (IBGE, 2015; USDA-FAS, 2015). Para manter e melhorar esta competitividade no mercado internacional é fundamental o monitoramento da sanidade animal e a aplicação de programas sanitários adequados e eficientes, especialmente em relação às doenças virais que causam grande impacto na produtividade.

As infecções em bovinos causadas por pestivírus resultam em grandes perdas econômicas em todo mundo. Estas podem variar de subclínicas até fatais e podem envolver sinais clínicos respiratórios, reprodutivos e digestivos (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). As espécies virais que causam estas infecções pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, são elas: vírus da diarreia viral bovina tipo 1 (BVDV-1), tipo 2 (BVDV-2) e vírus da doença da fronteira (BDV) (SIMMONDS et al., 2011). Um pestivírus atípico chamado de vírus Hobi-like ou de BVDV-3 (BAUERMANN et al., 2013) também tem sido detectado causando doença em bovinos na Ásia (STAHL et al., 2007), Europa (DECARO et al., 2011) e no Brasil (CORTEZ et al., 2006).

Os pestivírus apresentam uma considerável diversidade genética e antigênica (NEILL, 2013). A espécie BVDV-1 é dividida em pelo menos 20 subgenótipos, 1a a 1t (BECHER et al., 1999; GAO et al., 2013; GIAMMARIOLI et al., 2014; JACKOVA et al., 2008; NAGAI et al., 2008; VILCEK et al., 2001; VILCEK et al., 2004; XUE et al., 2010; YESILBAG et al., 2008; YESILBAG et al., 2014), BVDV-2 em três subgenótipos, 2a a 2c (BECHER et al., 1999; FLORES et al., 2002; PETERHANS et al., 2010; TAJIMA et al., 2001), BDV em sete genótipos, 1 a 7 (ARNAL et al., 2004; BECHER et al., 2003; DUBOIS et al., 2008; GIAMMARIOLI et al., 2011; VILCEK et al., 1997) e o CSFV em três genogrupos (1, 2 e 3), cada com 3 ou 4 subgrupos (LOWINGS et al., 1996; PAN et al., 2005; PATON et al., 2000; POSTEL et al., 2012, 2013).

O conhecimento sobre a diversidade de pestivírus é importante para determinar possíveis fontes de infecção, para informar programas de controle e para o desenvolvimento de testes de diagnóstico e vacinas (BOOTH et al., 2013; GIAMMARIOLI et al., 2014; YILMAZ et al., 2012).

Apesar da ampla distribuição dos pestivírus (BVDV-1, BVDV-2) pelo Brasil, o país não possui programa de controle e erradicação. A vacinação não é obrigatória, ao contrário, é incipiente e realizada de maneira desigual nas diferentes regiões e sistemas de produção (FLORES et al., 2005; WEBER et al., 2014a).

Com o objetivo de proporcionar maiores informações sobre a diversidade de pestivírus presentes no País para um futuro programa de controle e erradicação, e para auxiliar no desenvolvimento de vacinas e testes de diagnósticos mais eficazes, esta dissertação descreve a análise filogenética de pestivírus detectados no Brasil de 1995 a 2014.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico dos Pestivírus de Ruminantes

Os pestivírus de ruminantes são: BVDV, BDV e o Hobi-like (SCHEIZER; PETERHANS, 2014). Em 1946, uma nova doença transmissível em bovinos foi descrita nos Estados Unidos. Esta doença foi caracterizada por leucopenia, pirexia, depressão, diarreia, anorexia, lesões gastrointestinais e hemorragias (OLAFSON et al., 1946). O agente etiológico foi isolado em 1957 e nomeado como BVDV e a doença como BVD (LEE; GILLESPIE, 1957). Uma doença similar causada também pelo BVDV foi observada no Canadá, porém, esta se apresentava com mais severidade e maior taxa de mortalidade e foi denominada como doença das mucosas (CHILDS, 1946; RAMSEY; CHIVERS, 1953).

O BDV foi primeiro descrito causando a doença da fronteira (BD) em 1959 no Reino Unido, em ovinos que apresentaram perdas reprodutivas e pós-natal, tremores e cobertura escassa e anormal de lã (HUGHS; KERSHAWAND; SHAW, 1959).

Em 1973 o termo pestivírus foi inventado para um grupo de vírus antigenicamente similares (BVDV, CSFV, BDV) (HORZINEK, 1973). Mais tarde, análise filogenética de isolados identificados como BVDV, revelou dois grupos genéticos, BVDV-1 e BVDV-2 (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994), classificados como espécies do gênero pestivírus (SIMMONDS et al., 2011). A espécie BVDV-2 foi inicialmente identificada a partir do final da década de 80 na América do Norte, em surtos de BVD aguda e hemorrágica (CORAPI; FRENCH; DUBOVI, 1989; CARMAN et al., 1998).

Em 2004, um novo pestivírus foi detectado em um lote de soro fetal bovino (SFB) originário do Brasil (SCHIRRMEIER et al., 2004). Subsequentemente, este pestivírus denominado principalmente de Hobi-like tem sido detectado causando doença similar a BVD em bovinos na Ásia (STAHL et a., 2007), Europa (DECARO et al., 2011) e no Brasil (CORTEZ et al., 2006).

2.2 Caracterização, Genoma e Replicação Dos Pestivírus

O gênero *Pestivirus* pertence à família *Flaviviridae*. Os vírus deste gênero são

esféricos, pequenos, medem entre 40 e 60 nm de diâmetro, possuem nucleocapsídeo icosaédrico e envelope (Figura 1) (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; SIMMONDS et al, 2011). O genoma consiste em uma fita linear de RNA de sentido positivo com aproximadamente 12,3 kilobases (kb) de comprimento, que possui nas extremidades 5' e 3' duas regiões não traduzidas (UTR). Esta molécula de RNA codifica uma única fase aberta de leitura (ORF), que é traduzida em uma longa poliproteína com aproximadamente quatro mil aminoácidos, que é clivada em 12 proteínas individuais à medida que é traduzida: a autoprotease N terminal ou proteína N (N^{pro}), proteína do capsídeo (C), glicoproteínas do envelope (E^{ms} , E1, E2), e as proteínas não-estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (Figura 2) (SIMMONDS et al, 2011).

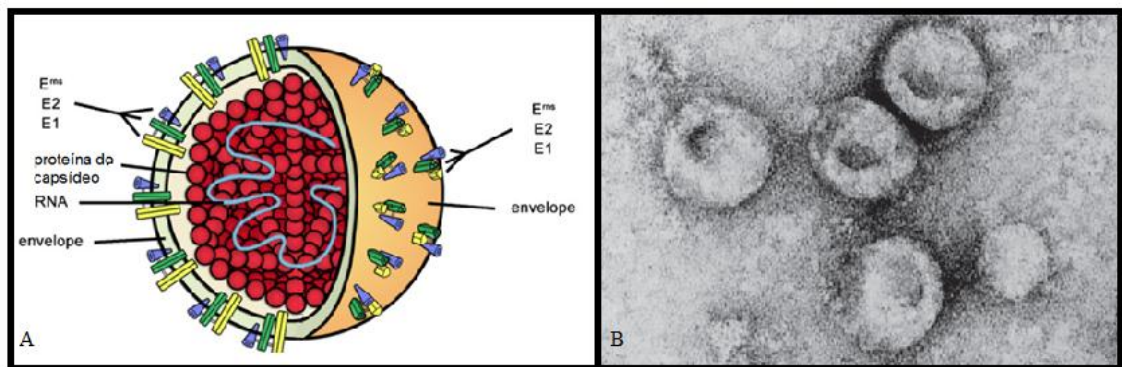


Figura 1. Morfologia e estrutura dos vírus do gênero *Pestivirus*. A) Ilustração esquemática de um vírion com seus principais componentes; B) Foto de microscopia eletrônica de vírions do vírus da diarreia viral bovina. Adaptado: BEER et al., 2007; SIMMONDS et al., 2011.

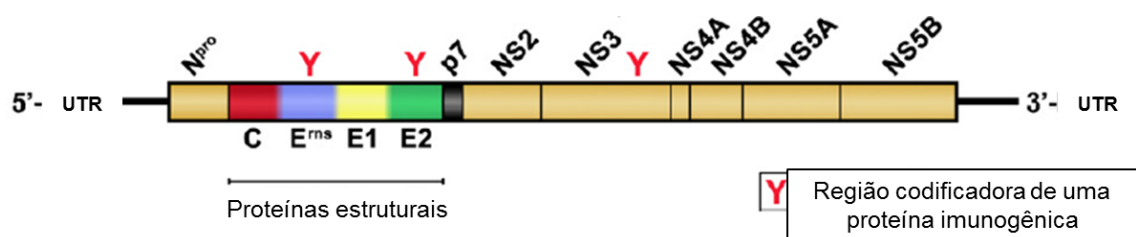


Figura 2. Estrutura e organização genômica dos pestivírus. Adaptado de BEER et al., 2007.

As UTRs se dobram e formam estruturas secundárias que interagem com proteínas celulares e virais. As UTRs têm função relacionada à regulação da replicação e transcrição do RNA, como também na tradução da ORF. A região 5'UTR é reconhecida por proteínas celulares que dirigem os ribossomos a se ligar nesta região e iniciar a tradução da poliproteína (NEILL, 2013). Esta região é a mais utilizada para detecção e caracterização, pois ela tem partes altamente conservadas, que são favoráveis à amplificação por PCR (RIDPATH, 2010).

Dentre as proteínas processadas, a N^{pro} é uma proteína autoproteolítica, sendo responsável por sua liberação da poliproteína. A sua função é relacionada ao bloqueio da produção de interferons. Esta proteína é única nos pestivírus, é altamente conservada e é frequentemente usada em análises filogenéticas (NEILL, 2013; RIDPATH, 2010). A proteína do capsídeo (C) reveste o RNA genômico, para protegê-lo dentro da partícula viral. A E^{ms} possui atividade de RNase, sendo importante na supressão do sistema imune do hospedeiro. Esta proteína é secretada na forma solúvel pelas células infectadas e muitos anticorpos produzidos contra esta são neutralizantes (NEILL, 2013; RIDPATH, 2010).

Pouco é conhecido sobre a função da E1, o que se sabe é que ela precisa formar um heterodímero com a E2 para que o vírus seja infeccioso (NEILL, 2013). A glicoproteína E2 possui os principais epítomos antigênicos, assim sendo o maior alvo da resposta imune humoral. Muitos anticorpos produzidos contra E2 são neutralizantes e efetivamente inibem a infecção. A E2 media a ligação ao receptor celular, portanto é o maior determinante do tropismo celular. Assim, constitui-se na região genética e antigênica mais variável dos pestivírus (LINDENBACH et al., 2007; NEILL, 2013; RIDPATH, 2010).

Por fim, a proteína p7 é necessária para a patogenicidade viral, não se sabe exatamente a função desta proteína, uma hipótese é que a proteína facilite a migração do vírus de célula a célula. As proteínas NS2 e NS3 podem ser encontradas individualizadas ou ligadas. Elas são necessárias para a replicação e viabilidade viral, também exercem função na clivagem da poliproteína viral. A proteína NS4a é um cofator da NS3. A proteína NS4b participa da replicação do RNA viral e é envolvida no rearranjo da membrana celular na célula infectada. As proteínas NS5a e NS5b também participam da replicação do RNA e a NS5b tem função de RNA polimerase (NEILL, 2013; RIDPATH, 2010).

O processo infeccioso viral inicia-se após a ligação do heterodímero E1-E2 aos receptores presentes na superfície celular. O vírus é então internalizado por endocitose dependente de clatrina, desencapsidado e o RNA é liberado no citoplasma, onde ocorrem a transcrição e a tradução. Na replicação ocorre a síntese de um RNA complementar de sentido negativo, que serve como um molde para a síntese do RNA genômico. Este RNA de sentido positivo é traduzido em uma poliproteína que é auto clivada e forma as proteínas estruturais e não-estruturais. A partícula é montada e

maturada no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi e, por fim, o vírion é liberado via exocitose (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; NEILL, 2013; SIMMONDS et al, 2011).

2.3 Classificação e Diversidade Genética

As espécies do gênero *Pestivirus* que são reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) são: vírus da diarreia viral bovina tipo 1 (BVDV-1) e tipo 2 (BVDV-2), vírus da peste suína clássica (CSFV) e vírus da doença da fronteira (BDV) (SIMMONDS et al., 2011). Uma suposta quinta espécie, constitui-se em um vírus isolado de girafa, em 1967, no Quênia (AVALOS-RAMIREZ et al., 2001). Outros pestivírus têm sido identificados e definidos como atípicos: o vírus Hobi-*like* também nomeado de BVDV-3 (BAUERMAN et al., 2013), que já foi isolado de búfalo e de bovinos (DECARO et al., 2011; SCHIRRMIEIER et al., 2004; STALDER et al., 2005); o vírus Pronghorn isolado de um antílope nos Estados Unidos (VILCEK et al., 2005); o vírus Bungowannah, isolado de suínos com miocardite na Austrália (KIRKLAND et al., 2007) e também pestivírus identificados em ovinos na Tunísia (THABTI et al., 2005) e em ovinos e caprinos na Turquia (OGUZOGLU et al., 2009). A Figura 3 representa a relação filogenética das espécies estabelecidas e atípicas de pestivírus.

Os pestivírus apresentam uma considerável diversidade genética (NEILL, 2013). Dentre as espécies reconhecidas pelo ICTV que infectam bovinos (BVDV-1, BVDV-2, BDV), 20 subgenótipos de BVDV-1 já foram descritos, 1a a 1t (BECHER et al., 1999; GAO et al., 2013; GIAMMARIOLI et al., 2014; JACKOVA et al., 2008; NAGAI et al., 2008; VILCEK et al., 2001; VILCEK et al., 2004; XUE et al., 2010; YESILBAG et al., 2008; YESILBAG et al., 2014), três subgenótipos de BVDV-2, 2a a 2c (BECHER et al., 1999; FLORES et al., 2002; PETERHANS et al., 2010; TAJIMA et al., 2001), sete genótipos de BDV, 1 a 7, (ARNAL et al., 2004; BECHER et al., 2003; DUBOIS et al., 2008; GIAMMARIOLI et al., 2011; VILCEK et al., 1997) e o CSFV em três genogrupos (1, 2 e 3), cada com 3 ou 4 subgrupos (LOWINGS et al., 1996; PAN et al., 2005; PATON et al., 2000; POSTEL et al., 2012, 2013)

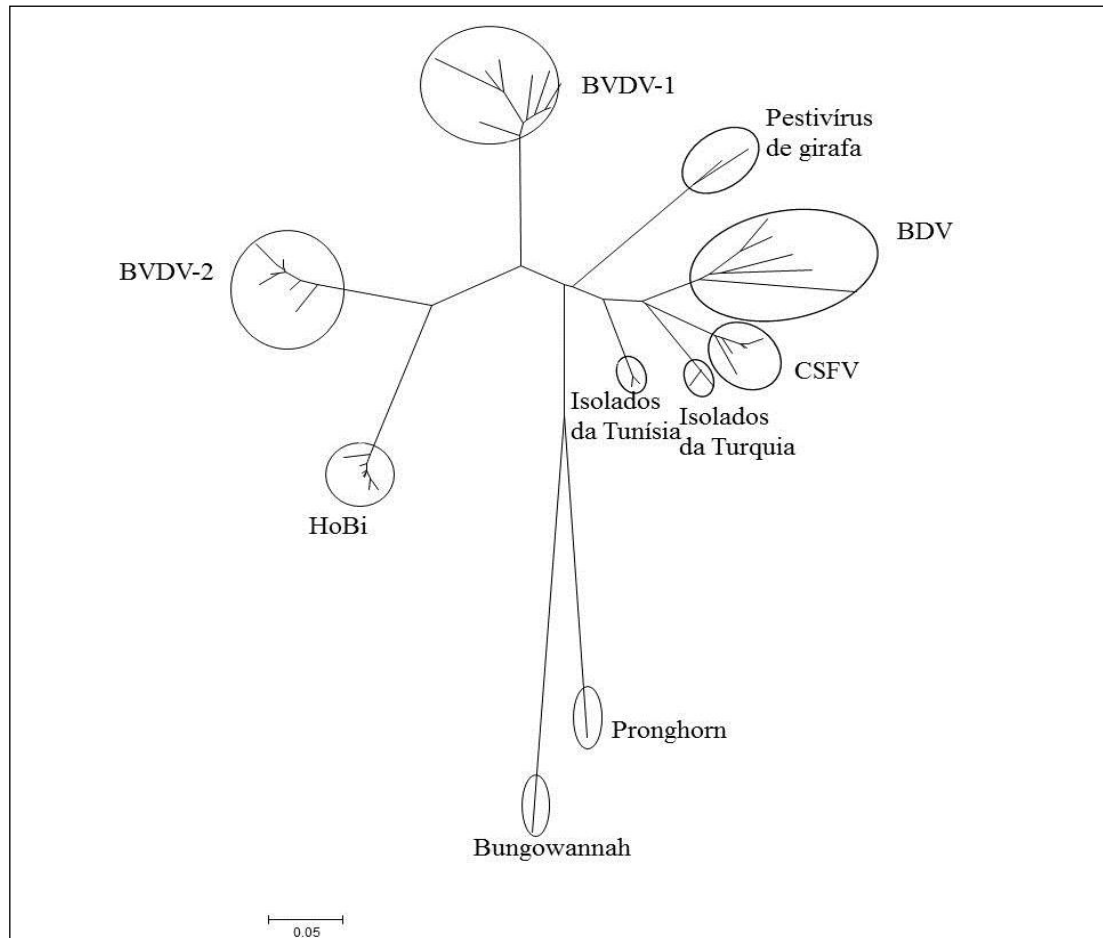


Figura 3: Análise filogenética de pestivírus com base nas sequências de nucleotídeos da região 5'UTR, utilizando o método de inferência Neighbor Joining, modelo de substituição de Kimura-2 parâmetros e *bootstrap* com 1000 réplicas. Análise realizada com o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

Os pestivírus podem apresentar dois biótipos, citopático (cp) e não-citopático (ncp), dependendo da habilidade de causar efeito citopático em cultivo celular. Vírus ncp predominam na natureza, enquanto que vírus cp são raros. As cepas cp surgem de cepas ncp através de vários eventos genéticos que resultam na clivagem da proteína NS2/3 em NS2 e NS3. Essa alteração na proteína origina a doença das mucosas, uma forma fatal da infecção pelo BVDV em bovinos. Entre estes eventos genéticos incluem-se: recombinação, inserção de sequências celulares, duplicações, deleções, mutações pontuais e rearranjos (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; NEILL, 2013; SIMMONDS et al, 2011). A citopatologia *in vitro* não se correlaciona com a virulência *in vivo*, ou seja, as cepas cp não são mais patogênicas do que as ncp, tanto que as formas clínicas mais severas da forma aguda da infecção são associadas com cepas ncp, e somente estas podem resultar em animais persistentemente infectados (NEILL, 2013; RIDPATH, 2010).

Análise filogenética constitui-se em uma ferramenta útil para classificar e conhecer a diversidade genética dos pestivírus e para revelar as histórias evolutivas em comum. A filogenia tem sido embasada principalmente na comparação de sequências de nucleotídeos da região 5'UTR, N^{pro} e E2 (BOOTH et al., 2013; LIU et al., 2010; OGUZOGLU et al., 2012; PECORA et al., 2014; TAJIMA et al., 2001; VILCEK et al., 2001). Este conhecimento gerado sobre a diversidade de pestivírus a partir de análises filogenéticas é importante para determinar possíveis fontes de infecção, para informar programas de controle, para o desenvolvimento de testes de diagnóstico e vacinas (BOOTH et al., 2013; GIAMMARIOLI et al., 2014; YILMAZ et al., 2012).

2.4 Diversidade Antigênica

Os pestivírus são antigenicamente relacionados, e possuem reatividade cruzada em teste de soro-neutralização (SIMMONDS et al., 2011). Contudo, estudos têm mostrado diversidade antigênica através de diferenças na neutralização entre as espécies de pestivírus (BVDV-1 e 2), entre os subgenótipos e inclusive observando divergências dentro de um mesmo subgenótipo (BACHOFEN et al., 2008; BECHER et al., 2003; BEHERA et al., 2011; MINAMI et al., 2011; NAGAI et al., 2001; PECORA et al., 2014; PIZARRO-LUCERO et al., 2006; RIDPATH et al., 2010). Além disso, o vírus Hobi-like é mais diferente antigenicamente (interespecie) do que o BVDV-1 e 2 (BAUERMANN; FLORES; RIDPATH, 2012).

O significado prático destas diferenças antigênicas foi evidenciado pela falha vacinal em animais imunizados com vacinas embasadas em cepas de BVDV-1 e que não foram eficazes em evitar a infecção com cepas de BVDV-2 experimentalmente (RIDPATH; BOLIN; DUBOVI, 1994). Em outro estudo, uma vacina contendo BVDV-1a induziu baixo nível de anticorpos contra BVDV-1b (FULTON et al., 2003). Também já foi relatado que vacinas com BVDV-1 e BVDV-2 induziram uma resposta fraca de anticorpos contra infecção por vírus Hobi-like, o que pode provavelmente não ter conferido a proteção necessária (BAUERMANN et al., 2013a). Apesar disto, ainda não é bem compreendido se as variações genéticas e antigênicas são significativas o suficiente para ter um impacto na proteção conferida pela vacinação (RIDPATH, 2010).

Oito vacinas comerciais usadas no Brasil foram avaliadas quanto à imunogenicidade. Esta foi indetectável contra BVDV-1 e BVDV-2, em pelo menos

quatro e seis vacinas, respectivamente. Além disso, apenas uma vacina induziu resposta em 100% dos animais em títulos moderados a altos, tanto para o BVDV-1 quanto para o BVDV-2. Estes resultados reforçam a necessidade de revisão na formulação e/ou produção das vacinas para pestivírus no Brasil (ANZILIERO et al., 2015).

2.5 Evolução

Os vírus de RNA apresentam uma alta variabilidade genética, o que nos pestivírus é resultante do acúmulo de mutações e de eventos de recombinação homóloga e heteróloga do genoma viral (NAGAI et al., 2004; PETERHANS et al., 2010). Os pestivírus são vírus de RNA de fita simples, com uma RNA polimerase que não possui capacidade de correção. Os nucleotídeos são incorporados erroneamente, introduzindo mutações e produzindo uma população de vírus, denominada quasispécie (RIDPATH, 2003). Quasispécies têm sido detectadas em animais infectados com BVDV (COLLINS; DESPORT; BROWNLIE, 1999; JONES; ZANDOMENI; WEBER, 2002) e consistem em um conjunto de vírus com genomas similares, que interagem cooperativamente em nível funcional e coletivamente contribuem para as características da população (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012; LAURING; ANDINO, 2010). A evolução de quasispécies é influenciada pelas altas taxas de mutação durante a replicação viral. Quasispécies são fontes de adaptabilidade viral, porque elas constituem-se em repositórios dinâmicos de variantes virais genotípicas e fenotípicas, que surgem espontaneamente ou em resposta a pressões seletivas internas ou externas, tais como a resposta imune inata e adaptativa (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012; SCHWEIZER; PETERHANS, 2014).

Fenômenos evolutivos como as quasispécies podem ocorrer nos pestivírus visto que eles são propensos a altas taxas de mutação, o que leva à heterogeneidade genética, surgimento de diferentes grupos genéticos, espécies, genótipos e subgenótipos. Esta diversidade genética pode ser benéfica para a sobrevivência viral. Contudo, pode causar dificuldades na detecção e diferenciação destes vírus (RIDPATH, 2003). Além disso, discrepâncias observadas em análises filogenéticas de pestivírus sugerem que a ocorrência de recombinação seja um fenômeno frequente (LIU et al., 2010). Eventos de recombinação homóloga já foram evidenciados entre subgenótipos de BVDV-1, BVDV-2 e entre genogrupos de CSFV. Estes eventos podem desempenhar um

importante papel na evolução e diversificação dos BVDV e dos CSFV, no entanto podem representar um desafio para estudos filogenéticos e taxonômicos (HE et al., 2007; JONES; WEBER, 2004; NAGAI et al., 2004; WEBER et al., 2015). Entretanto, para ocorrer recombinação, duas variantes virais precisam infectar a mesma célula simultaneamente. Além disto, para o vírus recombinante se tornar a variante predominante, este precisa estar viável e apresentar vantagens em relação às cepas parentais, para poder competir com elas e se sobrepor (JONES; WEBER, 2004).

2.6 Epidemiologia

2.6.1 Hospedeiros e Distribuição Viral

O BVDV tem como hospedeiro natural os bovinos, o BDV os ovinos e o CSFV os suínos (GRONDAHL et al., 2003). Embora a atual classificação dos pestivírus se refere a espécie hospedeira de origem e a doença que este ocasiona, vários estudos têm comprovado que os pestivírus não são estritamente espécie-específicos e infectam, além da espécie hospedeira de origem, outros animais domésticos e silvestres (SAKODA et al., 1999; THABTI et al., 2005; VILCEK et al., 2005). O BVDV-1, BVDV-2 e BDV têm sido detectados em mais de 50 espécies da ordem Artiodáctila, classe Mammalia (BECHER et al., 1997; BECHER et al., 1999; GRONDAHL et al., 2003; NETTLETON, 1990; PASSLER; WALZ, 2009; TERPSTRA; WENSVOORT, 1988; THABTI et al., 2005; VAN CAMPEN et al., 2001; VILCEK; BELÁK, 1996; VILCEK et al., 1997; VILCEK; NETTLETON, 2006). Como exceção, somente o CSFV parece ser restrito a suínos e javalis (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

A presença de pestivirus em várias espécies animais é um fenômeno que pode ocorrer amplamente na natureza, sendo que eles tem o potencial de se disseminar entre animais de vida livre e animais de criação, o que pode ter grande importância epidemiológica (VILCEK; BELÁK, 1996; VILCEK; NETTLETON, 2006). Como por exemplo, a infecção de hospedeiros que não sejam bovinos, com o potencial de atuarem como reservatórios do vírus, pode ser um obstáculo para o sucesso na implantação de estratégias de controle de BVDV em bovinos (PASSLER; WALZ, 2009; BRODERSEN, 2014).

BVDV é uma dos agentes infecciosos mais disseminados em bovinos, com uma alta prevalência em quase todas as populações estudadas. Notavelmente, o BVDV pode

ser um dos vírus que habita animais de vida terrestre mais amplamente distribuídos, juntamente com o BDV, ambos pestivírus de ruminantes (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014).

A infecção pelo CSFV é endêmica em grande parte da Ásia, enquanto que no Canadá, Austrália, Estados Unidos, Nova Zelândia e em muitos países da Europa o CSFV já foi erradicado. Em alguns países da Europa ainda ocorrem casos esporádicos da doença, já em países da América Central e do Sul a infecção tem permanecido endêmica, porém, com a vacinação sistemática, os casos têm reduzido drasticamente. No Brasil ocorreu um programa oficial de controle e erradicação e o País pode ser dividido em uma área livre da doença (Região Sul, Sudeste, Centro-Oeste e parte da Região Nordeste) e uma região onde ocorreram focos isolados da doença nos anos 2000 (RIDPATH; BAUERMANN; FLORES, 2012).

O vírus *Hobi-like* foi inicialmente isolado de soro fetal bovino proveniente do Brasil (SCHIRRMEIER et al., 2004) e posteriormente em búfalos deste País (STALDER et al., 2005). A partir disso, este pestivírus tem sido detectado em bovinos infectados naturalmente, em soro fetal bovino e em cultivos celulares, provenientes do Brasil, Itália, Tailândia, Bangladesh, Austrália e da Índia (CORTEZ et al., 2006; DECARO et al., 2011; HAIDER et al., 2014; LIU et al., 2009; MAO et al., 2012; MISHRA et al., 2014; STAHL et al., 2007; WEBER et al., 2014b). O aumento do número de relatos de vírus *Hobi-like* no mundo todo é uma preocupação para países que possuem programas de controle e erradicação de BVDV, como também para países endêmicos para este pestivírus atípico, porque ele pode se tornar restritivo para o comércio internacional de animais e produtos com países que são livres deste pestivírus (BAUERMANN, 2013b). Ao contrário da aparente ampla distribuição do vírus *Hobi-like*, outras supostas espécies de pestivírus já foram isoladas, mas de um número limitado de animais e em regiões geográficas únicas (BAUERMANN et al., 2013b).

2.6.2 Animais Persistentemente Infectados

Em uma população infectada, em média de 1 a 2% dos animais são persistentemente infectados (PI). Os PI são o principal reservatório e fonte de transmissão do vírus, pois, eles excretam o vírus em alto título em secreções e excreções, durante toda a vida. O PI desempenha um papel substancialmente maior na transmissão viral do que um animal transitoriamente infectado. Isto porque vírus é

excretado em títulos inferiores em animais transitoriamente infectados e somente por alguns dias (HOUE, 1999; LINDBERG; HOUE, 2005; RIDPATH; BAUERMANN; FLORES; 2012).

2.6.3 Transmissão

A transmissão pode ocorrer horizontalmente, por contato direto ou indireto, ou ainda transversalmente. A rota mais comum de transmissão é o contato direto entre animais, principalmente entre PI e suscetíveis. Entretanto, várias maneiras de transmissão indireta têm sido demonstradas: agulhas, luvas para palpação retal, vacinas contaminadas, soro fetal bovino, semen, transferência de embriões e inseminação artificial (GIVENS et al., 2003; HOUE, 1999; LINDBERG; HOUE, 2005; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

A introdução do vírus em um rebanho e a prevalência da infecção são associadas com determinantes epidemiológicos como: densidade animal, comércio de animais e práticas de pastagem, sendo que a principal forma de introdução viral ocorre pela compra de animais PI ou fêmeas gestando fetos PI, coloquialmente conhecidas como “vacas de Tróia”. Outras formas ocorrem por exemplo, pelo contato dos animais com outros rebanhos através de pastagem comunal e contato em cercas (HOUE, 1999; LANYON et al., 2014; LINDBERG; HOUE, 2005).

2.7 Patogenia e Sinais Clínicos

A infecção por pestivírus em ruminantes tem uma ampla gama de apresentações clínicas (LANYON et al., 2014). Estas variam dependendo da cepa do vírus, espécie do hospedeiro, estado imunológico, e infecções concomitantes com outros patógenos. A manifestação clínica e patológica também pode variar de acordo com a idade e a situação reprodutiva do hospedeiro (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; RIDPATH, 2010). Embora o termo diarreia componha o nome da doença (diarreia viral bovina), sinais respiratórios e reprodutivos são mais comumente relatados (RIDPATH, 2010). Esta infecção pode resultar nas seguintes formas: infecção de animais não-prenhes, infecção de fêmeas prenhes, infecção persistente e doença das mucosas (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

2.7.1 Infecção Aguda de Animais Não-prenhes

A infecção aguda acomete animais de todas as idades, porém, é mais comum em animais jovens em rebanhos com infecção endêmica. Ela acontece quando um animal soronegativo e imunocompetente é exposto ao vírus (NEWCOMER; GIVENS, 2013). Esta forma da doença é uma das manifestações mais importantes da infecção por pestivírus (BRODERSEN, 2014) e é caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade (OIE, 2008).

A viremia inicia de forma transitória aos três dias após a infecção e dura de dez a quatorze dias, até que a imunidade se desenvolva. Após a soroconversão, os animais ficam protegidos contra uma reinfeção (HOUE; LINDBERG; MOENNIG, 2006; LANYON et al., 2014; PETERHANS et al., 2010). O período de incubação dura de cinco a sete dias, e a maioria das infecções são subclínicas. Quando presente, os sinais clínicos são brandos, os animais podem apresentar febre, leucopenia, diarreia, secreção nasal e ocular, erosões ou úlceras no focinho e na mucosa oral, depressão, inapetência e diminuição na produção de leite (HOUE; LINDBERG; MOENNIG, 2006; LANYON et al., 2014; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; NEWCOMER; GIVENS, 2013). Fêmeas podem ter infertilidade, enquanto que touros podem apresentar diminuição na fertilidade e infecção prolongada nos testículos, assim, eles podem disseminar o vírus por meses pelo sêmen (BRODERSEN, 2014; OIE, 2008). Cepas altamente virulentas podem ainda induzir úlceras disseminadas na orofaringe, laringe e esôfago, como também pode provocar severa trombocitopenia, o que leva a hemorragia extensa e altas taxas de mortalidade em animais suscetíveis (BRODERSEN, 2014; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; NEWCOMER; GIVENS, 2013).

O vírus induz uma variedade de efeitos no sistema imune, e conseqüentemente imunodepressão. O que exacerba as infecções secundárias bacterianas e/ou virais, e aumenta a severidade da doença e as chances de mortalidade (BRODERSEN, 2014; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; NEWCOMER; GIVENS, 2013; RIDPATH, 2010). Se o animal afetado não tiver nenhuma destas infecções oportunistas, ele tende a se recuperar completamente em três semanas (LANYON et al., 2014).

A excreção do vírus ocorre por vários fluídos corporais, como: secreção nasal e ocular, urina, leite, sêmen, saliva e fluídos fetais (LANYON et al., 2014). Além de haver distribuição altamente variável do antígeno nos tecidos e uma acentuada depleção dos folículos linfoides em vários tecidos (BRODERSEN, 2014).

2.7.2 Infecção de Fêmeas Prenhes

A disseminação transplacentária ocorre após a infecção de uma fêmea prenhe e suas consequências são dependentes da virulência da cepa e do tempo gestacional. Como resultados da infecção, podem ocorrer reduzidas taxas de concepção, morte fetal ou embrionária, aborto, problemas congênitos, infecção persistente ou infecção inaparente com presença de resposta imune (FIGURA 4) (BRODERSEN, 2014; LANYON et al., 2014; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; OIE, 2008; RIDPATH, 2010).

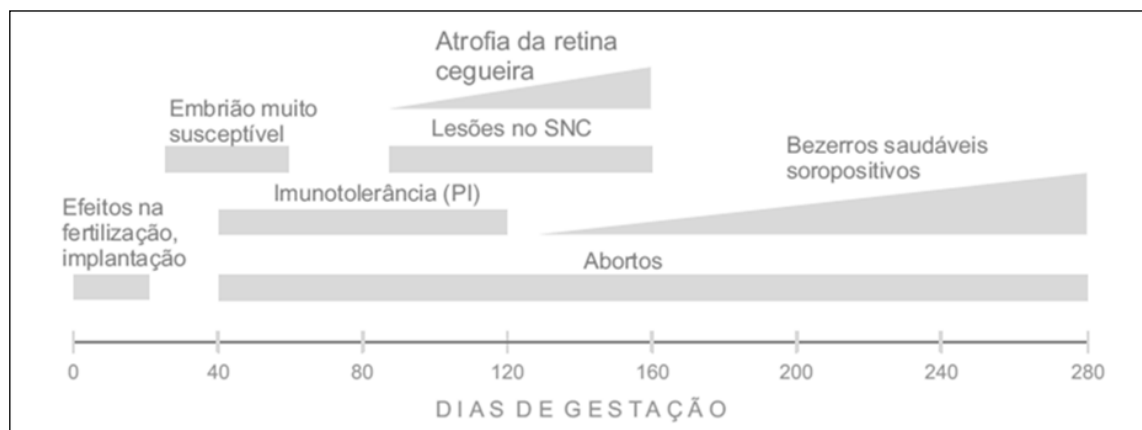


Figura 4. Representação esquemática das consequências da infecção de fêmeas bovinas prenhes de acordo com o estágio de gestação. Fonte: Ridpath et al. (2012).

2.7.3 Infecção Persistente

Somente cepas ncp estabelecem infecção fetal, se este tipo de infecção ocorrer entre os 30 e 125 dias da gestação, há o estabelecimento de animais PI. Além disto, fêmeas prenhes que são PI também darão origem a bezerros PI (LANYON et al., 2014; NETTLETON, 2013; PETERHANS et al., 2010; RIDPATH, 2010; SCHWIZER; PETERHANS, 2014). Durante este período, o sistema imune está imaturo no feto e não possui competência para montar uma resposta imune contra o vírus, assim o animal desenvolve imunotolerância. Estes animais permanecem soronegativos e disseminam grande quantidade de vírus em todas as secreções e excreções por toda a vida, e eficientemente transmitem o vírus para animais suscetíveis no rebanho (LANYON et al., 2014; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; PETERHANS et al., 2010; RIDPATH, 2010). Desta maneira, os PIs asseguram a persistência viral na população hospedeira (LANYON et al., 2014; PETERHANS et al., 2010).

Os sinais clínicos de um PI são muito variáveis. Os animais PIs podem parecer clinicamente normais, ou possuírem retardo no crescimento, diminuição no ganho de

peso e refugagem, bem como, podem apresentar defeitos no sistema nervoso central, como tremores e cegueira (HOUE; LINDBERG; MOENNIG, 2006; LANYON et al., 2014; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; NEWCOMER; GIVENS, 2013; PETERHANS et al., 2010; OIE, 2008; SCHWIZER; PETERHANS, 2014). Ainda, nestes animais há uma ampla distribuição do antígeno viral, incluindo nos linfonodos, epitélio do trato gastrointestinal, pulmões, timo, cérebro, pele e nas glândulas salivares e uma depleção localmente restrita ou moderada dos tecidos linfoides (BRODERSEN, 2014; LANYON et al., 2014). A taxa de mortalidade para os PIs no primeiro ano de vida é maior que 50%, pois, devido uma imunidade deficiente, eles são suscetíveis a infecções secundárias e morrem de doenças como pneumonia e enterite. Isto, combinado com a doença das mucosas (discutidas posteriormente), leva a diminuição do tempo de sobrevivência para cerca de 30% para bovinos com mais de dois anos de idade (LANYON et al., 2014; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

2.7.4 Doença das Mucosas

Doença das mucosas (DM) ocorre quando os dois biótipos estão presentes: o vírus não-citopático (ncp) com qual o animal originalmente foi infectado persistentemente *in utero*, e a cepa citopática (cp) homóloga genética e antigenicamente, sendo estas duas cepas chamadas de “par viral” (FIGURA 5). Esta cepa cp surge de mutações da cepa ncp, através de mutações, incluindo recombinação, inserções de sequências celulares, duplicações, deleções, e rearranjos (BRODERSEN, 2014; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; PETERHANS et al., 2010).

Com menos frequência, pode ocorrer uma superinfecção com uma cepa cp homóloga a ncp proveniente de uma fonte externa, o que já foi associado com surtos raros de doença das mucosas associados à vacina e também pela transmissão viral entre PIs (LANYON et al., 2014; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; SCHWIZER; PETERHANS, 2014).

As características clínicas da DM são as mesmas que as de uma infecção aguda de animais não prenhes, no entanto, com maior gravidade. A doença é rara, invariavelmente fatal, tendo início súbito e pode se estender por várias semanas ou meses, de forma crônica com sinais clínicos recorrentes. Os animais costumam ter febre, anorexia, salivação, diarreia aquosa, secreção nasal, desidratação, definhamento e morte (HOUE; LINDBERG; MOENNIG, 2006; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011;

OIE, 2008; SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). A forma aguda é caracterizada por erosões e úlceras na mucosa oral, nasal, esôfago, intestino delgado e nas placas de Peyer. Por outro lado, na forma crônica, os animais tipicamente apresentam úlceras na pele (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; NEWCOMER; GIVENS, 2013).

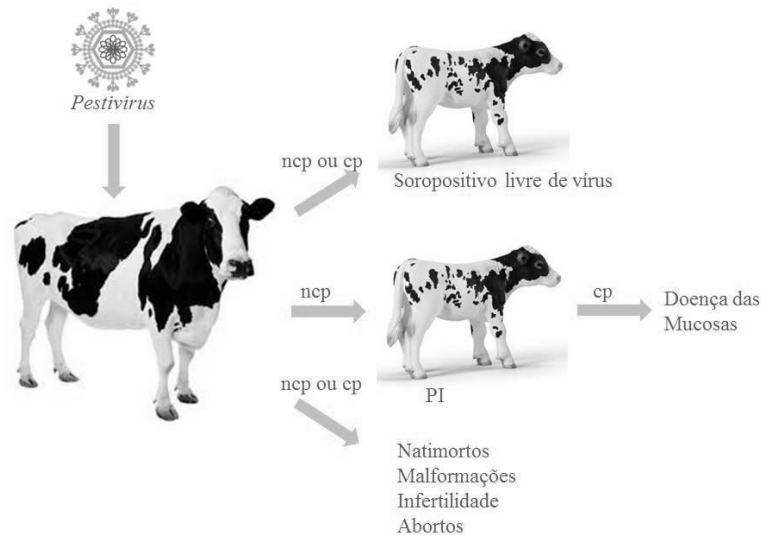


Figura 5. Consequências da infecção de fêmeas bovinas prenhes de acordo com o biótipo do vírus. Adaptado de Ridpath et al. (2012).

Na DM é observada uma ampla distribuição do antígeno viral, incluindo nas glândulas salivares, ocorre severa depleção de todos os tecidos linfoides e severas lesões no trato gastrointestinal (BRODERSEN, 2014). Esta forma da infecção não é transmissível, pois, somente animais PI a desenvolvem, e estes possuem os dois biótipos cp e ncp envolvidos na patogênese (SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). A DM representa um exemplo raro onde a evolução viral associada com a mudança de biótipo leva a morte do animal afetado e, por fim, leva a extinção do vírus cp que causou a doença (PETERHANS et al., 2010).

2.7.5 Vírus Hobi-like

A apresentação clínica desenvolvida em bovinos pela infecção pelo vírus Hobi-like é indistinguível da infecção causada por BVDV. Os animais podem apresentar, por exemplo, retardo no crescimento, redução na produção de leite, doença respiratória, leucopenia, problemas reprodutivos e aborto (BAUERMANN et al., 2013a; BIANCHI et al., 2011; CORTEZ et al., 2006; DECARO et al., 2011; DECARO et al., 2012; RIDPATH et al., 2013). O Hobi-like também já foi detectado em animais PIs

(DECARO et al., 2013) e associado ao desenvolvimento de uma síndrome semelhante a doença das mucosas (DECARO et al., 2014; WEBER et al., 2014b).

2.8 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo de uma infecção causada por pestivírus em ruminantes deve ser feito com base na história clínica, nos sinais clínicos e nas lesões microscópicas e macroscópicas (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). No entanto, como a infecção é clinicamente diversa e não apresenta sinais clínicos patognomônicos, um diagnóstico definitivo é somente obtido por testes laboratoriais (NEWCOMER; GIVENS, 2013; OIE, 2008; SANDVIK, 1999). Os testes laboratoriais são baseados no isolamento viral em cultivo celular, detecção do antígeno viral (imunofluorescência, imunohistoquímica, ELISA), detecção do RNA viral (RT-PCR, RT-qPCR) e detecção de anticorpos por sorologia (ELISA, soroneutralização) (NEWCOMER; GIVENS, 2013; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

No entanto, a alta diversidade genética dos pestivírus causa problemas relativos à detecção e diferenciação destes vírus (RIDPATH, 2003). Desta maneira, é necessário avaliação dos testes de diagnóstico a fim de certificar que eles detectam a ampla gama de diversidade antigênica e genética encontrada entre os pestivírus. Bem como a realização de pesquisa de rotina nos rebanhos bovinos e nas demais espécies de hospedeiros, com o objetivo de detectar novas variantes virais que possam não ser detectadas com os atuais testes de diagnóstico (DUBOVI, 2013; OIE, 2008).

A detecção rápida e sensível de pestivírus é um aspecto relevante no contexto de diagnóstico para programas de controle e erradicação, que têm sido focados na detecção de animais PIs. Como estes animais possuem alta carga viral, os testes de diagnóstico empregados para detectar estes alcançam excelente sensibilidade e especificidade (LANYON et al., 2014). Dois testes com resultados positivos de amostras coletadas com no mínimo três semanas de diferença ainda são necessários para confirmação do estado de PI (LIU et al., 2008; OIE, 2008).

2.8.1 Isolamento Viral

O isolamento viral é historicamente considerado a prova ouro para o diagnóstico de pestivírus, porém, é caro e lento, assim outras técnicas têm sido mais utilizadas, pela

facilidade e pelo baixo custo. No entanto, o isolamento viral é o único que consegue diferenciar vírus não viáveis de vírus biologicamente ativos (BRODERSEN, 2014; NEWCOMER; GIVENS, 2013; RIDPATH, 2010).

Há muitas variações da técnica e todas devem ser otimizadas para obter a máxima sensibilidade na detecção. O vírus pode ser isolado em vários tipos celulares e a partir de secreção nasal, sangue, soro, sêmen, *pool* de leite e tecidos de animais afetados, como fragmento de orelha ou tecidos de fetos abortados (LANYON et al., 2014; NEWCOMER; GIVENS, 2013; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; OIE, 2008).

Para o diagnóstico de uma infecção persistente através do isolamento viral, o critério é que as amostras sejam coletadas com no mínimo três semanas de diferença, sem soroconversão (OIE, 2008; SANDVIK, 1999). Em relação ao diagnóstico de DM, a confirmação deve ser realizada pelo isolamento do vírus cp (OIE, 2008).

Um problema enfrentado no isolamento viral em cultivo celular é a contaminação com pestivírus ncp, geralmente provenientes do soro fetal bovino usado como um suplemento nos meios de cultivo celular. O monitoramento a fim de assegurar que isto não aconteça, é uma medida essencial para o controle de qualidade no diagnóstico de pestivírus. Além disto, o soro fetal bovino precisa ser livre de anticorpos neutralizantes contra os pestivírus (OIE, 2008; SANDVIK, 1999). Desde que as células infectadas por vírus ncp não podem ser distinguidas do controle de células não infectadas, é necessário o uso de imunofluorescência ou imunoperoxidase (HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; OIE, 2008; SANDVIK, 1999).

2.8.2 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica (IHC) fornece um diagnóstico específico, sensível e robusto para detecção de pestivírus, principalmente em tecidos como pele e fragmentos de orelha (OIE, 2008; LANYON et al., 2014; SANDVIK, 1999). Para animais PIs, praticamente todos os tecidos podem ser usados, especialmente, os linfonodos, glândulas tireoides, pele, cérebro, abomaso e placenta (OIE, 2008). Nestes animais, o antígeno viral está presente na pele em altos títulos, assim a IHC tem desempenhado um importante papel em programas de controle e erradicação, que visam identificar animais PIs através do uso da técnica a partir de fragmentos de orelha (DUBOVI, 2013). Desta maneira o teste tem alcançado sensibilidade de 100% até para detecção de PI infectado com vírus HoBi-like (BAUERMANN et al., 2014; DUBOVI, 2013)

2.8.3 RT-PCR e RT-qPCR

A presença de RNA viral pode ser detectada por RT-PCR. Esta técnica é rápida e oferece alta sensibilidade, o que é adequado para amostras biológicas com baixa quantidade viral, como tanques de leite, amostras de *pool* de soro ou provenientes de uma infecção aguda (HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; LANYON et al., 2014). A RT-PCR é adequada também para avaliar contaminações por pestivírus em soro feral bovino e em vacinas, onde geralmente há também baixo título viral (OIE, 2008).

Testes de RT-PCR usando primers específicos para a região 5'UTR são os mais empregados, por esta região ser bastante conservada (OIE, 2008; SANDVIK, 1999). RT-PCR a partir de tanque de leite pode ser útil para um teste inicial, a fim de indicar se há algum animal PI ou transitoriamente infectado entre as vacas lactantes (HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; LANYON et al., 2014). Esta técnica é sensível o suficiente para detectar uma vaca PI lactante em um grupo de 132 animais (LANYON et al., 2014; OIE, 2008). O mesmo princípio pode ser aplicado para *pools* de soro e para *pools* de fragmento de orelha. Que se constituem em técnicas rápidas e econômicas (LANYON et al., 2014; WEINSTOCK; BHUDEVI; CASTRO, 2001). Atualmente, muitos testes de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) estão sendo desenvolvidos que são altamente específicos e sensíveis. Vários tipos de amostras podem ser usados: soro, sangue, leite, tecidos, secreção nasal, pelo, sêmen e embriões (NEWCOMER; GIVENS, 2013; SINGH et al., 2011).

A identificação de um PI pode ser feita através da detecção do RNA viral no sangue através de RT-qPCR. No entanto, na presença de resultado positivo, uma nova coleta deve ser realizada com no mínimo três semanas de diferença em relação a primeira amostra, e esta precisa ser positiva para confirmar o estado de PI (NEWCOMER; GIVENS, 2013; OIE, 2008). Para facilitar o diagnóstico, testes de RT-qPCR têm sido desenhados a fim de diferenciar infecções agudas de persistentes, com base na carga viral presente na amostra (LANYON et al., 2014). Além disto, testes de RT-qPCR também tem sido desenvolvidos com a capacidade de diferenciar BVDV-1 e 2 (BAXI et al., 2006; BHUDEVI; WEINSTOCK, 2001; LETELLIER; KERKHOFS, 2003), ou para apenas detectar vírus *Hobi-like* (LIU et al., 2008). Recentemente, kits comerciais de RT-qPCR têm sido validados para detectar RNA de BVDV em amostras de fragmento de orelha, sangue, plasma, soro e leite. Alguns destes kits já apresentaram

uma ótima sensibilidade (100%) para detecção de vírus *Hobi-like* em fragmentos de orelha (BAUERMANN et al., 2014).

Entretanto, um problema tem sido enfrentado no uso de RT-PCR e RT-qPCR, pois, vários testes desenhados para detectar BVDV falham em detectar e diferenciar vírus *Hobi-like* ou possuem sensibilidade diminuída comparada a detecção de BVDV. Isto ocorre devido a variações na sequência na região do primer e/ou da sonda (BAUERMANN et al., 2014; LIU et al., 2008; SCHIRRMIEIER et al., 2004). Assim, há necessidade de vigilância contínua e de desenvolvimento de novos testes para detectar cepas divergentes, como por exemplo, para identificação dos vírus *Hobi-like* (DUBOVI, 2013).

2.8.4 Testes Sorológicos

Os testes sorológicos podem ser usados, por exemplo, para investigar o estado de exposição de um rebanho ou de um animal, o estágio da infecção no rebanho e para avaliar a eficácia de vacinas. No entanto, testes sorológicos são limitados quando a vacinação é praticada, devido à dificuldade de diferenciar animais infectados de animais vacinados (DUBOVI, 2013; NEWCOMER; GIVENS, 2013; SANDVIK, 1999). Além disto, na interpretação de resultados negativos deve-se levar em conta o estado de imunotolerância de animais PI (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Pois, como estes animais não desenvolvem resposta imune contra o vírus que lhe está infectando, os testes sorológicos não conseguem identificá-los (NEWCOMER; GIVENS, 2013).

Para rebanhos leiteiros não vacinados, o teste em tanque de leite para anticorpos é uma ferramenta útil e mais barata que permite uma triagem inicial para classificação do estado do rebanho (HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; LANYON et al., 2014; OIE, 2008; SANDVIK, 1999). Também é possível testar *pools* de soro por ELISA para detecção de anticorpos, o que permite estimar a soroprevalência dos animais do *pool* (LANYON et al., 2014).

As técnicas mais usadas para a detecção de anticorpos contra pestivírus são a soroneutralização (SN) e o ELISA (HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; OIE, 2008). A SN é um teste sensível, específico, adequado para quantificação de anticorpos por titulação e é reconhecido como teste de referência para sorologia de BVDV. Devido à sua alta especificidade, é essencial usar um vírus desafio antígenicamente similar aos

vírus de campo (HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; OIE, 2008; SANDVIK, 1999)

A SN pode ser biologicamente mais relevante do que o ELISA, porque ela pode avaliar o estado de anticorpo em relação as variação que existe entre os isolados de pestivírus. Além do mais, ela pode ser empregada em amostras de hospedeiros que não sejam bovinos (DUBOVI, 2013). Porém, a SN é trabalhosa, cara e precisa de cultivo celular. Além do mais, os resultados podem variar entre laboratórios devido ao uso de diferentes cepas ou tipos celulares (DUBOVI, 2013; HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; LANYON et al., 2014).

Há muitos testes de ELISA desenvolvidos *in house* ou na forma de kits comerciais para detecção de anticorpos, por exemplo, em soro, leite individual ou tanque de leite. As vantagens do uso desta técnica consistem na facilidade de triagem de muitas amostras, alta sensibilidade e especificidade, rapidez e custo menor em relação à SN disponíveis (DUBOVI, 2013; HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; LANYON et al., 2014; OIE, 2008; SANDVIK, 1999).

2.8.5 Testes de ELISA para Detecção de Antígeno

Os testes de ELISA para detecção de antígeno geralmente se baseiam na detecção da proteína NS2/3 ou E^{ms} em tecidos, como sangue e principalmente fragmento de orelha (HOUE; LINDBERG; MOENNING, 2006; OIE, 2008; SANDVIK, 1999), o que tem possibilitado um teste economicamente viável para os programas de controle e erradicação de BVDV (DUBOVI, 2013; LANYON et al., 2014). Estes testes de ELISA apresentam sensibilidade similar ao isolamento viral (DUBOVI, 2013; NEWCOMER; GIVENS, 2013; OIE, 2008). Entretanto, os kits comerciais não são desenhados para detectar animais transitoriamente infectados (DUBOVI, 2013).

2.9 Controle e Profilaxia

Programas de erradicação de BVDV sem vacinação começaram nos países da Escandinávia na década de 90. Estes se basearam na identificação de rebanhos infectados e não-infectados usando uma combinação de testes sorológicos, e eliminação

do vírus do rebanho através da remoção dos animais PIs (LINDBERG; ALENIUS, 1999; HOUE; LINDBERG; MOENING, 2006; SANDVIK, 2004).

O sucesso destes programas na Escandinávia tem levado ao desenvolvimento de programas nacionais e regionais de controle e erradicação em países como Áustria, Alemanha, Itália e Holanda, Suíça, Eslovênia, França, Escócia e Irlanda. Estes programas são baseados na remoção dos animais PIs com ou sem vacinação (LANYON et al, 2014; LINDBERG; ALENIUS, 1999; NETTLETON, 2013; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; RIDPATH, 2010). Em países europeus sem nenhum programa sistemático, a vacinação é geralmente usada (HOUE; LINDBERG; MOENING, 2006).

Além de detectar e eliminar os animais PIs, os programas têm focado em medidas de biossegurança para prevenir a introdução viral e o monitoramento contínuo dos rebanhos livres para rápida detecção de uma possível reinfecção (LANYON et al, 2014; SCHWEIZER; PETERHANS, 2014). Estas medidas de biossegurança agem especialmente sobre o comércio animal para prevenir a comercialização de animais PIs, fêmeas portando um feto PI e mesmo de animais transitoriamente infectados (LINDBERG; ALENIUS, 1999; HOUE; LINDBERG; MOENING, 2006; RIDPATH, 2010).

Depois dos animais PIs terem sido eliminados, o uso da vacina será decidido conforme a situação epidemiológica. O que acontece também com o planejamento de qualquer programa de controle e erradicação, que irá variar conforme a incidência dos pestivírus, densidade animal, características do comércio, contato com populações silvestres, variação das cepas circulantes e tipo de produção. Em propriedades com alta densidade animal, comércio intensivo e alta prevalência de BVDV, a vacinação precisa ser empregada. Em propriedades com baixa prevalência, a vacinação não precisa ocorrer, já que o risco de reintrodução é muito pequeno (HOUE; LINDBERG; MOENING, 2006; RIDPATH, 2010). Portanto, um programa pode ter duas fases, primeiro, eliminação dos PIs, seguida de vacinação e erradicação. Isto acontece em estados da Alemanha com alta prevalência da infecção e minimiza o risco de reintrodução em rebanhos livres do vírus (HOUE; LINDBERG; MOENING, 2006).

As vacinas têm sido usadas por mais de 50 anos. No entanto elas não têm se mostrado efetivas na redução da disseminação de BVDV, pois elas não eliminam o vírus dos rebanhos (BRODERSEN, 2014; NEWCOMER, 2013; RIDPATH, 2010). Possivelmente, isto ocorre porque o controle pela vacinação é comprometido pela

diversidade observada nas cepas de pestivírus, pela falta de uma proteção fetal completa e pela falha em remover animais PIs (RIDPATH, 2010; SANDVIK, 2004; SCHWEIZER; PETERHANS, 2014).

Consequentemente, os maiores desafios no desenvolvimento de vacinas são a proteção contra a ampla diversidade antigênica dos pestivírus e a prevenção da infecção fetal (KALAYCIOGLU, 2011; NEWCOMER; GIVENS 2013; OIE, 2008). Para uma melhor proteção vacinal, as vacinas necessitam refletir os cepas prevalentes ou tipos antigênicos presentes no país do seu uso (MAHONY et al., 2005; RIDPATH, 2010). Como muitos países tem usado a vacinação e não obtiveram redução da prevalência da infecção, eles têm empregado programas que combinam o uso de vacinas com medidas de biossegurança para efetuar o controle (HOUE; LINDBERG; MOENING, 2006).

Não há uma vacina padrão para BVDV. Porém, há muitas vacinas comercialmente disponíveis que podem conter: com vírus vivos atenuados (MLV) ou inativados (KV) (OIE, 2008; RIDPATH, 2010). Elas têm na composição BVDV-1 e BVDV-2 e, por enquanto, não há nenhuma vacina disponível para vírus Hobi-like (BAUERMANN et al., 2013a; KALAYCIOGLU, 2011).

A recomendação é o uso de duas doses de MLV. Se uma KV for usada, o recomendado é que seja realizada uma segunda dose com MLV (HOUE; LINDBERG; MOENING, 2006). Estas MLV são baseadas em cepas atenuadas e geralmente induzem uma resposta imune mais ampla e duradoura do que as KV, devido aos maiores títulos de anticorpos neutralizantes e a indução de uma resposta imune celular potente (KALAYCIOGLU, 2011; NEWCOMER; GIVENS, 2013). Se for aplicada somente a KV, são necessárias duas doses, contudo, a maior vantagem destas vacinas em relação as MLV é a segurança (NEWCOMER; GIVENS, 2013). Isto porque, as MLV não podem ser administradas a fêmeas prenhes, devido ao risco de infecção transplacentária, além de haver o risco de indução da doença das mucosas em animais PI (BRODERSEN, 2014; KALAYCIOGLU, 2011; OIE, 2008).

Há necessidade do desenvolvimento de vacinas que protejam mais e que sejam seguras. Além das vacinas comerciais, há muitas sendo desenvolvidas e testadas experimentalmente, como as vacinas recombinantes de subunidade (BRODERSEN, 2014; KALAYCIOGLU, 2011).

Os programas de controle e erradicação mais eficazes são baseados em biossegurança, pesquisa e controle. Além do mais, para o sucesso destes programas é

importante que haja a transferência de informações e conhecimentos para todos os grupos envolvidos na implementação do programa (LINDBERG; ALENIUS, 1999; NEWCOMER; GIVENS, 2013; RIDPATH, 2010; SANDVIK, 2004).

2.10 Situação dos Pestivírus de Ruminantes no Brasil

A infecção pelo BVDV no Brasil tem sido descrita desde a década de 60 (CORREA; NETO; BARROS, 1968), e atualmente está amplamente distribuída pelos rebanhos brasileiros, com 22-66% dos animais e 43-82% dos rebanhos soropositivos (ALMEIDA et al., 2013; CANAL et al., 1998; QUINCOZES et al., 2007; THOMPSON et al., 2006). O conhecimento sobre os pestivírus presentes no País cresceu nos últimos anos, devido ao aumento no número de laboratórios envolvidos em pesquisa e diagnóstico. Assim BVDV-1a, 1b, 1d, BVDV-2b e *Hobi-like* já foram detectados (BIANCHI et al., 2011; CORTEZ et al., 2006; FLORES et al., 2002; WEBER et al., 2014b; WEBER et al., 2014c). Entretanto, o BDV nunca foi detectado no Brasil nem no restante da América do Sul (WEBER et al., 2014a).

Em dois estudos recentes, a proporção de BVDV-2 foi semelhante a de BVDV-1, com frequências variando de 40-57% para BVDV-1 e 42-45% para BVDV-2 (BIANCHI et al., 2011; WEBER et al., 2014c). Estas frequências de BVDV-2 são similares às descritas no Chile (PIZARRO-LUCERO et al., 2006) e na Coreia do Sul (OEM et al., 2009), porém, bem maiores do que aquelas relatadas nos demais países em que a diversidade destes pestivírus já foi estudada (BOOTH et al., 2013; LUZZAGO et al., 2014; KUTA et al., 2013; MAHONY et al., 2005; MISHRA et al., 2004; PECORA et al., 2014; RIDPATH et al., 2010; ULARAMU et al., 2013; YILMAZ et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

Apesar da ampla distribuição da infecção pelo País e da considerável diversidade genética dos isolados, o Brasil ainda não possui um programa oficial de controle e erradicação. Apenas alguns produtores adotam voluntariamente medidas de controle. No entanto, a ausência de medidas de controle no Brasil em um contexto internacional onde mais países vêm continuamente adotando programas de controle e erradicação poderá originar restrições ao comércio internacional de produtos de origem bovina. Além disto, no Brasil a vacinação não é obrigatória, ao contrário, é incipiente e realizada de maneira desigual nas diferentes regiões e sistemas de produção. Somente

vacinas inativadas são licenciadas e estas contêm cepas só de BVDV-1 ou de BVDV-1 e de BVDV-2. No entanto, questiona-se sobre a eficácia destas vacinas, devido a alta variabilidade antigênica dos pestivírus e ao uso de apenas vacinas inativadas, apesar do conhecimento de que as vacinas atenuadas são mais eficientes (FLORES et al., 2005; NEWCOMER; GIVENS, 2012; WEBER et al., 2014a).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados e a discussão, bem como os materiais e métodos empregados para a realização dos experimentos que compõem esta dissertação, serão apresentados a seguir na forma de um artigo científico como segue:

1- Genetic diversity of ruminant pestiviruses detected in Brazil

Este artigo será submetido ao periódico *Transboundary and Emerging Diseases*.

Genetic diversity of bovine pestiviruses in Brazil

S. Silveira^a, M. N. Weber^a, A. C. S Mósena^a, M. S. da Silva^a, A. F. Streck^a, E. F. Flores^b, Rudi Weiblen^b, D. Driemeier^c, C. A. Pescador^d, C. W. Canal^{a*}

^aLaboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bSetor de Virologia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cSetor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^dLaboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

*Corresponding author:

Cláudio W. Canal, Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), CEP 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel.: +55 51 33086926; Fax: +55 51 33087305; E-mail: claudio.canal@ufrgs.br

Summary

Pestivirus infections in ruminants result in significant economic losses worldwide. The etiological agents are three species from the genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae*: *Bovine Viral Diarrhea Virus type 1* (BVDV-1), BVDV-2, *Border Disease Virus* (BDV) and, an atypical pestivirus named Hobi-like virus. In the present study, eighty nine pestivirus isolates from Brazil collected between 1995 and 2014, originated from cattle, fetal bovine serum (FBS) or detected as cell culture contaminants were characterized through nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of part of the 5' untranslated region (5'UTR), N terminal autoprotease (N^{pro}) and envelope glycoprotein 2 (E2) genes. Genetic analysis indicated that 53.9% of the sequences belonged to BVDV-1, 33.7% to BVDV-2 and 12.3% to Hobi-like. BVDV-1a (35.9%) and BVDV-2b (31.4%) were the predominant subgenotypes, followed by BVDV-1b (10.1%) and 1d (6.7%). BVDV-2c (2.2%) and BVDV-1e (1.1%) were identified in Brazil for the first time. This study evidenced a high genetic diversity of Brazilian pestivirus isolates and it will be useful for evaluating the diagnostic tools and for the development of more effective vaccines and may also contribute for pestivirus control and programs in Brazil.

Keywords:

Pestivirus

Cattle

Phylogeny

BVDV

Hobi-like

Introduction

Pestiviruses are single-stranded, positive-sense RNA viruses. The viral genome contains a unique open reading frame flanked by untranslated regions (UTRs) at the 5' and 3' ends, which encodes a long polyprotein that is processed into 11 or 12 polypeptides (Simmonds et al., 2011). The infection in cattle results in significant economic losses worldwide with manifestations ranging from mild clinical signs to severe forms, such as respiratory disease, abortions and even death (MacLachlan and Dubovi, 2011). The causative agent can be one of the three recognized species from the family *Flaviviridae*, genus *Pestivirus*: *Bovine Viral Diarrhea Virus type 1* (BVDV-1), BVDV-2 and *Border Disease Virus* (BDV) (Simmonds et al., 2011). An atypical pestivirus named Hobi-like (Schirrneier et al., 2004) was detected in cattle from South America (Cortez et al., 2006; Bianchi et al., 2011; Weber et al. 2014a), Asia (Stahl et al., 2007; Mao et al., 2012; Haider et al., 2014; Mishra et al., 2014) and Europe (Decaro et al., 2011; Decaro et al., 2012; Decaro et al., 2013).

Phylogenetic analysis has been used to characterize genetic groups of pestivirus from different areas of the world. This genetic classification is mostly based on comparison of nucleotide sequences of 5'UTR and terminal autoprotease (N^{pro}) (Tajima et al., 2001; Vilcek et al., 2001; Nagai et al., 2008; Booth et al., 2013; Pecora et al., 2014) and currently, at least 20 subgenotypes of BVDV-1 (1a-1t) (Vilcek et al., 2001; Giammarioli et al., 2014; Yesilbag et al., 2014) and three BVDV-2 (2a-2c) have been described (Tajima et al., 2001; Flores et al., 2002; Peterhans et al., 2010; Jenckel et al., 2014). Previous studies had been performed in Brazil to classify pestivirus isolates by phylogenetic analysis; however the majority of those studies used solely the 5'UTR and some of these did not classify at the subgenotype level (Canal et al., 1998; Flores et al., 2000; Cortez et al., 2006; Lunardi et al., 2008; Bianchi et al., 2011). In order to obtain more reliable phylogenetic analysis, the use of three or more regions of the pestivirus genome for subgenotyping is recommended (Nagai et al., 2008; Yesilbag et al., 2008; Liu et al., 2009a). Taking into account the need to better understand the genetic diversity of pestivirus isolates in Brazil, in this study, three genomic regions of Brazilian pestivirus isolates were analyzed. Such knowledge is important to understand the epidemiology, design accurate diagnostic tests and effective vaccines. This study will contribute towards the development of future national pestivirus control programs.

Materials and Methods

Samples

Eighty-nine pestivirus isolates obtained between 1995 and 2014 in different laboratories were characterized. The isolates were originated from cattle, fetal bovine serum (FBS) or found as cell culture contaminants from six Brazilian federal states (RS, MS, MT, SC, PB, PR). The description of the isolates is presented in the supplementary Table S1.

RNA isolation and RT-PCR

RNA was isolated from the samples using TRIzol® LS Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA synthesis was carried out using SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies). Primers used in the RT-PCR are listed in Table 1. To avoid unnecessarily sequencing of closely related viral isolates, when more than one isolate showed 100% identity in 5'UTR, only one was sequenced in the N^{pro} and E2 regions.

Table 1- Primers used for RT-PCR and sequencing

Genomic region	Pestivirus	Primers	Reference
5'UTR	BVDV-1,	324, 326 forward, reverse	Vilcek et al., 1994 Deregt et al., 2006
	BVDV-2		
N ^{pro}	Hobi-like	BD1, BD3 LV pesti F, LV pesti R	Vilcek et al., 2001 Weber et al., 2014c
	BVDV-1		
E2	BVDV-2	E2f, E2r SF3, SR3	Tajima et al., 2001 Liu et al., 2009c
	Hobi-like		
	BVDV-1,		
	BVDV-2		

Sequencing and phylogenetic analysis

The PCR amplification products were purified using the Nucleo Spin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to manufacturer's description. The sequences of both strands were sequenced using a Big Dye Terminator cycle sequencing kit, version 3.1, on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The partial 5'UTR, N^{pro} and E2 sequences of the present study and of representative pestivirus strains retrieved from GenBank were aligned with Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA6) (Tamura et al., 2013), using Muscle algorithm. All the sequences of Brazilian pestivirus isolates and alignments are available in Figshare (<http://figshare.com/>), with the DOI numbers <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1299442-1299450> and <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1299456-1299458>, respectively. The evolutionary history was inferred by Maximum Likelihood method (Guindon and Gascuel, 2003) using the Kimura 2-parameter substitution model (Kimura, 1980) for the 5'UTR and N^{pro} sequences and using the Tamura 3-parameter substitution model (Tamura, 1992) for the E2 sequences. A gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites with five categories, with invariable sites for the N^{pro} and E2 sequences. All evolutionary analyses were conducted in MEGA6 with 1,000 bootstrap replicates each.

The percentage of identity of pairwise evolutionary distances within and between groups was calculated using Geneious Trial 8.0.4 (<http://www.geneious.com/>). The GenBank accession numbers of the Brazilian pestivirus isolates sequences are shown in Table 2.

Results

The eighty-nine pestivirus isolates investigated gave rise to 87 sequences of partial 5'UTR (234 bp), 55 of N^{pro} (361 bp) and 54 of E2 (303 bp). The sequences from isolates Embrapa2007 and LV/N98/13 of 5'UTR, EVI006, LV/95-77/13, LV/N98/13, LV/MDBK200/14 and LV/CER189/14 of N^{pro} and LV/LF79/12, LV/40-30/13, Embrapa2007, LV/BVDV158, LV/MDBK200/14 and LV/CER189/14 of E2 could not be amplified in that genomic regions.

In total, 53.9% (48/89) sequences were identified as BVDV-1, 33.7% (30/89) as BVDV-2 and 12.3% (11/89) as Hobi-like viruses. At the subgenotyping level, the highest number of isolates (35.9%, 32/89) was classified as BVDV-1a and 31.4% (28/89) as BVDV-2b. Furthermore, BVDV-1b (10.1%, 9/89), 1d (6.7%, 6/89), 1e (1/89, 1.1%) and 2c (2.2%, 2/89) were also identified.

The phylogenetic trees of the 5'UTR, N^{pro} and E2 sequences are shown in Figure

1a, Figure 1b and Figure 1c, respectively. The overall tree topology was similar between the three genomic regions, with two exceptions (Table 2). A phylogenetic tree of 5'UTR and E2 showed that the majority of the Brazilian BVDV-1a sequences are located in the same cluster of Oregon C24V, but distinct from the cluster of NADL. For the Brazilian BVDV-1b isolates, the phylogenetic tree of the three genomic regions showed that these sequences are more genetic related with strain CP7 (1b2) than with strain Osloss (1b1).

A bootstrap analysis inferred a robust phylogeny for the phylogenetic tree of N^{pro} and E2. High bootstrap values were observed for the N^{pro} (more than 97%) and for the E2 (over 83%), for each monophyletic cluster, at the species and subgenotype level.

Regardless of the 5'UTR tree, bootstrap values for clusters at the species level were consistent (over 92%). However, values at the subgenotype level were lower, ranging less than 70% to 96%.

The pairwise evolutionary distances were calculated and the sequence identities within Brazilian pestivirus isolates are shown in Table 3. The pestivirus isolates had nucleotide similarities ranging from 64.6-100%, 60.6-100% and 58.25-100% in the 5'UTR, N^{pro} and E2, respectively. The comparison between Brazilian pestivirus isolates and reference strains is shown in Table 4. The nucleotide similarities ranged between 88.9-100%, 84.2-98.6%, 80.5-97.5% in the 5'UTR, N^{pro} and E2, respectively.

Table 3 – Percentage of nucleotide similarity within Brazilian pestivirus isolates in the tree genomic regions analyzed.

Pestivirus type/subgenotype	5'UTR	N ^{pro}	E2
BVDV-1	85.8 – 100	76.4 – 100	70.3 – 100
BVDV-2	87.8 – 100	78.9 – 100	80.2 – 99
Hobi-like	97.1 – 100	94.7 – 99.4	91.5 – 100
BVDV-1a	89.8 – 100	84.4 – 100	84.8 – 99.3
BVDV-1b	97.77 – 100	88.6 – 98.8	87.9 – 100
BVDV-1d	99.1	98.4 – 100	96.3 – 97.1
BVDV-2b	90.3 – 100	82.2 – 100	83.8 – 99
BVDV-1 and BVDV-2	69.3 – 78.8	63.1 – 70.6	60.8 – 69.6
BVDV-1 and Hobi-like	64.6 – 71.7	60.6 – 66.4	58.2 – 65.6
BVDV-2 and Hobi-like	69.9 – 77	62.6 – 68.4	59 – 65.6

Table 4 - Percentage of nucleotide similarity between Brazilian pestivirus isolates and reference strains* in the tree genomic regions analyzed

Pestivirus type/subgenotype	5'UTR	N ^{pro}	E2
BVDV-1a	89.7 – 96.4	86.4 – 92.8	82.8 – 92.4
BVDV-1b	94.6 – 97.3	85.8 – 94.4	85.3 – 92.7
BVDV-1d	99.5	98.3 – 98.6	96.7 – 97.5
BVDV-1e	92.4 – 100	84.2 – 85.8	80.5 – 93.4
BVDV-2b	91.7 – 98.2	84.2 – 97.2	85.1 – 95.3
BVDV-2c	98.1	97.5	97
Hobi-like	88.9 – 99.5	84.2 – 96.4	87.1 – 96.3

*** the same reference strains shown in Figure 1a, 1b and 1c. BVDV-1a (Oregon C24V, NADL), 1b (Osloss, CP7), 1d (10JJ-SKR), 1e (1891/99, 3-Italy), 2b (Giessen 6, Soldan, Hokudai-Lab/09), 2c (VOE 4407) and Hobi-like (IndABI15385/12, Th/04 KhonKaen, D32/00 HoBi).

Discussion

Knowledge about the genetic diversity of pestiviruses is important in order to design adequate diagnostic tests and for effective surveillance, inform control programs and to determine likely infection sources (Yilmaz et al., 2012; Booth et al., 2013; Giammarioli et al., 2014). It is also important to drive vaccine development, in order to improve their protection spectrum, taking into account the pestivirus isolates circulating in a given region (Ridpath, 2010). Brazil has the world's largest commercial cattle herd with more than 211 million of animals (IBGE, 2015; USDA-FAS, 2015). Although pestiviruses are widespread in the country, there is no official control and eradication program for this virus. Only inactivated vaccines are commercially available. Vaccination is not mandatory and is still incipient. Formulation of adequate vaccines depends on more profound knowledge of the genetic and antigenic properties of circulating viruses. For these reasons, the genetic diversity of pestivirus isolates from Brazil was investigated by phylogenetic analysis for 5'UTR, N^{pro} and E2 partial regions of the 89 viral isolates. We hope these information will help in understanding the genetic plethora of pestiviruses circulating in the country, contributing for more effective diagnosis, surveillance and control.

BVDV-1 was the more frequent pestivirus species detected, followed by BVDV-2 and Hobi-like. This frequency of BVDV-2 was similar to that described previously in Brazil (Bianchi et al., 2011; Weber et al., 2014b), Chile (Pizarro-Lucero et al., 2006) and in South Korea (Oem et al., 2009), but higher than that detected in Argentina (Jones

et al., 2001; Pecora et al., 2014), North America (Kim et al., 2009; Ridpath et al., 2010), Europe (Tajima et al., 2001; Yilmaz et al., 2012; Booth et al., 2013; Kuta et al., 2013; Luzzago et al., 2014;), Asia (Mishra et al., 2004; Gao et al., 2013; Zhang et al., 2014), Africa (Ularamu et al., 2013) and Australia (Mahony et al., 2005). This suggest that BVDV-2 have existed as long as BVDV-1 in Brazil, and that this specie is well adapted and established to the environment.

Brazilian pestivirus isolates show a considerable heterogeneity. Previously, BVDV- 1a, 1b, 1d, BVDV-2b and Hobi-like were detected (Flores et al., 2002; Cortez et al., 2006; Bianchi et al., 2011; Weber et al., 2014a; Weber et al., 2014b). In this study, BVDV-1a and BVDV-2b were the predominant subgenotypes, while BVDV-2c and BVDV-1e are reported for the first time. BVDV-1b and BVDV-1d were also detected. A high frequency of BVDV-2b was detected in this study and none BVDV-2a was identified. This result is uncommon, since BVDV-2a is more frequently reported than BVDV-2b (Ridpath et al., 2010; Pecora et al., 2014; Zhang et al., 2014), including in Chile and South Korea which have high percentage of the BVDV-2 (Pizarro-Lucero et al., 2006; Oem et al., 2009). BVDV-2b has been detected in Brazil since the early 90th (Canal et al., 1998; Flores et al., 2002) and it has shown growing number of detections (Cortez et al., 2006, Bianchi et al., 2011, Weber et al., 2014b). This may help in understanding the evolution and epidemiology of this subgenotype.

Almost all Brazilian BVDV-1a clustered with the Oregon strain group and BVDV-1a was also found as the predominant subgenotype such as in UK (Strong et al., 2013), South Korea (Oem et al., 2009), Japan (Nagai et al., 2004) and Argentina (Jones et al., 2001). BVDV-1b was the third subgenotype more frequently found in Brazil and all sequences clustered into BVDV-1b2, according to the classification defined by Tajima et al. (2001). On the other hand, this subgenotype is the most frequently found in the world (Barros et al., 2006; Pizarro-Lucero et al., 2006; Oem et al., 2010; Ridpath et al., 2010; Deng et al., 2012; Kuta et al., 2013; Giammarioli et al., 2014; Pecora et al., 2014). In this study, BVDV-1d was identified in low frequency, as reported in Europe (Jackova et al., 2008; Hornberg et al., 2009; Yilmaz et al., 2012; Booth et al., 2013; Luzzago et al., 2014). The BVDV-1e was detected in this study in low frequency as in several countries from Europe (Hurtado et al., 2003; Barros et al., 2006; Hornberg et al., 2009; Booth et al., 2013; Strong et al., 2013) and China (Zhang et al., 2014), however,

in contrast to studies from France (Jackova et al., 2008) and Italy (Giammarioli et al., 2014), where this subgenotype has been more frequently found.

The BVDV-2c subgenotype was first identified in German in the 90s (Wolfmeyer et al., 1997; Becher et al., 1999), and since then, few reports are available (Tajima et al., 2001; Peterhans et al., 2010). Recently, it received more attention when this virus was identified in outbreaks in Germany where highly virulent strains caused high mortality. Strains from United States were also characterized as belonging to this subgenotype (Jenckel et al., 2014). It is not known, what are the implications for animal health of this Brazilian BVDV-2c isolate, since it was detected contaminating cell cultures. However, the emergence of this isolate raises concern about the possibility of this subgenotype to be spread in the country.

Hobi-like viruses represented 12.3% of the isolates described. These isolates were originally identified in FBS, cell culture and in samples obtained from cattle with clinical disease from different Brazilian States. This atypical pestivirus was first detected in Brazilian FBS (Schirrmeier et al., 2004) and in Brazilian buffalos (Stalder et al., 2005), but have been also detected in other countries from South America, Asia and Europe, in cattle naturally infected, FBS and contaminated cell cultures (Stahl et al., 2007; Liu et al., 2009a; Decaro et al., 2011; Mao et al., 2012; Haider et al., 2014; Mishra et al., 2014; Weber et al., 2014b). The increasing number of reports of this pestivirus worldwide may represent a threat for countries with BVDV eradication programs underway. Even for endemic countries with Hobi-like virus-positive status, it may also become an issue for international trade of animals and products with countries free of this pestivirus (Bauermann, 2013). Further studies are necessary to ascertain the relevance of these findings in terms of diagnostic, control and immunization strategies.

Eleven isolates from BVDV-1a, 1d, 2c and Hobi-like were detected in contaminated cell cultures or FBS. Contamination of FBS and cell culture by BVDV-1, BVDV-2 and Hobi-like virus have been often observed (Bolin and Ridpath, 1998; Xia et al., 2011; Uryvaev et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Gagnieur et al., 2014; Zhang et al., 2014). There are important concerns, since those are components of many biological products, like vaccines. Thereby, the international trade of FBS is a potential source of transboundary spread of pestivirus, as Hobi-like virus, and consequently, with implications for BVD control programs (Stahl et al., 2007; Luzzago et al., 2014).

The phylogenetic analysis and the pairwise genetic distances revealed a clear segregation between species and subgenotypes. The Brazilian pestivirus sequences had a large variation in the nucleotide sequence and showed a considerable difference in relation to reference strain sequences. Sequences in the 5'UTR tree from two isolates could not be classified, but in the other hand, the N^{pro} and the E2 tree allowed these sequences to cluster with BVDV-2b strains. In addition, bootstrap values for 5'UTR were lower than with the two other regions and in some branches, lower than desired to have a considerable confidence, as often observed in other studies (Becher et al., 1997; Vilcek et al., 2005, Gao et al., 2013; Gong et al., 2014). Therefore, analysis of the 5'UTR alone might not give the highest resolution for phylogenetic analysis and may cause confusion regarding subgenotype classification (Baule et al., 1997; Booth et al., 2013). In contrast, E2 and N^{pro} are well suited for phylogenetic analysis and could provide valuable information when unclear results are obtained from 5'UTR analysis (Becher et al., 2003; Giangaspero and Harasawa, 2014). Hence, at least two genomic regions of pestivirus should be analysed in order to correctly classify the isolates (Booth et al., 2013).

The present study provided a better understanding about genetic variability of pestivirus in Brazil where BVDV-1 was the most frequent pestivirus species detected, but BVDV-2 and Hobi-like were also detected. BVDV-1a and BVDV-2b were the most frequent found subgenotypes, but BVDV-1b, 1d, 1e and 2c were also detected, with the BVDV-1e and 2c being described for the first time in South America. This information may be useful for evaluating the diagnostic tools and for the development of more effective vaccines and may also contribute for pestivirus control and programs in Brazil.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgements

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) supported this study.

References

- Barros, S.C., F. Ramos, S. Paupério, G. Thompson, M. Fevereiro, 2006: Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res.* 118, 192–195.
- Bauermann, F. V., J.F. Ridpath, R. Weiblen, E.F. Flores, 2013: HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25, 6–15.
- Baule, C., M. Van Vuuren, J.P. Lowings, S. Bela, 1997: Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in Southern Africa. *Virus. Res.* 52, 205–220.
- Becher, P., R. Avalos Ramirez, M. Orlich, S. Cedillo Rosales, M. König, M. Schweizer, H. Stalder, H. Schirrmeyer, H.-J. Thiel, 2003: Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311, 96–104.
- Becher, P., M. Orlich, A. Kosmidou, M. Ko, M. Baroth, 1999: Genetic diversity of Pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology.* 71, 64–71.
- Becher, P., M. Orlich, A.D. Shannon, G. Horner, M. Ko, 1997: Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* 78, 1357–1366.
- Bianchi, E., M. Martins, R. Weiblen, E. F. Flores, 2011: Genotypic and antigenic profile of bovine viral diarrhoea virus isolates from Rio Grande do Sul, Brazil (2000-2010). *Pesq. Vet. Bras.* 31, 649–655.
- Bolin, S.R. and J.F. Ridpath, 1998: Prevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 10, 135–139.
- Booth, R.E., C.J. Thomas, L.M.R. El-Attar, G. Gunn, J. Brownlie, 2013: A phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from six different regions of the UK and links to animal movement data. *Vet. Res.* 44, 43.
- Botton, S.A., L.H.V.G. Gil, A.M. Silva, E.F. Flores, R. Weiblen, E.M. Pituco, P.M. Roehe, V. Moojen, A.C. Wendelstein, 1998: Preliminary characterization of Brazilian isolates of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Pesq. Vet. Bras.* 18, 83-90.
- Canal, C.W., M. Strasser, C. Hertig, A. Masuda, E. Peterhans, 1998: Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet. Microbiol.* 63, 85–97.
- Cortez, A., M.B. Heinemann, A.M.M.G. De Castro, R.M. Soares, A.M. V. Pinto, A.A. Alfieri, E.F. Flores, R.C. Leite, L.J. Richtzenhain, 2006: Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pesq. Vet. Bras.* 26, 211–216.
- Decaro, N., M. Losurdo, M.S. Lucente, R. Sciarretta, V. Mari, V. Larocca, G. Elia, N. Cavaliere, V. Martella, A. Fasanella, C. Buonavoglia, 2013: Persistent infection caused by Hobi-like pestivirus. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1241–3.
- Decaro, N., M.S. Lucente, V. Mari, F. Cirone, P. Cordioli, M. Camero, R. Sciarretta, M. Losurdo, E. Lorusso, C. Buonavoglia, 2011: Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1549–52.
- Decaro, N., M.S. Lucente, V. Mari, R. Sciarretta, P. Pinto, D. Buonavoglia, V. Martella, C. Buonavoglia, 2012: Hobi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. *J. Clin. Microbiol.* 50, 509-512.

- Deng, Y., C.-Q. Sun, S.-J. Cao, T. Lin, S.-S. Yuan, H.-B. Zhang, S.-L. Zhai, L. Huang, T.-L. Shan, H. Zheng, X.-T. Wen, G.-Z. Tong, 2012: High prevalence of bovine viral diarrhoea virus 1 in Chinese swine herds. *Vet. Microbiol.* 159, 490–493.
- Deregt, D., S. Gilbert, S. Dudas, J. Pasick, S. Baxi, K.M. Burton, M.K. Baxi, 2006: A multiplex DNA suspension microarray for simultaneous detection and differentiation of classical swine fever virus and other pestiviruses. *J. Virol. Methods* 136, 17–23.
- Flores, E.F., L.H.G. V. Gil, S.A. Botton, R. Weiblen, 2000: Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet. Microbiol.* 77, 175–183.
- Flores, E.F., J.F. Ridpath, R. Weiblen, F.S. Vogel, L.H.V. Gil, 2002: Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.* 87, 51–60.
- Gagnieur, L., J. Cheval, M. Gratigny, C. Hébert, E. Muth, M. Dumarest, M. Eloit, 2014: Unbiased analysis by high throughput sequencing of the viral diversity in fetal bovine serum and trypsin used in cell culture. *Biologicals.* 42, 145–52.
- Gao, S., J. Luo, J. Du, Y. Lang, G. Cong, J. Shao, T. Lin, F. Zhao, S. Belák, L. Liu, H. Chang, H. Yin, 2013: Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus in Western China. *Vet. Microbiol.* 163, 172–6.
- Giammarioli, M., L. Ceglie, E. Rossi, M. Bazzucchi, C. Casciari, S. Petrini, G.M. De Mia, 2014: Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. *Virus Genes.* doi:10.1007/s11262-014-1132-2
- Giangaspero, M. and R. Harasawa, 2014: Characterization of genotypes among bovine viral diarrhoea virus type 1 strains according to palindromic nucleotide substitutions in the genomic 5'-untranslated region. *J. Virol. Methods* 195, 34–53.
- Guindon, S. and O. Gascuel, 2003: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- Gong, X., L. Liu, F. Zheng, Q. Chen, Z. Li, X. Cao, H. Yin, J. Zhou, X. Cai, 2014: Molecular investigation of bovine viral diarrhoea virus infection in yaks (*Bos grunniens*) from Qinghai, China. *Virol. J.* 11, 29.
- Haider, N., M.S. Rahman, S.U. Khan, A. Mikolon, E.S. Gurley, M.G. Osmani, I.S. Shanta, S.K. Paul, L. Macfarlane-Berry, A. Islam, J. Desmond, J.H. Epstein, P. Daszak, T. Azim, S.P. Luby, N. Zeidner, M.Z. Rahman, 2014: Identification and epidemiology of a rare HoBi-like pestivirus strain in Bangladesh. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 193–8.
- Hornberg, A., S.R. Fernández, C. Vogl, S. Vilcek, M. Matt, M. Fink, J. Köfer, K. Schöpf, 2009: Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet. Microbiol.* 135, 205–13.
- Hurtado, A., A.L. García, G. Aduriz, R.A. Juste, 2003: Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus Res.* 92, 67–73.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015: Available at: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=3939&z=p&o=27&i=P> (accessed 08 January 2015).
- Jackova, A., M. Novackova, C. Pelletier, C. Audeval, E. Gueneau, A. Haffar, E. Petit, L. Rehby, S. Vilcek, 2008: The extended genetic diversity of BVDV-1: typing of BVDV isolates from France. *Vet. Res. Commun.* 32, 7–11.
- Jenckel, M., D. Höper, H. Schirrmeyer, I. Reimann, K. V. Goller, B. Hoffmann, M. Beer, 2014: Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent

- type 2 bovine viral diarrhoea virus detected by deep sequencing. *J. Virol.* 88, 6983–6992.
- Jones, L.R., R. Zandomeni, E.L. Weber, 2001: Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Vet. Microbiol.* 81, 367–375.
- Yesilbag, K., C. Forster, B. Bank-Wolf, Z. Yilmaz, F. Alkan, A. Ozkul, I. Burgu, S. C. Rosales, H. Thiel, M. Konig, 2008: Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a new subgroup in BVDV-1. *Vet. Microbiol.* 130, 258–267.
- Kim, S.G., R.R. Anderson, J.Z. Yu, N.C. Zylich, H. Kinde, S. Carman, D. Bedenice, E.J. Dubovi, 2009: Genotyping and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from BVDV infected alpacas in North America. *Vet. Microbiol.* 136, 209–216.
- Kimura, M., 1980: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Kuta, A., M.P. Polak, M. Larska, J.F. Żmudziński, 2013: Predominance of bovine viral diarrhoea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland. *Vet. Microbiol.* 166, 639–644.
- Liu, L., H. Xia, N. Wahlberg, S. Belák, C. Baule, 2009: Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology* 385, 351–357.
- Liu, L., J. Kampa, S. Belák, C. Baule, 2009: Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen. *Vet. Microbiol.* 138, 62–68.
- Liu, L., H. Xia, C. Baule, S. Belák, 2009: Maximum likelihood and Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic characterization of a novel pestivirus, SVA/cont-08. *Arch. Virol.* 154, 1111–1116.
- Lunardi, M., S. A. Headley, J. A N. Lisbôa, A M. Amude, A. A. Alfieri, 2008: Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. *Res. Vet. Sci.* 85, 599–604.
- Luzzago, C., S. Lauzi, E. Ebranati, M. Giammarioli, A. Moreno, V. Cannella, L. Masoero, E. Canelli, A. Guercio, C. Caruso, M. Ciccozzi, G.M. De Mia, P.L. Acutis, G. Zehender, S. Peletto, 2014: Extended genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. *Biomed Res. Int.* doi:10.1155/2014/147145.
- MacLachlan, N.J. and E.J. Dubovi, 2011: *Flaviviridae*. In: MacLachlan, N.J., and E.J. Dubovi (eds), *Fenner's Veterinary Virology*, 4th edn. pp. 467–481. Academic Press, London.
- Mahony, T.J., F.M. McCarthy, J.L. Gravel, B. Corney, P.L. Young, S. Vilcek, 2005: Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. *Vet. Microbiol.* 106, 1–6.
- Mao, L., W. Li, W. Zhang, L. Yang, J. Jiang, 2012: Genome sequence of a novel Hobi-like pestivirus in China. *J. Virol.* 86, 12444.
- Mishra, N., K. Rajukumar, A. Pateriya, M. Kumar, P. Dubey, S.P. Behera, A. Verma, P. Bhardwaj, D.D. Kulkarni, D. Vijaykrishna, N.D. Reddy, 2014: Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet. Microbiol.* 174, 239–46.
- Nagai, M., M. Hayashi, M. Itou, T. Fukutomi, H. Akashi, H. Kida, Y. Sakoda, 2008: Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes* 36, 135–139.

- Nagai, M., M. Hayashi, S. Sugita, Y. Sakoda, M. Mori, T. Murakami, T. Ozawa, N. Yamada, H. Akashi, 2004: Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus Res.* 99, 103–113.
- Oem, J.-K., J.-Y. Chung, I.-S. Roh, H.-R. Kim, Y.-C. Bae, K.-H. Lee, Y.-H. Jin, O.-S. Lee, 2010: Characterization and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus in brain tissues from nonambulatory (Downer) cattle in Korea. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 518–523.
- Oem, J.-K., B.-H. Hyun, S.-H. Cha, K.-K. Lee, S.-H. Kim, H.-R. Kim, C.-K. Park, Y.-S. Joo, 2009: Phylogenetic analysis and characterization of Korean bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* 139, 356–360.
- Oliveira, T.F.P., A.A. Fonseca, M.F. Camargos, A.M. de Oliveira, A.C. Pinto Cottorello, A.D.R. Souza, I.G. de Almeida, M.B. Heinemann, 2013: Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals* 41, 407–414.
- Pecora, A., D. A. Malacari, J.F. Ridpath, M.S. Perez Aguirreburualde, G. Combessies, A. C. Odeón, S. A. Romera, M.D. Golemba, A. Wigdorovitz, 2014: First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res. Vet. Sci.* 96, 204–212.
- Peterhans, E., C. Bachofen, H. Stalder, M. Schweizer, 2010: Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet. Res.* 41, 44.
- Pizarro-Lucero, J., M.-O. Celedón, M. Aguilera, A. de Calisto, 2006: Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet. Microbiol.* 115, 208–217.
- Ridpath, J.F., 2010: Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26, 105–121.
- Ridpath, J.F., R.W. Fulton, P.D. Kirkland, J.D. Neill, 2010: Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the Southwestern United States. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 184–191.
- Schirrneier, H., G. Strebelow, K. Depner, B. Hoffmann, M. Beer, 2004: Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 85, 3647–3652.
- Simmonds, P., P. Becher, M.S. Collet, E. A. Gould, F. X. Heinz, G. Meyers, T. Monath, A. Pletnev, C. M. Rice, K. Stiansny, H.J. Thiel, A. Weiner, J. Bukhet, 2011: Family *Flaviviridae*. In: King, A.M.Q., M.J. Adams, E.B. Carstens, E. Lefkowitz (eds), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. pp. 1003–1020. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
- Ståhl, K., M. Beer, H. Schirrneier, B. Hoffmann, S. Belák, S. Alenius, 2007: Atypical “HoBi”-like pestiviruses-recent findings and implications thereof. *Vet. Microbiol.* 142, 90–93.
- Stalder, H.P., P. Meier, G. Pfaffen, C.W. Canal, J. Rüfenacht, P. Schaller, C. Bachofen, S. Marti, H.R. Vogt, E. Peterhans, 2005: Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 72, 37–41.
- Strong, R., J. Errington, R. Cook, N. Ross-Smith, P. Wakeley, F. Steinbach, 2013: Increased phylogenetic diversity of bovine viral diarrhoea virus type 1 isolates in England and Wales since 2001. *Vet. Microbiol.* 162, 315–320.
- Tajima, M., H.-R. Frey, O. Yamato, Y. Maede, V. Moennig, H. Scholz, I. Greiser-Wilke, 2001: Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res.* 76, 31–42.

- Tamura, K., 1992: Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition -transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9, 678-687.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski, S. Kumar, 2013: MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Ularanu, H.G., K.P. Sibeko, A. B. Bosman, E.H. Venter, M. Van Vuuren, 2013: Genetic characterization of bovine viral diarrhoea (BVD) viruses: confirmation of the presence of BVD genotype 2 in Africa. *Arch. Virol.* 158, 155–163.
- Uryvaev, L.V., A.V. Dedova, L.V. Dedova, K.S. Ionova, N.A. Parasjuk, T.K. Selivanova, N.I. Bunkova, E.A. Gushina, T.V. Grebennikova, R.J. Podchernjaeva, 2012: Contamination of cell cultures with bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Bull. Exp. Biol. Med.* 153, 77-81.
- USDA – FAS, United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, 2015: Available at: http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf (accessed 08 January 2015).
- Vilcek, S., A. J. Herring, J. A. Herring, P. F. Nettleton, J. P. Lowings, D. J. Paton, 1994: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology.* 136, 309-323.
- Vilcek, S., D. J. Paton, B. Durkovic, L. Strojny, G. Ibata, A. Moussa, A. Loitsch, W. Rossmann, S. Vega, M. T. Scicluna, V. Paifi, 2001: Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archives of Virology.* 146, 99-115.
- Vilcek, S., B. Durkovic, M. Kolesarova, D.J. Paton, 2005: Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev. Vet. Med.* 72, 31–35.
- Weber, M.N., A.G. Galuppo, R.F. Budaszewski, A.O. Corbellini, A.C.S. Mósena, L.D. Pinto, L.S. Marques, J.L. Rodrigues, C.W. Canal, 2013: Evaluation of pre-nucleic acid extraction for increasing sensitivity of detection of virus in bovine follicular fluid pools. *Theriogenology.* 79, 980–985.
- Weber, M.N., A.C.S. Mósena, S.V.D. Simões, L.L. Almeida, C.R.M. Pessoa, R.F. Budaszewski, T.R. Silva, J.F. Ridpath, F. Riet-Correa, D. Driemeier, C.W. Canal, 2014: Clinical presentation resembling mucosal disease associated with “HoBi”-like pestivirus in a field outbreak. *Transbound. Emerg. Dis.* 1–9.
- Weber, M.N., S. Silveira, G. Machado, F.H.S. Groff, A.C.S. Mósena, R.F. Budaszewski, P.M. Dupont, L.G. Corbellini, C.W. Canal, 2014: High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Res.* 191, 117–24.
- Wolfmeyer, A., G. Wolf, M. Beer, W. Strube, H. Hehnen, 1997: Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch. Virol.* 142, 2049–2057.
- Xia, H., B. Vijayaraghavan, S. Belák, L. Liu, 2011: Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *PLoS One.* 6, 1-3.
- Yeşilbağ, K., C. Förster, M.O. Ozyiğit, G. Alpay, P. Tuncer, H.-J. Thiel, M. König, 2014: Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Vet. Microbiol.* 169, 42–9.

- Yilmaz, H., E. Altan, J. Ridpath, N. Turan, 2012: Genetic diversity and frequency of bovine viral diarrhea virus (BVDV) detected in cattle in Turkey. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 411–416.
- Zhang, S.-Q., B. Tan, P. Li, F.-X. Wang, L. Guo, Y. Yang, N. Sun, H.-W. Zhu, Y.-J. Wen, S.-P. Cheng, 2014: Comparison of conventional RT-PCR, reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, and SYBR green I-based real-time RT-PCR in the rapid detection of bovine viral diarrhea virus nucleotide in contaminated commercial bovine sera batches. *J. Virol. Methods* 207, 204–209.

Table 2 - Classification and accession number of pestivirus isolates analyzed.

Isolate	Pestivirus type/subgenotype			Accession number		
	5'UTR	N ^{pro}	E2	5'UTR	N ^{pro}	E2
LV/AM/09	BVDV-1b	BVDV-1b	BVDV-1b	KP715115	KP743050	KP743078
LV/S.Chico/09	BVDV-1b	BVDV-1b	BVDV-1b	KP715126	KP743061	KP743088
LV/Pato102/09	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KP715137	KP743045	KP743109
LV/Jaguari/09	BVDV-1b	BVDV-1b	BVDV-1b	KP715119	KP743054	KP743082
EVI006	BVDV-1a	-	BVDV-1a	KP715114	-	KP743067
VM96	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KP715141	KP743049	KP743113
M26TT	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KP715127	KP743062	KP743089
SV239/05	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KP715130	KP743065	KP743092
SV478/07	Hobi-like	Hobi-like	Hobi-like	KP715142	KP743038	KP743116
SV154/08	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KP715139	KP743047	KP743111
SV275/08	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KP715140	KP743048	KP743112
SV163/01	BVDV-1b	BVDV-1b	BVDV-1b	KP715128	KP743063	KP743090
SV216/02	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KP715129	KP743064	KP743091
SV663/00	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KP715131	KP743066	KP743093
SV011/03	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KP715138	KP743046	KP743110
LV/Itabajara/12	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KP715118	KP743053	KP743081
LV/LF80/11	BVDV-1d	BVDV-1d	BVDV-1d	JX122862.1	KP743059	KP743086
LV/LF15/12	BVDV-1e	BVDV-1e	BVDV-1e	KP715120	KP743055	KP743083
LV/LF43/12	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KP715121	KP743056	KP743084
LV/LF66/12	BVDV-1b	BVDV-1b	BVDV-1b	KP715122	KP743057	KP743085
LV/LF79/12	BVDV-1a	BVDV-1a	-	KP715123	KP743058	-
LV/Hipra01/12	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KP715132	KP743042	KP743106
LV01/12	Hobi-like	Hobi-like	Hobi-like	KC465388	KC465392	KC465396
LV02/12	Hobi-like	Hobi-like	Hobi-like	KC465389	KC465393	KC465397
LV04/12	Hobi-like	Hobi-like	Hobi-like	KC465391	KC465395	KC465399
LV/PB22487/12	Hobi-like	Hobi-like	Hobi-like	KP715144	KP743039	KP743115
LV/Hipra150/13	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KP715135	KP743043	KP743107
LV/N614/13	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KP715125	KP743060	KP743087
LV11-65/13	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KM007106.1	KM217386.1	KP715113
LV15-77/13	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KM007107.1	KM217387.1	KP743068
LV17-09/13	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KM007108.1	KM217388.1	KP743069
LV20-71/13	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KM007109.1	KM217389.1	KP743070
LV20-85/13	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KM007119.1	KM217399.1	KP743094
LV22-02/13	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KM007120.1	KM217400.1	KP743095
LV23-07/13	BVDV-1b	BVDV-1b	BVDV-1b	KM007110.1	KM217390.1	KP743071
LV28-31/13	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KM007121.1	KM217401.1	KP743096
LV33-18/13	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KM007112.1	KM217392.1	KP743072
LV40-30/13	BVDV-2b	BVDV-2b	-	KM007122.1	KM217402.1	-
LV49-21/13	BVDV-1b	BVDV-1b	BVDV-1b	KM007113.1	KM217393.1	KP743073
LV49-51/13	?	BVDV-2b	BVDV-2b	KM007123.1	KM217403.1	KP743097
LV55-85/13	BVDV-1d	BVDV-1d	BVDV-1d	KM007115.1	KM217395.1	KP743074

LV56-10/13	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KM007124.1	KM217404.1	KP743098
LV60-53/13	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KM007116.1	KM217396.1	KP743075
LV60-57/13	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KM007125.1	KM217405.1	KP743099
LV67-46/13	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KM007126.1	KM217406.1	KP743100
LV85-59/13	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KM007117.1	KM217397.1	KP743076
LV86-68/13	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KM007127.1	KM217407.1	KP743101
LV86-80/13	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KM007118.1	KM217398.1	KP743077
LV92-38/13	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KM007128.1	KM217408.1	KP743102
LV92-45/13	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KM007129.1	KM217409.1	KP743103
LV95-77/13	BVDV-2b	-	BVDV-2b	KM007130.1	-	KP743104
Embrapa2007	-	Hobi-like	-	-	KP743037	-
LV/N1156/13	BVDV-2b	BVDV-2b	BVDV-2b	KP715136	KP743044	KP743108
LV/C3P/13	BVDV-1d	BVDV-1d	BVDV-1d	KP715116	KP743051	KP743079
LV/N98/13	-	-	Hobi-like	-	-	KP743114
LV/BVDV158	?	BVDV-2b	-	KP715133	KP743040	-
LV/MDBK200/14	BVDV-1a	-	-	KP715124	-	-
LV/CER157/14	BVDV-1a	BVDV-1a	BVDV-1a	KP715117	KP743052	KP743080
LV/CRFK56/14	BVDV-2c	BVDV-2c	BVDV-2c	KP715134	KP743041	KP743105
LV/CER189/14	Hobi-like	-	-	KP715143	-	-

“-” not performed.

“?” unclassified.

(a)

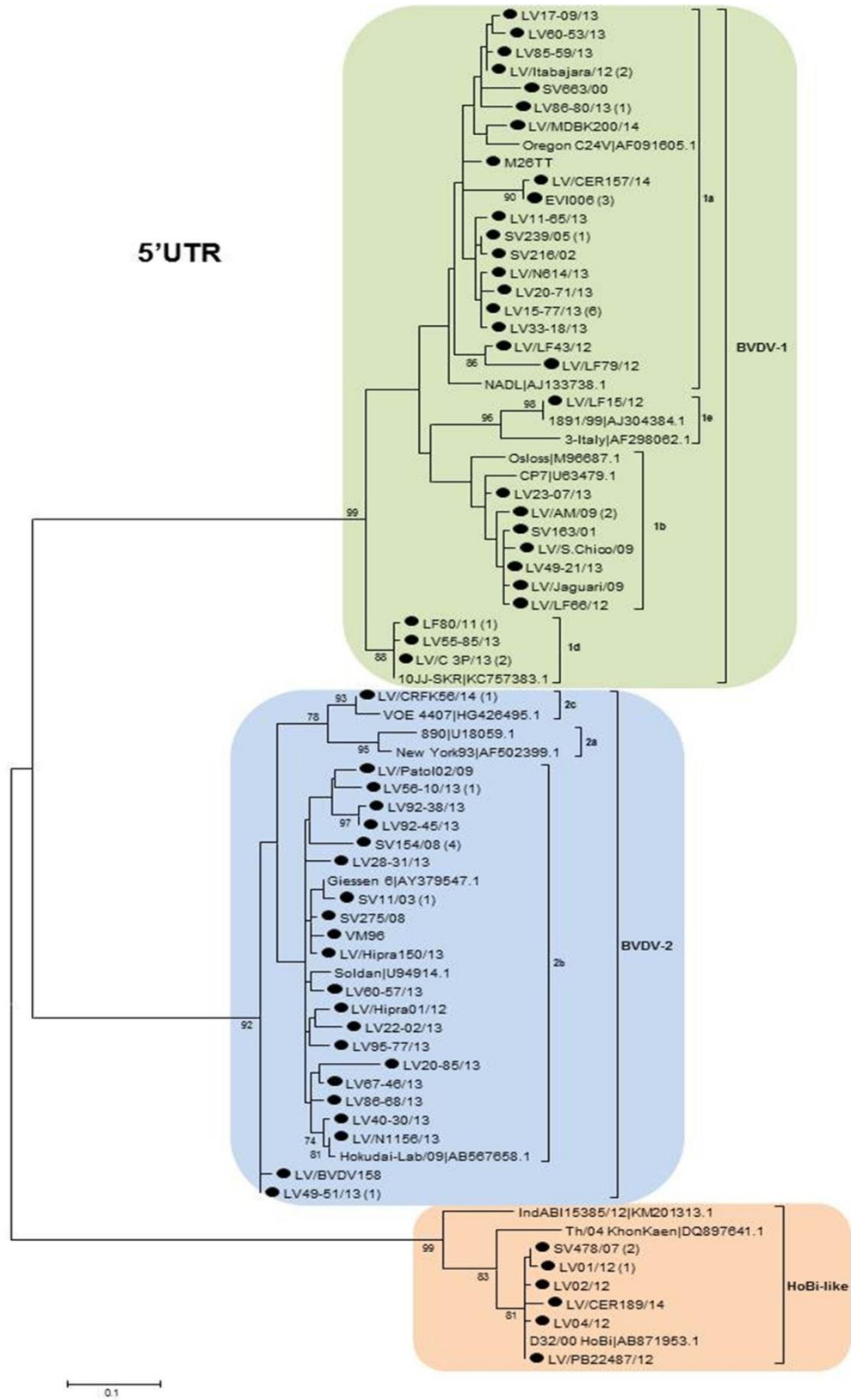
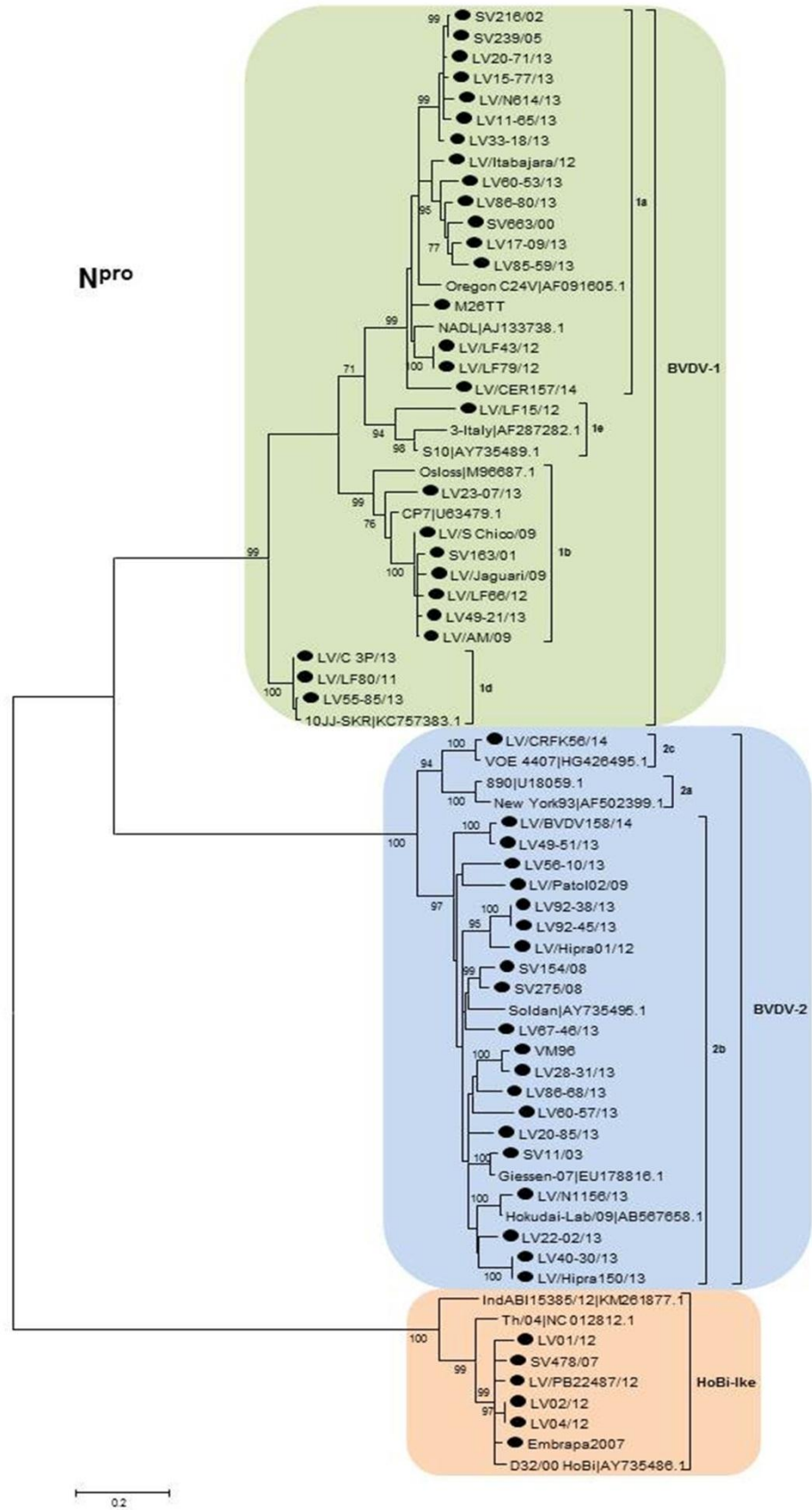
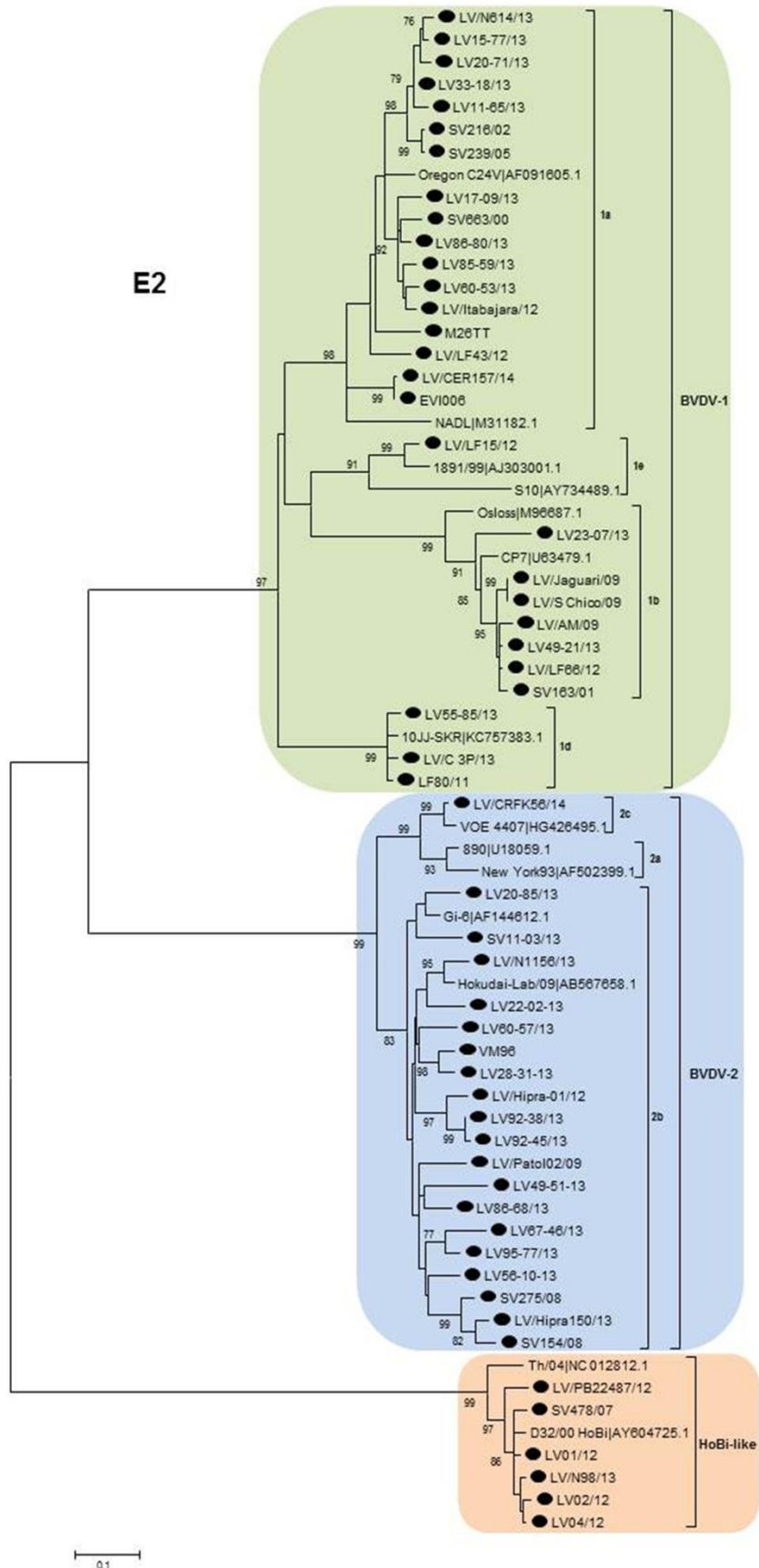


Fig. 1. The phylogenetic tree based on the 5'UTR (a), N^{pro} (b), E2 (c) sequences of reference strains and Brazilian pestivirus isolates. MEGA 6 was used for phylogeny inference according to maximum likelihood algorithm. Bootstrap supported by >70% of 1000 replicates are indicated in nodes. Brazilian pestivirus isolates are highlighted with a symbol (●). The GenBank accession numbers of the reference strains are listed after the strain names. The bar represents a genetic distance. Numbers in brackets (side of sequence name) in figure 1a represents the number of isolates with 100% identity in 5'UTR.

(b)



(c)



Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Description of 89 pestivirus isolates analysed

Table S1 - Description of 89 pestivirus isolates analysed

No	Isolate	Year of isolation	Estate of origin	Sample material	Remarks	Reference
1	LV/AM/09	2009	RS	serum	persistently infected animal(PI), farm with reproductive disorders	-
2	LV/S.Chico/09	2009	RS	serum	PI, farm with reproductive disorders	-
3	LV/Patol02/09	2009	RS	serum	PI, farm with reproductive disorders	-
4	LV/Jaguari/09	2009	RS	serum	PI, farm with reproductive disorders	-
5	EVI006	1995	RS	serum	calf without clinical presentation, farm with reproductive disorder	Botton et al., 1998
6	VM96 (LV96)	1996	RS	serum	chronic gastroenteric disease	Flores et al., 2000
7	M26TT	na	na	na		-
8	SV239/05	2005	MS	na	PI, farm with reproductive disorders	-
9	SV478/07	2007	MT	na	PI	-
10	SV154/08	2008	RS	serum	farm with previous infection of BVDV	Bianchi et al., 2011
11	SV275/08	2008	RS	serum	farm with reproductive disorders	Bianchi et al., 2011
12	SV163/01	2001	RS	spleen	Cow with respiratory disease and digestive disorders	Bianchi et al., 2011
13	SV216/02	2002	RS	serum	PI, with diarrhea, ulcerations in the digestive tract	Bianchi et al., 2011
14	SV663/00	2000	RS	serum	calf with respiratory disease and retarded growth	Bianchi et al., 2011
15	SV011/03	2003	RS	serum	calf with diarrhea	Bianchi et al., 2011
16	LV/Itabajara/12	2012	RS	serum	PI, farm with reproductive disorders	-
17	LV/LF80/11	2011	RS	follicular fluid	pool of follicular fluid collected in abattoir	Weber et al., 2013
18	LV/LF15/12	2012	SC	follicular fluid	pool of follicular fluid collected in abattoir	-
19	LV/LF43/12	2012	SC	follicular fluid	pool of follicular fluid collected in abattoir	-
20	LV/LF66/12	2012	SC	follicular fluid	pool of follicular fluid collected in abattoir	-
21	LV/LF79/12	2012	SC	follicular fluid	pool of follicular fluid collected in abattoir	-
22	LV/Hipra01/12	2012	RS	serum	farm with reproductive disorders	-
23	LV01/12	2012	PB	serum	PI, farm with reproductive disorders	Weber et al., 2014b
24	LV02/12	2012	PB	serum	PI, farm with reproductive disorders	Weber et al., 2014b
25	LV04/12	2012	PB	serum	PI, farm with reproductive disorders	Weber et al., 2014b
26	LV/PB22487/12	2012	PB	serum	PI, farm with reproductive disorders	-
27	LV/Hipra150/13	2013	RS	serum	farm with reproductive disorders	-
28	LV/N614/13	2013	RS	spleen		-
29	LV11-65/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
30	LV15-77/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
31	LV17-09/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
32	LV20-71/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
33	LV20-85/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
34	LV22-02/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
35	LV23-07/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
36	LV28-31/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c

37	LV33-18/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
38	LV40-30/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
39	LV49-21/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
40	LV49-51/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
41	LV55-85/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
42	LV56-10/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
43	LV60-53/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
44	LV60-57/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
45	LV67-46/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
46	LV85-59/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
47	LV86-68/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
48	LV86-80/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
49	LV92-38/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
50	LV92-45/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
51	LV95-77/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
52	Embrapa2007	2007	PR	na		-
53	LV/N1156/13	2013	na	spleen, thymus cell	farm with abortions	-
54	LV/C3P/13	2013	RS	culture		-
55	LV/N98/13	2013	MT	serum	farm with calf showing diarrhea, weakness	-
56	LV/BVDV158	na	RS	serum		-
57	LV/MDBK200/14	2014	RS	cell culture		-
58	LV/CER157/14	2014	RS	cell culture		-
59	LV/CRFK56/14	2014	RS	cell culture		-
60	LV/CER189/14	2014	RS	cell culture		-
61	LV/c- SFB/13	2013	RS	cell culture		-
62	AP1337	na	na	na		-
63	SV66/07	2007	RS	serum	gastroenteric disease	Bianchi et al., 2011
64	SV728/02	2002	na	serum	PI, asymptomatic calf	Bianchi et al., 2011
65	LV71	na	na	na		-
66	N1093/07	2007	na	na		-
67	LV15-83/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
68	LV29-44/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
69	LV40-29/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
70	LV40-40/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
71	LV55-16/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
72	LV56-27/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
73	LV56-85/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
74	LV90-31/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
75	LV108-11/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
76	LV49-62/13	2013	RS	serum		Weber et al., 2014c
77	SV284/08	2008	na	tissues	farm with reproductive disorders, calf with diarrhea and prostration	Bianchi et al, 2011
78	LF14/11	2011	RS	follicular fluid	pool of follicular fluid collected in abattoir	Weber et al., 2013

79	Cles	na	na	na		-
80	Storch	na	na	na		-
81	LV210185K/13	2013	na	FBS		-
82	LV/20650/14	2014	na	FBS		-
83	LV/MDBK10/14	2014	RS	cell culture		-
84	LV/MDBK18/14	2014	RS	cell culture		-
85	LV/CRFK301/14	2014	RS	cell culture		-
86	LV03/12	2012	PB	serum	PI, farm with reproductive disorders	Weber et al., 2014b
87	AP1275/13	2013	RS	spleen	PI, gastroenteric disease	-
88	LV210120K/13	2013	na	FBS		-
89	SV108/05	2005	RS	na	Heifer with chronic diarrhea	-

"na" not available

"-" isolates from this study

4 CONCLUSÕES

- BVDV-1 (53,9%) foi a espécie mais detectada, porém BVDV-2 (33,7%) e vírus Hobi-*like* (12,3%) também foram detectados.
- Os subgenótipos identificados foram BVDV-1a, 1b, 1d, 1e, 2b e 2c.
- BVDV-1e e 2c foram detectados pela primeira vez no Brasil.
- A topologia das árvores filogenéticas das três regiões genômicas foi similar. Porém, a análise filogenética da N^{pro} e da E2 se mostrou mais adequada e consistente para a classificação dos pestivírus analisados.
- As sequências dos isolados de pestivírus brasileiros tiveram uma grande variação na sequência de nucleotídeos e mostraram uma considerável diferença em relação às cepas de referência.
- Os resultados desta dissertação fornecem um maior entendimento sobre a diversidade genética dos pestivírus brasileiros, o que poderá auxiliar no desenvolvimento de vacinas e testes de diagnósticos mais eficazes, que contribuirão em futuros programas de controle e erradicação no País.

REFERÊNCIAS

- ANZILIERO, D. et al. Resposta sorológica aos herpesvírus bovino tipo 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 58-63, jan. 2015.
- ALMEIDA, L. L. et al. Herd-level risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 3, p. 901-7, dez. 2013.
- ARNAL, M. C. et al. A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). **Journal of General Virology**, v. 85, p. 3653-7, ago. 2004.
- AVALOS-RAMIREZ, R. et al. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. **Virology**, v. 286, n. 2, p. 456-65, 1 ago. 2001.
- BACHOFEN, C. et al. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 1-2, p. 93-102, 18 set. 2008.
- BAUERMANN, F. V; FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 253-61, mar. 2012.
- BAUERMANN, F. V et al. In vitro neutralization of HoBi-like viruses by antibodies in serum of cattle immunized with inactivated or modified live vaccines of bovine viral diarrhoea viruses 1 and 2. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 1-2, p. 242-5, 27 set. 2013.
- BAUERMANN, F. V et al. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 1, p. 6-15, jan. 2013.
- BAUERMANN, F. V et al. Generation of calves persistently infected with HoBi-Like pestivirus and comparison of methods for detection of these persistent infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 3845-52, nov. 2014.
- BAXI, M. et al. A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n. 1-3, p. 37-44, 25 ago. 2006.
- BECHER, P. et al. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. **Journal of General Virology**, p. 1357-66, 1997.

- BECHER, P. et al. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. **Virology**, v. 71, p. 64–71, 1999.
- BECHER, P. et al. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**, v. 311, n. 1, p. 96–104, jun. 2003.
- BEER, M.; REIMANN, I.; HOFFMANN, B.; DEPNER, K. Novel marker vaccines against classical swine fever. **Vaccine**, v. 25, p. 5665–70, 2007.
- BEHERA, S. P. et al. Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolated from cattle in India. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 2, p. 189–96, mar. 2011.
- BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. Fluorogenic RT ± PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 1–10, 2001.
- BIANCHI, E. et al. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 649–55, 2011.
- BOOTH, R. E. et al. A phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from six different regions of the UK and links to animal movement data. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 43, jan. 2013.
- BRODERSEN, B. W. Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 453–64, mar. 2014.
- CANAL, C. W. et al. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 63, n. 2-4, p. 85–97, out. 1998.
- CARMAN, S et al. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 27-35, 1998.
- CHILDS, T. X disease of cattle – Saskatchewan. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, n. 11, p. 316-9, 1946.
- COLLINS, M. E.; DESPORT, M.; BROWNLIE, J. Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. **Virology**, v. 259, n. 1, p. 85–98, 20 jun. 1999.

CORAPI, W. V; FRENCH, T. W; DUBOVI, E. J. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. **Journal of Virology**, v. 63, n. 9, p. 3934-3943, 1989.

CORTEZ, A. et al. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, n. 4, p. 211-16, 2006.

DECARO, N. et al. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1549-52, 2011.

DECARO, N. et al. HoBi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 509-12, 2012.

DECARO, N. et al. Persistent infection caused by Hobi-like pestivirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1241-3, abr. 2013.

DECARO, N. et al. Mucosal disease-like syndrome in a calf persistently infected by Hobi-like pestivirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 2946-54, ago. 2014.

DOMINGO, E., SHELDON, J., PERALES, C. Viral quasispecies evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 2, p. 159-216, 2012.

DUBOIS, E. et al., Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p. 69-79, 2008.

DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 8-13, jan. 2013.

FLORES, E. F. et al. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, v. 87, n. 1, p. 51-60, jul. 2002.

FLORES, E. F. et al. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil Viral - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 25, n. 3, p. 125-134, 2005.

FULTON, R. W. et al. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 89-95, jun. 2003.

GAO, S. et al. Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhea virus in Western China. **Veterinary Microbiology**, v. 163, n. 1-2, p. 172-6, 12 abr. 2013.

GIAMMARIOLI, M. et al. Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 3-4, p. 231–6, 27 jan. 2011.

GIAMMARIOLI, M. et al. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. **Virus Genes**, 28 out. 2014, DOI 10.1007/s11262-014-1132-2.

GIVENS, M. et al. Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhoea virus in semen samples from the Southeastern United States. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 145–55, out. 2003.

GRONDAHL, C. et al. Characterization of a pestivirus isolated from persistently infected mousedeer (*Tragulus javanicus*). **Archives of Virology**, v. 148, p. 1455-63, 2003.

HAIDER, N. et al. Identification and epidemiology of a rare HoBi-like pestivirus strain in Bangladesh. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, n. 3, p. 193–8, jun. 2014.

HE, C.-Q. et al. Evidence of natural recombination in classical swine fever virus. **Virus Research**, v. 126, n. 1-2, p. 179–85, jun. 2007.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 89–107, jan. 1999.

HOUE, H.; LINDBERG, A.; MOENNIG, V. Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 5, p. 427–436, 1 set. 2006.

IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2015. Disponível em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=3939&z=p&o=27&i=P>>. Acesso em: 08 jan. 2015.

JACKOVA, A et al. The extended genetic diversity of BVDV-1: typing of BVDV isolates from France. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 1, p. 7–11, jan. 2008.

JONES, L. R. ZANDOMENI, R.; WEBER, E. L. Quasispecies in the 5h untranslated genomic region of bovine viral diarrhoea virus from a single individual. **Journal of General Virology**, p. 2161–8, 2002.

JONES, L. R.; WEBER, E. L. Homologous recombination in bovine pestiviruses. Phylogenetic and statistic evidence. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 335–43, dez. 2004.

KALAYCIOGLU, A.T. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) diversity and vaccination. **Veterinary Quarterly**, v. 29, n.2, p. 60-7, 2011.

KIRKLAND, P. D. et al. Identification of a novel virus in pigs-Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. **Virus Research**, v. 129, n. 1, p. 26–34, out. 2007.

KUTA, A et al. Predominance of bovine viral diarrhea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 639–44, 25 out. 2013.

LANYON, S. R. et al. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. The **Veterinary journal**, v. 199, n. 2, p. 201–9, fev. 2014.

LAURING, A. S; ANDINO, R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p.1-8, 2010.

LEE, K. M; GILLESPIE, J. H. Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, p. 952-2, 1957.

LETELLIER, C. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. **Journal of Virological Methods**, v. 114, n. 1, p. 21–7, dez. 2003.

LINDBERG, A. L.; ALENIUS, S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 2-3, p. 197–222, jan. 1999.

LINDBERG, A; HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1-2, p. 55–73, 15 nov. 2005.

LINDENBACH, B. D. et al., Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M and P. M. Howley (org). **Fields Virology**. 5th. Phyladelphia: Lippincott-Raven, 2007, cap. 33, p. 1101 - 52.

LIU, L. et al. A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. **Journal of Virological Methods**, v. 154, n. 1-2, p. 82–5, dez. 2008.

LIU, L. et al. Maximum likelihood and Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic characterization of a novel pestivirus, SVA/cont-08. **Archives of Virology**, v. 154, n. 7, p. 1111–6, jan. 2009.

LIU, L. et al. Effects of methodology and analysis strategy on robustness of pestivirus phylogeny. **Virus Research**, v. 147, n. 1, p. 47–52, jan. 2010.

LOWINGS, P. et al. Classical swine fever virus diversity and evolution. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 1311–21, 1996.

LUZZAGO, C. et al. Extended genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-8, jan. 2014.

HORZINEK, M. C. The structure of togaviruses. **Progress in Medical**, v. 16, p. 109-56, 1973.

HUGHS, L. E.; KERSHAW, G. F.; SHAW, I. G. “B” or border disease: an undescribed disease of sheep, **Veterinary Record**, v. 71, p. 313-317, 1959.

MACLACHLAN, N.J. and E.J. Dubovi: *Flaviviridae*. In: MacLachlan, N.J., and E.J. Dubovi (Org.). **Fenner’s Veterinary Virology**. London: Academic Press, 2011. 4th edn. p. 467–81.

MAHONY, T. J. et al. Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 1-2, p. 1–6, 20 mar. 2005.

MAO, L. et al. Genome sequence of a novel Hobi-like pestivirus in China. **Journal of Virology**, v. 86, n. 22, p. 12444, nov. 2012.

MINAMI, F. et al. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhoea virus subgenotypes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p. 35–9, jan. 2011.

MISHRA, N. et al. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 3-4, p. 207–12, 9 dez. 2004.

MISHRA, N. et al. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. **Veterinary Microbiology**, v. 174, n. 1-2, p. 239–46, 7 nov. 2014.

NAGAI, M. et al. Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan. **Archives of Virology**, v. 146, n. 4, p. 685–96, 9 maio 2001.

NAGAI, M. et al. Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. **Virus Research**, v. 99, n. 2, p. 103–13, fev. 2004.

NAGAI, M. et al. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolated in Japan. **Virus Genes**, v. 36, n. 1, p. 135–9, fev. 2008.

NEILL, J. D. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 2–7, jan. 2013.

NETTLETON, P. F. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. **Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.** v. 9, n. 1, p. 131–50, 1990.

NETTLETON, P. Bovine viral diarrhoea virus: biology, diagnosis and control. **The Veterinary Record**, v. 172, n. 17, p. 447–8, maio 2013.

NEWCOMER, B. W.; GIVENS, M. D. Approved and experimental countermeasures against pestiviral diseases: Bovine viral diarrhoea, classical swine fever and border disease. **Antiviral Research**, v. 100, n. 1, p. 133–50, out. 2013.

OEM, J.-K. et al. Phylogenetic analysis and characterization of Korean bovine viral diarrhoea viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 3-4, p. 356–60, nov. 2009.

OGUZOGLU, T. C. et al. Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup? **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 3-4, p. 374–9, 30 mar. 2009.

OĞUZOĞLU, T. Ç. et al. Molecular characteristics of bovine virus diarrhoea virus 1 isolates from Turkey: approaches for an eradication programme. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 4, p. 303–10, ago. 2012.

OIE. Bovine viral diarrhoea. In: **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 6. ed. Paris: Office International des Epizooties, 2008. p. 698–711.

OLAFSON, P. et al. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Vet**, v. 36, p. 205-13, 1946.

PAN, C.H. et al. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus in Taiwan. **Archives of Virology**, v. 150, p. 1101–19, 2005.

PASSLER, T.; WALZ, P. H. Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. **Animal health research reviews**, v. 11, n. 2, p. 191–205, dez. 2009.

PATON, D.J. et al. Genetic typing of classical swine fever virus. **Veterinary Microbiology**, v. 73, p. 137-57, 2000.

PECORA, A. et al. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 1, p. 204–12, fev. 2014.

PETERHANS, E. et al. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. **Veterinary Research**, v. 41, n. 6, p. 44, 2010.

PIZARRO-LUCERO, J. et al. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1-3, p. 208–17, 15 jun. 2006.

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

POSTEL, A. et al. Classical swine fever virus isolates from Cuba form a new. **Veterinary Microbiology**, v. 161, p. 334–8, 2013.

QUINCOZES, C. G. et al. Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Ciências Agrárias**, v. 28, n.2, p. 269–76, abr, jun 2007.

RAMSEY, F. K; CHIVERS, W. H. Mucosal disease of cattle. **North Am Vet**, v. 34, p. 629-33, 1953.

RIDPATH, J. F; BOLIN, S. R; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, p. 66-74, 1994.

RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 127–31, jun. 2003.

RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. The Veterinary clinics of North America. **Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 105–21, mar. 2010.

RIDPATH, J. F. et al. Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 2, p. 184–191, 1 mar. 2010.

RIDPATH, J. F.; BAUERMAN, F. V; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária - Virologia geral e doenças víricas**. Santa Maria: Editora UFSM, 2nd. ed. 2012. p. 657–90.

RIDPATH, J. F. Immunology of BVDV vaccines. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 14–9, jan. 2013.

SAKODA, Y. et al. Genetic heterogeneity of porcine and ruminant pestiviruses mainly isolated in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 75–86, fev. 1999.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 123-34, 1999.

SANDVIK, T. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 151–69, mar. 2004.

SCHIRRMEIER, H. et al. 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. 3647–52, dez. 2004.

SCHWEIZER, M.; PETERHANS, E. Pestiviruses. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 2, p. 141–63, fev. 2014.

SIMMONDS, P., et al. Family *Flaviviridae*. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E. (eds), **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2011, p. 1003–1020.

SINGH, K. et al. Development of a novel diagnostic test for detection of bovine viral diarrhoea persistently infected animals using hair. **Journal of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 295, 2011.

STÅHL, K. et al. Atypical “HoBi”-like pestiviruses--recent findings and implications thereof. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 90–3, 21 abr. 2007.

STALDER, H. P. et al. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1-2, p. 37–41, 15 nov. 2005.

TAJIMA, M. et al. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. **Virus Research**, v. 76, n. 1, p. 31–42, jul. 2001.

TAMURA, K et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725–9, 2013.

THABTI, F et al. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. **Archives of Virology**, v. 150, p. 215–29, 2005.

TERPSTRA, C., WENSVOORT, G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. **Res Vet Sci**, v.45, n.2, p. 137-42, 1988.

THOMPSON, J. A. et al. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle

in the State of Paraíba, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 76, n. 3-4, p. 290–301, 17 out. 2006.

ULARAMU, H. G. et al. Genetic characterization of bovine viral diarrhoea (BVD) viruses: confirmation of the presence of BVD genotype 2 in Africa. **Archives of Virology**, v. 158, n. 1, p. 155–63, jan. 2013.

USDA – FAS, United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> Acesso em: 8 jan. 2015.

VAN CAMPEN, H. et al. Isolation of bovine viral diarrhea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 2, p. 306–11, abr. 2001.

VILCEK, S et al. Genetic identification of pestivirus strain Frieters as a border disease virus from pigs. **Journal Virological Methods**, v.60, p.103-8, 1996.

VILCEK, S et al. Molecular characterization of ovine pestiviruses. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 725-35, 1997.

VILCEK, S et al. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of Virology**. v.146, p. 99-115, 2001.

VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESÁROVÁ, M.; GREISER-WILKE, I.; PATON, D. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. **Veterinary Research**, v. 35, p. 609–15, 2004.

VILCEK, S. et al. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1-2, p. 31–515 nov. 2005.

VILCEK, S.; NETTLETON, P. F. Pestiviruses in wild animals. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n. 1-3, p. 1–12, 25 ago. 2006.

WEBER, M et al. Bovine viral diarrhea in Brazil: current status and future perspectives. **British Journal of Virology**, v. 1, n. 3, p. 92-7, 2014a.

WEBER, M. N. et al. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with “HoBi”-like pestivirus in a field outbreak. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 1–9, 16 abr. 2014b.

WEBER, M. N. et al. High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. **Virus Research**, v. 191, p. 117–24, 13 out. 2014c.

WEBER, M. N. et al. Homologous recombination in pestiviruses: identification of three putative novel events between different subtypes/genogroups. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 219-24, 2015.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A E. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 343-6, jan. 2001.

XUE, F. et al. Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China between 2005 and 2008. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 2-4, p. 379-83, 14 jul. 2010.

YESILBAG, K. et al. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a new subgroup in BVDV-1. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3-4, p. 258-67, 25 ago. 2008.

YEŞILBAĞ, K. et al. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. **Veterinary Microbiology**, v. 169, n. 1-2, p. 42-9, 21 fev. 2014.

YILMAZ, H. et al. Genetic diversity and frequency of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detected in cattle in Turkey. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 5, p. 411-6, set. 2012.

ZHANG, S.-Q. et al. Comparison of conventional RT-PCR, reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, and SYBR green I-based real-time RT-PCR in the rapid detection of bovine viral diarrhoea virus nucleotide in contaminated commercial bovine sera batches. **Journal of Virological Methods**, v. 207, p. 204-9, out. 2014.