

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

ANA CRISTINA SBARAINI MÓSENA

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE BVDV-1 SUBTIPO I E VÍRUS ‘HOBI’-
LIKE DETECTADOS NO BRASIL**

PORTO ALEGRE

2017

ANA CRISTINA SBARAINI MÓSENA

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE BVDV-1 SUBTIPO I E VÍRUS
'HOBI'- *LIKE* DETECTADOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção
do grau de Mestre em Ciências Veterinárias da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**ORIENTADOR: CLÁUDIO WAGECK
CANAL**

PORTO ALEGRE

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Mosena, Ana Cristina Sbaraini
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE BVDV-1 SUBTIPO I E
VÍRUS 'HOBI'- LIKE DETECTADOS NO BRASIL / Ana Cristina
Sbaraini Mosena. -- 2017.
96 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, 2017.

1. pestivírus. 2. 'HoBi'-like. 3. BVDV. 4.
filogenia. I. Canal, Cláudio Wageck, orient. II.
Titulo.

Ana Cristina Sbaraini Mósena

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE BVDV-1 SUBTIPO I E VÍRUS ‘HOBI’-LIKE
DETECTADOS NO BRASIL**

Dissertação aprovada em 23 de fevereiro de 2017, como requisito parcial para obtenção de 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

Prof^ª Dr^ª Ana Beatriz Gorini da Veiga
Membro da Comissão

Prof^ª Dr^ª Ana Paula Ravazzolo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Nilo Ikuta
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por todo amor, dedicação e apoio; à minha irmã pela ajuda e companheirismo; ao Gustavo, pelo carinho e pela disposição.

Ao Laboratório de Virologia da FaVet, por abrir as portas, disponibilizado oportunidades, e por ter me concedido grandes mestres e colegas, que acima de tudo se mostraram grandes amigos, e que levarei para sempre comigo.

Aos amigos da FaVet, pela presença ao longo dos anos.

A todos que encontrei durante esta caminhada, e que de algum jeito a fizeram melhor, obrigada a todos!

RESUMO

O gênero *Pestivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, é constituído por espécies virais de importância na saúde animal no mundo todo, as quais podem afetar a economia dos países de forma impactante. São reconhecidas quatro espécies pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV): vírus da peste suína clássica (*Classical Swine Fever Virus* – CSFV), vírus da doença da fronteira (*Border Disease Virus*- BDV), vírus da diarreia viral bovina tipo 1 (*Bovine Viral Diarrhea Virus 1*- BVDV-1) e 2 (BVDV-2). Algumas das espécies deste gênero- CSFV e BVDV- são de notificação obrigatória na Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), causando sanções econômicas importantes quando presentes. Recentemente, possíveis novas espécies vêm sendo caracterizadas, porém ainda não foram reconhecidas como espécies do gênero *Pestivirus*. Com o objetivo de gerar mais informações acerca da diversidade genética de pestivírus no país, o presente trabalho descreve os genomas completos e a caracterização genômica e filogenética de uma cepa de BVDV-1 subtipo i e duas de vírus ‘HoBi’-like. Os genomas completos foram obtidos através de sequenciamento de nova geração; as anotações, predição da poliproteína viral e dos sítios de clivagem foram feitos através do software Geneious, e a análise filogenética foi realizada através do software MEGA 6. O BVDV-1 subtipo i foi pela primeira vez isolado no Brasil, sendo também a primeira descrição de genoma completo deste subtipo de BVDV. Também foi descrito o genoma completo de duas cepas de vírus ‘HoBi’-like isolados no Brasil, além da caracterização de outras cepas de ‘HoBi’-like disponíveis em bancos de dados. Os dados moleculares destes isolados foram comparados com aqueles das demais espécies do gênero *Pestivirus*, e estas informações deverão auxiliar na futura classificação deste como espécie. Os resultados apresentados na dissertação adicionam conhecimento sobre a diversidade genética de BVDV-1 no Brasil além de informações acerca do vírus ‘HoBi’-like, reforçando esta espécie ainda não reconhecida como um novo membro do gênero *Pestivirus*, os ‘HoBi’-like vírus.

Palavras-chave: pestivírus, BVDV, ‘HoBi’-like, , filogenia.

ABSTRACT

The genus Pestivirus, within the family Flaviviridae, includes species that are important pathogens affecting animal health that can cause impacting losses in the economy worldwide. According to the International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV), there are four recognized species in this genus: Classical swine fever virus (CSFV), Bovine Viral Diarrhea Virus1 and 2 (BVDV -1, BVDV-2), and Border disease virus (BDV). Some of the species within this genus - CSFV and BVDV- are notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE), and can cause exportation barriers or sanctions. Other putative new species have been characterized recently, but remain officially unrecognized. In order to generate data about the genetic diversity of pestivirus in Brazil, this study describes complete genomes and the genomic and phylogenetic characterization of an isolate of BVDV-1i and two isolates of 'HoBi'-like virus. Complete genomes were sequenced through Next Generation Sequencing; genome annotations, polyprotein prediction and identification of cleavage sites were performed with software Geneious, and phylogenetic analysis with software MEGA 6. BVDV-1 subtype i was found in Brazil for the first time, and this is the first complete genome ever characterized for this subtype. Two strains of 'HoBi-like' virus isolated in Brazil were also described and characterized together with other 'HoBi'-like strains available in databases. The molecular data obtained for these isolates were compared to those of other Pestivirus species. These data can help in future classification of these 'HoBi'-like strains as a new recognized species. The knowledge on genetic diversity and the characterization of pestiviruses can contribute with surveillance programs and with appropriate animal health measures to control these viral diseases.

Key Words: pestivirus, BVDV, 'HoBi'-like, phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia da família <i>Flaviviridae</i>.....	12
Figura 2. Análise filogenética de espécies do gênero <i>Pestivirus</i>.....	14
Figura 3. Consequências da infecção persistente e infecção transitória pelo BVDV	18
Figura 4. Esquema de organização do genoma de pestivírus, da poliproteína viral e dos sítios de clivagem.	22
Figura 5. Representação da estrutura secundária da região 5'UTR do genoma.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ADAR	adenosina deaminase que age no RNA
BDV	Vírus da doença da fronteira
BVDV-1	Vírus da diarreia viral bovina 1
BVDV-2	Vírus da diarreia viral bovina 2
C	capsídeo
CP	citopático
CSFV	Vírus da peste suína clássica
DM	doença das mucosas
E	estrutural
GTP	guanosina trifosfatada
HCV	Vírus da hepatite C
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IFN	Interferon
IRES	sítio interno de eUTRada no ribossomo
IRF	Fator regulatório de Interferon
NCP	não citopático
NS	não estrutural
NTP	nucleotídeo trifosfatado
NTPase	nucleotídeo trifosfatase
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
ORF	fase de leitura aberta
PI	persistentemente infectado
RpRd	RNA polimerase RNA dependente
SFB	soro fetal bovino
SL	<i>stem loop</i>
UTR	Região não traduzida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	Taxonomia	12
3.2	Espécies do gênero <i>Pestivirus</i>	14
3.2.1	Peste Suína Clássica	14
3.2.2	Doença da Fronteira	15
3.2.3	Vírus da Diarreia Viral Bovina 1 e 2	16
3.2.4	Vírus ‘HoBi’-like	19
3.3	Diversidade genética dos pestivírus	20
3.3.1	Filogenia	20
3.3.2	Diversidade genética interespecies	20
3.3.3	Diversidade genética intraespecies	21
3.4	Genoma	22
3.4.1	Região 5’ não traduzida do genoma	22
3.4.2	N ^{pro}	24
3.4.3	E2	25
3.4.4	NS2	27
3.4.5	NS3	28
3.4.6	NS5B	29
3.4.6	Região 3’ não traduzida do genoma	30
4	ARTIGOS	32
4.1	Artigo I	33
4.2	Artigo II	41
5	DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
6	REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira se destaca no agronegócio mundial. O Brasil possui o segundo maior rebanho do mundo, sendo líder nas exportações mundiais (BRASIL-BOVINOS E BUBALINOS, 2016). Neste cenário, a saúde animal é importante tanto para diminuir perdas econômicas, quanto para evitar sanções e barreiras sanitárias. Isto é assegurado com a adoção de medidas de controle de doenças, especialmente as causadas por vírus (BRASIL- SANIDADE ANIMAL, 2009).

O gênero *Pestivirus* causa grandes perdas econômicas (HOUE, 2003), e algumas espécies deste gênero estão incluídas em listas de notificação da OIE (OIE-LISTED DISEASES, INFECTIONS AND INFESTATIONS IN FORCE IN 2017, 2017). O gênero possui quatro espécies reconhecidas: vírus da peste suína clássica (CSFV), vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV-1), BVDV-2 e vírus da doença da fronteira (BDV) (SIMMONDS et al., 2011). Estas espécies possuem uma grande diversidade genética, gerando inclusive a classificação das espécies em subgrupos; o BVDV-1, por exemplo, possui mais de 17 subtipos descritos (VILCEK et al., 2001). O conhecimento sobre a presença de pestivírus e a diversidade destes é de extrema importância para realização de programas de monitoramento, teste de diagnóstico eficientes e promoção da saúde do rebanho. Bovinos são hospedeiros naturais do BVDV-1 e 2. A infecção aguda por esses vírus desencadeia distúrbios reprodutivos, defeitos congênitos, morte de animais jovens e, ainda, pode gerar animais persistentemente infectados (PI), causando prejuízos para a saúde animal e para a economia mundial, já que o vírus apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todo o mundo (HOUE, 2003). Outro pestivírus de bovinos que vem ganhando destaque pela distribuição global é o grupo dos vírus 'HoBi'-like, que, apesar de ser somente uma possível espécie, já causa preocupação pela contaminação de produtos biológicos e pela infecção cursar com mesmos quadros clínicos em bovinos que o BVDV-1 e 2 (STÅHL et al., 2010; DECARO et al., 2013; WEBER et al., 2014a). No Brasil, o BVDV-1, 2 e a possível nova espécie dos vírus 'HoBi'-like foram detectados no rebanho bovino (CANAL et al., 1998; FLORES et al., 2000; SILVEIRA et al., 2015).

Com o objetivo de gerar maiores informações sobre a diversidade de pestivírus em bovinos no Brasil, esta dissertação descreve a detecção, pela primeira vez no Brasil, do BVDV-1 subtipo i, gerando o primeiro sequenciamento de genoma completo deste subtipo. Também foram sequenciados genomas completos de dois isolados de vírus 'HoBi'-like detectados em diferentes regiões do Brasil, caracterizando genômica e filogeneticamente estes e outros genomas completos desta possível nova espécie.

2. OBJETIVOS

Os resultados, discussões e conclusões desta dissertação objetivam esclarecer os seguintes pontos:

- Contribuir com conhecimento sobre a diversidade de pestivírus em bovinos no Brasil;
- Disponibilizar em bancos de dados o sequenciamento de genoma completo de uma cepa de BVDV-1 subtipo i e duas cepas de vírus ‘HoBi’-like do Brasil, aumentando o número de sequências de genoma completo de pestivírus disponíveis em bancos de dados;
- Caracterizar genômica e filogeneticamente a provável espécie dos vírus ‘HoBi’-like, contribuindo para uma futura classificação destes vírus no gênero *Pestivirus*;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Taxonomia

A família *Flaviviridae* não está incluída em nenhuma ordem viral, de acordo com o ICTV. É composta por inúmeros vírus de importância na saúde humana e animal, incluindo oficialmente, pelo ICTV, quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*. Dentro destes gêneros, a inclusão de espécies é determinada por inúmeros critérios, como sequência de nucleotídeos e amino ácidos, antigenicidade, associação de vetores-hospedeiros- sintomas; o principal critério utilizado é a comparação da sequência de nucleotídeos e a filogenia (Figura 1) (ICTV- FLAVIVIRIDAE, 2017).

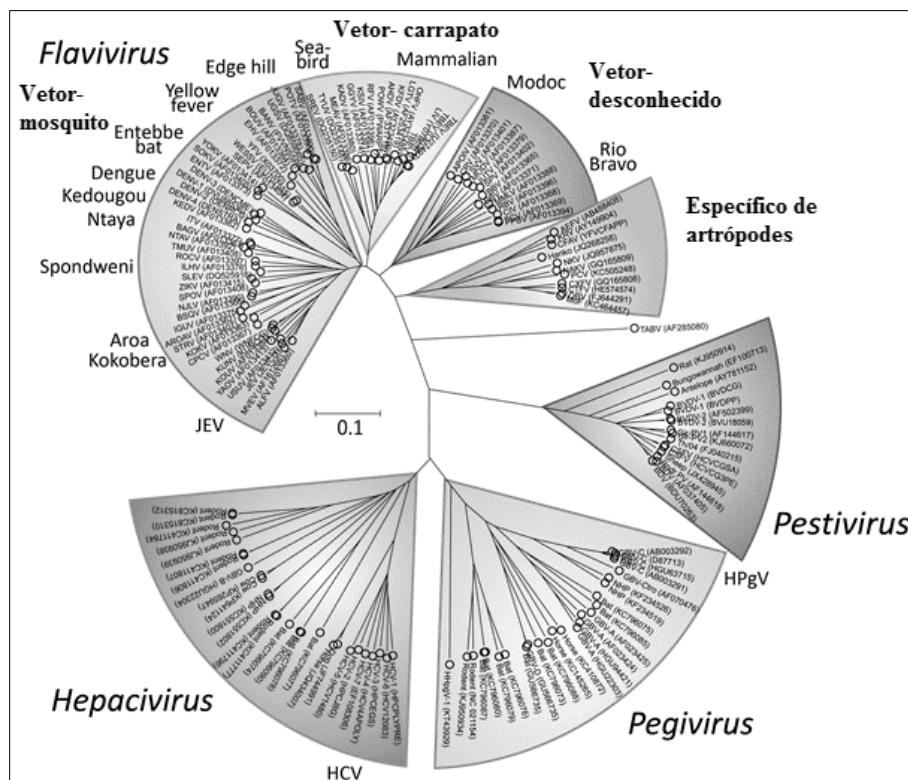


Figura 1. Filogenia da família Flaviviridae. Esta árvore foi baseada na sequência de amino ácidos da RNA polimerase viral dos flavivírus, e os gêneros estão demonstrados em clusters distintos (ICTV- FLAVIVIRIDAE, 2017).

Dentro do gênero *Flavivirus*, os vírus são transmitidos aos hospedeiros por artrópodes, mosquitos ou carrapatos (arbovírus), e como característica única do genoma dos flavivírus há uma estrutura de *cap* na 5'UTR (ICTV- GENUS: FLAVIVIRUS, 2017). Dentre as espécies do gênero, 54 no total, estão importantes agentes como o *Vírus da dengue*, o *Vírus da febre amarela*, *Vírus da encefalite japonesa* e *Vírus da Zika* (BORDI et al., 2016). A

espécie referência do gênero é o vírus da Febre Amarela.

A única espécie de hepacivírus reconhecida é o *Vírus da hepatite C*, que ocorre somente em humanos. As características que distinguem os membros do gênero *Hepacivirus* são a transmissão direta entre humanos e a replicação limitada dos vírus em cultivo celular (ICTV- GENUS: HEPACIVIRUS, 2017).

O gênero *Pegivirus* foi reconhecido como pertencente à família *Flaviviridae* somente em 2012. Dentre as espécies descritas no gênero estão o *Pegivirus A* e *B*, encontrados em hospedeiros primatas e morcegos, respectivamente, sendo que a infecção pode ser persistente mas sem sinais clínicos relacionados (ICTV- GENUS: PEGIVIRUS, 2017). Além da posição distante na filogenia, membros deste gênero possuem características genômicas distintas, como a proteína do capsídeo sem homologia com os outros flavivírus (STAPLETON et al., 2011).

O gênero *Pestivirus* abriga vários vírus de importância na saúde animal, sendo que dentro do gênero são reconhecidas quatro espécies: CSFV, BVDV-1, BVDV-2 e BDV (SIMMONDS et al., 2011). As características genômicas únicas dos membros deste gênero são duas proteínas exclusivas, a N^{pro} e E^{ms}, e a existência de dois biotipos, o citopático (CP) e não citopático (NCP) (BECHER et al., 2011). Recentemente, possíveis novas espécies vêm sendo propostas e caracterizadas, dentre elas: pestivírus de girafa (AVALOS-RAMIREZ et al., 2001), pestivírus de antílope (VILCEK et al., 2005), vírus Bungowannah (encontrado em suínos- KIRKLAND et al., 2007), vírus “Aydin”-like (encontrado em ovinos e caprinos- OGUZOGLU et al., 2009), um grupo de vírus detectados em pequenos ruminantes na Tunísia (THABTI et al., 2005), pestivírus atípico de suínos (HAUSE et al., 2015), pestivírus detectados em ratos (FIRTH et al., 2014), pestivírus detectados em morcegos (WU et al., 2012) e um grupo de vários vírus referidos como vírus ‘HoBi’-like ou BVDV-3 (Schirrneier et al., 2004). As relações filogenéticas desses vírus são apresentadas na Figura 2.

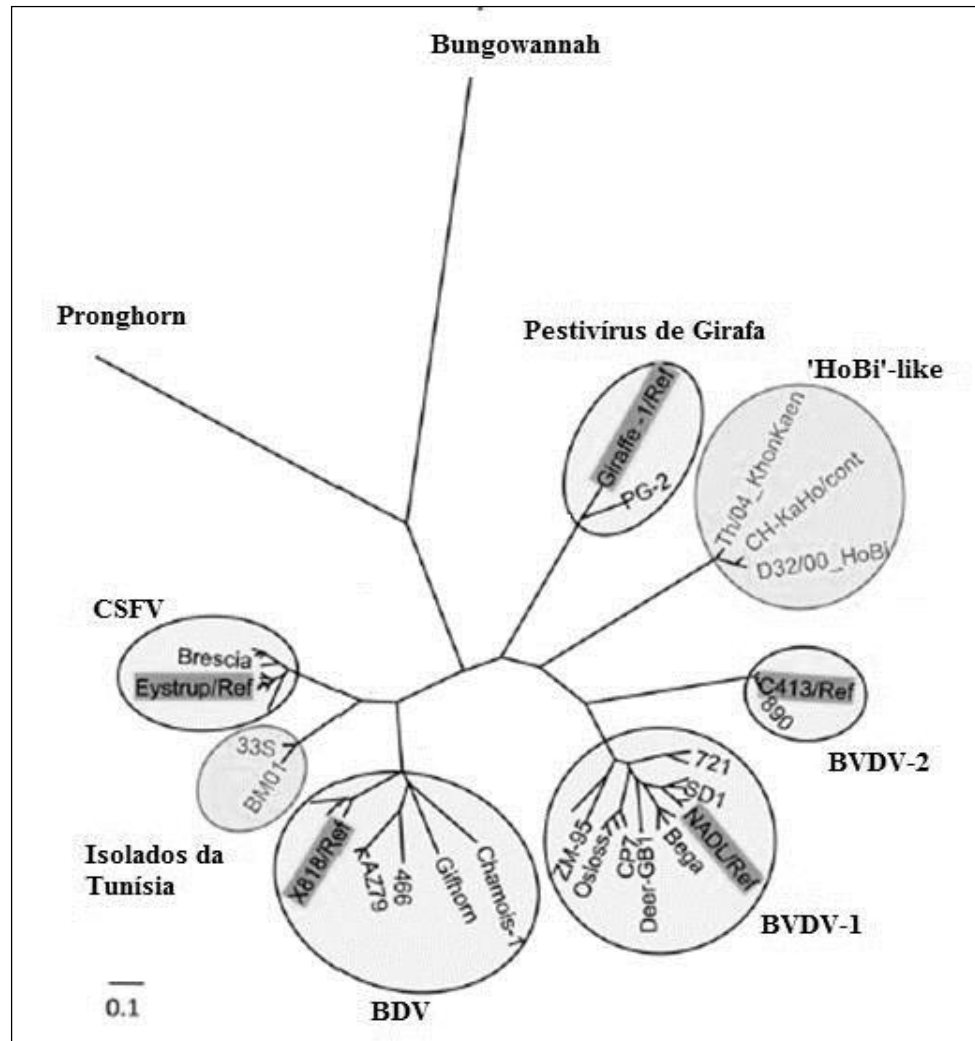


Figura 2. Análise filogenética de espécies do gênero *Pestivirus*. Esta árvore foi feita através dos métodos de *Maximum likelihood* e análise Bayesiana, utilizando as regiões genômicas 5'UTR, Npro e E2. Fonte: LIU et al., 2009a.

3.2 Espécies do gênero *Pestivirus*

3.2.1 Peste Suína Clássica

O vírus da peste suína clássica (CSFV) é um vírus importante que causa doença grave e contagiosa tanto em suínos domésticos como silvestres. Por ser de difícil controle em altas densidades populacionais, está na lista de doenças de notificação obrigatória da OIE. Está distribuída por todo o mundo, embora alguns países já tenham erradicado a doença (EDWARDS et al., 2000).

A gravidade dos sinais clínicos depende principalmente da idade do animal e virulência

do isolado. O mesmo isolado pode causar diferentes formas da doença, dependendo da idade, raça e imunidade do hospedeiro: em suínos adultos a doença é geralmente leve ou subclínica (MOENNIG; FLOEGEL-NIESMANN; GREISER-WILKE, 2003). A via de transmissão é a oro-nasal, sendo as tonsilas o órgão de predileção após a exposição ao vírus; a partir destas o vírus é drenado para linfonodos, medula óssea e tecido linfóide do trato digestivo. Atinge a corrente sanguínea em altos títulos e invade o fígado, pâncreas e rins. A forma clássica da doença é caracterizada por febre alta, lesões hemorrágicas, diarreia, conjuntivite, imunodepressão com infecções secundárias e alta mortalidade (PATON; GREISER-WILKE, 2003).

O vírus é capaz de atravessar a barreira transplacentária em fêmeas gestantes. Essa infecção geralmente resulta em perdas reprodutivas dependendo da fase gestacional. Podem ocorrer abortos, natimortos, nascimento de leitões fracos, com tremor ou malformações (MOENNIG, 2000). Infecção de gestantes com 50 a 70 dias de gestação pode levar ao nascimento de leitões persistentemente infectados, que geralmente apresentam crescimento inferior, refugo e tremores congênitos. Alguns leitões PI são clinicamente normais e podem sobreviver por vários meses. (MOENNIG; FLOEGEL-NIESMANN; GREISER-WILKE, 2003). Os hospedeiros naturais da CSF são membros da família *Suidae*, sendo os suínos domésticos e os javalis reservatórios suscetíveis (MOENNIG, 2000).

A CSF tem difícil controle em áreas de alta concentração de criações comerciais ou grande número de suídeos silvestres por ser altamente contagiosa. Por esta razão é considerada doença estratégica do ponto de vista sanitário e está na lista de notificações obrigatórias da OIE (OIE-LISTED DISEASES, INFECTIONS AND INFESTATIONS IN FORCE IN 2017, 2017). No Brasil, a doença foi considerada endêmica até a década de 1980, com sucesso em reduzir a ocorrência a partir de programas oficiais. Surtos da doença na região Sul, a região com maior produção na suinocultura industrial, não foram mais identificados desde 1988 (EDWARDS et al., 2000). Em 1992 foi implementado o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Peste Suína Clássica, e a monitoria e vigilância continua atualmente com o Plano de Contingência para peste suína clássica (BRASIL- SANIDADE ANIMAL, 2009).

3.2.2 Doença da Fronteira

O vírus da Doença da Fronteira (BDV) ocasiona uma doença de ovinos e caprinos que causa na maioria das vezes sinais reprodutivos, podendo ser congênita, mas também aguda. Foi

reconhecida pela primeira vez em 1959 na região de fronteira entre a Inglaterra e Wales, e está disseminada pela Europa, Austrália e América do Norte (NETTLETON et al., 1998). A infecção aguda de ovelhas não prenhes e de animais jovens é geralmente subclínica, e pode cursar com febre leve e leucopenia transitória, percebidas de quatro a onze dias após infecção e associadas a uma viremia curta. Porém sinais clínicos mais evidentes são vistos na infecção de ovelhas prenhes, em que o vírus atravessa a barreira transplacentária e causa infecção do feto, resultando em reabsorção, abortamentos, nascimento de cordeiros fracos e inviáveis, além de malformações congênitas (BECHER et al., 1998).

Os sinais clínicos em cordeiros nascidos vivos são muito variáveis. Os filhotes são geralmente pequenos, fracos e não conseguem se manter em pé. São comuns sinais neurológicos como tremores violentos ou finos nos membros, cabeça e cauda (NETTLETON et al., 1998), e anormalidades e mudança na cor e textura da lã. A maioria dos cordeiros morre pouco depois do nascimento, mas alguns conseguem se recuperar inclusive dos sinais neurológicos (MONIES; PATON; VILCEK, 2004). A infecção de fêmeas prenhes até 80 dias de gestação pode gerar filhotes persistentemente infectados, assim como ocorre com bovinos e infecção congênita por BVDV. Cordeiros que nascem com sinais clínicos tem pouca chance de sobrevivência e morrem cedo, tendo imunodepressão e suscetibilidade a vários outros agentes. Filhotes menos afetados podem sobreviver, mas a morte pode ocorrer a qualquer momento. Alguns animais persistentemente infectados (PI) podem se tornar adultos e excretar o vírus por anos (NETTLETON, 1990).

3.2.3 Vírus da Diarreia Viral Bovina 1 e 2

O Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) está presente no mundo todo e causa grandes prejuízos econômicos para a criação de bovinos (HOUE, 2003). Os primeiros casos descritos eram de uma doença de sintomatologia leve a branda de curta duração, porém, nas últimas décadas, surtos graves relacionados à infecção aguda por BVDV têm sido relatados (RIDPATH et al., 2006).

O BVDV foi segregado em duas espécies distintas (THIEL et al., 2005), BVDV- 1 e BVDV-2, sendo assim classificados pois possuem variabilidade entre os seus genomas. Enquanto existem similaridades entre BVDV-1 e BVDV-2, há diferenças biológicas significantes entre os isolados das duas espécies (RIDPATH, 2003). A reatividade sorológica cruzada entre BVDV-1 e BVDV-2 é geralmente baixa, e isto apresenta implicações importantes para o diagnóstico e para a eficácia das vacinas (BAUERMANN, FLORES &

RIDPATH, 2012).

Em animais não prenhes, a infecção geralmente é subclínica, porém sinais brandos como febre curta, sinais respiratórios, sintomas gastroentéricos e leucopenia podem estar presentes. A virulência e quadros clínicos gerados pelas diferentes cepas de BVDV podem ser de grande variabilidade, porém as maiores diferenças entre quadros clínicos é pronunciada entre as cepas de BVDV-2, que podem gerar de sinais não detectáveis, semelhantes à maioria dos BVDV-1, a febres de quase 42°C que perduram por três dias ou mais, com diminuição dos linfócitos em 40% e plaquetas em 60% (RIDPATH et al., 2013). Algumas cepas não citopáticas de BVDV-2 podem causar síndrome hemorrágica com grave quadro clínico e em média 20% de mortalidade (RIDPATH, 2003). As cepas de BVDV podem ser classificadas em dois biotipos, citopático (CP) ou não citopático (NCP), de acordo com a citopatogenicidade em cultivo celular, mas não está correlacionada com a virulência da cepa. A grande maioria das cepas virulentas de campo são do biotipo NCP (PETERHANS et al., 2010).

A infecção pelo BVDV em fêmeas prenhes suscetíveis cursa com transmissão transplacentária do vírus. As consequências desta infecção para o concepto dependem da idade gestacional em que ocorre a infecção e da cepa do vírus. No início da gestação pode ocorrer reabsorção embrionária e retorno ao estro; se o feto for infectado, podem ocorrer abortos, mumificação fetal, natimortos ou bezerros fracos e inviáveis ou o nascimento de animais PI. A infecção no terço final da gestação frequentemente leva ao nascimento de bezerros normais, livres do vírus (RIDPATH et al., 2010; DUBOVI, 2013). A infecção intrauterina dos 40 aos 120 dias de gestação pode gerar bezerros PI. O sistema imune do feto não está desenvolvido e falha ao montar a resposta imune, desenvolvendo imunotolerância à cepa infectante e excretando altos títulos do vírus em todas as secreções corporais (Figura 4). Somente cepas NCP são capazes de estabelecer e manter infecção persistente (PETERHANS et al., 2010), constituindo-se no principal reservatório e fonte de disseminação viral entre os animais (ARENHART et al., 2009).

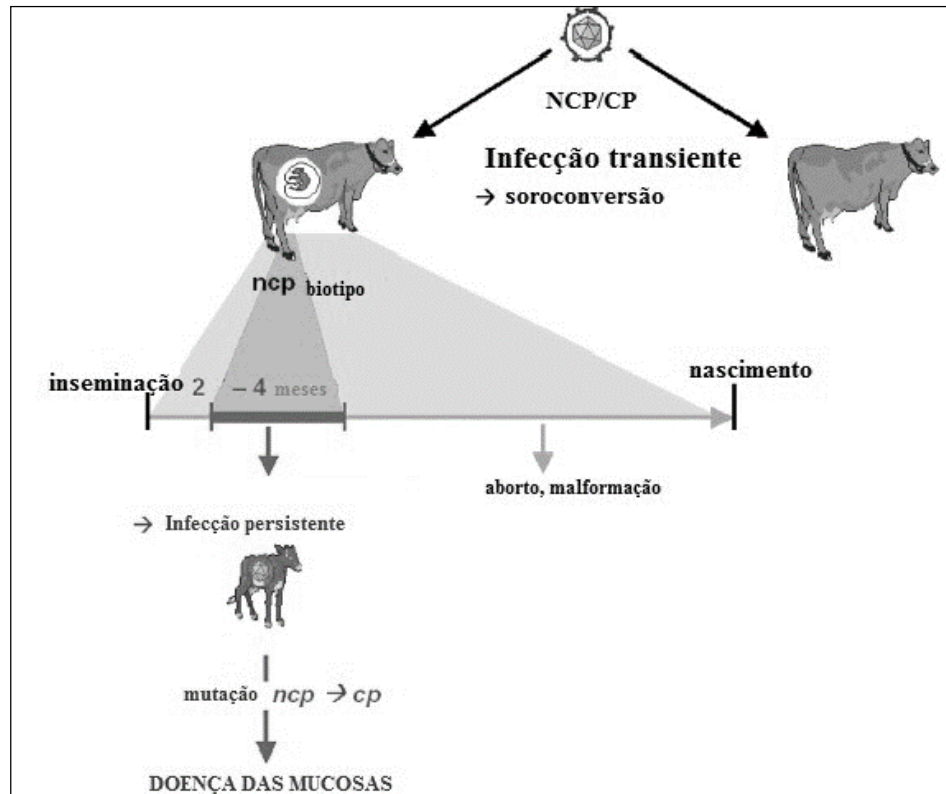


Figura 3. Consequências de infecção persistente e transitória pelo BVDV. A infecção de um animal soronegativo com qualquer um dos biotipos (NCP ou CP) conduz a uma infecção transitória que normalmente não apresenta sinais, com eliminação do vírus e produção de resposta imune. Em contraste, a infecção com cepas NCP em fêmeas soronegativas entre o segundo e quarto mês de gestação pode levar a um feto PI. Os bezerros PI são imunotolerantes para a cepa BVDV infectante, nascem sem anticorpos para esta cepa e excretam grandes quantidades de vírus durante toda a sua vida. Se o vírus NCP muta para biotipo CP ou se o animal é infectado com um vírus CP antigenicamente semelhante, o bezerro PI desenvolverá a letal Doença das Mucosas. Fonte: PETERHANS et al., 2010.

Os animais PI podem desenvolver um quadro clínico fatal denominado Doença das Mucosas (DM), com 100% de mortalidade. O mecanismo da DM está associado ao surgimento do biotipo CP da cepa de BVDV à qual o animal PI é imunotolerante. Este biotipo surge como resultado de mutações, rearranjos, deleções ou recombinação da cepa NCP, quase sempre resultando na expressão da proteína NS3 clivada da NS2 (BACHOFEN et al., 2010).

3.2.4 Vírus ‘HoBi’-like

A possível nova espécie referida como ‘HoBi’-like se refere a um grupo de vírus descritos primeiramente por pesquisadores da Alemanha em 2004, em que um pestivírus atípico foi isolado de um lote de soro fetal bovino (SFB) importado do Brasil (SCHIRRMEIER et al., 2004). A partir deste relato, muitos pestivírus geneticamente semelhantes foram encontrados como contaminantes em cultivo celular (STALDER et al., 2005; LIU et al., 2009b; PELETTO et al., 2012; MAO et al., 2012; GAO et al., 2016; SILVEIRA et al., 2015). Porém infecção natural de bovinos e búfalos por estas cepas começaram a ser relatadas na Ásia (STAHL et al., 2007), Itália (DECARO et al., 2012a), Estados Unidos da América (XIA et al., 2011) e Brasil (BIANCHI et al., 2011; SILVEIRA et al., 2015). A nomeação ‘HoBi’-like é derivada do nome do primeiro isolado relatado, HoBi_D32/00. Alguns autores também se referem a estes vírus como BVDV-3, por sua semelhança nos sinais da infecção com as outras espécies de BVDV, porém eles são geneticamente distantes e antigenicamente distintos, com 75% e 80% de similaridade de nucleotídeos com BVDV-1 e BVDV-2, respectivamente (BAUERMANN; FLORES & RIDPATH, 2012).

Infecção experimental em bovinos demonstrou que infecção por vírus ‘HoBi’-like cursam com sinais semelhantes aos da infecção por cepas de BVDV com baixa virulência. Foi observada febre e decréscimo no número de linfócitos circulantes (RIDPATH et al., 2013). Além disso, a gravidade do quadro clínico pode estar sujeita aos mesmos fatores de que depende a infecção pelo BVDV: fatores relacionados ao hospedeiro e à cepa. Portanto sinais clínicos leves após infecção por estes vírus podem não ser as únicas consequências, chegando a cursar com a morte do animal. Cepas NCP e CP foram isoladas de um mesmo bovino que morreu por doença respiratória (DECARO et al., 2012a), e há relato destas cepas causando surto de doença respiratória em um rebanho na Europa (DECARO et al., 2011). Estes vírus também causaram surtos de aborto e mal formações (BIANCHI et al., 2011; DECARO et al., 2012b), e cepas CPs foram detectadas causando quadro semelhante à DM em um rebanho no Brasil (WEBER et al., 2014a), e relato de um bovino com quadro característico de animal PI causado por um vírus ‘HoBi’-like (DECARO et al., 2013).

3.3 Diversidade genética dos pestivírus

3.3.1. Filogenia

A análise filogenética é importante para inferir a história evolucionária e epidemiológica de um vírus, para tentar rastrear a origem de surtos e fornecer bases para uma abordagem padronizada de classificação (PATON et al., 2000; VILCEK et al., 2001). A genotipagem é determinada comparando sequências genômicas de dois ou mais isolados, sendo que não há regras para determinar quanta diferença há entre duas sequências para que sejam consideradas como sendo de grupos diferentes. Utilizar as porções mais conservadas das sequências genômicas resultará na diferenciação de poucos subgrupos, e utilizar as porções mais variáveis irá aumentar o número de agrupamentos (RIDPATH, 2003). Nos pestivírus, a porção mais conservada é a região 5'UTR (THURNER et al., 2004), e a menos conservada é a porção do genoma que codifica a proteína E2, que é reconhecida pelo sistema imune.

3.3.2. Diversidade genética interespecies

As quatro espécies reconhecidas de pestivírus (BVDV-1, BVDV-2, CSFV e BDV) eram, antigamente, classificadas de acordo com a origem de hospedeiro natural. Atualmente podem ser diferenciadas através de filogenia do genoma completo (BECHER, ORLICH & THIEL, 1998; RIDPATH & BOLIN, 1997) e sequências parciais, especialmente a 5'UTR, que pode ser usada para estabelecer as espécies (BECHER et al., 1997), e os isolados são classificados de acordo com sua relação genética com as cepas virais que são usadas referência de cada espécie (DUBOIS et al., 2008). Análises mais recentes dos representantes de pestivírus reconhecidos e possíveis novas espécies utilizaram análises da região genômica da 5'UTR, N^{pro} e E2 gene através dos métodos *Maximum likelihood* e análise Bayesiana. Foi então proposta a classificação dos pestivírus em 9 espécies: BVDV-1, BVDV-2, CSFV, BDV, vírus 'HoBi'-like, Pestivírus de girafa, Vírus de ovinos da Tunísia, Pestivírus de Antílope e Bungowannah (LIU et al., 2009a), sendo que nestas análises não foram incluídos outros novos possíveis pestivírus. A relação evolucionária entre os pestivírus reconhecidos e os não classificados ainda não foi determinadas, já que diferentes relações são inferidas entre diferentes regiões genômicas (LIU et al., 2009a).

3.3.3. Diversidade genética intraespécies

Para determinar a variabilidade em nível genômico, três regiões são frequentemente utilizadas na classificação de pestivírus: região da 5'UTR (RIDPATH, BOLIN & DUBOVI, 1994; WOLFMAYER et al., 1997; VILCEK et al., 2001), gene da N^{pro}, que codifica autoprotease (BECHER et al., 1997; VILCEK et al., 2001) e região codificante da E2, glicoproteína imunodominante (BECHER et al., 1999; TAJIMA et al., 2001). Análises filogenéticas mais completas utilizam 5 regiões: 5'UTR, N^{pro}, E2, NS3 e NS5B, e os isolados podem se comportar de maneira diferente dependendo da região analisada, sugerindo que diversas regiões do genoma devem ser analisadas para a caracterização de isolados de pestivírus, ou que o ideal seria uma análise do genoma completo (NAGAI et al., 2004).

A diversidade genética do BVDV-1 é muito grande, sendo reportados mais de 17 subtipos até agora, nomeados em ordem alfabética (VILCEK et al., 2001; VILCEK et al., 2004; DENG et al., 2012; GIAMMARIOLI et al., 2015b). A classificação do BVDV-1 em subtipos não é aceita pelo ICTV, mas é amplamente utilizada na epidemiologia molecular (JACKOVA et al., 2008).

A busca pela diversidade de subtipos do BVDV-1 também levou a descoberta de subtipos dentro do BVDV-2, que foi classificado com espécie através de comparação da região 5'UTR (RIDPATH, BOLIN & DUBOVI, 1994). O BVDV-2 atualmente é dividido em três subtipos (2a a 2c) (TAJIMA et al., 2001).

A diversidade genética do BDV também é extensa, com 6 genótipos reportados (DUBOIS et al., 2008). O CSFV foi dividido em três genótipos (1, 2 e 3) que foram subdivididos em subgenótipos (1.1, 1.2, 1.3, 1.4; 2.1, 2.2, 2.3; 3.1, 3.2, 3.3, 3.4) (PATON et al., 2000; BEER et al., 2015). A maior implicância prática destas variações genéticas é a baixa reatividade sorológica cruzada, podendo levar a falhas vacinais e perda da habilidade de detecção dos testes laboratoriais (FULTON et al., 2003; BACHOFEN et al., 2008; GIAMMARIOLI et al., 2015a).

Até as possíveis novas espécies propostas já mostram grande diversidade genética, sendo propostos subtipos. É o caso dos vírus 'HoBi'-like, com 3 subtipos propostos de acordo com a origem geográfica das cepas (MISHRA et al., 2014) e do pestivírus atípico de suínos, que apesar de descrito recentemente, já tem relatada grande diversidade entre isolados (BEER et al., 2016).

3.4. Genoma

Os pestivírus têm o genoma constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva de cerca de 12,3Kb. Este genoma possui duas regiões não traduzidas (UTR) nas extremidades 5' e 3'. Possui uma única fase aberta de leitura (ORF), e sua tradução gera uma longa poliproteína de aproximadamente quatro mil aminoácidos, que é clivada em várias proteínas, sendo elas estruturais (E) e não estruturais (NS) (COLLETT et al., 1988; DENG; BROCK, 1992). Algumas das regiões mais importantes para análise da diversidade (e classificação dentro de espécie e subgrupo) serão abordadas a seguir.

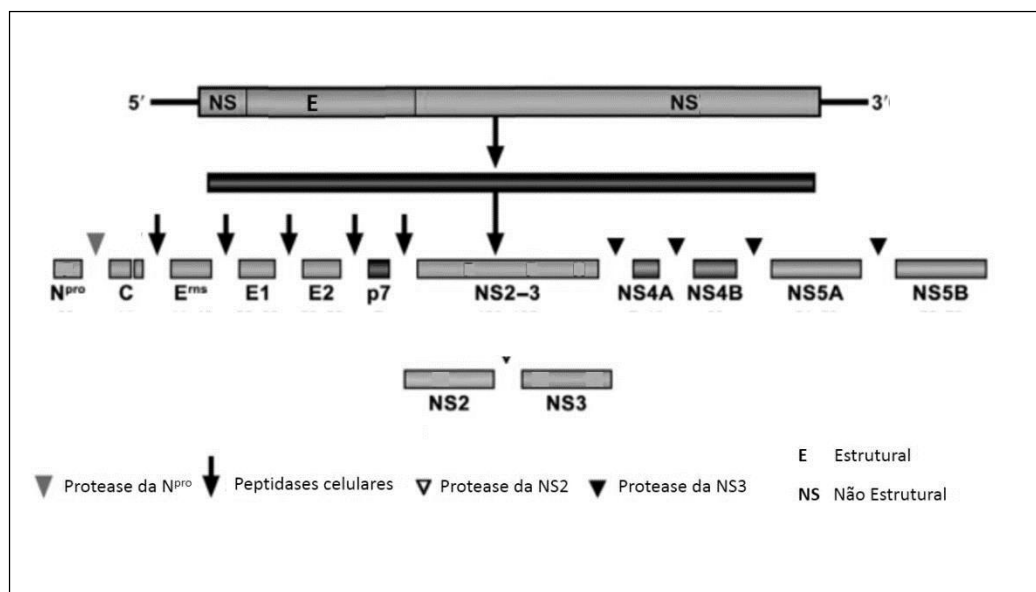


Figura 4. Esquema de organização do genoma de pestivírus, poliproteína e sítios de clivagem. Estes sítios são clivados com diferentes proteases, dando origem a 11-12 proteínas, não estruturais (NS) ou estruturais (E).
Fonte: Tautz, Tews & Meyers, 2015.

3.4.1. Região 5' não traduzida do genoma viral

Os pestivírus possuem uma região 5' não traduzida (UTR) muito mais longa (330 a 385 nucleotídeos) do que os demais flavivírus (97 a 119), e contém inúmeros códons AUG (TAUTZ, TEWS & MEYERS, 2015). O genoma dos membros da família *Flaviviridae* não possui estrutura *cap* na extremidade 5' (BROCK, DENG & RIBLET, 1992), que tem função de interação com o ribossomo e sinalização para que a tradução ocorra somente no códon AUG na extremidade final da região 5' (KOZAK, 1986). Vírus são dependentes da maquinaria celular para a tradução das proteínas virais, e para garantir que o RNA viral seja aceito pelos componentes da célula, a estratégia de muitos vírus, incluindo os pestivírus, envolve a ligação

dos ribossomos em estruturas secundárias complexas formadas pelo RNA na região da 5'UTR, denominada sítio interno de entrada no ribossomo (IRES), onde se inicia a tradução (POOLE et al., 1995). O IRES é capaz de recrutar a subunidade menor do ribossomo e posicioná-lo no sítio de início da tradução, que se inicia no códon AUG correto (TAUTZ, TEWS & MEYERS, 2015). Este sítio interno de entrada no ribossomo é altamente conservado entre os pestivírus (THURNER et al., 2004).

Vários estudos têm demonstrado que características específicas da estrutura secundária e terciária da 5'UTR têm papel essencial na correta tradução do RNA viral. A região 5'UTR inicia-se com uma sequência capaz de formar uma estrutura estável de *stem-loop* denominada *hairpin* Ia que, acredita-se, seja um elemento de estrutura secundária bifuncional envolvido tanto na iniciação da tradução como na replicação do RNA viral (RIJNBRAND et al., 1997; YU et al., 2000). Os elementos do IRES são caracterizados por duas estruturas complexas de *stem-loop*, denominadas domínios II e III. O local de início da tradução se encontra logo após um pseudonó formado por interação de um *loop* do domínio III e sequências muito próximas ao codon AUG (MOES & WIRTH, 2007), representado na figura 3. O pseudonó é um componente essencial para o funcionamento do IRES, e ajuda a posicionar o códon de início AUG no local p do ribossomo (KOLUPAEVA et al., 2000). A posição do códon AUG na 5'UTR é crucial, já que os ribossomos parecem não reconhecer códons AUG fora de uma região que cerca o códon autêntico de início da tradução (RIJNBRAND et al., 1997).

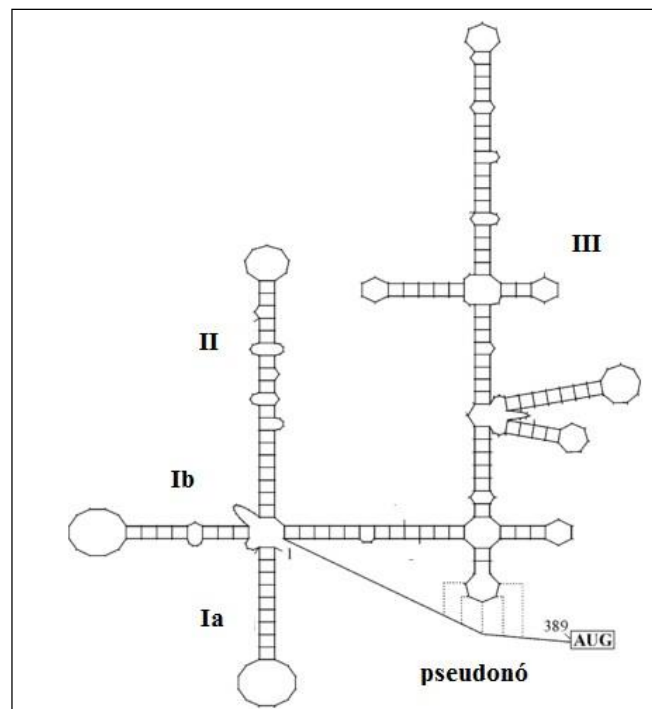


Figura 5. Representação da estrutura secundária da região 5'UTR. Há a indicação dos *stem loops* (Ia, Ib, II e III) e pseudonó formado perto do códon AUG de início da tradução. Fonte: Tautz, Tews & Meyers (2015)

3.4.2. N^{pro}

A primeira proteína viral traduzida é a proteína não estrutural N^{pro}, que possui atividade autoproteolítica. Ela é responsável pela própria clivagem, se desligando da poliproteína com clivagem entre ela e a proteína seguinte (STARK et al., 1993), gerando o amino-terminal (N-terminal) da proteína do capsídeo (C). A N^{pro} só é encontrada nos, e é formada por mais ou menos 160 aminoácidos. Sem homologia com nenhuma outra protease, a N^{pro} tem sua própria subfamília, c53, dentro da família das cisteína proteases (RAWLINGS, BARRETT & BATEMAN, 2012).

A proteína N^{pro} não é necessária para a replicação do vírus em cultivo celular, embora mutantes defectivos sejam facilmente neutralizados pelas defesas do hospedeiro (TRATSCHIN et al., 1998). Isso se deve provavelmente ao fato de a proteína interferir na via do Interferon tipo I (IFN), marcando o Fator regulatório de Interferon 3 e 7 (IRF-3 e IRF-7), que são fatores de transcrição dos genes do Interferon α e β , através de poliubiquitinação. Isto conseqüentemente leva à degradação destes fatores pelos proteossomas (RUGGLI et al., 2009; GIL et al., 2006; HILTON et al., 2006; BAUHOFFER et al., 2007; FIEBACH et

al.,2011). A função autoproteolítica da proteína não é necessária para a atividade de degradação dos IRFs (SEAGO, GOODBOURN & CHARLESTON, 2010; HILTON et al., 2006). A atividade de inibição da indução de IFN I também já foi associada a infecções persistentes de fetos com cepas NCP (CHARLESTON et al., 2016), além de inserções nesta região favorecerem a clivagem entre NS2 e 3, originando cepas CP de isolados NCP (MULLER et al., 2003; KAMEYAMA et al., 2006).

3.4.3 E2

A proteína E2 é a última das proteínas estruturais na poliproteína, sendo clivada da proteína E1 e da proteína posterior, a p7, por peptidases celulares (RUMENAPF et al., 1993). A E2, assim como a E1, é proteína integral de membrana, cuja âncora contém resíduos hidrofóbicos que interagem com a membrana do vírus, sendo E2 a principal glicoproteína do envelope viral (WEILAND et al., 1990). A E2 possui características que a tornam capaz de realizar fusão de membranas, sendo indicada como uma das responsáveis pela entrada do vírus na célula (FERNÁNDEZ-SAINZ et al., 2014), e determina o tropismo celular (LIANG et al., 2016; ASFOR et al., 2014). A proteína E2 fica retida dentro da célula através de sua âncora transmembrana, já que esta, assim como E^{ms}, não foi encontrada em grande quantidade na membrana citoplasmática de células infectadas, mas sim na membrana do retículo endoplasmático. Isto indicou que o vírion é liberado por brotação das cisternas do retículo (GRUMMER et al., 2001; WEILAND et al., 2016). A porção C-terminal contém um domínio hidrofóbico que ancora a proteína ao envelope (THIEL et al., 1991).

A E2 é formada por 373 aminoácidos, possui 15 resíduos de cisteína conservados entre os pestivírus, sendo que o BVDV possui dois resíduos a mais, e estes resíduos mediam interações entre as glicoproteínas através de pontes dissulfeto (LI et al., 2013), como a formação de homodímeros da E2 e heterodímeros com a E1 (WEILAND et al., 1990; RONECKER et al., 2008). A formação de heterodímeros E1-E2 no BVDV se mostrou essencial para a entrada do vírus na célula, e depende de resíduos nos segmentos transmembrana das duas glicoproteínas: lisina e arginina na E1 e arginina na E2 (RONECKER et al., 2008). Na E2, os sítios de glicosilação são menos conservados do que os resíduos de cisteína: no CSFV há seis sítios de N-glicosilação (RISATTI et al., 2007), e no BVDV há 4 (OMARI et al., 2013).

Estudos em cultivo celular descreveram que a adsorção dos vírions começa com o

primeiro contato sendo mediado pela E^{ms}, seguido pela ligação da E2 com um receptor celular, sendo a internalização com fusão de membranas atingida somente após a mediação da E1 (HULST & MOORMANN, 1997). Os vírions são internalizados através de endocitose mediada por receptores dependentes de clatrina (GRUMMER, GROTHA & GREISER-WILKE, 2004). A inibição da infecção celular quando proteínas E2 de BVDV e CSFV foram adicionadas ao meio de cultura indica que a E2 destas duas espécies virais utilizam o mesmo receptor para aderir e entrar na célula (HULST & MOORMANN, 1997), e já foi demonstrado que dois peptídeos específicos provenientes da E2 se ligam ao receptor da célula e têm o poder de inibir a infecção (LI et al., 2011).

Já foram descritos vários receptores celulares que se ligam à E2, porém o mais descrito e tido como receptor celular do BVDV é o CD46 bovino, um cofator que protege a célula de um ataque inespecífico do sistema complemento (MAURER et al., 2009). Porém este receptor em nenhum momento do ciclo celular é internalizado, e é suposto que os pestivírus necessitam de outros cofatores para entrada na célula, como receptores de heparan-sulfato (DRAGER, BEER & BLOME, 2015). Algumas moléculas celulares também tiveram seu potencial de ligação à E2 descritos: uma molécula da membrana celular que se liga a filamentos de actina, possivelmente relacionada à via endocítica do vírus (SCHELP, GREISER-WILKE & MOENNIG, 2000); a beta-actina, um componente do citoesqueleto, que, se inibida, reduz a replicação do CSFV em cultivo celular (HE et al., 2014); e anexina 2, uma proteína de membrana que foi associada à entrada do CSFV na célula, sem a qual houve inibição da replicação viral em cultivo (YANG et al., 2015).

A E2 é a glicoproteína que contém grande parte dos determinantes antigênicos, e é alvo da maioria da resposta humoral, com a maioria dos epítomos localizados na porção N-terminal (DEREGT et al., 1998). Resposta imune gerada pela E2 sozinha foi suficiente para proteção de suínos contra CSFV (HULST et al., 1993). No CSFV, quatro domínios (ABCD) foram sugeridos para esta proteína: os domínios BC, que possuem os epítomos não conservados, responsáveis pela especificidade antigênica, enquanto os domínios AD são conservados (OMARI et al., 2013). Para atingir a conformação correta destes 4 domínios, são necessários 6 resíduos de cisteína, presentes na porção N-terminal (CHANG et al., 2010). Vários epítomos de linfócitos T citotóxicos foram mapeados nesta proteína (ARMENGOL et al., 2002; CEPPI et al., 2005), e mudanças nestes epítomos podem ser responsáveis pela pressão seletiva positiva e evasão da resposta imune (TANG & ZHANG, 2007).

3.4.4 NS2

Após a proteína p7, são clivadas na poliproteína as proteínas NS2 e NS3. A NS2 é formada por 450 aminoácidos, e é encontrada fusionada como uma proteína única, NS2/3, em células infectadas com cepas NCP. NS2 e NS3 são encontradas individualizadas em cepas CP. A clivagem entre NS2 e 3 é processada pela própria NS2, que recentemente teve descrita sua atividade de protease restrita a esta clivagem (LACKNER et al., 2004). Há um processo intramolecular que parece inibir o domínio onde se encontra a protease, não permitindo atividade de clivagem em qualquer outro processo: a parte C-terminal da NS2 parece bloquear fisicamente o sítio ativo da protease após a clivagem entre NS2-3 (LORENZ et al., 2006). Além de função de autoprocessamento, a NS2 possui um N-terminal hidrofóbico com no mínimo 4 domínios transmembrana, necessários para a translocação desta proteína para o retículo endoplasmático (RE). A NS2 do HCV induz estresse no RE da célula hospedeira, desempenhando um papel importante na patogênese do HCV, e por terem homologia, supõe-se que a NS2 dos pestivírus também possa exercer este papel na virulência (GUO et al., 2011).

A atividade proteolítica da NS2 necessita de interação com uma chaperona celular denominada Jiv (proteína do domínio J interagindo com a proteína viral) (LACKNER, THIEL & TAUTZ, 2006), e foi observado que a extensão da clivagem entre NS2/3 está intimamente correlacionada com os níveis intracelulares de Jiv (MULLER et al., 2003). Em casos de infecção pelo biotipo NCP em animais gestantes pode ocorrer longas infecções persistentes depois de exposição intrauterina, onde a NS2/3 permanece na forma não clivada. Supõe-se que este controle da atividade de protease e clivagem entre NS2 e NS3 através da limitação na quantidade de Jiv pode ser um importante fator regulatório do vírus (RINCK et al., 2001). Esta regulação pode abranger tanto a patogenicidade quanto a propagação na população de hospedeiros (LACKNER et al., 2004), sendo fator central na adaptação dos pestivírus ao seu hospedeiro.

A NS2 não é necessária para a replicação do RNA (BEHRENS et al., 1998), embora a NS2/3, não clivada, seja indispensável na montagem e saída de partículas da célula (AGAPOV et al., 2004). Com relação à clivagem entre estas duas proteínas em perspectiva temporal, foi detectada clivagem quase completa da NS2-3 em BVDV NCP nas primeiras horas de infecção, que caiu para níveis praticamente indetectáveis 6 a 9 h após a infecção; já para cepas CP esta diminuição da clivagem foi apenas moderada (LACKNER et al., 2004). Esta regulação temporal no autoprocessamento da NS2/3 é necessária para trocar da fase de

alta atividade de replicação do genoma viral para uma fase de morfogênese (BECHER & TAUTZ, 2011).

A maioria dos pestivírus citopáticos possuem inserções no genoma, entre NS2 e NS3, provenientes da célula hospedeira e que são substrato de proteases celulares muito eficientes, com alto índice e rápida clivagem. Como a NS2/3 não clivada é necessária para a morfogênese e liberação de partículas virais da célula infectada, a maioria destes vírus citopáticos possuem também duplicações genômicas codificando NS2/3 não clivada (BECHER & TAUTZ, 2011). Sem a dependência da NS2/3 não clivada, mais pestivírus citopáticos seriam capazes de fazer uma infecção autônoma, e induzir DM: isso diminuiria o tempo de duração de infecções nos hospedeiros. Portanto esta dependência de NS2/3 não clivada é considerada uma vantagem na estratégia de infecção persistente dos pestivírus (PETERHANS et al., 2010).

3.4.5 NS3

A clivagem das proteínas não estruturais que segue à NS2 ocorre em quatro sítios de clivagem (NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, eNS5A/NS5B) através de uma serino protease cujo sítio catalítico está na NS3. Essa protease necessita da proteína NS4A como cofator para exercer sua atividade de clivagem (BAZAN & FLETTERICKT, 1988; XU et al., 1997; MENDEZ et al., 1998; TAUTZ, KAISER & THIEL, 2000). A atividade de protease da NS3 se encontra na porção N-terminal, onde está o sítio de ligação para o domínio cofator da NS4A (TAUTZ, KAISER & THIEL, 2000). Esta protease da NS3 é necessária para a viabilidade dos vírions (GRASSMANN, ISKEN & BEHRENS, 1999), e também pode iniciar a via de apoptose celular através de interação com caspases da célula hospedeira (GAMLEN et al., 2010). Além de uma serino protease na porção N-terminal, a proteína NS3 abriga na porção C-terminal duas outras atividades enzimáticas: uma RNA helicase, que tem importante papel nos primeiros passos da replicação viral (GORBALENYA et al., 1989; WARRENER & COLLETT, 1995; GRASSMANN, ISKEN & BEHRENS, 1999), e uma NTPase estimulada por RNA (TAMURA, WARRENER & COLLETT, 1993).

A helicase da NS3 funciona no desenrolamento de estruturas secundárias na 3' UTR ou em regiões de codificação, permitindo o início da replicação ou facilitando a atividade da RNA polimerase viral (proteína NS5B) (GU et al., 2000). A direção em que a RNA helicase atua é 3' para 5' (WARRENER & COLLETT, 1995), a mesma direção da RNA polimerase

viral, que interage especificamente com a 3'UTR para começar a replicação (SHENG et al., 2007). Estas funções enzimáticas da NS3 são essenciais na síntese do genoma de RNA, e por consequência na produção de partículas infecciosas (GU et al., 2000).

A helicase da NS3, assim como outras helicases celulares e virais, tem papel importante na tradução, e pode estimular a tradução mediada pelo sítio interno de entrada no ribossomo (IRES). A NS5B (RNA polimerase) e NS3 interagem através do domínio protease da NS3, sendo que a NS5B potencializa a helicase da NS3, estimulando a tradução (ZHANG et al., 2005; XIAO et al., 2008; WANG et al., 2010). Além desta interação, a própria protease da NS3 pode estimular a atividade da helicase (WEN et al., 2009). A NS3 também parece ter importante função na morfogênese, já que uma mutação de apenas um aminoácido no domínio helicase faz com que a NS3 possa substituir funcionalmente a proteína do capsídeo (RIEDEL et al., 2012).

A NTPase presente no C-terminal da NS3 utiliza a fosforilação de nucleotídeos para gerar energia para inúmeros processos, como a ligação do complexo replicase ao RNA e na própria atividade da helicase (DENG & SHUMAN, 1996), com a maior eficiência na obtenção de energia com hidrólise de ATP e CTP (WEN et al., 2009). A atividade da NTPase é estimulada pela presença de RNA fita simples (TAMURA, WARRENER & COLLETT, 1993), e tanto esta quanto as outras atividades enzimáticas da NS3 têm um papel central nos primeiros passos da replicação viral (GRASSMANN, ISKEN & BEHRENS, 1999). Esta proteína é imunogênica e antígenicamente conservada entre os pestivírus (SANDVIK, 2005).

3.4.6 NS5B

A proteína NS5B possui sequências que a caracterizam como uma RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) (COLLETT et al., 1988). A RpRd é responsável pela replicação do genoma RNA de polaridade positiva e é caracterizada pelo motivo Gly-Asp-Asp (KOONIN, 1991). A NS5B demonstra atividade de polimerase *in vitro*, porém *in vivo* a replicação do genoma requer a ação conjunta de NS3 e NS5B (ZHONG, GUTSHALL & VECCHIO, 1998).

A NS5B mostrou *in vitro* tanto características de replicação dependente de primer (elongativa, *copy back*) como independente de primer (replicação *de novo*) (ZHONG, GUTSHALL & VECCHIO, 1998; LAI et al., 1999). Outro estudo mostrou que a estrutura da polimerase se complexa com GTP, que é uma molécula requerida para a síntese *de novo* do genoma; o GTP se liga de forma adjacente ao NTP de iniciação da replicação (CHOI et al.,

2004).

A RpRd assemelha-se a uma mão direita composta por domínios que formam dedos, palma e polegar. Este formato é conservado entre todas RpRd virais e outras polimerases, porém os pestivírus possuem um domínio extra localizado no N-terminal (CHOI et al., 2004), que junto com a ponta dos dedos é requerido para ligar e dar assistência na translocação da fita molde de RNA. Os dois ácidos aspárticos do motivo de RpRd coordenam íons metálicos que catalisam a adição de NTP na fita nascente. A replicação dos pestivírus é feita por um grande complexo de replicação ligado à membrana, composto por RNA viral, polimerase viral e outras proteínas virais e celulares. Ocorre a síntese de uma fita de RNA polaridade negativa, resultando em duplas fitas das quais têm origem várias outras positivas utilizadas na geração da progênie viral (CHOI et al., 2006). A NS5B também parece exercer função na morfogênese, sendo identificado um *locus* no C-terminal que pode ter função de marcar RNA recém sintetizado, destinando-o a locais onde as proteínas C, E1 e E2 se agrupam para um evento de brotamento, possivelmente na membrana do RE (ANSARI et al., 2004).

3.4.7 Região 3' não traduzida

Assim como a 5'UTR, a 3'UTR do genoma viral contém importantes elementos que possuem estrutura primária ou secundária específicas, além de ser o primeiro elemento do RNA que entra em contato com a RpRd para replicação (TAUTZ, TEWS & MEYERS, 2015). A região 3'UTR pode ser dividida em uma parte conservada e outra variável (DENG; BROCK, 1993; GRASSMANN, ISKEN & BEHRENS, 1999). São três os *stem-loops* (SL) formados a partir da estrutura secundária da 3'UTR. O SLI está localizado no final da 3'UTR, SLII no meio e SLIII na região que se segue logo após o códon de parada. Com relação à importância destas estruturas no ciclo de replicação, deleções internas ou retirada total do SL II ou SL III permitem replicação viral; porém deleção total dos SL II e SL III não permitiram produção de partículas infecciosas (PANKRAZ, THIEL & BECHER, 2005). A estrutura secundária do SLI é importante, já que mudanças na sequência primária, que não modificaram a estrutura secundária, viabilizaram produção de progênie (YU, GRASSMANN & BEHRENS, 1999).

Elementos ricos em adenosina e uracila são presentes e conservados na região 3'UTR em todas as cepas conhecidas de CSFV; no RNAm da célula hospedeira, estes elementos causam instabilidade do RNA. Uma molécula da célula hospedeira chamada HuR, que se liga

a estes elementos e protege o RNAm, também se liga à região 3'UTR do CSFV, sendo sugerido que HuR também protege o RNA genômico viral (NADAR et al., 2011). A ligação da NS5A e NS5B nesta região contribui na modulação da replicação do genoma viral (SHENG et al., 2012).

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os materiais e métodos empregados na realização dos experimentos, resultados gerados e discussão, serão apresentados na forma de dois artigos como segue:

I- Genomic characterization of a bovine viral diarrhea virus subtype 1i in Brazil

Este artigo foi publicado no periódico *Archives of Virology*, na categoria *Annotated Sequence Record*, em 2016, doi: 10.1007/s00705-016-3199-7.

II- Genomic and antigenic relationships between two 'HoBi'-like strains and other members of the Pestivirus genus

Este artigo está em processo de construção.

4.1 Artigo I

Genomic characterization of a bovine viral diarrhea virus subtype 1i

Ana Cristina S. Mósena¹, Matheus N. Weber¹, Samuel P. Cibulski¹, Simone Silveira¹, Mariana S. Silva¹, Fabiana Q. Mayer² and Cláudio W. Canal^{1*}

¹Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Eldorado do Sul, RS, Brazil.

*Corresponding author: Cláudio Wageck Canal. E-mail address: claudio.canal@ufrgs.br

Abstract

Bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1) belongs to the *Pestivirus* genus within the *Flaviviridae* family. Based in 5' untranslated regions (UTR) sequences, BVDV-1 can be divided in at least 17 subtypes (1a through 1q). BVDV-1i is an uncommon subtype – reported in the United Kingdom and Uruguay. In the present work, we report the first complete genome of BVDV-1i, detected in cattle from Southern Brazil (strain ACM/BR/2016). The genome presents 12,231 nt in length and contains a single ORF that encodes a polyprotein of 3,896 amino acids, flanked by 5' and 3' UTRs of 325 and 220 nt, respectively. Phylogenetic inferences based on whole genome, 5'UTR and N^{pro} regions showed that strain ACM/BR/2016 is closely related to previously characterized BVDV-1i members. The 5'UTR of the present strain shares the highest nucleotide identity (89.9%) with BVDV-1i strains from United Kingdom and N^{pro} with an Uruguayan strain (89.4%). To the best of our knowledge, this is the first BVDV-1i strain in which its whole genome was entirely sequenced and characterized. The complete genome of a BVDV-1i will help future studies on *Pestivirus* evolution and heterogeneity.

Keywords: BVDV-1i; pestivirus; subtype; bovine; sequencing.

Annotated sequence record

The *Pestivirus* genus within the *Flaviviridae* family comprises the recognized species *Bovine viral diarrhea virus type 1* (BVDV-1), BVDV-2, *Border disease virus* (BDV), *Classical swine fever virus* (CSFV) (SIMMONDS et al., 2011) and putative species that have been proposed, such as Giraffe-1 pestivirus (AVALOS-RAMIREZ et al., 2001), Pronghorn antelope (VILCEK et al., 2005), Bungowannah virus (KIRKLAND et al., 2007) and ‘HoBi’-like virus (SCHIRRMEIER et al., 2004). BVDV infection in cattle results in economic losses due to decreased reproductive performance, respiratory signs, growth retardation in persistently infected animals and mucosal disease (HOUE, 2003).

BVDV-1, as well as all pestiviruses, possesses a positive single-stranded RNA molecule of approximately 12.3 kb in length, flanked by 2 untranslated regions (5' and 3' UTR). The single open reading frame (ORF) is translated into a polyprotein and then processed into 12 viral polypeptides: N^{pro}-C-E^{ms}-E1-E2-p7-NS2/NS3-NS4A-NS4B- NS5A-NS5B (SIMMONDS et al., 2011). Genetic typing of BVDV-1 has been based on comparison of the 5' UTR and N^{pro} genomic regions and gives at least 17 subtypes (BVDV-1a to BVDV-1q) (VILCEK et al., 2001; DENG et al., 2014; WEBER et al., 2014; GIAMMARIOLI et al., 2015).

BVDV-1a and -1b are the most distributed BVDV-1 subtypes worldwide and take turns as the most prevalent in different countries (RIDPATH et al., 2011; VILCEK et al., 2001). BVDV-1i had been detected only in United Kingdom (BOOTH et al., 2013; STRONG et al., 2013; VILCEK et al., 2001) and recently in Uruguay in 2014 (MAYA et al., 2016). In 2016, a specimen consisting of serum from a suspected case of bovine viral diarrhea (BVD) in a four year male Angus was received in the Virology Laboratory of Federal University from Rio Grande do Sul for BVDV diagnosis. Confirmation of the presumptive diagnosis and typing of the BVDV involved was performed by RT-PCR with primers for the conserved 5' UTR (VILCEK et al., 1994) followed by Sanger sequencing. Nucleotide sequencing indicated a BVDV-1i. In order to contribute to the BVDV-1 database in public genome libraries and expand the knowledge about BVDV-1 genetic variability, the present study aimed to perform the whole genome sequencing and genetic characterization of a BVDV-1i for the first time in literature.

The serum sample was centrifuged at 3,000 x g during 15 min and the supernatant was used for total RNA isolation using TRIzol LS Reagent (Ambion), according to the manufacturer's instructions. Isolated RNA was converted to cDNA, which was enriched

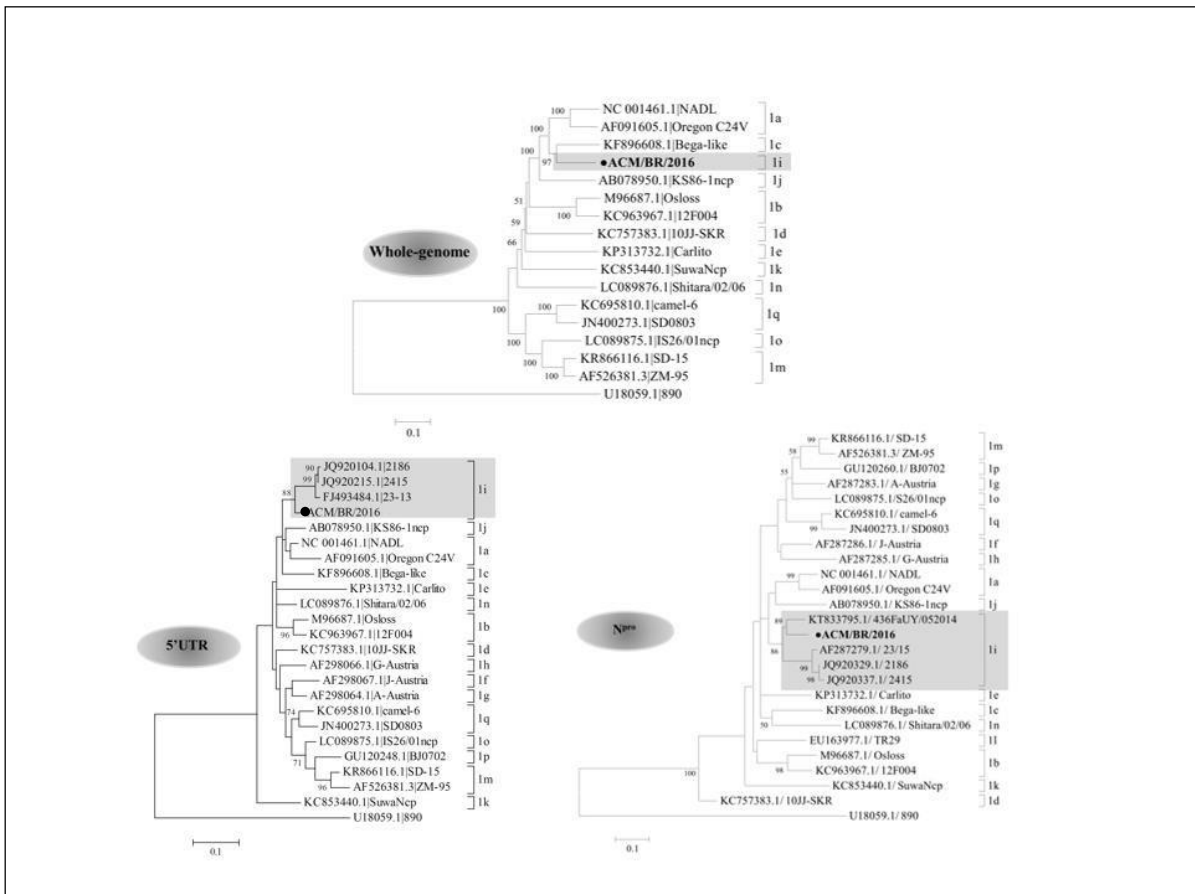
through Complete Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma Aldrich). Libraries were prepared with Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina) and sequenced on an Illumina MiSeq platform with 2×250-bp paired end run (Illumina). Reads were assembled into contigs using SPAdes 3.6 (BANKEVICH et al., 2012) and compared to sequences in the GenBank nucleotide and protein databases using BLASTn/BLASTx. Geneious software (Biomatters Ltd.) was used for open reading frame (ORF) prediction and genome annotations. Phylogenetic inferences were performed based on complete genomes, 5'UTR and N^{pro} nucleotide regions using representative BVDV-1 subtypes (Table 1). Multiple sequence alignments were performed using MAFFT (KATOY et al., 2002). MEGA software (version 6, MEGA6) (TAMURA et al., 2013) was used for phylogenetic inferences using Maximum Likelihood criterion. The statistical model for each inference was calculated using the “Find Best DNA/Protein Models” tool available in MEGA6.

The complete genome of the BVDV-1i strain ACM/BR/2016 (GenBank accession no. KX857724) has 12,231 nt in length and contains a single ORF of 11,688 nt, encoding a polyprotein of 3,896 amino acids. The average coverage of ACM/BR/2016 genome is 38X. The 5' UTR and 3' UTR of this strain are 325 and 220 nucleotides in length, respectively. Based on genome annotations of other BVDVs, UTRs and genes were mapped as the following nucleotide positions in the genome: 5'UTR 1- 325; N^{pro} 326- 829; C 830-1,135; E^{ms} 1,136-1,816; E1 1,817-2,401; E2 2,402-3,523; p7 3,524-3,733; NS2 3,734-5,083; NS3 5,084-7,132; NS4a 7,133-7,324; NS4b 7,325-8,365; NS5a 8,366-9,853; NS5b 9,854-12,010; 3'UTR 12,011-12,231.

Whole genome phylogenetic tree based on 11 BVDV-1 subtypes (-1a, -1b, -1c, -1d, -1e, -1j, -1k, -1m, -1n, -1o and -1q) available at GenBank database showed that ACM/BR/2016 clustered in the same terminal node of BVDV-1c (Bega-like strain, GenBank accession no. KF896608.1) supported by 97% bootstrap value (Fig. 1a) sharing 84.6% of nucleotide identity. In the 5' UTR-based phylogenetic tree, ACM/BR/2016 was close related to BVDV-1i strains 2186, 2415 and 23-13, reported in United Kingdom (VILCEK et al., 2001; TAMURA et al., 2013) (GenBank accession no. JQ920104.1, JQ920215.1 and FJ493484.1, respectively) supported by 88% bootstrap value (Fig. 1b) sharing 89-89.9% of nucleotide identity. When comparing the N^{pro} region, the strain reported in the present work clustered in BVDV-1i cluster in the same terminal node with strain 436FaUY/052014 (GenBank accession no. KT833795.1) reported in Uruguay (MAYA et al., 2016) supported by 89% bootstrap value (Fig. 1c) showing 89.4% of nucleotide identity. The relationship of

the BVDV-1i reported herein and others available in GenBank varied in the different phylogenetic trees due the lack of subtype -1i strains and since not all have both 5'UTR and N^{pro} or whole genome sequences available.

Fig.1 Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of the full length genome (a), 5'UTR (b) and N^{pro} gene (c). Phylogenetic trees were reconstructed using the maximum likelihood method. All analyses were conducted with 1,000 bootstrap replicates, and the percentage of replicate trees in which the sequences clustered together are shown next to the branches. Evolutionary distances were computed using General Time Reversible model with Gamma distribution model with Invariant sites for all hypothesis. The GenBank accession numbers of sequences of reference strains used in phylogenetic analysis are represented into the figure. BVDV-1i sequences were highlighted in bold. BVDV-1i ACM/BR/2016 is highlighted by a dot (●)



The BVDV-1i ACM/BR/2016 genome has nucleotide sequence identities of 78.6% to 84.6 % with other BVDV-1 strains and about 68.3% with the 890 BVDV-2 strain in whole genome. The genes and UTRs of ACM/BR/2016 were compared with all BVDV-1 and the BVDV-2 strain used in this study (Table 1). ACM/BR/2016 presented highest degree of nucleotide identity in 5' UTR and N^{pro} with BVDV-1i strains. In other genomic regions, ACM/BR/2016 presented highest identity with strains Oregon CV24V (BVDV-1a) and Bega-

like (BVDV-1c) (Genbank accession numbers AF091605.1 and KF896608.1, respectively).

The BVDV-1 genomes were analyzed in order to visualize insertions and deletions in the open reading frame. When comparing the complete coding sequences of ACM/BR/2016 and other BVDV-1 subtypes, no insertions or deletions were observed in the ACM/BR/2016, but BVDV-1m strains ZM-95, SD-15 and BVDV-1o strain IS26/01ncp (GenBank accession numbers AF526381.3, KR866116.1, LC089875.1, respectively) showed a six-nucleotide insertion in the C gene, and ZM-95 also had a three- nucleotide insertion in the glycoprotein E2 gene.

In summary, a virus belonging to BVDV-1i subtype, named ACM/BR/2016, was first detected in Brazil, whereas this subtype was described only in cattle in United Kingdom (VILCEK et al., 2001; BOOTH et al., 2013) and recently in Uruguay (MAYA et al., 2016). We determined the complete genome sequence of this BVDV-1 cattle-associated strain, in which the phylogenetic and sequence analyses showed that it belongs to the BVDV-1i subtype. Therefore, this is the first report of the whole genome sequence of a BVDV-1i virus, and it will contribute to future studies in pestivirus diversity and evolution.

Table 1 Nucleotide sequence identity (%) of the ACM_BR_2016 strain, compared with the coding sequences of other available whole genome sequences of several subtypes of BVDV- 1 used in the trees; accession numbers are shown in Fig.1, except for X818 (AF037405.1), Alfort/187 (X87939.1), H138 (AF144617.2) and D32/00_HoBi (AB871953.1).

*Cytopathogenic strains had insertions removed from genome analysis (NADL: *Jiv* insertion of 271 nucleotides; Osloss: ubiquitin insertion of 229 nucleotides; and H138: *Jiv* insertion of 258 nucleotides). NA: Not available.

Strain	Species/Subtype	5' UTR	N _{pro}	C	E _{rns}	E1	E2	p7	NS2/3	NS4a	NS4b	NS5a	NS5b	3' UTR
NADL	BVDV-1a	91.1	82.5	82.6	83.2	80.1	79.3	78	85.2*	84.3	84.8	81.6	84.8	82.5
Oregon_C24V	BVDV-1a	90.4	84.5	86.6	83.8	80.8	80.9	82.3	85	85.4	85.2	80.6	84.4	82.2
Osloss	BVDV-1b	89.5	82.9	83.9	81	77.4	74.2	74.2	81.7*	83.8	81.9	76.8	81.5	64.4
12F004	BVDV-1b	89.2	81.9	83.3	81.6	77.4	75.2	73.8	81.6	84.3	80.7	78	81.3	81.9
Bega-like	BVDV-1c	89.5	82.7	85.2	83.9	82.9	81.5	78	86.3	86.4	86.5	81.9	85.3	85
10JJ-SKR	BVDV-1d	89.8	81.1	81	80.4	78.4	76.1	75.2	81.5	85.4	84.2	78.8	81.1	62.3
Carlito	BVDV-1e	86.7	82.1	81.6	81.9	77.9	75.4	77.1	80.9	82.2	81.8	76.2	81.9	66
J-Austria	BVDV-1f	86.6	83.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A-Austria	BVDV-1g	87.0	83.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
G-Austria	BVDV-1h	85.1	80.7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23-13	BVDV-1i	89.7	88.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2415	BVDV-1i	90.5	86.7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2186	BVDV-1i	88	87.7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
436FaUY/052014	BVDV-1i	NA	90.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KS86-1ncp	BVDV-1j	89.9	83.7	82	82.9	75.5	79.4	73.3	83.1	84.3	85	80.4	82.8	81.4
SuwaNcp	BVDV-1k	84.9	80	80.7	83.5	76.2	75.2	71.4	81.5	80.7	81.2	76.2	80.8	62.8
TR29	BVDV-1l	NA	82.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SD-15	BVDV-1m	86.2	82.8	80.7	79.7	76.4	74.5	71.4	80.8	81.7	82	77.4	79.4	60.3
ZM-95	BVDV-1m	84.7	82.5	78.8	79.4	76.4	76.4	71.9	80.5	80.7	82.4	77.2	79.5	60.4
Shitara/02/06	BVDV-1n	91.1	80.5	79	80.7	77.4	74.3	71.9	81.4	84.3	82	75.6	79.7	61.9
IS26/01ncp	BVDV-1o	86.8	81.2	77.8	79.4	76.5	74.4	73.8	80.1	83.3	81.5	76.4	80.7	63.1
BJ0702	BVDV-1p	84.2	80.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
camel-6	BVDV-1q	89.2	80.5	78.4	81.7	77.4	73.1	73.3	80.7	84.8	81.5	77.9	79.1	54.6
SD0803	BVDV-1q	88.6	78.9	79.7	82.2	78.4	73.6	72.3	80.9	83.3	83.2	77	78.6	61.7
890	BVDV-2a	74.4	67	73.2	70	70.2	64.3	63.8	67.8	72.3	74.6	65.7	69.5	53.3
X818	BDV-1	68.1	66	65.6	71.3	68.9	61.1	57	65.6	77	69.2	60.3	68	48.7

Acknowledgments

The authors thank Setor de Patologia Veterinária (Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) for providing isolates, and 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) for supporting this study.

References

1. Simmonds P, Becher P, Collet MS, et al (2011) Flaviviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus Taxon. Ninth Rep. Int. Comm. Taxon. Viruses*. Academic Press, San Diego, pp 1003–1020
2. Avalos-Ramirez R, Orlich M, Thiel HJ, Becher P (2001) Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286:456–465. doi: 10.1006/viro.2001.1001
3. Vilcek S, Ridpath JF, Van Campen H, et al (2005) Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res* 108:187–193. doi: 10.1016/j.virusres.2004.09.010
4. Kirkland PD, Frost MJ, Finlaison DS, et al (2007) Identification of a novel virus in pigs - Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res* 129:26–34. doi: 10.1016/j.virusres.2007.05.002
5. Schirrneier H, Strebellow G, Depner K, et al (2004) Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J Gen Virol* 85:3647–3652. doi: 10.1099/vir.0.80238-0
6. Houe H (2003) Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31:137–143. doi: 10.1016/S1045-1056(03)00030-7
7. Vilcek S, Paton DJ, Durkovic B, et al (2001) Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol* 146:99–115.
8. Deng Y, Shan T-L, Tong W, et al (2014) Genomic characterization of a bovine viral diarrhea virus 1 isolate from swine. *Arch Virol*. doi: 10.1007/s00705-014-2064-9
9. Weber M, Silveira S, Machado G, et al (2014) High frequency of bovine viral diarrhea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Res* 191:117–124. doi: 10.1016/j.virusres.2014.07.035
10. Giammarioli M., Ridpath J., Rossi E., et al (2015) Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals* 43:220–224. doi: 10.1016/j.biologicals.2015.05.009
11. Ridpath JF, Lovell G, Neill JD, et al (2011) Change in predominance of Bovine viral diarrhea virus subgenotypes among samples submitted to a diagnostic laboratory over a 20-year time span. *J Vet diagnostic Investig* 23:185–193. doi: 10.1177/104063871102300201
12. Booth RE, Thomas CJ, El-Attar LMR, et al (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. doi: 10.1186/1297-9716-44-43
13. Maya L, Puentes R, Reolón E, et al (2016) Molecular diversity of bovine viral diarrhea virus in Uruguay. *Arch Virol* 161:529–535. doi: 10.1007/s00705-015-2688-4
14. Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, et al (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 136:309–323.
15. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
16. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence

- alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30:3059–3066. doi: 10.1093/nar/gkf436
17. Tamura K, Stecher G, Peterson D et al (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
 18. Strong R, Errington J, Cook R et al (2013) Increased phylogenetic diversity of bovine viral diarrhoea virus type 1 isolates in England and Wales since 2001. *Vet Microbiol* 162:315–20. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.09.006

4.2 Artigo II

Genomic and antigenic relationships between two ‘HoBi’-like strains and other members of the *Pestivirus* genus

Ana Cristina S. Mósena¹, Samuel P. Cibulski¹, Matheus N. Weber¹, Simone Silveira¹, Mariana S. Silva¹, Fabiana Q. Mayer², Paulo M. Roehé³ and Cláudio W. Canal^{1*}

¹Laboratório de Virologia – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Laboratório de Biologia Molecular – Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Laboratório de Virologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author. Tel: +55 51 33086926

E-mail address: claudio.canal@ufrgs.br ([C. W. Canal](mailto:C.W.Canal))

Abstract

'HoBi'-like viruses comprise a putative new species within the genus *Pestivirus* of the family *Flaviviridae*. 'HoBi'-like viruses have been detected worldwide in batches of fetal calf serum, in surveillance programs for bovine pestiviruses and from animals presenting clinical signs resembling bovine viral diarrhea virus (BVDV) disease. To date, only six complete genome sequences of 'HoBi'-like viruses are available in public databases. Moreover, detailed analyses of such genomes are still scarce. In an attempt to expand data on the genetic diversity and biology of pestiviruses, two genomes of 'HoBi'-like viruses recovered from Brazilian cattle are described and characterized in the present study. The current analysis of the whole genome and antigenic properties of these two new 'HoBi'-like strains suggests that these viruses are genetically close to recognized pestiviruses. The present data provides evidence that 'HoBi'-like viruses are members of the genus *Pestivirus* and should be formally recognized as a novel species.

Keywords: pestivirus, 'HoBi'-like virus, complete genome, characterization

1. Introduction

The genus *Pestivirus* of the family *Flaviviridae* comprises four recognized species: bovine viral diarrhoea virus type 1 (BVDV-1) and 2 (BVDV-2), border disease virus (BDV) and classical swine fever virus (CSFV) (SIMMONDS et al., 2011). Additional species have been putatively added to the genus, including the giraffe pestivirus (AVALOS- RAMIREZ et al., 2001), Pronghorn antelope virus (VILCEK et al., 2005), Bungowannah virus (KIRKLAND et al., 2007), “Aydin”-like virus (OGUZOGLU et al., 2009), a still unnamed group of viruses detected in small ruminants in Tunisia (THABTI et al., 2005), atypical porcine pestivirus (HAUSE et al., 2016), pestiviruses detected in Norwegian rats (FIRTH et al., 2014), pestiviruses detected in bats (WU et al., 2012) and a group of various viruses referred to as ‘HoBi’-like viruses or BVDV-3 (SCHIRRMEIER et al. 2004). The first ‘HoBi’-like virus was isolated from a Brazilian batch of fetal calf serum (FCS), and referred to as D32/00_HoBi (SCHIRRMEIER et al., 2004). Thenceforth, ‘HoBi’-like viruses have been identified as contaminant in cell cultures (STALDER et al., 2005; LIU et al., 2009; PELETTO et al., 2012; MAO et al., 2012; GAO et al., 2016), in diseased animals (DECARO et al., 2011; BIANCHI et al., 2011; WEBER et al., 2014; SILVEIRA et al., 2015) and in pestivirus surveillance programs (STAHL et al., 2007; BIANCHI et al., 2011; SILVEIRA et al., 2015).

Pestivirus infections in cattle result in economic losses worldwide, specially due to its effect on reproductive performance and, in view of its immunodepressive capacity, lead to enhancement of concurrent or associated diseases (HOUE, 2003). Clinical signs detected in ‘HoBi’-like virus–related infections in cattle cannot be differentiated from those observed in BVDV infections, where respiratory signs (DECARO et al., 2011; XIA et al., 2012; WEBER et al., 2014), abortion (CORTEZ et al., 2006; DECARO et al., 2012), generation of persistently infected calves (DECARO et al., 2013; WEBER et al., 2014;

BAUERMANN et al., 2014) and syndromes resembling mucosal disease (WEBER et al., 2014; DECARO et al., 2014) can be observed.

Initial phylogenetic inferences based on the 5' untranslated region (5'UTR), N^{PRO} and E2-coding regions of 'HoBi'-like viruses seem to indicate that such viruses are closely related to recognized pestivirus species (CORTEZ et al., 2006; LIU et al., 2009; BIANCHI et al., 2011; DECARO et al., 2011; PELETTI et al., 2012; WEBER et al., 2014; SILVEIRA et al., 2015). Antigenic comparisons performed with pestivirus-specific monoclonal antibodies (mAbs) revealed different patterns of reactivity of 'HoBi'-like viruses when compared to other pestivirus members (SCHIRRMIEIER et al., 2004; BAUERMANN et al., 2012). In the present study, the complete genome sequence of two 'HoBi'-like viruses isolated in Brazil were analyzed; the antigenic and genomic relatedness to other pestiviruses were examined and seems to justify the insertion of 'HoBi'-like viruses in a new species within the *Pestivirus* genus.

2. Material and methods

2.1. Samples

Two previously reported 'HoBi'-like strains were used in the present study: isolate PB22487 was recovered from a persistently infected (PI) calf raised in the state of Paraíba, Northeastern Brazil, in 2012 (SILVEIRA et al., 2015); isolate SV478/07 was recovered from a persistently infected (PI) calf from the state of Mato Grosso, Midwestern Brazil, in 2007 (SILVEIRA et al., 2015). Additionally, six 'HoBi'-like and 22 reference pestiviruses' whole genomes were retrieved from GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and included in the analyses.

2.2. Virus isolation

Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK) (originally ATCC, CCL-22TM) were

multiplied in Eagle's minimal essential medium (EMEM; Gibco®) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco®) and antibiotics (penicillin 100 IU/mL; streptomycin 100 µg/mL; Gibco®). All cell cultures, FCS and media were tested free of pestiviruses or antibodies as previously described (Weber et al., 2014). Cells were subcultured every 3- 4 days following standard procedures (Freshney, 1992; Roehe et al., 1997). Serum samples were centrifuged at 3,000 x g for 15 minutes and the supernatant was used to inoculate semiconfluent monolayers of MDBK cells. Virus multiplication was carried out on MDBK cells following standard procedures (Roehe et al., 1997); at the third passage, cells were seeded in 96-well plates (3-4 x 10⁵ cells/well), infected with each isolate at approximately 100 TCID₅₀/well. Plates were then incubated for three days at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, fixed in 20% acetone for immunoperoxidase staining with monoclonal antibodies (mAb) (see below). Aliquots of the viruses were stored at -80 °C for subsequent RNA extraction.

2.3. Monoclonal antibodies (mAbs) and immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)

Antigenic characterization of PB22487 and SV478/07 was performed with a broad panel of monoclonal antibodies shown in Figure 1. Representative strains of the four recognized species were used as comparison: BVDV-1 'Oregon C24V' (GenBank AF091605), 'Singer' (GenBank DQ088995), 'NADL' (GenBank M31182), 'EVI001' (Oliveira et al., 1998) and 'EVI006' (GenBank KP743067); BVDV-2 'Soldan' (Canal et al., 1998); BDV 'W', 'M2', '3535', '137/4' and '390' (Oliveira et al., 1998); and CSFV 'Alfort' (GenBank U90951), 'Glentorf' (GenBank U45478), 'PS Porco' (GenBank AF026715) and 'EVI100' (GenBank AF026761). Previously prepared MDBK monolayers were infected with each of the strains with ~100 TCID₅₀/well and incubated for 4 days at 37 °C in a CO₂ incubator. After incubation, the cell monolayers were fixed in acetone and stained with each mAb in an immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) as previously described (Roehe et al.,

1997). The even columns of the plates were kept uninfected and used as negative controls. After fixed with acetone, monolayers were rehydrated with PBS and incubated with 50 μ L of appropriate dilutions of each of the mAbs (Table 1) for 15 minutes at 37°C. A mouse anti-immunoglobulin G (anti-IgG)- peroxidase conjugate (Sigma Aldrich) was used as secondary antibody. Infected cells were revealed by the addition of carbazole (3-amino-9-ethylcarbazole; Sigma Aldrich) as recommended.

2.4. Viral RNA isolation and sequencing

Supernatants from spiked MDBK cultures (approximately 30 mL) were clarified at low speed centrifugation, filtered through a 0.45 μ m filter and subjected to ultracentrifugation at 100,000 x g during 120 minutes on a 25% sucrose cushion. The viral pellet was eluted in 250 μ L of ultrapure water. Total RNA was extracted using TRIzol LS (Ambion), according to the manufacturer's instructions. The cDNA libraries were further prepared with the "whole transcriptome amplification" kit (WTA2, Sigma Aldrich). Illumina libraries were prepared with "Nextera DNA sample preparation" kit (Illumina) and sequenced in an IlluminaMiSeq platform (Illumina) (2 \times 250-bp paired-end run).

2.5. Genome assembly

High-quality paired-end reads were trimmed using FastaQC (ANDREWS, 2010). Reads were assembled into contigs using SPAdes (version 3.6) (BANKEVICH et al., 2012). The Geneious software (v. 8.1.7) (KEARSE et al., 2012) was used for open reading frame (ORF) prediction and genome annotations.

2.6. Phylogenetic inferences

For comparative genomic analyses, non-cytopathic and cytopathic strains of recognized and putative pestivirus species were obtained from GenBank (Table 1). Cytopathic reference strains had the insertions removed from its genome sequences.

Phylogenetic inferences were performed with the complete genome sequences of the isolates obtained in the present study and reference and representative strains (Table 1). Multiple sequence alignments were performed using MAFFT software (Kato et al., 2002). MEGA6 software (Tamura et al., 2013) was used to reconstruct the phylogenetic trees. Phylogenetic trees were generated from the complete genome, 5'UTR, N^{pro}, E2 and NS2-3 regions, using Maximum Likelihood method (GUINDON; GASCUEL, 2003) with 1,000 bootstrap replicates. The statistical model was inferred for each hypothesis using the 'Find Best DNA/Protein Models' tool available in MEGA6.

The ORF, polyprotein, cleavage sites and similarities between strains used in the analyses were obtained using software Geneious version 6.1.5. The N-Glycosylation sites were predicted using the NetNGlyc 1.0 Server available in the CBS website (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (USSERY, 2008). PRALINE on line alignment toolbox was used to construct the figure 3 (SIMOSSIS and HERINGA, 2005).

3. Results and Discussion

3.1. *De novo* sequencing and genome architecture of PB22487 and SV478/07 'HoBi'- like strains

Sequencing with the IlluminaMiSeq sequencer (2×150 cycles run) generated 67,336 high quality, paired-end reads for PB22487 and 43,188 for SV478/07 (Q score ≥ 30). The sequence reads were *de novo* assembled into 2,080 (PB22487) or 1,058 (SV478/07) contigs using SPAdes 3.6 assembler. *De novo* assembled sequences were analyzed by comparison to GenBank sequences via BLASTn and BLASTx tools of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website. One contig indicative of *Pestivirus* genome was identified in each assembly. The remaining contigs were related either to the bovine genome or to unknown sources (not shown). Contig PB22487 was composed of 4,642 reads (mean coverage ~47).

The SV478/07 contig was composed by 848 reads (mean coverage ~9).

The genome of PB22487 comprises 12,240 nucleotides, while the genome of SV478/07 is 12,266 nucleotides long. The genomes were arranged as linear RNA molecules, with GC contents of 46.2% and 46.0%, respectively. Both display a classical *Flaviviridae* genome organization, comprising one single ORF flanked by 5' and 3' untranslated regions.

3.2. Virus isolation and antigenic characterization

The isolation and amplification of 'HoBi'-like viruses in MDBK cultures was performed using standard procedures (FRESHNEY, 1992; ROEHE et al., 1997), and neither isolate presented the typical pestivirus cytopathic effect. Reactivity of mAbs with members of recognized pestivirus species and two 'HoBi'-like strains described in this study are shown in Figure 1. The results from immunoperoxidase staining are consistent with previous reports which demonstrated conserved epitopes shared among 'HoBi'-like virus and BVDV-1 and -2 isolates. Moreover, the 'HoBi'-like virus analyzed presented reactivity with a higher number of mAb specific for NS2-3 than for E2 (SCHIRRMEIER et al., 2004; BAUERMANN, FLORES & RIDPATH, 2012).

3.3. Comparative analysis of PB22487, SV478/07 and other 'HoBi'-like viruses

Two 'HoBi'-like viruses described in the present study and other six 'HoBi'-like strains retrieved from GenBank were analyzed. The complete genome sequences showed an overall degree of 90.3% to 96.4% nucleotide identity. The comparison of complete genomes of pestiviruses representative of the BVDV-1, BVDV-2, BDV and CSFV species with 'HoBi'-like viruses showed similarities ranging from 66.3% to 68.1%; the similarities among these representative pestiviruses ranged from 66.2% to 71.7%. Similarity of amino acids between the reference strains are shown in Figure 2. The putative polyprotein of strains PB22487 and SV478/07 is 3,899 amino acids long, identical to the other non cytopathic

'HoBi'-like viruses analyzed but slightly different when compared to other pestivirus species (Table 1), as the genome regions translated into proteins (Supplemental Table 1).

The 5'-terminal sequence motif GTATA (or GUAUA) in 5'UTR region is conserved among all pestiviruses analyzed so far (AVALOS-RAMIREZ et al., 2001; BECHER, ORLICH, & THIEL, 2000; FROLOV et al., 1998), including all 'HoBi'-like strains used in this study. Replication of pestiviruses requires this sequence for an efficient replication, like other viruses and genes from eukaryotic cells (HOMA, GLORIOSO & LEVINE, 1988; NAKAJIMA, HORIKOSHI, & ROEDER, 1988).

In the 3'UTR region, AT-rich regions containing ATTA motifs, which are considered a feature of pestiviruses' 3'UTR, were found in all pestivirus species and 'HoBi'-like viruses analyzed, including the two isolates whose sequences are reported here. The proportion of 63% to 73% of A and T bases for the 'HoBi'-like strains in the 3'UTR region is consistent with 60-74% found in other pestiviruses (KIRKLAND et al., 2015). Although little is known about its function, these AU rich regions could help in RNA stability (VILCĚK et al., 1999).

The single open reading frame of the pestiviruses' genome encodes the polyprotein which suffers cleavage from viral and cellular proteases, generating 12 products (N^{pro}-C-E^{rns}-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A- NS4B-NS5A-NS5B). N^{pro} cleaves itself from the polyprotein (STARK et al., 1993), structural proteins (C to p7) are cleaved from the polyprotein by cellular signal peptidases (NEILL, 2013), cleavage between NS2 and NS3 is catalyzed by a protease domain within NS2 (LACKNER et al., 2004), and NS3 to NS5b cleavage occurs by a serino protease domain into the NS3 (BAZAN; FLETTERICKT, 1988). Conservation of cleavage sites is important for the function of the proteins. Conservation of amino acid sequences at cleavage sites among 'HoBi'-like viruses analyzed in this study, including PB22487 and SV478/07, and other pestivirus species can vary depending on the site. There was nearly complete conservation among pestiviruses for cleavage sites N^{pro}/C, NS3-4A, NS4A/B,

NS4B/5A and NS5A/B. For C/E^{ems}, E^{ems}/E1, and E1/E2 cleavage sites, the site was conserved only in one side of the cleaved site, and the greatest variability was found between 'HoBi'-like strains and other pestiviruses in the E2/p7 and p7/NS2 cleavage site (Figure 3). Conservation of cleavage sites among pestivirus species has been reported, claiming the fact that correct cleavage of the polyprotein generates mature and functional viral proteins (AVALOS-RAMIREZ et al., 2001; KIRKLAND et al., 2015). These shared similarities reinforce 'HoBi'-like viruses as a new member of *Pestivirus* genus.

The range of similarity between the different proteins of the 'HoBi'-like analyzed and representative pestivirus members are described in Supplemental Table 2. E2 region was selected for a detailed description below due to its importance in immunological response and cell entry (LI, WANG, KANAI, & MODIS, 2013; LIANG et al., 2016). The E2 protein is a structural glycoprotein exposed in the surface of virions and cell membranes, containing neutralizing epitopes, thus inducing major humoral responses (WEILAND et al., 1990). This protein showed the lowest similarity among 'HoBi'-like strains and representative strains of pestiviruses when compared to the other proteins. The E2 protein of BVDV possesses three domains, and this topology was found in the crystal structure of BVDV-1 (LI et al., 2013): Domains I and II contain antibody epitopes that are exposed on the viral surface, and Domain III does not contain any antibody epitope, indicating that it is not on the viral surface and could act as an anchor to the protein; these features could indicate this domain as more conserved than domain I and II.

The deduced amino acid sequence for the immunodominant E2 envelope protein of 'HoBi'-like viruses analyzed in this study revealed 17 cysteine residues, 15 of them conserved among all pestiviruses, and 2 of them that are only present in ruminant pestiviruses (BVDV-1, BVDV-2, BDV). A region of 16 amino acids in the E2 protein that are highly conserved among all recognized pestivirus species (BECHER et al., 1999), is conserved in all

‘HoBi’-strains analyzed in this study (Figure 4). This region is probably an important site for attachment to cell or interaction with receptors (OMARI et al., 2012; LI et al., 2013).

N-glycosylation is a frequent protein modification that contributes to the antigenic properties of proteins (NEILL, 2013). The E2 glycoprotein has the major antigenic determinants that lead to humoral response, therefore changes in glycosylation in this region could modify antigenic properties of this protein. Modifications in E1-E2 glycosylation were associated with virulence attenuation (FERNANDEZ-SAINZ et al., 2009; RISATTI et al., 2007) and immune system evasion (GAVRILOV et al., 2011) in CSFV. The N-Glycosylation sites were predicted using the NetNGlyc 1.0 Server available in the CBS website (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Three putative N-glycosylation sites were found at the E2 region of all eight ‘HoBi’-like sequences analyzed in this study: NTTL, NWTC and NETG (amino acid positions 807, 876 and 920 respectively). These conserved sites have already been described in other ‘HoBi’-like strains (LANG et al., 2014; WEBER et al., 2017). The three conserved putative N-glycosylation sites are presented in other pestivirus species, like BVDV-1 and BVDV-2 (TAO et al., 2013; ZHU et al., 2016). A fourth putative N-glycosylation site (NTTC) in amino acid position 929 was present in only four of the ‘HoBi’-like strains analyzed: SV478/07, LVRI/cont-1 (GenBank KC297709), CH-KaHo/cont (GenBank JX985409) and D32/00 (GenBank AB871953) (Figure 5).

3.4. Phylogenetic relationships among ‘HoBi’-like strains and other pestiviruses

Using Maximum-Likelihood phylogenetic inferences, both strains described in the present study and other six ‘HoBi’-like sequences were grouped into the putative ‘HoBi’-like species in all trees (Figure 6). The phylogenetic tree constructed with basis on complete genomes suggests that ‘HoBi’-like viruses, BVDV-1 and BVDV-2 species have emerged from a common ancestor (Figure 6 A). The phylogenetic tree constructed based on the 5’UTR region showed ‘HoBi’-like clade as a sister clade to the established species BVDV-2, both

emerging from a common branch with BVDV-1 species (Figure 6 B). The N^{pro}, E2 and NS2/3-based phylogenetic trees clearly show one separate branch corresponding to ‘HoBi’-like viruses, and other major branches corresponding to pestivirus species BVDV-1, BVDV-2, BDV, CSFV, and the tentative Giraffe species (Figure 6 C, D, E), supported by bootstrap values of 92–100%.

‘HoBi’-like viruses are genetic and antigenic distant from other pestivirus species, but these isolates have some of the features shared by pestiviruses species. In phylogenetic relations, trees obtained from comparisons of complete genome (Fig.6 a) and different regions hypothesized that ‘HoBi’-like viruses very likely share a common ancestor with BVDV-2 (Fig. 6 b), or that an ancestor originated one cluster with ‘HoBi’- like viruses and another with BVDV-1, 2 and other species (Fig. 6 c,d,e). This ambiguous proposed results regarding the relationship between ‘HoBi’-like viruses and other pestiviruses in phylogenetic analyses are well reported in literature, and it depends on which genome region is analyzed (LIU et al., 2009; LIU et al., 2010; WEBER et al., 2014; SILVEIRA et al., 2015;). The evolutionary history of the major pestivirus lineages is already unclear but it was determined that BVDV-1, BVDV-2, ‘HoBi’-like viruses and pestivirus of giraffe shared a common ancestor (LIU et al 2009). These pestiviruses have evolved separately and formed independent lineages after possibly being moved to specific regions of the world which could explain the incongruences in tree topologies.

4. Conclusion

This study provides strong data that support the classification of ‘HoBi’-like virus as *Pestivirus* species. Comparison of available complete genome ‘HoBi’-like strains with viruses from the recognized and putative pestivirus species shows that 'HoBi'-like viruses are genetically similar to other pestivirus species and possess all genomic and structural elements of “classical” pestiviruses. Collectively these data readily meet the criteria described for the

definition of a pestivirus species (BECHER et al., 1999; KIRKLAND et al., 2015). The data shown in this study also meet the definition of a *Pestivirus* species, therefore ‘HoBi’-like viruses should be considered as a new species of the *Pestivirus* genus.

Acknowledgments

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 work. CWC and PMR are 1C and 1A research fellows, respectively.

Table 1.Length of complete genome, polyprotein and non-translated regions of some pestiviruses strains*.

Species	Strain	GenBank accession number	Genome length (nt)	ORF (nt)/Polyprotein (aa)	5' UTR (nt)	3' UTR (nt)
BVDV-1	NADL	M31182	12,303	11,964/3,898	385	224
	Osloss	M96687	12,252	11,967/3,899	383	172
	Bega	KF896608	12,193	11,975/3,898	278	218
	10JJ-SKR	KC757383	12,267	11,694/3,897	384	189
	Carlito	KP313732	12,264	11,697/3,898	383	184
BVDV-2	890	BVU18059	12,285	11,694/3,898	385	206
	Potsdam 1600	HG426491	12,265	11,694/3,897	367	203
	Hokudai	AB567658	12,286	11,694/3,897	387	206
CSFV	94.4/IL/94/TWN	AY646427	12,296	11,697/3,898	372	227
	Berger	KJ619377	12,295	11,697/3,898	372	227
	Eystrup	AF326963	12,301	11,697/3,898	373	232
BDV	X818	NC_003679	12,333	11,688/3,895	372	273
	Aveyron	KF918753	12,284	11,700/3,899	370	215
	Chamois	GU270877	12,305	11,700/3,899	376	230
	Gifhorn	KF925348	12,325	11,694/3,897	375	257
	Reindeer	AF144618	12,318	11,688/3,895	370	260
Turkish strains	Burdur/05-TR	KM408491	12,281	11,688/3,895	375	219
	Aydin/04-TR	NC_018713	12,292	11,688/3,895	377	227
Giraffe	H138	NC_003678	12,340	11,703/3,901	382	250
	PG-2	KJ660072	12,264	11,685/3,894	381	199
Pronghorn	Pronghorn	NC_024018	12,273	11,694/3,898	369	210
Bungowannah	B869	NC_023176	12,649	11,757/3,918	391	504
'HoBi'-like	D32/00	AB871953	12,265	11,700/3,899	367	199
	JS12/01	JX469119	12,145	11,700/3,899	311	134
	CH-KaHo/cont	JX985409	12,279	11,700/3,899	380	199
	Th/04_KhonKaen	NC_012812	12,337	11,700/3,899	383	255
	LVRI/cont-1	KC297709	12,282	11,700/3,899	383	200
	Italy-1/10-1	HQ231763	12,104	11,700/3,899	276	128
	PB 22487	This study	12,239	11,700/3,899	340	199
	SV478/07	This study	12,266	11,700/3,899	370	196

1 * Numbers in parenthesis indicate the length of the genome without inserted host cellular sequences (NADL, Osloss, H138) or duplicated viral sequences (890).

mAb	Antigen	BVDV1				BVDV2	BDV					CSFV				HoBi-like		
		Oregon C24/V	Singer	NADL	EVI001	EVI006	Soldan	BDV W	BDV M2	BDV 3535	BDV 137/4	BDV 390	Alfort	Glenfort	PS Porco	EVI100	PB 22487	SV478/07
210	BVDV ERNS																	
115	BVDV E2																	
214	BVDV E2																	
112	BVDV NS2-3																	
160	BVDV NS2-3																	
220	CSFV E2																	
187	CSFV E2																	
216	CSFV																	
217	CSFV																	
302	CSFV																	
304	CSFV																	
306	CSFV																	

Figure 1. Reactivity of mAbs with members of recognized pestivirus species and two 'HoBi'-like strains described in this study. Reactivity was measured by immunoperoxidase-linked assay. Black indicates reactivity of the virus indicated at first line with the mAb indicated at the left column. Description of mAbs includes the denomination and antigen specificity for species and target protein.

12

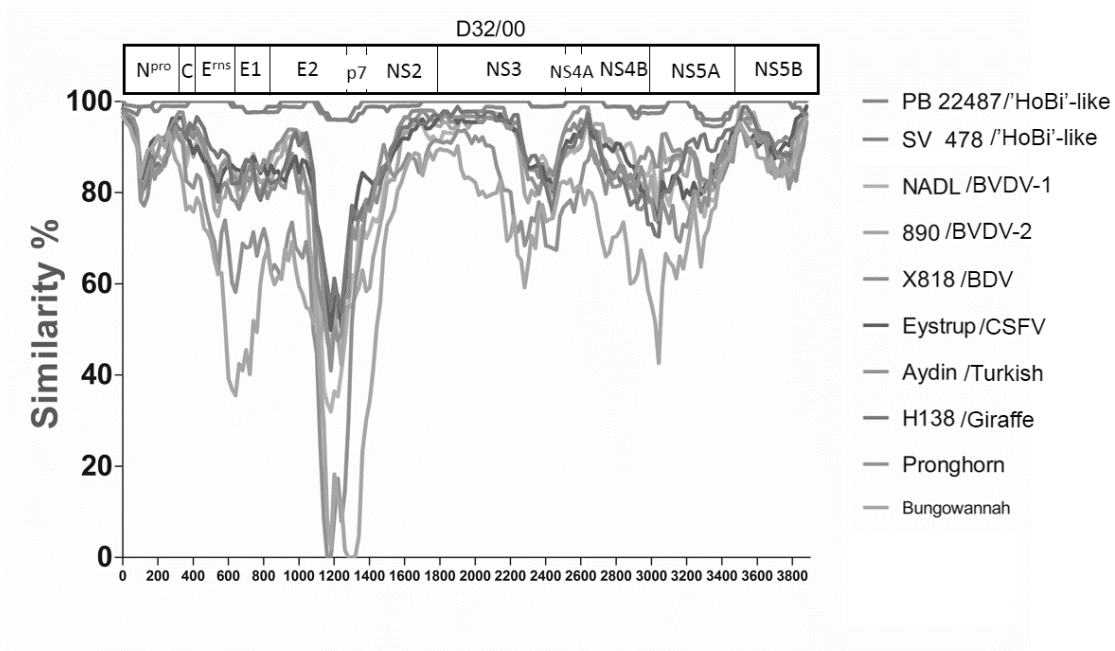


Figure 2. Pairwise polyprotein comparison of 'HoBi'-like reference strain D32/00. The graphic shows similarity between the 'HoBi'-like reference strain, the two strains described in this study and reference strains for each of the pestivirus species, according to the amino acid position into the polyprotein.

18

other_HoBi	I	I	R	G	--	K	F	N	T	T	L	L	N	G	P	A	F	
Italy-1_10-1	V	I	R	G	--	K	F	N	T	T	L	L	N	G	P	A	F	
Th_04_KhonKaen	I	I	R	G	--	K	F	N	A	T	L	L	N	G	P	A	F	
NADL	I	V	R	G	--	K	F	N	T	T	L	L	N	G	P	A	F	
890	V	I	K	G	--	K	F	N	A	S	L	L	N	G	P	A	F	
CSFV	V	V	K	G	--	K	Y	N	T	T	L	L	N	G	S	A	F	
X818	V	V	K	G	--	K	Y	N	T	T	L	L	N	G	S	A	F	
Aydin	V	V	K	G	--	K	Y	N	A	T	L	L	N	G	S	A	F	
Giraffe	V	V	K	G	--	N	F	N	T	T	L	I	N	H	S	A	F	
Pronghorn__	L	V	K	G	--	N	F	N	C	T	L	T	N	A	Q	A	F	
Bungowannah	V	V	R	S	T	T	Q	F	N	P	I	S	I	S	T	P	S	F

Unconserved 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conserved

823

Figure 3. Alignment of the highly conserved amino acid region in E2 for selected recognized pestivirus species and ‘HoBi’-like viruses. The conserved sequence “VVRGKFNTTLLNGPAF” is analyzed, and level of conservation in sites is represented by colors (shown in legend). ‘HoBi’-like strains are shown inside the box, and an insertion of two amino acids is observed for the Bungowannah strain.2005). 27

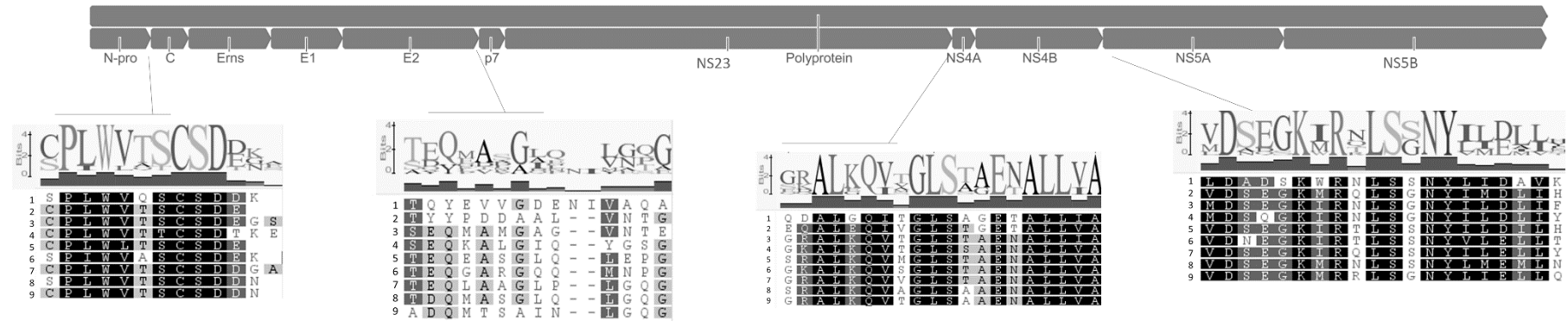
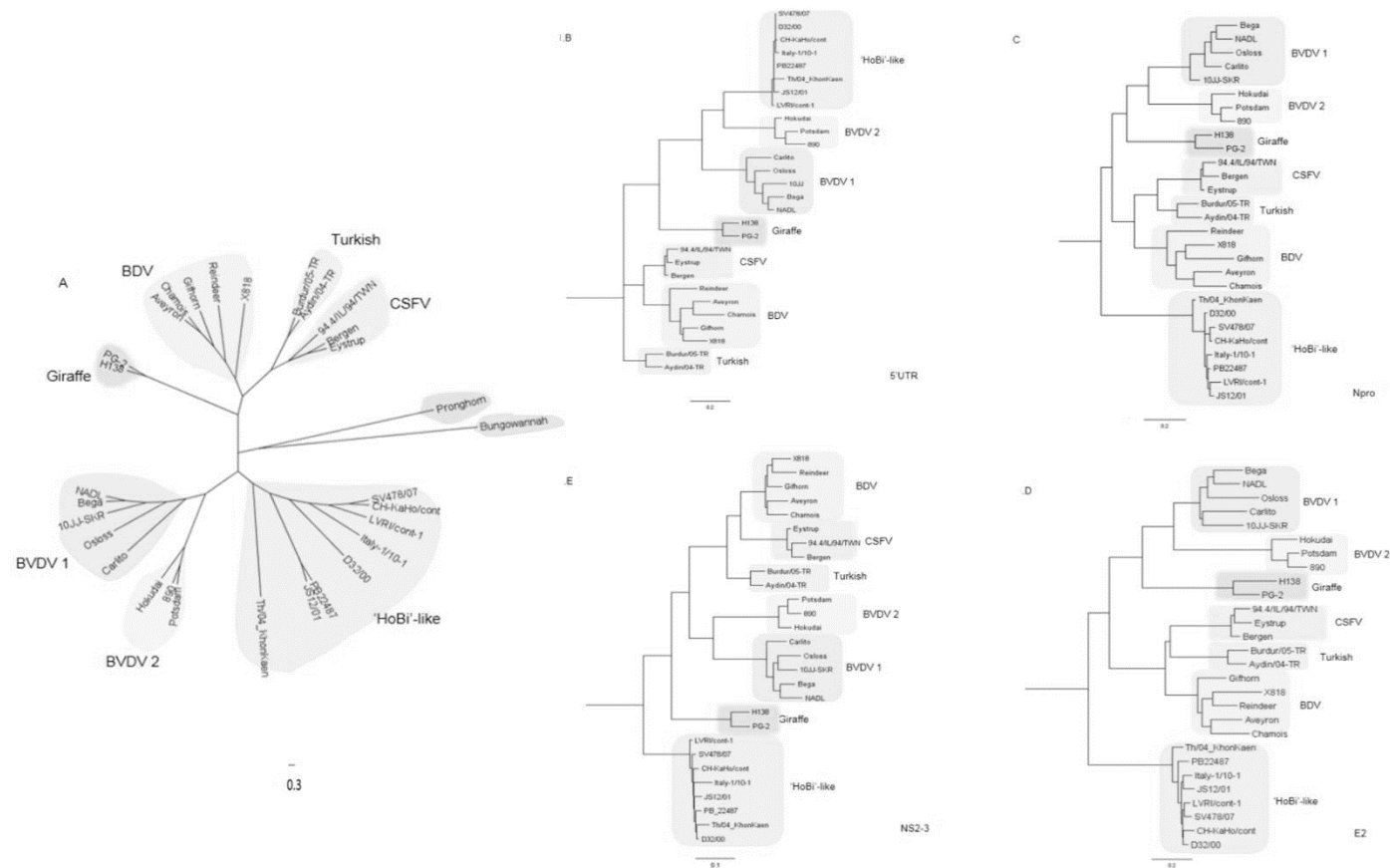


Figure 4. Comparison of some cleavage sites motifs of ‘HoBi’-like and other pestiviruses. Alignments were generated with MUSCLE and the figures were drawn in Geneious. Representative strains of each species is indicated in numbers: 1 (Bungowannah-NC_023176), 2 (Pronghorn-NC_024018), 3 (890-BVU18059), 4 (NADL- M31182), 5 (H138- NC_003678), 6 (D32/00- AB871953), 7 (Eystrup- AF326963), 8 (Aydin/04-NC_018713) and 9 (X818- NC_003679).

35

36

37



38

39 **Figure 5. Phylogenetic trees showing the genetic diversity of 'HoBi'-like viruses with putative and recognized species of *Pestivirus* genus.** (A) ML tree using the complete genome sequence, (B) 5' UTR region, (C) deduced amino acid sequence for N^{pro} protein, (D) deduced amino acid sequence for E2 protein and (E) deduced amino acid sequence for NS2/3 protein.

		Y		Y		Y	Y																																																																																																																								
PB 22487	F	N	T	T	L	L	N	G	P	A	F	L	V	C	P	Y	G	W	T	G	T	I	E	C	T	V	V	S	D	S	T	L	K	T	Q	L	V	K	R	F	V	R	Y	K	P	F	P	H	R	K	H	C	M	D	Q	M	V	V	G	E	D	L	Y	K	C	L	Y	G	G	N	W	T	C	I	P	G	D	R	V	L	Y	Q	G	G	E	V	K	N	C	K	W	C	G	Y	T	F	E	E	P	S	E	L	P	H	F	L	G	K	C	R	L	T	N	E	T	G	Y	R	V	D	D	T	T	C	N	R	D
SV_478	F	N	T	T	L	L	N	G	P	A	F	L	V	C	P	Y	G	W	T	G	T	I	E	C	T	V	V	S	D	S	T	L	K	T	Q	V	V	K	R	F	A	R	Y	K	P	F	P	H	R	K	H	C	M	D	Q	M	V	V	G	E	D	L	Y	E	C	L	Y	G	G	N	W	T	C	I	P	G	D	R	V	L	Y	Q	G	G	E	V	K	D	C	K	W	C	G	F	T	F	E	E	P	S	E	L	P	H	F	L	G	K	C	R	L	T	N	E	T	G	Y	R	V	D	N	T	T	C	N	R	D
Th/04_KhonKaen	F	N	T	T	L	L	N	G	P	A	F	L	V	C	P	Y	G	W	T	G	T	I	E	C	T	M	V	S	D	S	T	L	K	T	Q	V	V	K	R	F	R	Y	K	P	F	P	H	R	K	H	C	M	D	Q	M	V	V	G	E	D	L	Y	E	C	L	Y	G	G	N	W	T	C	I	P	G	D	R	V	L	Y	Q	G	G	E	V	K	D	C	K	W	C	G	F	T	F	E	E	P	S	D	L	P	H	F	L	G	K	C	R	L	T	N	E	T	G	Y	R	V	D	D	T	T	C	N	R	D	
Italy-1/10-1	F	N	T	T	L	L	N	G	P	A	F	L	V	C	P	Y	G	W	T	G	T	I	E	C	T	V	V	S	D	S	T	L	K	T	Q	V	V	K	R	F	A	R	Y	K	P	F	P	H	R	K	H	C	M	D	Q	M	V	V	G	E	D	L	Y	K	C	L	Y	G	G	N	W	T	C	I	P	G	D	R	V	L	Y	Q	G	G	K	V	K	D	C	K	W	C	G	F	F	E	E	P	S	D	L	P	H	F	L	G	K	C	R	L	T	N	E	T	G	Y	R	V	D	D	T	T	C	N	R	D	
LVRI/cont-1	F	N	T	T	L	L	N	G	P	A	F	L	V	C	P	Y	G	W	T	G	T	I	E	C	T	V	V	S	D	S	T	L	K	T	Q	V	A	K	R	F	A	R	Y	K	P	F	P	H	R	K	H	C	I	D	Q	M	V	V	G	E	D	L	Y	E	C	L	Y	G	G	N	W	T	C	I	P	G	D	R	V	L	Y	H	G	G	E	V	K	D	C	K	W	C	G	F	T	F	E	E	P	S	D	L	P	H	F	L	G	K	C	R	L	T	N	E	T	G	Y	R	V	D	N	T	T	C	N	R	D
JS12/01	F	N	T	T	L	L	N	G	P	A	F	L	V	C	P	Y	G	W	T	G	T	I	E	C	T	V	V	S	G	S	T	L	N	T	Q	V	V	K	R	F	R	Y	E	P	F	P	H	R	K	Q	C	M	D	Q	M	V	V	G	E	D	L	Y	E	C	L	Y	G	G	N	W	T	C	I	P	G	D	R	V	L	Y	Q	G	G	E	V	K	D	C	K	W	C	G	F	T	F	E	E	S	S	D	L	P	H	F	L	G	K	C	R	L	T	N	E	T	G	Y	R	V	D	D	T	T	C	N	R	D	
CH-KaHo/cont	F	N	T	T	L	L	N	G	P	A	F	L	V	C	P	Y	G	W	T	G	T	I	E	C	T	V	V	S	D	S	T	L	K	T	Q	V	V	K	R	F	R	Y	K	P	F	P	H	R	K	H	C	I	D	Q	M	V	V	G	E	D	L	Y	K	C	L	Y	G	X	N	W	T	C	I	P	G	D	R	V	L	Y	Q	G	G	E	V	K	D	C	K	W	C	G	F	T	F	E	E	P	S	D	L	P	H	F	L	G	K	C	R	L	T	N	E	T	G	Y	R	V	D	N	T	T	C	N	R	D	
D32/00_HoBi	F	N	T	T	L	L	N	G	S	A	F	L	V	C	P	Y	G	W	T	G	T	I	E	C	T	V	V	S	D	S	T	L	K	T	Q	V	V	K	R	F	A	R	Y	K	P	F	P	H	R	K	H	C	M	D	Q	M	V	V	G	E	D	L	Y	E	C	L	Y	G	G	N	W	T	C	I	P	G	D	R	V	L	Y	Q	G	G	E	V	K	D	C	K	W	C	G	F	T	F	E	E	P	S	D	L	P	H	F	L	G	K	C	R	L	T	N	E	T	G	Y	R	V	D	N	T	T	C	D	R	

Figure 6. Putative Nglycosylation sites within the E2 protein sequence. Conserved sites among the ‘HoBi’-like strains analyzed in this study are indicated in red, and the unic non conserved glycosylation site is indicated in blue.

5. References

- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality coUTRoL tool for high throughput sequence data. *Reference Source*.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H. J., & Becher, P. (2001). Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, 286(2), 456–465. <http://doi.org/10.1006/viro.2001.1001>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A., Dvorkin, M., Kulikov, A., ... Pevzner, P. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. <http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bauermann, F. V., Falkenberg, S. M., Vander Ley, B., Decaro, N., Brodersen, B. W., Harmon, A., ... Ridpath, J. F. (2014). Generation of calves persistently infected with HoBi-like pestivirus and comparison of methods for detection of these persistent infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), 3845–3852. <http://doi.org/10.1128/JCM.01563-14>
- Bauermann, F. V., Flores, E. F., & Ridpath, J. F. (2012). Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: Possible impacts on diagnosis and coUTRoL. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(2), 253–261. <http://doi.org/10.1177/1040638711435144>
- Bauermann, F. V., Flores, E. F., & Ridpath, J. F. (2012). Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and coUTRoL. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 24(2), 253– 61. <http://doi.org/10.1177/1040638711435144>
- Bazan, F., & Fletterick, R. J. (1988). of serine proteases: Structural and functional implications, 85(November), 7872–7876.
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M., & Thiel, H. J. (1999). : identification of novel groups anGenetic diversity of pestivirusesd implications for classification. *Virology*, 262(1), 64–71. <http://doi.org/10.1006/viro.1999.9872>
- Becher, P., Orlich, M., & Thiel, R. (2000). Mutations in the 5' Nontranslated Region of Bovine Viral Diarrhoea Virus Result in Altered Growth Characteristics, 74(17), 7884–7894.
- Bianchi, E., Martins, M., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2011). Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(8), 649–655. <http://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000800003>
- Canal, C. W., Strasser, M., Hertig, C., Masuda, a, & Peterhans, E. (1998). Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Veterinary Microbiology*, 63(2-4), 85–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9850989>
- Cortez, A., Heinemann, M. B., Castro, A. M. M. G. De, Soares, R. M., Pinto, A. M. V, Alfieri, A. A., ... Richtzenhain, L. J. (2006). Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5' -UTR region 1, 26(4), 211–216.

- Decaro, N., Lanave, G., Lucente, M. S., Mari, V., Varello, K., Losurdo, M., ... Buonavoglia, C. (2014). Mucosal disease-like syndrome in a calf persistently infected by Hobi-like pestivirus. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(8), 2946–2954. <http://doi.org/10.1128/JCM.00986-14>
- Decaro, N., Losurdo, M., Lucente, M. S., Sciarretta, R., Mari, V., Larocca, V., ... Buonavoglia, C. (2013). Persistent infection caused by Hobi-like pestivirus. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(4), 1241–3. <http://doi.org/10.1128/JCM.03134-12>
- Decaro, N., Lucente, M. S., Mari, V., Cirone, F., Cordioli, P., Camero, M., ... Buonavoglia, C. (2011). Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(8), 1549–52. <http://doi.org/10.3201/eid1708.101447>
- Decaro, N., Lucente, M. S., Mari, V., Sciarretta, R., Pinto, P., Buonavoglia, D., ... Buonavoglia, C. (2012). Hobi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(2), 509–12. <http://doi.org/10.1128/JCM.05887-11>
- Fernandez-sainz, I., Holinka, L. G., Gavrillov, B. K., Prarat, M. V., Gladue, D., Lu, Z., ... Borca, M. V. (2009). Alteration of the N-linked glycosylation condition in E1 glycoprotein of Classical Swine Fever Virus strain Brescia alters virulence in swine. *Virology*, *386*(1), 210–216. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.042>
- Firth, C., Bhat, M., Firth, M. A., Williams, S. H., Frye, M. J., Simmonds, P., ... Ian, W. (2014). Detection of Zoonotic Pathogens and Characterization of Novel Viruses Carried by Commensal *Rattus norvegicus* in New York City, *5*(5), 1–16. <http://doi.org/10.1128/mBio.01933-14>. Editor
- Freshney, R. (1992). *Animal Cell Culture: A practical approach* (2nd ed.). New York: Oxford University Press.
- Frolov, I., McBride, M. S., Rice, C. M., Frolov, I., Bride, M. S. M. C., & Rice, C. M. (1998). cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhea virus-hepatitis C virus 5' nontranslated region chimeras cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhea virus – hepatitis C virus 5' nontranslated region chimeras, 1418–1435.
- Gao, S., Du, J., Tian, Z., Xing, S., Chang, H., Liu, G., ... Yin, H. (2016). Genome analysis of an atypical bovine pestivirus from fetal bovine serum. *Virus Genes*, 10–12. <http://doi.org/10.1007/s11262-016-1321-2>
- Gavrillov, B. K., Rogers, K., Fernandez-sainz, I. J., Holinka, L. G., Borca, M. V., & Risatti, G. R. (2011). Effects of glycosylation on antigenicity and immunogenicity of classical swine fever virus envelope proteins. *Virology*, *420*(2), 135–145. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2011.08.025>
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, *52*(5), 696–704. <http://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Hause, B. M., Collin, E. A., Peddireddi, L., Yuan, F., Chen, Z., Hesse, R. A., ... Anderson, G. (2016). Communication Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA, (2015), 2994–2998. <http://doi.org/10.1099/jgv.0.000251>
- Homa, F. L., Glorioso, J. C., & Levine, M. (1988). A specific 15-bp TATA box promoter element is required for expression of a herpes simplex virus type 1 late gene, 40–53.
- Houe, H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*, *31*(2), 137–

143. [http://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00030-7](http://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00030-7)
- Karl, S., Jaruwan, K., Stefan, A., Annie, P., Claudia, B., Suneerat, A., & Sándor, B. (2007). Short note Natural infection of cattle with an atypical “ HoBi ” -like pestivirus – Implications for BVD coUTR_{ol} and for the safety of biological products, *38*, 517–523.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, *30*(14), 3059–3066. <http://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647–1649. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kirkland, P. D., Frost, M. J., Finlaison, D. S., King, K. R., Ridpath, J. F., & Gu, X. (2007). Identification of a novel virus in pigs-Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. *Virus Research*, *129*(1), 26–34. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.05.002>
- Kirkland, P. D., Frost, M. J., King, K. R., Finlaison, D. S., Hornitzky, C. L., Gu, X., ... Ridpath, J. F. (2015). Genetic and antigenic characterization of Bungowannah virus, a novel pestivirus. *Veterinary Microbiology*, *178*(3-4), 252–259. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.05.014>
- Lackner, T., Mu, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H., Gorbalenya, A. E., & Tautz, N. (2004). Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus, *78*(19), 10765–10775. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10765>
- Lang, Y., Gao, S., Du, J., Shao, J., Cong, G., Lin, T., ... Chang, H. (2014). Polymorphic genetic characterization of E2 gene of bovine viral diarrhea virus in China. *Veterinary Microbiology*, *174*(3-4), 554–559. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.10.018>
- Li, Y., Wang, J., Kanai, R., & Modis, Y. (2013). Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhea virus. <http://doi.org/10.1073/pnas.1300524110>
- Liang, D., Sainz, I. F., Ansari, I. H., Gil, L. H. V. G., Vassilev, V., & Donis, R. O. (2016). The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses, (2003), 1269–1274. <http://doi.org/10.1099/vir.0.18557-0>
- Liu, L., Kampa, J., Belák, S., & Baule, C. (2009). Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen. *Veterinary Microbiology*, *138*(1-2), 62–8. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.006>
- Liu, L., Xia, H., Baule, C., Belák, S., & Wahlberg, N. (2010). Effects of methodology and analysis strategy on robustness of pestivirus phylogeny. *Virus Research*, *147*(1), 47–52. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.10.004>
- Mao, L., Li, W., Zhang, W., Yang, L., & Jiang, J. (2012). Genome sequence of a novel Hobi-like pestivirus in China. *Journal of Virology*, *86*(22), 12444. <http://doi.org/10.1128/JVI.02159-12>
- Nakajima, N., Horikoshi, M., & Roeder, R. G. (1988). Factors Involved in Specific Transcription by Mammalian RNA Polymerase II : Purification , Genetic Specificity , and TATA Box-Promoter Interactions of TFIID, *8*(10), 4028–4040.

- Neill, J. D. (2013). Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*, *41*(1), 2–7. <http://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.002>
- Oguzoglu, T. C., Tan, M. T., Toplu, N., Demir, a B., Bilge-Dagalp, S., Karaoglu, T., ... Greiser-Wilke, I. (2009). Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup? *Veterinary Microbiology*, *135*(3-4), 374–9. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.085>
- Oliveira, E., Roehe, P., Schaefer, Rejane, Flores, Eduardo, Weiblen, R., Oliveira, L., & Edwards, S. (1998). Estudio Preliminar de Pestivirus Brasilenos Mediante Anticuerpos Monoclonales. *Avances En Ciencias Veterinarias*, *13*:1, 30–36.
- Omari, K. El, Iourin, O., Harlos, K., Grimes, J. M., & Stuart, D. I. (2012). Report Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell EUTry. *CellReports*, *3*(1), 30–35. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.001>
- Peletto, S., Zuccon, F., Pitti, M., Gobbi, E., Marco, L. De, Caramelli, M., ... Acutis, P. L. (2012). Detection and phylogenetic analysis of an atypical pestivirus, strain IZSPLV_To. *Research in Veterinary Science*, *92*(1), 147–50. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.015>
- Risatti, G. R., Holinka, L. G., Sainz, I. F., Carrillo, C., & Kutish, G. F. (2007). Mutations in the carboxyl terminal region of E2 glycoprotein of classical swine fever virus are responsible for viral attenuation in swine, *364*, 371–382. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2007.02.025>
- Roehe, P. M., Da Silva, T. C., Nardi, N. B., Oliveira, L. G., & De Almeida Rosa, J. C. (1997). Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, *17*(1), 41–44. <http://doi.org/10.1590/S0100-736X1997000100007>
- Schirmer, H., Strebelow, G., Depner, K., Hoffmann, B., & Beer, M. (2004). Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *Journal of General Virology*, *85*(12), 3647–3652. <http://doi.org/10.1099/vir.0.80238-0>
- Silveira, S., Weber, M. N., Mosen, A. C. S., da Silva, M. S., Streck, A. F., Pescador, C. A., Canal, C. W. (2015). Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–11. <http://doi.org/10.1111/tbed.12427>
- Stalder, H. P., Meier, P., Pfaffen, G., Wageck-Canal, C., Rüfenacht, J., Schaller, P., ... Peterhans, E. (2005). Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*, *72*(1-2), 37–41; discussion 215–9. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.020>
- Stark, R., Meyers, G., Rumenapf, T., & Thieli, H. J. (1993). Processing of Pestivirus Polyprotein: Cleavage Site between Autoprotease and Nucleocapsid Protein of Classical Swine Fever Virus, *67*(12), 7088–7095.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. <http://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tao, J., Wang, Y., Wang, J., Wang, J., & Zhu, G. (2013). Identification and genetic characterization of new bovine viral diarrhea virus genotype 2 strains in pigs isolated in China. *Virus Genes*, *46*(1), 81–7. <http://doi.org/10.1007/s11262-012-0837-3>

- Thabti, F., Letellier, C., Hammami, S., Pépin, M., Ribière, M., Mesplède, a, ... Russo, P. (2005). Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Archives of Virology*, *150*(2), 215–29. <http://doi.org/10.1007/s00705-004-0427-3>
- Vilček, Š., Paton, D., Lowings, P., Bjodierklund, H., Nettleton, P., & Belák, S. (1999). Genetic analysis of pestiviruses at the 3' end of the genome. *Virus Genes*, *18*(2), 107–114. <http://doi.org/10.1023/A:1008000231604>
- Vilcek, S., Ridpath, J. F., Van Campen, H., Cavender, J. L., & Warg, J. (2005). Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Research*, *108*(1-2), 187–193. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.09.010>
- Wang, F., Deng, M., Huang, Y., & Chang, C. (2015). Structures and Functions of Pestivirus Glycoproteins: Not Simply Surface Matters, 3506–3529. <http://doi.org/10.3390/v7072783>
- Weber, M. N., Bauermann, F. V, Canal, C. W., Bayles, D. O., Neill, J. D., & Ridpath, J. F. (2017). Temporal dynamics of “HoBi” -like pestivirus quasispecies in persistently infected calves generated under experimental conditions. *Virus Research*, *227*, 23–33. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.09.018>
- Weber, M. N., Mósen, a C. S., Simões, S. V. D., Almeida, L. L., Pessoa, C. R. M., Budaszewski, R. F., ... Canal, C. W. (2014). Clinical Presentation Resembling Mucosal Disease Associated with “HoBi”-like Pestivirus in a Field Outbreak. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–9. <http://doi.org/10.1111/tbed.12223>
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., & Meyers, G. (1990). Pestivirus Glycoprotein Which Induces Neutralizing Antibodies Forms Part of a Disulfide- Linked Heterodimer, *64*(8), 3563–3569.
- Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., ... Du, J. (2012). Virome Analysis for Identification of Novel Mammalian Viruses in Bat Species from Chinese Provinces, *86*(20), 10999–11012. <http://doi.org/10.1128/JVI.01394-12>
- Xia, H., Uttenthal, Å., Alenius, S., & Shan, H. (2012). Atypical Pestivirus and Severe Respiratory Disease in Calves , Europe Bartonella spp . Bacteremia and Rheumatic Symptoms in Patients from Lyme Disease – endemic Region, *18*(11), 1917–1918.
- Zhu, L., Lu, H., Cao, Y., Gai, X., Guo, C., Liu, Y., ... Wang, X. (2016). Molecular Characterization of a Novel Bovine Viral Diarrhea Virus Isolate SD-15, (20140204064), 1–18. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0165044>

Supplemental Table 1. Comparative size (in amino acids) of the different proteins of the polyprotein in some pestiviruses.

Species	Strain	N ^{pro}	C	E ^{rns}	E1	E2	P7	NS2	NS3	NS4A	NS4B	NS5A	NS5B
BVDV-1	NADL	168	102	227	194	374	70	453	683	64	347	496	719
	Osloss	168	102	227	194	375	70	453	683	64	347	496	719
	Bega	168	102	227	194	374	70	453	683	64	347	496	719
	10JJ-SKR	168	101	227	194	374	70	453	683	64	347	496	719
	Carlito	168	102	227	194	374	70	453	683	64	347	496	719
BVDV-2	890	168	102	227	194	372	70	453	683	64	347	497	719
	Potsdam 1600	168	102	227	194	372	70	453	683	64	347	497	719
	Hokudai	168	102	227	194	372	70	453	683	64	347	497	719
CSFV	94.4/IL/94/TWN	168	99	227	194	373	70	457	683	64	347	497	718
	Berger	168	99	227	194	373	70	457	683	64	347	497	718
	Eystrup	168	99	227	194	373	70	457	683	64	347	497	718
BDV	X818	168	98	227	194	373	70	453	683	64	347	497	719
	Aveyron	168	100	227	194	373	70	457	683	64	347	497	718
	Chamois-1	168	100	227	194	373	70	457	683	64	347	497	718
	Gifhorn	168	100	227	194	373	70	453	683	64	347	497	718
	Reindeer	168	100	227	194	373	70	453	683	64	347	497	718
Turkish strains	Burdur/05-TR	168	100	227	194	373	70	453	683	64	347	497	718
	Aydin/04-TR	168	100	227	194	373	70	453	683	64	347	497	718
Giraffe	H138	168	100	227	194	374	70	452	683	64	347	497	719
	PG-2	168	98	227	194	374	70	452	683	64	347	497	719
Pronghorn	Pronghorn	168	97	227	194	371	70	459	683	62	347	500	718
Bungowannah	B869	177	99	222	196	377	72	460	683	63	347	505	717
'HoBi'-like	D32/00	168	101	227	194	373	70	453	683	64	347	497	719
	JS12/01	168	101	227	194	373	70	453	683	64	347	497	719
	CH-KaHo/cont	168	101	227	194	373	70	453	683	64	347	497	719
	Th/04_KhonKaen	168	101	227	194	373	70	453	683	64	347	497	719

LVRI/cont-1	168	101	227	194	373	70	453	683	64	347	497	719
Italy-1/10-1	168	101	227	194	373	70	453	683	64	347	497	719
PB22487	168	101	227	194	373	70	453	683	64	347	497	719
SV_478	168	101	227	194	373	70	453	683	64	347	497	719

Supplemental Table 2. Similarity of nucleotides and amino acids between ‘HoBi’-like viruses and other pestiviruses. Similarity of nucleotides and amino acids for all protein regions, expressed in percentage, among ‘HoBi’-like strains analyzed in this study and representative strains of recognized and putative pestivirus species. Strains analyzed, described by name and GenBank access number, are: ‘HoBi’-like (SV478/07; XXXX, PB 22487:XXX,D32/00: AB871953, Italy-1/10-1: HQ231763,CH-KaHo/cont: JX985409, LVRI/cont-1: KC297709, JS12/01: JX469119, Th/04_KhonKaen: NC_012812), BVDV-1 (NADL: M31182), BVDV-2(890: BVU18059), BDV (Eystrup: AF326963), CSFV (X818-NC_003679), Turkish (Aydin/04- NC_018713), Giraffe(H138- NC_003678), Pronghorn (NC_024018) and Bungowannah (NC_023176).

5'UTR	SV478/07	PB 22487	AB871953	HQ231763	JX985409	KC297709	JX469119	NC_012812	M31182	BVU18059	AF326963	NC_003679	NC_018713	NC_003678	NC_024018	NC_023176
SV478		99.219	98.093	99.275	97.297	97.027	97.428	92.703	72.966	73.890	69.067	66.133	67.914	71.654	61.538	57.216
Paraíba	99.219		99.609	98.438	98.633	99.219	98.047	94.531	73.764	77.652	70.656	66.409	66.795	72.453	59.922	54.478
AB871953	98.093	99.609		98.551	97.275	97.548	97.106	92.643	71.693	72.368	69.892	65.591	67.116	71.164	60.160	56.883
HQ231763	99.275	98.438	98.551		98.370	97.101	96.739	94.203	73.852	77.465	70.251	66.308	67.742	72.632	60.000	55.326
JX985409	97.297	98.633	97.275	98.370		96.842	96.624	92.632	71.739	72.519	68.831	64.545	66.406	70.332	60.853	56.140
KC297709	97.027	99.219	97.548	97.101	96.842		96.785	92.950	72.081	73.232	69.072	65.206	66.408	71.066	61.538	55.970
JX469119	97.428	98.047	97.106	96.739	96.624	96.785		92.926	75.078	76.250	71.338	67.834	69.427	72.500	60.127	55.215
NC_012812	92.703	94.531	92.643	94.203	92.632	92.950	92.926		71.574	72.727	68.557	65.979	67.442	70.305	62.051	56.468
BVDCG	72.966	73.764	71.693	73.852	71.739	72.081	75.078	71.574		73.924	70.051	66.497	70.483	71.465	62.025	58.168
BVU18059	73.890	77.652	72.368	77.465	72.519	73.232	76.250	72.727	73.924		68.687	64.646	66.076	73.165	61.266	56.296
AF326963	69.067	70.656	69.892	70.251	68.831	69.072	71.338	68.557	70.051	68.687		77.540	80.423	71.026	61.658	60.302
NC_003679	66.133	66.409	65.591	66.308	64.545	65.206	67.834	65.979	66.497	64.646	77.540		80.688	68.462	60.724	56.281
NC_018713	67.914	66.795	67.116	67.742	66.406	66.408	69.427	67.442	70.483	66.076	80.423	80.688		72.051	61.795	58.291
NC_003678	71.654	72.453	71.164	72.632	70.332	71.066	72.500	70.305	71.465	73.165	71.026	68.462	72.051		62.341	60.100
NC_024018	61.538	59.922	60.160	60.000	60.853	61.538	60.127	62.051	62.025	61.266	61.658	60.724	61.795	62.341		57.178
NC_023176	57.216	54.478	56.883	55.326	56.140	55.970	55.215	56.468	58.168	56.296	60.302	56.281	58.291	60.100	57.178	



N ^{pro} (nucleotides)	SV478/07	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M3118 2	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_02317 6
SV478		95.833	96.032	95.833	97.222	95.238	95.238	89.583	64.683	64.286	67.063	66.071	66.468	63.889	57.937	50.888
Paraíba	95.833		96.230	96.429	95.437	96.230	97.024	90.774	65.873	65.079	66.667	66.071	68.056	65.079	58.730	51.874
AB871953	96.032	96.230		95.437	95.635	94.841	95.635	91.171	65.079	64.087	67.262	65.873	67.063	64.881	58.929	51.479
HQ231763	95.833	96.429	95.437		96.230	95.437	95.833	89.583	66.270	64.286	66.468	66.270	66.071	64.286	57.540	50.690
JX985409	97.222	95.437	95.635	96.230		94.444	95.238	89.583	65.278	63.492	67.063	66.667	65.873	63.690	58.730	51.085
KC297709	95.238	96.230	94.841	95.437	94.444		96.429	88.790	64.484	63.492	65.476	64.683	67.063	63.690	58.333	50.296
JX469119	95.238	97.024	95.635	95.833	95.238	96.429		90.377	65.278	64.484	66.270	66.270	67.659	63.889	58.532	51.085
NC_012812	89.583	90.774	91.171	89.583	89.583	88.790	90.377		66.369	63.988	66.567	66.171	67.163	64.782	59.623	51.282
BVDCG	64.683	65.873	65.079	66.270	65.278	64.484	65.278	66.369		67.262	65.476	66.865	64.087	67.262	58.532	45.957
BVU18059	64.286	65.079	64.087	64.286	63.492	63.492	64.484	63.988	67.262		67.063	65.079	63.889	65.079	61.111	48.718
AF326963	67.063	66.667	67.262	66.468	67.063	65.476	66.270	66.567	65.476	67.063		70.040	73.413	66.468	60.119	51.282
NC_003679	66.071	66.071	65.873	66.270	66.667	64.683	66.270	66.171	66.865	65.079	70.040		69.246	65.675	59.524	49.310
NC_018713	66.468	68.056	67.063	66.071	65.873	67.063	67.659	67.163	64.087	63.889	73.413	69.246		65.873	59.921	48.718
NC_003678	63.889	65.079	64.881	64.286	63.690	63.690	63.889	64.782	67.262	65.079	66.468	65.675	65.873		57.143	52.071
NC_024018	57.937	58.730	58.929	57.540	58.730	58.333	58.532	59.623	58.532	61.111	60.119	59.524	59.921	57.143		51.085
NC_023176	50.888	51.874	51.479	50.690	51.085	50.296	51.085	51.282	45.957	48.718	51.282	49.310	48.718	52.071	51.085	

C (nucleotides)	SV478/07	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M3118 2	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_02317 6
SV478		95.050	96.370	96.700	97.690	97.360	96.040	90.759	66.993	73.529	66.993	68.627	66.129	69.307	61.386	68.977
Paraíba	95.050		95.380	95.050	95.380	96.370	96.370	89.109	66.993	72.222	67.647	68.301	66.452	70.297	61.056	68.647
AB871953	96.370	95.380		97.030	97.360	97.030	95.050	90.099	66.993	73.203	67.647	68.301	66.774	69.967	61.386	69.967

HQ231763	96.700	95.050	97.030		97.690	97.360	95.380	90.099	66.993	71.895	67.647	67.974	66.129	70.297	62.046	68.647
JX985409	97.690	95.380	97.360	97.690		98.350	96.370	90.429	66.667	72.549	67.320	68.301	65.806	69.637	61.056	68.647
KC297709	97.360	96.370	97.030	97.360	98.350		97.360	90.759	66.993	73.529	66.993	67.974	65.806	69.967	61.386	69.307
JX469119	96.040	96.370	95.050	95.380	96.370	97.360		90.099	65.686	71.569	66.667	67.647	67.097	69.637	60.726	69.307
NC_012812	90.759	89.109	90.099	90.099	90.429	90.759	90.099		66.340	71.895	65.196	66.993	63.548	68.977	61.386	67.987
BVDCG	66.993	66.993	66.993	66.993	66.667	66.993	65.686	66.340		68.954	65.359	63.725	64.516	66.993	64.052	63.072
BVU18059	73.529	72.222	73.203	71.895	72.549	73.529	71.569	71.895	68.954		67.974	67.320	65.806	65.686	64.052	61.111
AF326963	66.993	67.647	67.647	67.647	67.320	66.993	66.667	65.196	65.359	67.974		72.667	70.066	65.686	62.092	60.131
NC_003679	68.627	68.301	68.301	67.974	68.301	67.974	67.647	66.993	63.725	67.320	72.667		69.055	64.706	61.111	61.438
NC_018713	66.129	66.452	66.774	66.129	65.806	65.806	67.097	63.548	64.516	65.806	70.066	69.055		60.323	60.645	59.032
NC_003678	69.307	70.297	69.967	70.297	69.637	69.967	69.637	68.977	66.993	65.686	65.686	64.706	60.323		62.373	63.000
NC_024018	61.386	61.056	61.386	62.046	61.056	61.386	60.726	61.386	64.052	64.052	62.092	61.111	60.645	62.373		59.667
NC_023176	68.977	68.647	69.967	68.647	68.647	69.307	69.307	67.987	63.072	61.111	60.131	61.438	59.032	63.000	59.667	

E ^{rms} (nucleotides)	SV478/07	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M3118 2	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_02317 6
SV478		95.888	96.035	95.742	97.063	97.063	94.860	89.427	70.338	72.981	71.366	71.512	74.890	71.512	60.646	58.079
Paraíba	95.888		96.916	95.742	96.769	97.357	96.035	90.749	70.044	73.421	71.659	71.366	74.596	71.219	60.940	58.079
AB871953	96.035	96.916		95.448	96.916	97.210	95.154	90.308	69.750	72.687	71.072	71.806	74.009	71.806	60.940	57.205
HQ231763	95.742	95.742	95.448		96.623	96.916	94.420	90.015	69.750	72.100	70.485	71.366	74.156	70.925	60.059	57.205
JX985409	97.063	96.769	96.916	96.623		97.944	95.154	90.896	69.750	73.421	71.219	71.953	74.743	71.219	60.352	57.787
KC297709	97.063	97.357	97.210	96.916	97.944		95.742	90.602	69.604	73.128	71.219	71.366	74.302	71.219	60.940	57.642
JX469119	94.860	96.035	95.154	94.420	95.154	95.742		89.574	70.044	72.687	71.219	70.631	73.275	70.925	60.352	58.079
NC_012812	89.427	90.749	90.308	90.015	90.896	90.602	89.574		69.310	73.421	70.778	72.540	74.009	72.247	60.940	57.933
BVDCG	70.338	70.044	69.750	69.750	69.750	69.604	70.044	69.310		71.512	68.722	71.512	73.715	70.631	57.709	56.477

BVU18059	72.981	73.421	72.687	72.100	73.421	73.128	72.687	73.421	71.512		71.512	71.366	72.100	74.890	59.471	58.370
AF326963	71.366	71.659	71.072	70.485	71.219	71.219	71.219	70.778	68.722	71.512		73.128	74.449	72.540	60.940	56.623
NC_003679	71.512	71.366	71.806	71.366	71.953	71.366	70.631	72.540	71.512	71.366	73.128		76.946	72.687	58.737	56.914
NC_018713	74.890	74.596	74.009	74.156	74.743	74.302	73.275	74.009	73.715	72.100	74.449	76.946		72.687	60.206	57.642
NC_003678	71.512	71.219	71.806	70.925	71.219	71.219	70.925	72.247	70.631	74.890	72.540	72.687	72.687		60.646	57.933
NC_024018	60.646	60.940	60.940	60.059	60.352	60.940	60.352	60.940	57.709	59.471	60.940	58.737	60.206	60.646		54.585
NC_023176	58.079	58.079	57.205	57.205	57.787	57.642	58.079	57.933	56.477	58.370	56.623	56.914	57.642	57.933	54.585	

E1 (nucleotides)	SV478/07	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M3118 2	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_02317 6
SV478		95.726	95.897	96.068	97.607	96.068	96.068	91.966	69.744	68.889	66.838	69.060	67.005	68.205	54.545	51.443
Paraíba	95.726		95.726	95.726	97.094	94.872	96.239	92.308	68.718	69.231	67.179	68.718	67.174	69.231	55.746	51.783
AB871953	95.897	95.726		96.239	96.923	95.043	95.385	93.162	69.744	68.547	65.983	69.060	67.005	68.205	55.060	51.104
HQ231763	96.068	95.726	96.239		96.923	95.726	96.410	92.650	69.573	69.060	65.812	69.573	67.174	68.547	54.374	50.764
JX985409	97.607	97.094	96.923	96.923		96.752	97.436	93.333	69.744	69.060	65.812	68.547	67.005	68.205	54.545	51.104
KC297709	96.068	94.872	95.043	95.726	96.752		95.214	91.795	69.573	68.205	66.496	68.889	66.836	68.376	53.859	50.764
JX469119	96.068	96.239	95.385	96.410	97.436	95.214		92.479	69.231	68.889	66.667	69.573	66.497	68.889	54.031	50.764
NC_012812	91.966	92.308	93.162	92.650	93.333	91.795	92.479		69.744	67.863	65.812	68.718	67.513	67.350	53.859	49.406
BVDCG	69.744	68.718	69.744	69.573	69.744	69.573	69.231	69.744		69.402	68.889	72.137	69.036	69.231	55.403	51.273
BVU18059	68.889	69.231	68.547	69.060	69.060	68.205	68.889	67.863	69.402		68.376	69.573	68.697	72.479	56.089	50.934
AF326963	66.838	67.179	65.983	65.812	65.812	66.496	66.667	65.812	68.889	68.376		75.556	72.420	72.479	54.717	50.085
NC_003679	69.060	68.718	69.060	69.573	68.547	68.889	69.573	68.718	72.137	69.573	75.556		71.066	73.162	56.089	52.122
NC_018713	67.005	67.174	67.005	67.174	67.005	66.836	66.497	67.513	69.036	68.697	72.420	71.066		69.543	55.518	49.236
NC_003678	68.205	69.231	68.205	68.547	68.205	68.376	68.889	67.350	69.231	72.479	72.479	73.162	69.543		56.261	53.141
NC_024018	54.545	55.746	55.060	54.374	54.545	53.859	54.031	53.859	55.403	56.089	54.717	56.089	55.518	56.261		51.783

NC_023176	51.443	51.783	51.104	50.764	51.104	50.764	50.764	49.406	51.273	50.934	50.085	52.122	49.236	53.141	51.783
-----------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

E2 (nucleotides)	SV478/07	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M3118 2	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_02317 6
SV478		91.957	94.638	94.817	94.951	95.353	92.583	88.382	62.032	59.269	57.909	59.786	59.083	59.164	50.619	48.944
Paraíba	91.957		91.600	91.957	92.627	92.404	92.583	87.846	62.656	59.982	58.088	60.054	59.259	59.964	50.796	48.768
AB871953	94.638	91.600		94.102	94.504	94.549	93.029	89.097	61.141	59.626	58.624	59.875	59.612	59.609	50.973	49.032
HQ231763	94.817	91.957	94.102		94.415	95.174	93.119	87.846	62.121	58.824	58.088	59.339	59.524	58.096	50.619	49.648
JX985409	94.951	92.627	94.504	94.415		95.487	93.610	89.500	61.898	59.938	58.311	59.651	59.744	58.941	51.106	48.812
KC297709	95.353	92.404	94.549	95.174	95.487		93.119	88.472	61.408	59.002	57.909	59.339	59.877	59.164	51.062	49.296
JX469119	92.583	92.583	93.029	93.119	93.610	93.119		88.919	62.121	59.893	58.177	59.964	59.436	59.431	51.239	49.384
NC_012812	88.382	87.846	89.097	87.846	89.500	88.472	88.919		61.364	60.740	58.579	58.847	60.185	60.498	52.257	50.748
BVDCG	62.032	62.656	61.141	62.121	61.898	61.408	62.121	61.364		64.706	60.873	60.339	60.053	62.378	50.619	48.112
BVU18059	59.269	59.982	59.626	58.824	59.938	59.002	59.893	60.740	64.706		56.595	58.913	56.261	57.853	51.327	48.288
AF326963	57.909	58.088	58.624	58.088	58.311	57.909	58.177	58.579	60.873	56.595		65.862	65.520	57.117	50.177	50.176
NC_003679	59.786	60.054	59.875	59.339	59.651	59.339	59.964	58.847	60.339	58.913	65.862		63.933	61.210	53.628	50.352
NC_018713	59.083	59.259	59.612	59.524	59.744	59.877	59.436	60.185	60.053	56.261	65.520	63.933		59.083	50.791	48.255
NC_003678	59.164	59.964	59.609	58.096	58.941	59.164	59.431	60.498	62.378	57.853	57.117	61.210	59.083		51.545	49.824
NC_024018	50.619	50.796	50.973	50.619	51.106	51.062	51.239	52.257	50.619	51.327	50.177	53.628	50.791	51.545		49.387
NC_023176	48.944	48.768	49.032	49.648	48.812	49.296	49.384	50.748	48.112	48.288	50.176	50.352	48.255	49.824	49.387	

p7 (nucleotides)	SV478/07	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M3118 2	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_02317 6
SV478		94.762	96.667	96.190	97.143	92.381	94.286	89.048	57.143	59.048	61.905	60.476	61.792	61.905	52.381	46.047

Paraíba	94.762		96.190	95.714	96.190	91.905	93.333	89.524	58.571	59.524	62.857	61.905	65.094	62.381	53.333	44.651
AB871953	96.667	96.190		98.571	98.571	95.714	96.190	92.381	58.571	57.619	61.905	60.000	62.736	61.905	51.905	46.977
HQ231763	96.190	95.714	98.571		98.095	95.238	96.667	90.952	58.095	58.095	62.381	60.476	62.264	61.429	52.381	47.907
JX985409	97.143	96.190	98.571	98.095		94.286	95.714	90.952	58.095	57.143	61.429	61.429	63.208	61.429	52.857	47.442
KC297709	92.381	91.905	95.714	95.238	94.286		92.857	89.048	57.619	57.143	62.381	59.524	61.792	59.524	50.476	46.512
JX469119	94.286	93.333	96.190	96.667	95.714	92.857		88.571	58.571	57.619	62.381	60.000	62.736	62.381	51.429	46.047
NC_012812	89.048	89.524	92.381	90.952	90.952	89.048	88.571		58.095	56.667	60.952	60.952	62.736	61.429	53.810	47.442
BVDCG	57.143	58.571	58.571	58.095	58.095	57.619	58.571	58.095		62.857	57.143	56.667	60.377	63.333	54.762	44.651
BVU18059	59.048	59.524	57.619	58.095	57.143	57.143	57.619	56.667	62.857		56.667	57.619	56.132	57.143	57.143	46.047
AF326963	61.905	62.857	61.905	62.381	61.429	62.381	62.381	60.952	57.143	56.667		72.857	70.755	60.000	49.524	47.442
NC_003679	60.476	61.905	60.000	60.476	61.429	59.524	60.000	60.952	56.667	57.619	72.857		70.283	64.762	50.952	48.837
NC_018713	61.792	65.094	62.736	62.264	63.208	61.792	62.736	62.736	60.377	56.132	70.755	70.283		67.453	52.830	46.296
NC_003678	61.905	62.381	61.905	61.429	61.429	59.524	62.381	61.429	63.333	57.143	60.000	64.762	67.453		52.857	45.581
NC_024018	52.381	53.333	51.905	52.381	52.857	50.476	51.429	53.810	54.762	57.143	49.524	50.952	52.830	52.857		47.442
NC_023176	46.047	44.651	46.977	47.907	47.442	46.512	46.047	47.442	44.651	46.047	47.442	48.837	46.296	45.581	47.442	

NS2/3 (nucleotides)	SV478/07	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M3118 2	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_02317 6
SV478		95.511	96.420	95.158	96.816	95.951	95.951	91.109	70.599	70.276	69.912	70.951	69.327	70.712	62.526	58.064
Paraíba	95.511		95.892	94.308	96.053	95.188	95.921	90.874	70.158	69.982	69.561	70.745	69.385	70.070	62.759	58.414
AB871953	96.420	95.892		95.305	96.816	95.892	95.980	91.872	70.364	70.070	69.854	70.481	69.094	70.128	62.555	57.976
HQ231763	95.158	94.308	95.305		95.467	94.484	94.660	90.464	69.806	69.542	69.357	69.777	68.482	69.516	62.817	58.122
JX985409	96.816	96.053	96.816	95.467		96.435	96.141	91.740	70.276	69.997	69.781	70.687	69.400	69.807	62.438	58.341
KC297709	95.951	95.188	95.892	94.484	96.435		95.364	90.728	70.511	69.894	69.854	70.657	69.181	70.362	62.963	58.209
JX469119	95.951	95.921	95.980	94.660	96.141	95.364		91.138	70.276	70.100	69.737	70.569	69.415	70.537	62.700	58.180

NC_012812	91.109	90.874	91.872	90.464	91.740	90.728	91.138		70.775	69.689	69.912	69.660	69.094	70.099	62.380	58.384
BVDCG	70.599	70.158	70.364	69.806	70.276	70.511	70.276	70.775		71.391	69.737	70.452	68.978	69.107	61.534	57.947
BVU18059	70.276	69.982	70.070	69.542	69.997	69.894	70.100	69.689	71.391		69.094	70.393	68.978	69.078	60.922	57.655
AF326963	69.912	69.561	69.854	69.357	69.781	69.854	69.737	69.912	69.737	69.094		74.006	73.056	69.360	61.930	58.551
NC_003679	70.951	70.745	70.481	69.777	70.687	70.657	70.569	69.660	70.452	70.393	74.006		72.997	70.391	62.788	57.889
NC_018713	69.327	69.385	69.094	68.482	69.400	69.181	69.415	69.094	68.978	68.978	73.056	72.997		69.728	61.587	57.184
NC_003678	70.712	70.070	70.128	69.516	69.807	70.362	70.537	70.099	69.107	69.078	69.360	70.391	69.728		60.887	57.466
NC_024018	62.526	62.759	62.555	62.817	62.438	62.963	62.700	62.380	61.534	60.922	61.930	62.788	61.587	60.887		57.243
NC_023176	58.064	58.414	57.976	58.122	58.341	58.209	58.180	58.384	57.947	57.655	58.551	57.889	57.184	57.466	57.243	

NS4A (nucleotides)	SV478/07	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M3118 2	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_02317 6
SV478		95.313	96.354	96.875	96.875	96.875	94.271	90.625	75.000	78.125	71.354	76.042	74.479	76.563	60.938	65.625
Paraíba	95.313		96.875	96.354	96.354	97.396	95.833	93.229	77.083	77.083	71.354	77.083	75.000	78.125	60.938	64.063
AB871953	96.354	96.875		97.396	97.396	96.354	95.833	93.229	75.521	78.125	70.833	76.042	75.521	78.125	61.979	63.542
HQ231763	96.875	96.354	97.396		97.917	96.875	95.833	92.708	75.521	78.646	70.833	77.083	77.083	79.167	61.458	65.104
JX985409	96.875	96.354	97.396	97.917		96.875	95.313	92.188	76.563	78.646	71.354	76.042	76.563	78.125	61.458	64.063
KC297709	96.875	97.396	96.354	96.875	96.875		94.271	92.708	77.604	78.125	71.875	77.604	75.521	76.563	61.979	65.104
JX469119	94.271	95.833	95.833	95.833	95.313	94.271		91.146	75.521	77.083	72.917	77.083	78.646	78.125	60.417	65.104
NC_012812	90.625	93.229	93.229	92.708	92.188	92.708	91.146		76.563	76.563	71.875	76.563	74.479	78.646	61.458	63.542
BVDCG	75.000	77.083	75.521	75.521	76.563	77.604	75.521	76.563		71.875	74.479	77.083	75.000	77.604	63.542	60.938
BVU18059	78.125	77.083	78.125	78.646	78.646	78.125	77.083	76.563	71.875		77.604	69.792	70.833	76.042	64.063	60.417
AF326963	71.354	71.354	70.833	70.833	71.354	71.875	72.917	71.875	74.479	77.604		71.354	75.000	76.042	63.542	60.938
NC_003679	76.042	77.083	76.042	77.083	76.042	77.604	77.083	76.563	77.083	69.792	71.354		73.958	79.167	64.063	63.542
NC_018713	74.479	75.000	75.521	77.083	76.563	75.521	78.646	74.479	75.000	70.833	75.000	73.958		76.563	60.938	59.896

NC_003678	76.563	78.125	78.125	79.167	78.125	76.563	78.125	78.646	77.604	76.042	76.042	79.167	76.563		65.104	63.542
NC_024018	60.938	60.938	61.979	61.458	61.458	61.979	60.417	61.458	63.542	64.063	63.542	64.063	60.938	65.104		64.021
NC_023176	65.625	64.063	63.542	65.104	64.063	65.104	65.104	63.542	60.938	60.417	60.938	63.542	59.896	63.542	64.021	

NS4B (nucleotides)	SV478/07	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M3118 2	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_02317 6
SV478		94.717	96.061	94.621	95.581	94.717	93.372	90.490	70.029	71.470	70.317	70.125	70.989	73.295	64.073	62.344
Paraíba	94.717		96.350	95.197	95.773	95.485	95.293	91.354	70.125	70.701	70.893	70.317	71.278	73.295	65.322	62.728
AB871953	96.061	96.350		95.773	96.734	95.869	94.909	91.643	70.413	71.182	70.989	70.317	71.950	73.487	65.418	62.440
HQ231763	94.621	95.197	95.773		96.061	94.524	93.660	90.682	69.837	70.605	70.221	70.509	71.374	72.526	64.457	62.728
JX985409	95.581	95.773	96.734	96.061		95.869	94.524	91.354	69.549	71.566	70.701	69.933	71.566	72.526	65.130	62.824
KC297709	94.717	95.485	95.869	94.524	95.869		93.948	91.066	70.989	70.797	71.085	69.837	71.374	72.815	64.841	62.728
JX469119	93.372	95.293	94.909	93.660	94.524	93.948		90.874	70.317	70.605	70.989	70.413	71.950	73.007	65.034	62.344
NC_012812	90.490	91.354	91.643	90.682	91.354	91.066	90.874		70.125	70.509	71.662	70.221	73.007	72.526	65.898	61.479
BVDCG	70.029	70.125	70.413	69.837	69.549	70.989	70.317	70.125		75.120	70.413	69.549	70.317	71.085	67.435	60.423
BVU18059	71.470	70.701	71.182	70.605	71.566	70.797	70.605	70.509	75.120		68.300	69.933	71.182	70.701	63.977	61.287
AF326963	70.317	70.893	70.989	70.221	70.701	71.085	70.989	71.662	70.413	68.300		73.295	74.352	71.566	65.322	60.711
NC_003679	70.125	70.317	70.317	70.509	69.933	69.837	70.413	70.221	69.549	69.933	73.295		75.793	74.256	64.361	60.999
NC_018713	70.989	71.278	71.950	71.374	71.566	71.374	71.950	73.007	70.317	71.182	74.352	75.793		73.295	65.898	59.270
NC_003678	73.295	73.295	73.487	72.526	72.526	72.815	73.007	72.526	71.085	70.701	71.566	74.256	73.295		64.745	60.615
NC_024018	64.073	65.322	65.418	64.457	65.130	64.841	65.034	65.898	67.435	63.977	65.322	64.361	65.898	64.745		61.383
NC_023176	62.344	62.728	62.440	62.728	62.824	62.728	62.344	61.479	60.423	61.287	60.711	60.999	59.270	60.615	61.383	

NS5A (nucleotides)	SV478/07	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M3118 2	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_02317 6
SV478		95.238	96.110	94.165	96.244	95.842	94.836	89.470	59.222	61.780	60.630	60.161	57.895	58.149	53.015	48.003
Paraíba	95.238		95.909	93.561	95.506	94.769	95.372	89.604	59.423	61.580	60.832	60.027	58.026	58.283	53.347	48.461

AB871953	96.110	95.909		94.769	96.311	95.506	95.842	89.873	60.027	61.981	60.966	59.960	58.750	57.612	53.678	47.610
HQ231763	94.165	93.561	94.769		94.299	93.830	94.299	88.129	59.289	61.513	60.295	59.289	57.895	57.478	52.750	46.955
JX985409	96.244	95.506	96.311	94.299		95.775	95.037	89.001	59.826	61.780	60.899	59.960	58.224	58.350	53.082	47.544
KC297709	95.842	94.769	95.506	93.830	95.775		94.769	89.068	59.624	61.580	60.765	59.423	57.763	57.411	53.214	48.003
JX469119	94.836	95.372	95.842	94.299	95.037	94.769		88.799	59.960	61.780	61.234	60.429	57.895	57.948	53.082	48.003
NC_012812	89.470	89.604	89.873	88.129	89.001	89.068	88.799		60.899	61.312	60.698	59.826	59.342	57.277	52.154	48.461
BVDCG	59.222	59.423	60.027	59.289	59.826	59.624	59.960	60.899		65.728	59.356	60.966	59.684	60.966	53.015	47.020
BVU18059	61.780	61.580	61.981	61.513	61.780	61.580	61.780	61.312	65.728		59.839	59.973	58.762	61.044	54.365	47.937
AF326963	60.630	60.832	60.966	60.295	60.899	60.765	61.234	60.698	59.356	59.839		65.795	65.461	61.771	52.286	48.527
NC_003679	60.161	60.027	59.960	59.289	59.960	59.423	60.429	59.826	60.966	59.973	65.795		63.158	59.356	52.949	47.741
NC_018713	57.895	58.026	58.750	57.895	58.224	57.763	57.895	59.342	59.684	58.762	65.461	63.158		58.224	51.410	47.078
NC_003678	58.149	58.283	57.612	57.478	58.350	57.411	57.948	57.277	60.966	61.044	61.771	59.356	58.224		52.286	48.461
NC_024018	53.015	53.347	53.678	52.750	53.082	53.214	53.082	52.154	53.015	54.365	52.286	52.949	51.410	52.286		47.109
NC_023176	48.003	48.461	47.610	46.955	47.544	48.003	48.003	48.461	47.020	47.937	48.527	47.741	47.078	48.461	47.109	

NS5B (nucleotides)	SV478/07	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M3118 2	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_02317 6
SV478		95.654	95.932	96.209	96.490	96.163	96.117	91.285	69.857	69.579	69.949	69.871	66.637	70.042	62.932	56.901
Paraíba	95.654		96.163	95.700	95.427	95.793	96.440	91.794	68.886	69.764	69.718	69.362	66.233	69.810	63.117	56.944
AB871953	95.932	96.163		96.209	95.751	96.163	96.579	91.886	69.718	69.579	69.995	69.732	66.547	69.995	63.255	56.293
HQ231763	96.209	95.700	96.209		96.120	96.348	96.209	92.117	70.180	69.764	70.319	69.917	66.861	69.810	63.024	56.207
JX985409	96.490	95.427	95.751	96.120		95.982	95.935	91.432	69.099	69.238	69.099	69.437	65.994	69.838	62.920	56.592
KC297709	96.163	95.793	96.163	96.348	95.982		96.255	92.210	69.764	69.949	69.764	69.177	66.637	70.365	63.024	56.641
JX469119	96.117	96.440	96.579	96.209	95.935	96.255		92.626	69.394	70.365	70.134	69.270	66.547	70.042	62.748	56.814
NC_012812	91.285	91.794	91.886	92.117	91.432	92.210	92.626		70.250	68.816	69.834	69.154	66.524	69.741	63.370	56.836
BVDCG	69.857	68.886	69.718	70.180	69.099	69.764	69.394	70.250		69.031	68.289	67.192	66.682	68.011	61.641	56.641
BVU18059	69.579	69.764	69.579	69.764	69.238	69.949	70.365	68.816	69.031		68.567	67.377	65.020	68.985	62.195	56.727
AF326963	69.949	69.718	69.995	70.319	69.099	69.764	70.134	69.834	68.289	68.567		72.761	70.049	68.197	62.512	56.641

NC_003679	69.871	69.362	69.732	69.917	69.437	69.177	69.270	69.154	67.192	67.377	72.761		69.555	68.860	63.452	56.920
NC_018713	66.637	66.233	66.547	66.861	65.994	66.637	66.547	66.524	66.682	65.020	70.049	69.555		66.278	61.614	58.673
NC_003678	70.042	69.810	69.995	69.810	69.838	70.365	70.042	69.741	68.011	68.985	68.197	68.860	66.278		61.365	56.727
NC_024018	62.932	63.117	63.255	63.024	62.920	63.024	62.748	63.370	61.641	62.195	62.512	63.452	61.614	61.365		55.411
NC_023176	56.901	56.944	56.293	56.207	56.592	56.641	56.814	56.836	56.641	56.727	56.641	56.920	58.673	56.727	55.411	

Nºº(amino acids)	SV478/07	PB 22487	AB871953	HQ231763	JX985409	KC297709	JX469119	NC_012812	M31182	BVU18059	AF326963	NC_003679	NC_018713	NC_003678	NC_024018	NC_023176
SV478/07		94.643	95.833	95.238	97.619	92.262	93.452	91.667	65.476	66.667	69.643	67.857	70.238	64.881	56.548	44.382
PB 22487	94.643		97.619	97.024	95.833	95.238	97.619	93.452	66.071	68.452	69.048	67.857	70.833	64.881	57.143	45.506
AB871953	95.833	97.619		97.024	97.024	94.048	96.429	94.643	66.071	67.857	69.643	67.857	69.643	64.881	57.738	45.506
HQ231763	95.238	97.024	97.024		96.429	93.452	95.833	92.857	66.071	67.262	68.452	67.262	70.238	64.286	55.952	45.506
JX985409	97.619	95.833	97.024	96.429		92.262	94.643	92.857	66.071	66.667	70.238	68.452	70.833	65.476	57.143	44.944
KC297709	92.262	95.238	94.048	93.452	92.262		95.238	89.881	64.286	66.667	67.857	67.262	69.643	63.095	55.357	43.820
JX469119	93.452	97.619	96.429	95.833	94.643	95.238		93.452	65.476	68.452	69.048	69.048	69.643	64.286	57.143	44.944
NC_012812	91.667	93.452	94.643	92.857	92.857	89.881	93.452		65.476	69.048	69.643	69.643	70.238	64.881	58.929	44.944
M31182	65.476	66.071	66.071	66.071	66.071	64.286	65.476	65.476		72.024	70.833	70.238	69.048	69.048	58.333	41.573
BVU18059	66.667	68.452	67.857	67.262	66.667	66.667	68.452	69.048	72.024		72.024	69.048	69.048	67.262	61.310	44.944
AF326963	69.643	69.048	69.643	68.452	70.238	67.857	69.048	69.643	70.833	72.024		73.214	78.571	68.452	61.310	45.506
NC_003679	67.857	67.857	67.857	67.262	68.452	67.262	69.048	69.643	70.238	69.048	73.214		75.000	70.238	58.333	44.382
NC_018713	70.238	70.833	69.643	70.238	70.833	69.643	69.643	70.238	69.048	69.048	78.571	75.000		67.857	58.333	44.382
NC_003678	64.881	64.881	64.881	64.286	65.476	63.095	64.286	64.881	69.048	67.262	68.452	70.238	67.857		55.357	44.382
NC_024018	56.548	57.143	57.738	55.952	57.143	55.357	57.143	58.929	58.333	61.310	61.310	58.333	58.333	55.357		44.382
NC_023176	44.382	45.506	45.506	45.506	44.944	43.820	44.944	44.944	41.573	44.944	45.506	44.382	44.382	44.382	44.382	

C (amino acids)	SV478/0 7	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M31182	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_023176
SV478/07		97.030	98.020	98.020	99.010	100.000	100.000	94.104	73.529	78.431	74.510	73.267	72.277	75.248	61.386	72.277
PB 22487	97.030		99.010	97.030	96.040	97.030	97.030	92.124	72.549	77.451	73.529	71.287	71.287	74.257	59.406	71.287
AB871953	98.020	99.010		98.020	97.030	98.020	98.020	92.124	71.569	76.471	74.510	71.287	72.277	73.267	60.396	71.287
HQ231763	98.020	97.030	98.020		97.030	98.020	98.020	92.124	71.569	76.471	76.471	73.267	72.277	75.248	62.376	70.297
JX985409	99.010	96.040	97.030	97.030		99.010	99.010	93.114	72.549	77.451	73.529	73.267	71.287	74.257	61.386	71.287
KC297709	100.000	97.030	98.020	98.020	99.010		100.000	94.104	73.529	78.431	74.510	73.267	72.277	75.248	61.386	72.277
JX469119	100.000	97.030	98.020	98.020	99.010	100.000		94.104	73.529	78.431	74.510	73.267	72.277	75.248	61.386	72.277
NC_012812	94.104	92.124	92.124	92.124	93.114	94.104	94.104		70.633	75.535	69.652	69.352	67.372	72.322	57.471	68.362
M31182	73.529	72.549	71.569	71.569	72.549	73.529	73.529	70.633		77.451	71.569	69.608	69.608	71.569	58.824	64.706
BVU18059	78.431	77.451	76.471	76.471	77.451	78.431	78.431	75.535	77.451		75.490	69.608	70.588	72.549	62.745	65.686
AF326963	74.510	73.529	74.510	76.471	73.529	74.510	74.510	69.652	71.569	75.490		74.257	78.431	69.608	60.784	63.725
NC_003679	73.267	71.287	71.287	73.267	73.267	73.267	73.267	69.352	69.608	69.608	74.257		76.238	68.317	58.416	61.386
NC_018713	72.277	71.287	72.277	72.277	71.287	72.277	72.277	67.372	69.608	70.588	78.431	76.238		67.000	61.000	64.000
NC_003678	75.248	74.257	73.267	75.248	74.257	75.248	75.248	72.322	71.569	72.549	69.608	68.317	67.000		67.347	65.000
NC_024018	61.386	59.406	60.396	62.376	61.386	61.386	61.386	57.471	58.824	62.745	60.784	58.416	61.000	67.347		58.000
NC_023176	72.277	71.287	71.287	70.297	71.287	72.277	72.277	68.362	64.706	65.686	63.725	61.386	64.000	65.000	58.000	

E ^{ms} (amino acids)	SV478/0 7	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M31182	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_023176
SV478/07		96.916	96.916	96.035	97.357	96.916	96.035	94.714	77.974	79.736	76.652	81.057	80.617	79.295	59.471	58.696
PB 22487	96.916		97.357	96.476	97.797	97.357	95.595	95.595	77.093	80.176	76.652	81.057	80.617	79.295	59.031	59.130
AB871953	96.916	97.357		95.595	97.797	97.357	95.595	94.714	76.652	79.295	76.211	80.617	80.176	79.736	59.031	59.130
HQ231763	96.035	96.476	95.595		96.916	95.595	94.714	94.714	75.771	78.414	74.890	79.295	79.736	78.855	58.150	58.696
JX985409	97.357	97.797	97.797	96.916		97.797	96.035	96.035	77.093	80.176	76.652	81.498	81.938	80.176	59.031	59.130
KC297709	96.916	97.357	97.357	95.595	97.797		95.595	94.714	76.211	78.855	76.211	80.176	79.736	78.414	59.031	58.261
JX469119	96.035	95.595	95.595	94.714	96.035	95.595		92.952	76.211	77.533	75.330	78.855	78.855	78.414	58.150	58.261

NC_012812	94.714	95.595	94.714	94.714	96.035	94.714	92.952		77.974	80.176	76.211	80.176	81.938	79.736	58.590	59.130
M31182	77.974	77.093	76.652	75.771	77.093	76.211	76.211	77.974		78.855	73.128	76.652	77.974	75.771	59.031	56.087
BVU18059	79.736	80.176	79.295	78.414	80.176	78.855	77.533	80.176	78.855		74.009	77.974	77.974	80.617	57.709	55.217
AF326963	76.652	76.652	76.211	74.890	76.652	76.211	75.330	76.211	73.128	74.009		81.057	80.617	77.533	60.352	54.783
NC_003679	81.057	81.057	80.617	79.295	81.498	80.176	78.855	80.176	76.652	77.974	81.057		88.987	78.855	59.031	55.652
NC_018713	80.617	80.617	80.176	79.736	81.938	79.736	78.855	81.938	77.974	77.974	80.617	88.987		80.176	59.471	56.957
NC_003678	79.295	79.295	79.736	78.855	80.176	78.414	78.414	79.736	75.771	80.617	77.533	78.855	80.176		58.590	56.957
NC_024018	59.471	59.031	59.031	58.150	59.031	59.031	58.150	58.590	59.031	57.709	60.352	59.031	59.471	58.590		51.739
NC_023176	58.696	59.130	59.130	58.696	59.130	58.261	58.261	59.130	56.087	55.217	54.783	55.652	56.957	56.957	51.739	

E1 (amino acids)	SV478/0 7	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M31182	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_023176
SV478/07		96.923	98.462	98.974	98.462	97.436	97.436	95.385	74.872	71.795	75.897	74.359	71.282	71.282	45.128	42.347
PB 22487	96.923		97.436	97.949	98.462	96.410	98.462	94.872	74.359	70.769	75.385	74.359	70.769	72.308	45.128	44.388
AB871953	98.462	97.436		99.487	98.974	97.949	97.949	96.410	74.872	71.282	75.897	73.846	71.795	71.795	44.615	42.857
HQ231763	98.974	97.949	99.487		99.487	98.462	98.462	95.897	74.872	71.282	75.897	74.359	71.282	71.795	44.615	42.857
JX985409	98.462	98.462	98.974	99.487		97.949	98.974	96.410	74.872	71.282	75.897	74.359	71.282	71.795	44.615	43.367
KC297709	97.436	96.410	97.949	98.462	97.949		96.923	94.359	73.846	69.744	74.872	73.333	71.282	70.769	44.615	43.367
JX469119	97.436	98.462	97.949	98.462	98.974	96.923		95.385	74.872	71.795	76.410	74.872	71.795	72.308	44.615	43.367
NC_012812	95.385	94.872	96.410	95.897	96.410	94.359	95.385		76.410	73.333	76.410	74.872	73.846	71.282	45.641	43.367
M31182	74.872	74.359	74.872	74.872	74.872	73.846	74.872	76.410		81.026	77.436	75.385	76.923	75.897	45.128	43.367
BVU18059	71.795	70.769	71.282	71.282	71.282	69.744	71.795	73.333	81.026		74.359	78.462	76.923	77.949	48.718	44.388
AF326963	75.897	75.385	75.897	75.897	75.897	74.872	76.410	76.410	77.436	74.359		85.641	86.667	80.513	47.692	43.878
NC_003679	74.359	74.359	73.846	74.359	74.359	73.333	74.872	74.872	75.385	78.462	85.641		84.103	82.051	48.718	44.388
NC_018713	71.282	70.769	71.795	71.282	71.282	71.282	71.795	73.846	76.923	76.923	86.667	84.103		82.564	48.718	45.408
NC_003678	71.282	72.308	71.795	71.795	71.795	70.769	72.308	71.282	75.897	77.949	80.513	82.051	82.564		49.744	47.449
NC_024018	45.128	45.128	44.615	44.615	44.615	44.615	44.615	45.641	45.128	48.718	47.692	48.718	48.718	49.744		44.388
NC_023176	42.347	44.388	42.857	42.857	43.367	43.367	43.367	43.367	43.367	44.388	43.878	44.388	45.408	47.449	44.388	

E2 (amino acids)	SV478/0 7	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M31182	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_023176
SV478/07		91.421	94.638	93.029	93.042	94.370	91.957	89.032	62.299	56.417	58.445	57.641	59.249	57.487	43.617	42.480
PB 22487	91.421		91.689	91.421	91.433	92.225	91.153	89.837	61.230	56.684	58.445	57.373	58.981	58.021	43.617	41.953
AB871953	94.638	91.689		93.298	93.578	93.834	92.225	90.105	61.765	57.219	59.517	58.177	60.054	58.289	44.149	41.161
HQ231763	93.029	91.421	93.298		92.237	92.761	92.493	89.569	61.230	56.417	58.445	57.909	59.786	56.417	43.617	42.480
JX985409	93.042	91.433	93.578	92.237		94.114	92.237	90.117	62.312	57.766	58.993	57.117	60.602	57.766	42.831	41.173
KC297709	94.370	92.225	93.834	92.761	94.114		91.957	90.373	62.032	56.684	58.177	57.373	59.786	57.487	43.085	43.272
JX469119	91.957	91.153	92.225	92.493	92.237	91.957		89.837	61.497	57.754	58.445	57.641	58.713	58.021	43.617	41.953
NC_012812	89.032	89.837	90.105	89.569	90.117	90.373	89.837		60.719	57.511	58.738	57.129	60.078	59.383	44.173	42.240
M31182	62.299	61.230	61.765	61.230	62.312	62.032	61.497	60.719		64.706	62.032	59.358	63.636	60.267	43.617	39.314
BVU18059	56.417	56.684	57.219	56.417	57.766	56.684	57.754	57.511	64.706		54.011	55.615	54.545	53.867	43.351	41.161
AF326963	58.445	58.445	59.517	58.445	58.993	58.177	58.445	58.738	62.032	54.011		65.147	66.756	55.882	43.351	39.050
NC_003679	57.641	57.373	58.177	57.909	57.117	57.373	57.641	57.129	59.358	55.615	65.147		67.560	59.091	46.543	43.008
NC_018713	59.249	58.981	60.054	59.786	60.602	59.786	58.713	60.078	63.636	54.545	66.756	67.560		60.160	44.149	41.425
NC_003678	57.487	58.021	58.289	56.417	57.766	57.487	58.021	59.383	60.267	53.867	55.882	59.091	60.160		44.562	39.314
NC_024018	43.617	43.617	44.149	43.617	42.831	43.085	43.617	44.173	43.617	43.351	43.351	46.543	44.149	44.562		39.578
NC_023176	42.480	41.953	41.161	42.480	41.173	43.272	41.953	42.240	39.314	41.161	39.050	43.008	41.425	39.314	39.578	

p7 (amino acids)	SV478/0 7	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M31182	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_023176
SV478/07		95.714	100.000	100.000	100.000	95.714	95.714	92.857	52.857	50.000	58.571	60.000	61.429	55.714	40.000	29.167
PB 22487	95.714		95.714	95.714	95.714	91.429	91.429	92.857	55.714	52.857	61.429	62.857	62.857	57.143	42.857	26.389
AB871953	100.000	95.714		100.000	100.000	95.714	95.714	92.857	52.857	50.000	58.571	60.000	61.429	55.714	40.000	29.167
HQ231763	100.000	95.714	100.000		100.000	95.714	95.714	92.857	52.857	50.000	58.571	60.000	61.429	55.714	40.000	29.167
JX985409	100.000	95.714	100.000	100.000		95.714	95.714	92.857	52.857	50.000	58.571	60.000	61.429	55.714	40.000	29.167

KC297709	95.714	91.429	95.714	95.714	95.714		94.286	88.571	51.429	48.571	57.143	60.000	61.429	54.286	37.143	27.778
JX469119	95.714	91.429	95.714	95.714	95.714	94.286		88.571	50.000	48.571	58.571	58.571	60.000	52.857	37.143	26.389
NC_012812	92.857	92.857	92.857	92.857	92.857	88.571	88.571		55.714	50.000	58.571	60.000	62.857	55.714	41.429	26.389
M31182	52.857	55.714	52.857	52.857	52.857	51.429	50.000	55.714		61.429	54.286	52.857	54.286	54.286	48.571	25.000
BVU18059	50.000	52.857	50.000	50.000	50.000	48.571	48.571	50.000	61.429		52.857	58.571	55.714	48.571	47.143	31.944
AF326963	58.571	61.429	58.571	58.571	58.571	57.143	58.571	58.571	54.286	52.857		80.000	80.000	58.571	40.000	27.778
NC_003679	60.000	62.857	60.000	60.000	60.000	60.000	58.571	60.000	52.857	58.571	80.000		77.143	55.714	38.571	31.944
NC_018713	61.429	62.857	61.429	61.429	61.429	61.429	60.000	62.857	54.286	55.714	80.000	77.143		65.714	41.429	30.556
NC_003678	55.714	57.143	55.714	55.714	55.714	54.286	52.857	55.714	54.286	48.571	58.571	55.714	65.714		42.857	25.000
NC_024018	40.000	42.857	40.000	40.000	40.000	37.143	37.143	41.429	48.571	47.143	40.000	38.571	41.429	42.857		27.778
NC_023176	29.167	26.389	29.167		29.167	27.778	26.389	26.389	25.000	31.944	27.778	31.944	30.556	25.000	27.778	

NS2/3 (amino acids)	SV478/0 7	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M31182	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_023176
SV478/07		97.535	97.887	95.599	97.887	98.063	97.887	96.215	72.675	71.535	77.544	78.785	79.401	74.249	65.179	56.906
PB 22487	97.535		98.151	94.894	97.271	97.447	97.271	96.039	72.268	71.122	77.544	78.521	78.873	74.086	65.179	56.906
AB871953	97.887	98.151		95.070	98.239	97.799	97.711	96.919	72.594	71.617	77.281	78.433	78.961	74.086	65.179	57.080
HQ231763	95.599	94.894	95.070		94.894	94.894	94.806	93.486	71.533	70.215	76.228	77.729	77.289	72.705	64.654	56.469
JX985409	97.887	97.271	98.239	94.894		97.711	97.359	96.127	72.594	71.535	77.456	78.609	79.049	74.167	64.567	57.168
KC297709	98.063	97.447	97.799	94.894	97.711		97.271	95.863	72.838	71.617	77.368	78.433	79.137	74.005	65.179	56.993
JX469119	97.887	97.271	97.711	94.806	97.359	97.271		95.687	72.512	71.535	77.281	78.609	79.225	74.086	65.267	56.818
NC_012812	96.215	96.039	96.919	93.486	96.127	95.863	95.687		72.104	70.792	76.754	77.993	78.785	73.436	64.917	56.731
M31182	72.675	72.268	72.594	71.533	72.594	72.838	72.512	72.104		68.740	72.114	73.817	73.328	79.448	58.313	53.160
BVU18059	71.535	71.122	71.617	70.215	71.535	71.617	71.535	70.792	68.740		71.875	72.442	72.855	66.335	58.491	53.607
AF326963	77.544	77.544	77.281	76.228	77.456	77.368	77.281	76.754	72.114	71.875		85.088	84.386	72.065	62.947	56.670
NC_003679	78.785	78.521	78.433	77.729	78.609	78.433	78.609	77.993	73.817	72.442	85.088		85.827	73.193	62.905	56.906
NC_018713	79.401	78.873	78.961	77.289	79.049	79.137	79.225	78.785	73.328	72.855	84.386	85.827		73.517	63.342	57.080
NC_003678	74.249	74.086	74.086	72.705	74.167	74.005	74.086	73.436	79.448	66.335	72.065	73.193	73.517		59.095	52.220

NC_024018	65.179	65.179	65.179	64.654	64.567	65.179	65.267	64.917	58.313	58.491	62.947	62.905	63.342	59.095		55.052
NC_023176	56.906	56.906	57.080	56.469	57.168	56.993	56.818	56.731	53.160	53.607	56.670	56.906	57.080	52.220	55.052	

NS4A (amino acids)	SV478/0 7	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M31182	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_023176
SV478/07		98.438	96.875	98.438	98.438	98.438	98.438	96.875	85.938	84.375	87.500	87.500	84.375	89.063	64.063	59.375
PB 22487	98.438		98.438	100.000	100.000	100.000	100.000	98.438	87.500	84.375	87.500	87.500	84.375	89.063	65.625	57.813
AB871953	96.875	98.438		98.438	98.438	98.438	98.438	100.000	85.938	82.813	89.063	85.938	84.375	89.063	67.188	56.250
HQ231763	98.438	100.000	98.438		100.000	100.000	100.000	98.438	87.500	84.375	87.500	87.500	84.375	89.063	65.625	57.813
JX985409	98.438	100.000	98.438	100.000		100.000	100.000	98.438	87.500	84.375	87.500	87.500	84.375	89.063	65.625	57.813
KC297709	98.438	100.000	98.438	100.000	100.000		100.000	98.438	87.500	84.375	87.500	87.500	84.375	89.063	65.625	57.813
JX469119	98.438	100.000	98.438	100.000	100.000	100.000		98.438	87.500	84.375	87.500	87.500	84.375	89.063	65.625	57.813
NC_012812	96.875	98.438	100.000	98.438	98.438	98.438	98.438		85.938	82.813	89.063	85.938	84.375	89.063	67.188	56.250
M31182	85.938	87.500	85.938	87.500	87.500	87.500	87.500	85.938		81.250	87.500	89.063	81.250	85.938	64.063	60.938
BVU18059	84.375	84.375	82.813	84.375	84.375	84.375	84.375	82.813	81.250		84.375	87.500	81.250	90.625	64.063	64.063
AF326963	87.500	87.500	89.063	87.500	87.500	87.500	87.500	89.063	87.500	84.375		90.625	87.500	90.625	67.188	57.813
NC_003679	87.500	87.500	85.938	87.500	87.500	87.500	87.500	85.938	89.063	87.500	90.625		85.938	92.188	64.063	64.063
NC_018713	84.375	84.375	84.375	84.375	84.375	84.375	84.375	84.375	81.250	81.250	87.500	85.938		90.625	65.625	57.813
NC_003678	89.063	89.063	89.063	89.063	89.063	89.063	89.063	89.063	85.938	90.625	90.625	92.188	90.625		67.188	60.938
NC_024018	64.063	65.625	67.188	65.625	65.625	65.625	65.625	67.188	64.063	64.063	67.188	64.063	65.625	67.188		65.625
NC_023176	59.375	57.813	56.250	57.813	57.813	57.813	57.813	56.250	60.938	64.063	57.813	64.063	57.813	60.938	65.625	

NS4B (amino acids)	SV478/0 7	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M31182	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_023176
SV478/07		96.830	95.965	93.372	95.965	95.101	96.254	93.372	76.945	76.657	77.810	77.233	77.810	78.098	67.435	62.824
PB 22487	96.830		99.135	96.542	99.135	97.983	98.847	96.254	78.098	77.522	80.115	79.539	79.827	79.827	69.164	63.112
AB871953	95.965	99.135		95.677	98.271	97.118	97.983	95.389	78.098	77.522	80.115	79.539	79.827	79.539	69.164	62.824

HQ231763	93.372	96.542	95.677		95.965	94.524	95.965	93.948	76.945	76.945	78.386	78.386	79.539	78.674	67.723	61.095
JX985409	95.965	99.135	98.271	95.965		97.118	98.271	95.677	77.522	77.522	79.251	78.674	79.827	78.963	68.876	63.112
KC297709	95.101	97.983	97.118	94.524	97.118		96.830	94.813	78.098	77.522	79.539	78.963	79.251	79.827	68.300	62.824
JX469119	96.254	98.847	97.983	95.965	98.271	96.830		95.677	78.098	77.522	79.539	78.963	79.827	79.251	68.876	62.824
NC_012812	93.372	96.254	95.389	93.948	95.677	94.813	95.677		77.233	77.233	79.827	79.251	79.539	79.251	69.741	62.248
M31182	76.945	78.098	78.098	76.945	77.522	78.098	78.098	77.233		85.591	78.386	76.369	78.963	80.403	67.723	61.671
BVU18059	76.657	77.522	77.522	76.945	77.522	77.522	77.522	77.233	85.591		76.081	76.657	78.098	79.251	68.012	62.536
AF326963	77.810	80.115	80.115	78.386	79.251	79.539	79.539	79.827	78.386	76.081		86.744	86.455	82.709	70.317	61.383
NC_003679	77.233	79.539	79.539	78.386	78.674	78.963	78.963	79.251	76.369	76.657	86.744		88.184	81.556	70.317	62.248
NC_018713	77.810	79.827	79.827	79.539	79.827	79.251	79.827	79.539	78.963	78.098	86.455	88.184		81.268	69.164	61.960
NC_003678	78.098	79.827	79.539	78.674	78.963	79.827	79.251	79.251	80.403	79.251	82.709	81.556	81.268		68.300	60.519
NC_024018	67.435	69.164	69.164	67.723	68.876	68.300	68.876	69.741	67.723	68.012	70.317	70.317	69.164	68.300		60.231
NC_023176	62.824	63.112	62.824	61.095	63.112	62.824	62.824	62.248	61.671	62.536	61.383	62.248	61.960	60.519	60.231	

NS5A (amino acids)	SV478/0 7	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M31182	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_023176
SV478/07		96.177	96.781	93.561	96.982	95.775	97.384	91.952	57.143	57.430	60.161	57.344	58.551	55.936	46.918	36.739
PB 22487	96.177		96.579	92.958	96.378	94.769	97.183	91.549	56.539	56.827	59.557	56.740	58.350	55.533	46.521	36.739
AB871953	96.781	96.579		93.763	96.982	95.372	97.384	93.159	57.746	57.430	60.362	57.746	59.759	55.533	47.714	36.346
HQ231763	93.561	92.958	93.763		93.763	92.555	94.970	88.934	55.131	56.225	58.350	55.533	57.948	54.930	45.527	35.560
JX985409	96.982	96.378	96.982	93.763		95.976	97.586	92.354	57.143	57.028	60.161	57.545	59.356	56.338	46.720	36.935
KC297709	95.775	94.769	95.372	92.555	95.976		96.378	90.744	55.936	57.028	59.356	55.734	58.753	55.734	46.521	36.739
JX469119	97.384	97.183	97.384	94.970	97.586	96.378		92.354	56.740	57.028	59.759	56.942	58.753	56.137	46.521	36.149
NC_012812	91.952	91.549	93.159	88.934	92.354	90.744	92.354		57.545	57.631	59.759	58.753	59.155	56.338	46.720	37.328
M31182	57.143	56.539	57.746	55.131	57.143	55.936	56.740	57.545		67.203	57.344	58.551	56.539	56.942	44.533	37.525
BVU18059	57.430	56.827	57.430	56.225	57.028	57.028	57.028	57.631	67.203		57.229	57.430	57.631	58.635	47.619	36.739
AF326963	60.161	59.557	60.362	58.350	60.161	59.356	59.759	59.759	57.344	57.229		62.575	69.215	59.155	44.533	37.328
NC_003679	57.344	56.740	57.746	55.533	57.545	55.734	56.942	58.753	58.551	57.430	62.575		62.978	57.545	44.930	36.346

NC_018713	58.551	58.350	59.759	57.948	59.356	58.753	58.753	59.155	56.539	57.631	69.215	62.978		58.753	43.936	37.917
NC_003678	55.936	55.533	55.533	54.930	56.338	55.734	56.137	56.338	56.942	58.635	59.155	57.545	58.753		43.340	36.149
NC_024018	46.918	46.521	47.714	45.527	46.720	46.521	46.521	46.720	44.533	47.619	44.533	44.930	43.936	43.340		36.576
NC_023176	36.739	36.739	36.346	35.560	36.935	36.739	36.149	37.328	37.525	36.739	37.328	36.346	37.917	36.149	36.576	

NS5B (amino acids)	SV478/0 7	PB 22487	AB87195 3	HQ23176 3	JX98540 9	KC29770 9	JX46911 9	NC_01281 2	M31182	BVU1805 9	AF32696 3	NC_00367 9	NC_01871 3	NC_00367 8	NC_02401 8	NC_023176
SV478/07		97.775	97.914	97.914	97.218	97.636	98.609	94.993	75.243	74.409	75.939	74.965	76.773	75.800	64.534	60.083
PB 22487	97.775		97.497	97.357	95.967	96.940	97.636	94.437	74.826	74.270	75.522	74.687	76.634	75.522	64.534	59.530
AB871953	97.914	97.497		98.331	96.801	98.053	98.748	95.271	74.965	74.270	76.078	74.965	76.912	75.522	64.812	59.669
HQ231763	97.914	97.357	98.331		96.801	97.914	98.748	95.828	75.104	74.548	76.078	74.687	76.912	75.800	64.673	59.254
JX985409	97.218	95.967	96.801	96.801		96.384	97.636	93.880	73.853	73.157	74.826	73.853	75.939	74.548	64.256	59.392
KC297709	97.636	96.940	98.053	97.914	96.384		98.331	95.549	75.382	74.270	76.495	74.687	77.330	75.800	64.673	59.530
JX469119	98.609	97.636	98.748	98.748	97.636	98.331		95.688	75.243	74.548	76.217	74.965	77.051	75.661	64.673	59.807
NC_012812	94.993	94.437	95.271	95.828	93.880	95.549	95.688		74.826	73.435	75.939	74.687	76.634	75.939	65.090	59.807
M31182	75.243	74.826	74.965	75.104	73.853	75.382	75.243	74.826		74.548	70.515	70.932	73.018	72.045	62.726	61.188
BVU18059	74.409	74.270	74.270	74.548	73.157	74.270	74.548	73.435	74.548		71.349	72.045	71.210	72.740	63.839	59.530
AF326963	75.939	75.522	76.078	76.078	74.826	76.495	76.217	75.939	70.515	71.349		79.109	82.476	74.131	65.508	60.359
NC_003679	74.965	74.687	74.965	74.687	73.853	74.687	74.965	74.687	70.932	72.045	79.109		77.886	73.992	64.673	60.635
NC_018713	76.773	76.634	76.912	76.912	75.939	77.330	77.051	76.634	73.018	71.210	82.476	77.886		74.409	65.460	63.260
NC_003678	75.800	75.522	75.522	75.800	74.548	75.800	75.661	75.939	72.045	72.740	74.131	73.992	74.409		63.978	60.221
NC_024018	64.534	64.534	64.812	64.673	64.256	64.673	64.673	65.090	62.726	63.839	65.508	64.673	65.460	63.978		59.116
NC_023176	60.083	59.530	59.669	59.254	59.392	59.530	59.807	59.807	61.188	59.530	60.359	60.635	63.260	60.221	59.116	

5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo (BRASIL, 2017), e apesar da presença de pestivírus que afetam a saúde do rebanho, não existe um programa oficial de controle destes vírus. Anticorpos contra uma espécie de pestivírus podem apresentar certa reação cruzada (COUVREUR et al., 2002; NEIL, 2012) com outras espécies, interferindo em testes diagnóstico. Porém esta característica não é suficiente para que anticorpos vacinais contra uma espécie possam proteger o animal de infecção por outra espécie e até subtipo de pestivírus, sendo sugerido que as vacinas contenham em sua composição espécies e subtipos presentes no território em que será aplicada a vacina (RIDPATH et al., 2010). Por estes motivos, a pesquisa sobre a presença e diversidade de pestivírus é de importância na promoção da saúde do rebanho bovino brasileiro.

O laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul possui linhas de pesquisa de vírus em bovinos, em especial de pestivírus de ruminantes. No laboratório, não somente é feito o diagnóstico, mas também a identificação dos pestivírus encontrados nas amostras, contribuindo com a pesquisa a cerca destes vírus no Brasil, em especial na região Sul. Em recente artigo, foram descritas as espécies e subtipos já diagnosticados em amostras no laboratório, como: BVDV-1(1a, 1b, 1d, 1e), BVDV-2 (2b, 2c) e vírus ‘HoBi’-like (SILVEIRA et al., 2015). Como contribuição à linha de pesquisa do laboratório, nesta dissertação foram descritos:

- 5.1 Uma cepa pertencente ao BVDV subtipo ‘i’, que foi detectada pela primeira vez no Brasil, sendo que antes este subtipo havia sido descrito somente no Reino Unido e Uruguai.
- 5.2 Duas cepas da possível nova espécie dos vírus ‘HoBi’-like foram detectadas em duas regiões distintas do Brasil e tiveram seu genoma completo sequenciado, e, junto com outros genomas de cepas disponíveis em banco de dados, foram caracterizadas, gerando dados para estudos filogenéticos e para uma possível classificação desta dentro do gênero *Pestivirus*.

Os resultados desta dissertação forneceram um maior entendimento sobre o genoma e relações filogenéticas dos pestivírus, em especial BVDV-1 e vírus ‘HoBi’-like, podendo auxiliar outros estudos através do sequenciamento completo dos genomas, e contribuir com conhecimento sobre a diversidade dos pestivírus no Brasil.

6 REFERÊNCIAS

- AGAPOV, E. V. et al. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious Bovine Viral Diarrhea Virus. **Journal of virology**, v. 78, n. 5, p. 2414–2425, 2004.
- ANSARI, I. H. et al. Involvement of a Bovine Viral Diarrhea Virus NS5B Locus in Virion Assembly. **Journal of Virology**, v. 78, n. 18, p. 9612–9623, 2004.
- ARENHART, S. et al. Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 736–742, 2009.
- ARMENGOL, E. et al. Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 551–560, 2002.
- ASFOR, A. S. et al. Recombinant pestivirus E2 glycoproteins prevent viral attachment to permissive and non permissive cells with different efficiency. **Virus Research**, v. 189, p. 147–157, 2014.
- AVALOS-RAMIREZ, R. et al. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. **Virology**, v. 286, n. 2, p. 456–465, 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.
- BACHOFEN, C. et al. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. **Veterinary microbiology**, v. 141, n. 3-4, p. 258–67, 24 mar. 2010.
- 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 coUTRoL. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 253–261, 2012.
- BAUHOFER, O. et al. Classical Swine Fever Virus N pro Interacts with Interferon Regulatory Factor 3 and Induces Its Proteasomal Degradation. **Journal of Virology**, v. 81, n. 7, p. 3087–3096, 2007.
- BAZAN, F.; FLETTERICKT, R. J. Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases : Structural and functional implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 7872–7876, 1988.
- BECHER, P. et al. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1357–1366, 1997.
- BECHER, P. et al. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. **Virology**, v. 262, n. 1, p. 64–71, 15 set. 1999.
- BECHER, P.; ORLICH, M.; THIEL, R. Complete Genomic Sequence of Border Disease Virus , a Pestivirus from Sheep. **Journal of Virology**, v. 72, n. 6, p. 5165–5173, 1998.
- BECHER, P.; TAUTZ, N. RNA recombination in pestiviruses: Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. **RNA Biology**, v. 8, n. 2, p. 216–224, 1 mar. 2011.

- BEER, M. et al. Genetic variability and distribution of Classical swine fever virus. **Animal Health Research Reviews**, v. 16, n. 1, p. 33–39, 2015.
- BEER, M. et al. High Prevalence of Highly Variable Atypical Porcine Pestiviruses Found in Germany. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 1–5, 2016.
- BEHRENS, S. et al. Characterization of an Autonomous Subgenomic Pestivirus RNA Replicon. **Journal of Virology**, v. 72, n. 3, p. 2364–2372, 1998.
- BIANCHI, E. et al. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 649–655, 2011.
- BORDI, L. et al. Emerging Zika Virus Infection : A Rapidly Evolving Situation. **Advances in experimental medicine and biology**, 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e Bubalinos**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em 8 dez, 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de legislação- Programas Nacionais de saúde animal do Brasil**. Brasília, DF, 2009. 441 p. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em 8 dez, 2016
- BROCK, K. V.; DENG, R.; RIBLET, S. M. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR. **Journal of virological methods**, v. 38, n. 1, p. 39–46, jul. 1992.
- 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.
- CEPPI, M. et al. Identification of classical swine fever virus protein E2 as a target for cytotoxic T cells by using mRNA-transfected antigen-presenting cells. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 2525–2534, 2005.
- CHANG, C. et al. Antigenic domains analysis of classical swine fever virus E2 glycoprotein by mutagenesis and conformation-dependent monoclonal antibodies. **Virus Research**, v. 149, n. 2, p. 183–189, 2010.
- CHARLESTON, B. et al. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1893-1897, 2001.
- CHOI, K. H. et al. The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhoea virus establishes the role of GTP in de novo initiation. **PNAS**, v. 101, n. 13, p. 4425–4430, 2004.
- CHOI, K. H. et al. The Structure of Bovine Viral Diarrhoea Virus RNA-Dependent RNA Polymerase and Its Amino- Terminal Domain. **Structure**, v. 14, p. 1107–1113, 2006.
- COLLETT, M. S. et al. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Pestivirus Bovine Viral Diarrhoea Virus. **Virology**, v. 199, p. 191–199, 1988.
- CORTEZ, A. et al. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5' -UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 211–216, 2006.

- DECARO, N. et al. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 1549–52, ago. 2011.
- DECARO, N. et al. Hobi-like pestivirus: Both biotypes isolated from a diseased animal. **Journal of General Virology**, v. 93, n. PART 9, p. 1976–1983, 2012a.
- DECARO, N. et al. Hobi-like pestivirus in aborted bovine fetuses. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 2, p. 509–12, fev. 2012b.
- DECARO, N. et al. Persistent infection caused by Hobi-like pestivirus. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1241–3, abr. 2013.
- DENG, L.; SHUMAN, S. An ATPase Component of the Transcription Elongation Complex Is Required for Factor-dependent Transcription Termination by Vaccinia RNA Polymerase. **The journal of biological chemistry**, v. 271, n. 46, p. 29386–29392, 1996.
- DENG, R.; BROCK, K. V. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a Pestivirus Genome , Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Strain SD-1. **Virology**, v. 191, p. 867–879, 1992.
- DENG, Y. et al. High prevalence of bovine viral diarrhea virus 1 in Chinese swine herds. **Veterinary microbiology**, v. 159, n. 3-4, p. 490–3, 12 out. 2012.
- DEREGT, D. et al. Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhea virus with neutralization escape mutants. **Virus research**, v. 53, p. 763–772, 1998.
- DRAGER, C.; BEER, M.; BLOME, S. Porcine complement regulatory protein CD46 and heparan sulfates are the major factors for classical swine fever virus attachment in vitro. **Archives of virology**, v. 160, p. 739–746, 2015.
- 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. Biologicals Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 8–13, 2013.
- EDWARDS, S. et al. Classical swine fever: the global situation. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 2-3, p. 103-119, Apr. 2000.
- FERNÁNDEZ-SAINZ, I. J. et al. Effect of specific amino acid substitutions in the putative fusion peptide of structural glycoprotein E2 on Classical Swine Fever Virus replication. **Virology**, v. 457, p. 121–130, 2014.
- FIEBACH, A. R. et al. Classical Swine Fever Virus N pro Limits Type I Interferon Induction in Plasmacytoid Dendritic Cells by Interacting with Interferon Regulatory Factor 7. **Journal of virology**, v. 85, n. 16, p. 8002–8011, 2011.
- FIRTH, C. et al. Detection of Zoonotic Pathogens and Characterization of Novel Viruses Carried by Commensal *Rattus norvegicus* in New York City. **mBio**, v. 5, n. 5, p. 1–16, 2014.
- FLORES, E. F. et al. Identificação do vírus da Diarréia Viral Bovina tipo 2 (BVDV-2) no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 85–89, 2000.

- 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.
- GAMLEN, T. et al. Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 133–144, 2010.
- GAO, S. et al. Genome analysis of an atypical bovine pestivirus from fetal bovine serum. **Virus Genes**, p. 10–12, 2016.
- GIAMMAROLI., M. et al. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. **Biologicals**, v. 43, n. 4, p. 220–224, 2015.
- GIL, L. H. V. G. et al. The Amino-Terminal Domain of Bovine Viral Diarrhoea Virus N pro Protein Is Necessary for Alpha / Beta Interferon Antagonism. **Journal of Virology**, v. 80, n. 2, p. 900–911, 2006.
- GORBALENYA, A. E. et al. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. **Nucleic acids research**, v. 17, n. 12, p. 4713–4730, 1989.
- GRASSMANN, C. W.; ISKEN, O.; BEHRENS, S. Assignment of the Multifunctional NS3 Protein of Bovine Viral Diarrhoea Virus during RNA Replication : an In Vivo and In Vitro Study. **Journal of Virology**, v. 73, n. 11, p. 9196–9205, 1999.
- GRUMMER, B. et al. Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral. **Journal of General Virology**, n. 2001, p. 2597–2605, 2001.
- GRUMMER, B.; GROTHA, S.; GREISER-WILKE, I. Bovine Viral Diarrhoea Virus is Internalized by Clathrin- dependent Receptor-mediated Endocytosis. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 432, p. 427–432, 2004.
- GU, B. et al. The RNA Helicase and Nucleotide Triphosphatase Activities of the Bovine Viral Diarrhoea Virus NS3 Protein Are Essential for Viral Replication. **Journal of Virology**, v. 74, n. 4, p. 1794–1800, 2000.
- GUO, K. et al. Identification of two internal signal peptide sequences : critical for classical swine fever virus non- structural protein 2 to trans-localize to the endoplasmic reticulum. **Virology Journal**, v. 8, p. 236, 2011.
- HAUSE, B. M. et al. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. **Journal of General Virology**, v. 10, p. 2994–2998, 2015.
- HE, F. et al. Beta-actin interacts with the E2 protein and is involved in the early replication of classical swine fever virus. **Virus research**, v. 179, p. 161–168, 2014.
- HILTON, L. et al. The NPro Product of Bovine Viral Diarrhoea Virus Inhibits DNA Binding by Interferon Regulatory Factor 3 and Targets It for Proteasomal Degradation. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11723–11732, 2006.
- HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 137–143, jun. 2003.

HULST, M. M. et al. Glycoprotein E1 of Hog Cholera Virus Expressed in Insect Cells Protects Swine from Hog Cholera. **Journal of Virology**, v. 67, n. 9, p. 5435–5442, 1993.

HULST, M. M.; MOORMANN, R. J. M. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E ns and E2 of classical swine fever virus : E ns and E2 interact with different receptors. **Journal of General Virology**, n. 1997, p. 2779–2787, 1997.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Family: Flaviviridae**. 2017. Disponível em: < https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae >. Acesso em 8 dez, 2016.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Genus: Flavivirus**. 2017. Disponível em: < https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus >. Acesso em 8 dez, 2016.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Genus: Hepacivirus**. 2017. Disponível em: < https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/362/genus-hepacivirus >. Acesso em 8 dez, 2016.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Genus: Pegivirus**. 2017. Disponível em: < https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/363/genus-pegivirus >. Acesso em 8 dez, 2016.

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, 2008.

KAMEYAMA, K. et al. Genetic recombination at different points in the N pro -coding region of bovine viral diarrhea viruses and the potentials to change their antigenicities and pathogenicities. v. 116, p. 78–84, 2006.

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, 2007.

KOLUPAEVA, V. G. et al. Ribosomal binding to the internal ribosomal eUTRy site of classical swine fever virus Ribosomal binding to the internal ribosomal eUTRy site of classical swine fever virus. **RNA**, v. 6, p. 1791–1807, 2000.

KOONIN, E. V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2197–2206, 1991.

KOZAK, M. Point Mutations Define a Sequence Flanking the AUG Initiator Codon That Modulates Translation by Eukaryotic Ribosomes. **Cell**, v. 44, p. 283–292, 1986.

LACKNER, T. et al. Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10765–10775, 2004.

- LACKNER, T.; THIEL, H.; TAUTZ, N. Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis. **PNAS**, v. 103, n. 5, p. 1510–1515, 2006.
- LAI, V. C. H. et al. Mutational Analysis of Bovine Viral Diarrhea Virus RNA- Dependent RNA Polymerase. **Journal of Virology**, v. 73, n. 12, p. 10129–10136, 1999.
- LI, X. et al. Identification of host cell binding peptide from an overlapping peptide library for inhibition of classical swine fever virus infection. **Virus Genes**, v. 43, p. 33–40, 2011.
- LI, Y. et al. Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhea virus. **PNAS**, v. 110, n. 17, p. 6805–6810, 2013.
- LIANG, D. et al. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. **Journal of General Virology**, n. 2003, p. 1269–1274, 2016.
- LIN, Z. et al. Classical swine fever virus and p7 protein induce secretion of IL-1 b in macrophages. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 2693–2699, 2014.
- 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. 2009a.
- LIU, L. et al. Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen. **Veterinary microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 62–8, 2 jul. 2009b.
- 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.
- LORENZ, I. C. et al. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. **Nature**, v. 442, p. 831–835, 2006.
- 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.
- MAURER, K. et al. CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 4, p. 1792–1799, 2009.
- MENDEZ, E. et al. Infectious Bovine Viral Diarrhea Virus (Strain NADL) RNA from Stable cDNA Clones : a Cellular Insert Determines NS3 Production and Viral Cytopathogenicity Infectious Bovine Viral Diarrhea Virus (Strain NADL) RNA from Stable cDNA Clones : a Cellular In. **Journal of Virology**, v. 72, n. 6, p. 4737–4745, 1998.
- 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. 239–246, 2014.
- MOES, L.; WIRTH, M. The internal initiation of translation in bovine viral diarrhea virus RNA depends on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. v. 14, p. 1–14, 2007.
- MOENNIG, V. FLOEGEL-NIESMANN, G.; GREISER-WILKE, I. Clinical signs and epidemiology of

- Classical Swine Fever: a review of new knowledge. **The Veterinary Journal**, London, v. 165, n. 1, p. 11-20, Jan.2003.
- MOENNIG, V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 73, v. 2-3, p. 93-102, Apr. 2000.
- MONIES, R. J. ; PATON, D. J. ; VILCEK, S. Mucosal disease-like lesions in sheep infected with Border disease virus. **Veterinary Record**, London, v. 155, n. 24, p. 765-769, Dec. 2004.
- MULLER, A. et al. Cell-Derived Sequences in the N-Terminal Region of the Polyprotein of a Cytopathogenic Pestivirus. **Jornal of virology**, v. 77, n. 19, p. 10663–10669, 2003.
- NADAR, M. et al. HuR binding to AU-rich elements present in the 3' untranslated region of Classical swine fever virus. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 340, 2011.
- NAGAI, M. et al. Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhea viruses using five different genetic regions. **Virus Research**, v. 99, n. 2, p. 103–113, fev. 2004.
- NAKAJIMA, N.; HORIKOSHI, M.; ROEDER, R. G. Factors Involved in Specific Transcription by Mammalian RNA Polymerase II : Purification , Genetic Specificity , and TATA Box-Promoter Interactions of TFIID. v. 8, n. 10, p. 4028–4040, 1988.
- NEILL, J. D. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. **Journal of Virology**, p. 2–7, 2012.
- NEILL, J. D. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 2–7, 2013.
- NETTLETON, P. F. et al. Border disease of sheep and goats. **Veterinary Research**, Paris, v. 29, n. 3-4, p. 327-340, May-Aug. 1998.
- 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.
- OLIVEIRA, E. et al. Estudio Preliminar de Pestivirus Brasileños Mediante Anticuerpos Monoclonales. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v. 13:1, p. 30–36, 1998.
- OMARI, K. EL et al. Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell Entry. **Cell Reports**, v. 3, n. 1, p. 30–35, 2013.
- OIE. World Organization for Animal Health. **Listed diseases, infections and infestations in force in 2017**. Disponível em: < <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>>. Acesso em: 8 dez. 2016.
- PANKRAZ, A.; THIEL, H.; BECHER, P. Essential and Nonessential Elements in the 3' Nontranslated Region of Bovine Viral Diarrhea Virus. **Journal of Virology**, v. 79, n. 14, p. 9119–9127, 2005.
- PATON, D. J. et al. Genetic typing of classical swine fever virus. **Veterinary microbiology**, v. 73, n. 2-3, p. 137–57, 13 abr. 2000.
- PATON, D. J.; GREISER-WILKE, I. Classical swine fever – an update. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 169-178, Dec. 2003.

- PELETTI, S. et al. Detection and phylogenetic analysis of an atypical pestivirus, strain IZSPLV_To. **Research in veterinary science**, v. 92, n. 1, p. 147–50, fev. 2012.
- PETERHANS, E. et al. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. **Veterinary research**, v. 41, n. 6, p. 44, 2010.
- POOLE, T. O. N. et al. Pestivirus Translation Initiation Occurs by Internal Ribosome Entry. **Virology**, v. 754, p. 750–754, 1995.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS : the database of proteolytic enzymes , their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 343–350, 2012.
- RIDPATH, J. et al. Comparison of acute infection of calves exposed to a high-virulence or low-virulence bovine viral diarrhea virus or a HoBi-like virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 3, p. 1–5, 2013.
- RIDPATH, J. F. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. **Biologicals**, v. 31, n. 2, p. 127–131, jun. 2003.
- RIDPATH, J. F. et al. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. **Veterinary microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 196–204, 31 maio 2006.
- RIDPATH, J. F. et al. Prevalence and Antigenic Differences Observed between Bovine Viral Diarrhea Virus Subgenotypes Isolated from Cattle in Australia and Feedlots in the Southwestern United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 2, p. 184–191, 1 mar. 2010.
- RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus , BD31, to other pestiviruses 1. **Virus research**, v. 50, p. 237–243, 1997.
- RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of Bovine viral diarrhea virus into genotypes. **Virology**, v. 205, p. 66–74, 1994.
- RIEDEL, C. et al. The Core Protein of Classical Swine Fever Virus Is Dispensable for Virus Propagation In Vitro. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1–14, 2012.
- RIJNBRAND, R. et al. Internal Entry of Ribosomes Is Directed by the 5' J Noncoding Region of Classical Swine Fever Virus and Is Dependent on the Presence of an RNA Pseudoknot Upstream of the Initiation Codon. **Journal of Virology**, v. 71, n. 1, p. 451–457, 1997.
- RINCK, G. et al. A Cellular J-Domain Protein Modulates Polyprotein Processing and Cytopathogenicity of a Pestivirus. **Journal of Virology**, v. 75, n. 19, p. 9470–9482, 2001.
- RISATTI, G. R. et al. Mutations in the carboxyl terminal region of E2 glycoprotein of classical swine fever virus are responsible for viral attenuation in swine. **Virology**, v. 364, p. 371–382, 2007.
- RONECKER, S. et al. Formation of bovine viral diarrhea virus E1 – E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 2114–2121, 2008.
- RUGGLI, N. et al. Classical Swine Fever Virus Can Remain Virulent after Specific Elimination of the Interferon Regulatory Factor 3-Degrading Function of N pro. **Journal of Virology**, v. 83, n. 2, p. 817–829,

2009.

RUMENAPF, T. et al. Processing of the Envelope Glycoproteins of Pestiviruses. **Jornal of virology**, v. 67, n. 6, p. 3288–3294, 1993.

SANDVIK, T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. **Preventive veterinary medicine**, v. 72, p. 3–16, 15 nov. 2005.

SCHELP, C.; GREISER-WILKE, I.; MOENNIG, V. An actin-binding protein is involved in pestivirus entry into bovine cells. **Virus research**, v. 68, p. 1–5, 2000.

SCHIRRMEIER, H. et al. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 12, p. 3647–3652, 2004.

SEAGO, J.; GOODBOURN, S.; CHARLESTON, B. The classical swine fever virus N pro product is degraded by cellular proteasomes in a manner that does not require interaction with interferon regulatory factor 3. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 721–726, 2010.

SHENG, C. et al. Characterization of interaction of classical swine fever virus NS3 helicase with 3 untranslated region. **Virus research**, v. 129, p. 43–53, 2007.

SHENG, C. et al. Classical swine fever virus NS5B protein suppresses the inhibitory effect of NS5A on viral translation by binding to NS5A. **Journal of General Virology**, n. 2012, p. 939–950, 2012.

SHENG, C. et al. Research in Veterinary Science Characterization of the C-terminal sequence of NS5A necessary for the assembly and production of classical swine fever virus infectious particles. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 2, p. 449–454, 2014.

SILVEIRA, S. et al. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 1–11, 2015.

SIMMONDS, P. et al. Flaviviridae. In: KING, A. M. Q. et al. (Eds.). . **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2011. p. 1003–1020.

STAHL, K. et al. Natural infection of cattle with an atypical “HoBi”-like pestivirus – Implications for BVD control and for the safety of biological products. v. 38, p. 517–523, 2007.

STÄHL, K. et al. Atypical “HoBi”-like pestiviruses--recent findings and implications thereof. **Veterinary microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 90–3, 21 abr. 2010.

STALDER, H. P. et al. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive veterinary medicine**, v. 72, n. 1-2, p. 37–41; discussion 215–9, 15 nov. 2005.

STAPLETON, J.T. et al. The GB viruses: A review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 233–246, 2011.

STARK, R. et al. Processing of Pestivirus Polyprotein : Cleavage Site between Autoprotease and Nucleocapsid Protein of Classical Swine Fever Virus. **Journal of Virology**, v. 67, n. 12, p. 7088–7095, 1993.

- 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, J.; WARRENER, P.; COLLETT, M. S. RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus Bovine viral diarrhoea virus. **Virology**, v. 193, p. 1–10, 1993.
- TANG, F.; ZHANG, C. Evidence for positive selection on the E2 gene of bovine viral diarrhoea virus type 1. **Virus Genes**, v. 35, p. 629–634, 2007.
- TAUTZ, N.; KAISER, A.; THIEL, H. NS3 Serine Protease of Bovine Viral Diarrhoea Virus : Characterization of Active Site Residues , NS4A Cofactor Domain , and Protease – Cofactor Interactions. **Virology**, v. 273, p. 351–363, 2000.
- TAUTZ, N.; TEWS, B. A.; MEYERS, G. **The Molecular Biology of Pestiviruses**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 93
- THABTI, F. et al. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. **Archives of virology**, v. 150, n. 2, p. 215–29, fev. 2005.
- THIEL, H. et al. Hog Cholera Virus : Molecular Composition of Virions from a Pestivirus. **Journal of Virology**, v. 65, n. 9, p. 4705–4712, 1991.
- THIEL, H.J et al. Flaviviridae. In: FANQUET C.M (Ed.) et al, **Virus Taxonomy**: eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses. San Diego: Elsevier, 2005; p. 981–998.
- THURNER, C. et al. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 1113–1124, 2004.
- TRATSCHIN, J. et al. Classical Swine Fever Virus Leader Proteinase N pro Is Not Required for Viral Replication in Cell Culture. **Journal of Virology**, v. 72, n. 9, p. 7681–7684, 1998.
- VILCEK, S. et al. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. **Archives of virology**, v. 146, n. 1, p. 99–115, jan. 2001.
- VILCEK, S. et al. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates : identification of a new BVDV-1 genetic group. **Veterinary Research**, v. 35, p. 609–615, 2004.
- VILCEK, S. et al. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. **Virus Research**, v. 108, n. 1-2, p. 187–193, 2005.
- WANG, P. et al. Classical swine fever virus NS3 enhances RNA-dependent RNA polymerase activity by binding to NS5B. **Virus research**, v. 148, p. 17–23, 2010.
- WARRENER, P.; COLLETT, M. S. Pestivirus NS3 (p80) Protein Possesses RNA Helicase Activity. **Journal of Virology**, v. 69, n. 3, p. 1720–1726, 1995.
- 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. 2014a.
- WEILAND, E. et al. Pestivirus Glycoprotein Which Induces Neutralizing Antibodies Forms Part of a Disulfide-

Linked Heterodimer. **Journal of Virology**, v. 64, n. 8, p. 3563–3569, 1990.

WEILAND, F. et al. Localization of pestiviral envelope proteins E₁ and E₂ at the cell surface and on isolated particles. **Journal of General Virology**, n. 1999, p. 1157–1165, 2016.

WEN, G. et al. Characterization of classical swine fever virus (CSFV) nonstructural protein 3 (NS3) helicase activity and its modulation by CSFV RNA-dependent RNA polymerase. **Virus research**, v. 141, p. 63–70, 2009.

WOLFMAYER, A. et al. Genomic (5' H UTR) and serological differences among German BVDV field isolates Brief Report. **Archives of virology**, v. 142, p. 2049–2057, 1997.

WU, Z. et al. Virome Analysis for Identification of Novel Mammalian Viruses in Bat Species from Chinese Provinces. **Journal of Virology**, v. 86, n. 20, p. 10999–11012, 2012.

XIA, H. et al. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. **PloS one**, v. 6, n. 12, jan. 2011.

XIAO, M. et al. Communication Effect of NS3 and NS5B proteins on classical swine fever virus internal ribosome entry site-mediated translation and its host cellular translation. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 994–999, 2008.

XU, J. et al. Bovine Viral Diarrhea Virus NS3 Serine Proteinase: Polyprotein Cleavage Sites, Cofactor Requirements, and Molecular Model of an Enzyme Essential for Pestivirus Replication. **Journal of Virology**, v. 71, n. 7, p. 5312–5322, 1997.

YANG, Z. et al. Annexin 2 is a host protein binding to classical swine fever virus E₂ glycoprotein and promoting viral growth in PK-15 cells. **Virus Research**, v. 201, p. 16–23, 2015

YU, H. et al. A Stem-Loop Motif Formed by the Immediate 5' J Terminus of the Bovine Viral Diarrhea Virus Genome Modulates Translation as well as Replication of the Viral RNA. **Journal of Virology**, v. 74, n. 13, p. 5825–5835, 2000.

YU, H.; GRASSMANN, C. W.; BEHRENS, S. Sequence and Structural Elements at the 3' J Terminus of Bovine Viral Diarrhea Virus Genomic RNA: Functional Role during RNA Replication. **Journal of Virology**, v. 73, n. 5, p. 3638–3648, 1999.

ZHANG, C. et al. Stimulation of Hepatitis C Virus (HCV) Nonstructural Protein 3 (NS3) Helicase Activity by the NS3 Protease Domain and by HCV RNA-Dependent RNA Polymerase. **Journal of Virology**, v. 79, n. 14, p. 8687–8697, 2005.

ZHONG, W.; GUTSHALL, L. L.; VECCHIO, A. M. D. E. L. Identification and Characterization of an RNA-Dependent RNA Polymerase Activity within the Nonstructural Protein 5B Region of Bovine Viral Diarrhea Virus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 9365–9369, 1998.