

Paweł Mirosław*, Aleksandra Antos, Mirosław Polak

Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Wpłynęło w marcu, zaakceptowano w lipcu 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka wirusa BVD. 3. Zróżnicowanie genetyczne. 4. Znaczenie zmienności genetycznej. 5. Podsumowanie

Genetic diversity of bovine diarrhea and mucosal disease virus

Abstract: Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is classified as a member of the *Pestivirus* genus of the *Flaviviridae* family. BVDV is one of the most important viral pathogens of ruminants worldwide, causing severe economic losses. Infection results in a wide range of clinical manifestations, ranging from mild respiratory disease to fetal death and mucosal disease. The virus particles are small and contain a single-stranded, positive-sense RNA molecule of approximately 12.3 kb with one large open reading frame flanked by two untranslated regions (5'UTR and 3'UTR). The polyprotein is proteolytically cleaved by viral and host proteases resulting in the formation of mature viral proteins. It is well established that BVDV strains show considerable genetic diversity. BVD viruses are classified as two species: BVDV-1 and BVDV-2. Quite recently, a new putative species, BVDV-3, was detected. The viruses exist as one of two biotypes: cytopathic or non-cytopathic, based on their activity in cell cultures. The phylogenetic analysis of the 5'UTR and N^{pro} region has revealed at least 21 distinct subtypes of BVDV-1 and 4 subtypes of BVDV-2. Genetic diversity of BVD viruses has serious clinical implications such as immune evasion, increase of virulence, host range alteration and also affects the efficacy of vaccination programmes and diagnostic methods.

1. Introduction. 2. Characteristics of BVD virus. 3. Genetic diversity. 4. The importance of genetic variation. 5. Conclusion

Słowa kluczowe: diagnostyka, podtypy, wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych, zmienność genetyczna
Key words: diagnostics, subtypes, bovine viral diarrhea and mucosal disease virus, genetic diversity

1. Wprowadzenie

Wirusy zawierające materiał genetyczny w postaci kwasu rybonukleinowego (RNA) charakteryzują się brakiem stabilności genetycznej oraz korzystają z wielu mechanizmów zmienności co zapewnia im przetrwanie w środowisku [8, 45, 57]. Cechy wyróżniające wirusy RNA to ogromna liczebność, produktywny cykl replikacyjny, niewielki oraz plastyczny genom podlegający nieprecyzyjnej replikacji. To sprawia, że egzystują w naturze jako wiele blisko spokrewnionych podtypów. Dynamikę ich zmienności charakteryzuje ciągłe powstawanie nowych wariantów i selekcja najlepiej przystosowanych szczepów do różnorodnych warunków środowiska [8, 45].

Wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych (Bovine Viral Diarrhea Virus – BVDV) jest patogenem ważnym z ekonomicznego punktu widzenia. Wirus ten wywołuje szerokie spektrum objawów klinicznych od łagodnych zachorowań z objawami najczęściej ze strony układu oddechowego, pokarmowego i rozrodczego aż do ciężkich infekcji, zamierania zarodków i poronień oraz rozwoju śmiertelnej choroby błon śluzowych (Mucosal disease – MD) [3]. Szacuje się, że ogólne straty wywołane przez BVDV oscylują na poziomie 10–40 milionów dolarów na jeden milion wycieleń [18].

2. Charakterystyka wirusa BVD

Wirus BVD należy do rodziny *Flaviviridae*, rodzaju *Pestivirus*. W oparciu o wspólne cechy genetyczne i strukturalne do rodziny *Flaviviridae* zakwalifikowano również m.in. wirusy Zachodniego Nilu, Denga, żółtej febry i wirus zapalenia wątroby typu C. Rodzaj *Pestivirus* zawiera cztery gatunki: wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych gatunek 1 i 2 (BVDV-1, BVDV-2), wirus choroby granicznej owiec (Border Disease Virus – BDV) oraz wirus klasycznego pomoru świń (Classical Swine Fever Virus – CSFV). Proponowana jest także nowa klasyfikacja uzupełniona o 4 nowo zidentyfikowane wirusy, które posiadają znamiona pestiwirusów, ale nie pasują do żadnego z czterech gatunków: BVDV-3 (atypowe pestiwirusy bydłace; wirusy HoBi-podobne), pestiwirus żyrafy, pestiwirus antylopy Pronghorn i wirus Bungowannah [23].

Wirion BVDV o wielkości 40–60 nm, zbudowany jest z rdzenia w postaci genomowego RNA pokrytego kapsydem, który otacza dwuwarstwowa błona lipidowa zawierająca glikoproteiny kodowane przez wirusowy materiał genetyczny [35].

Genom wirusa tworzy pojedynczą nić RNA o dodatniej polarności i długości około 12 300 par zasad [35]. Genomowe RNA nie jest poliadenylowane w końcu 3'

* Autor korespondencyjny: Paweł Mirosław, Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; tel. 81 889 31 21; e-mail: pawel.miroslaw@piwet.pulawy.pl

ani nie posiada czapeczki dołączanej na końcu 5'. RNA zawiera pojedynczą otwartą ramkę odczytu (Open Reading Frame – ORF), która koduje wszystkie białka wirusowe [6]. Powstająca poliproteina jest potranslacyjnie cięta zarówno przez wirusowe jak i komórkowe proteazy w celu uzyskania strukturalnych i niestrukturalnych białek wirusa. Na końcach 5' i 3' znajdują się regiony niekodujące (Untranslated Region – UTR) [14]. Tworzą one struktury drugorzędowe, które pełnią funkcje związane z procesami regulacji replikacji oraz translacji. 5'UTR zawiera wewnętrzne miejsce wiązania rybosomów (Internal Ribosomal Entry Site – IRES) uczestniczące w procesie inicjacji translacji [6, 13], z kolei w obrębie regionu 3'UTR zlokalizowane są elementy odpowiedzialne za terminację procesu translacji [19]. Regiony 5'UTR i 3'UTR są także niezbędne do efektywnej replikacji wirusa BVD [6, 19].

Otwarta ramka odczytu koduje około 4000 aminokwasów, z których po cięciu powstaje od 11 do 12 białek strukturalnych oraz niestrukturalnych. Do niestrukturalnych należą białka N^{pro}, NS2-3 (NS2, NS3), NS4A, NS4B, NS5A, NS5B i p7 do strukturalnych białka C, E^{ms}, E1, E2 [41]. N-końcowe białko (N^{pro}) jest autoproteazą cysteinową, która odcina samą siebie od kolejnego białka płaszczka (Core protein – C) oraz indukuje proteasomalną degradację czynnika transkrypcyjnego interferonu β – IRF3 (Interferon regulatory factor 3) [5, 14]. Kolejne białko E^{ms} jest silnie glikozylowane, wydzielane w postaci rozpuszczalnej przez zainfekowane komórki, występuje w postaci homodimerów [16]. Glikoproteina E^{ms} zawiera epitopy wykorzystywane do diagnostyki zakażeń BVDV [15, 35]. Białko to ma unikalną cechę RNazy, degradowuje jednoniciowe jak i dwuniciowe fragmenty RNA [16]. Białko E^{ms} jest luźno umocowane na powierzchni wirionu poprzez amfipatyczną helisę znajdującą się na C-końcowej części białka. Ta słaba interakcja pozwala E^{ms} oddzielić się od wirionu [52]. Glikoproteiny błonowe, E1 i E2 są integralnymi białkami błonowymi, niezbędnymi w procesie zakażenia. Glikoproteina E2 jest podstawowym elementem konstrukcyjnym wirionu i zawiera główne determinanty antygenowe. Przeważająca część humoralnej odpowiedzi immunologicznej jest nakierowana właśnie na epitopy białka E2 znajdujące się na jego N-końcu. Uważa się, że C-koniec ektodomeny E2, posiada funkcję wiązania z receptorem komórkowym [27] CD46 oraz LDL-R [37]. Niecytopatyczne (Non-cytopathic – ncp) szczepy BVDV kodują białko niestrukturalne NS2-3, natomiast u szczepów o biotypie cytopatycznym (Cytopathic – cp) białko to jest cięte na dwa odrębne białka: NS2 i NS3. Białko NS3 określane jest jako marker cytopatyczności, gdyż występuje wyłącznie u szczepów cytopatycznych wirusa BVD [41]. Niestrukturalne białko NS3 posiada aktywność proteazy serynowej. Enzym ten jest odpowiedzialny za wiele cięć wirusowej poliproteiny. Pro-

teaza serynowa NS3 odcina białka niestrukturalne. Natomiast białko NS4A służy jako kofaktor tej proteazy [24]. Białko NS4B jest prawdopodobnie składnikiem kompleksu replikacyjnego RNA oraz jest zaangażowane w przegrupowanie błony komórkowej w zakażonej komórce [56]. NS5A i NS5B są kodowane na C-końcu poliproteiny BVDV. NS5A jest fosfoproteiną niezbędną w procesie replikacji jednak o nie do końca scharakteryzowanej funkcji. NS5B posiada aktywność RNA-zależnej polimerazy RNA i jest głównym białkiem biorącym udział w replikacji genomowego RNA [20]. Z kolei białko p7 odgrywa ważną rolę w cyklu życiowym pestiwirusów. Bez jego udziału nie jest możliwe wytworzenie zakaźnych wirusów, nie bierze ono jednak udziału w procesie replikacji RNA [28].

3. Zróżnicowanie genetyczne

Powszechnie uznaje się, że szczepy BVDV wykazują znaczne zróżnicowanie genetyczne [12, 34, 35]. Podstawowym czynnikiem warunkującym mutacje w genomach wirusowych są błędy wynikające z nieprecyzyjnej replikacji kwasu nukleinowego przez RNA-zależną polimerazę RNA (NS5B). Wirusowe polimerazy RNA nie posiadają w przeciwieństwie do polimeraz DNA zdolności korekty błędów powstających podczas syntezy nici potomnych. Liczba błędów popełnianych przez RNA-zależną polimerazę RNA, której aktywność w przypadku wirusa BVD wykazuje białko NS5B wynosi około 1 na 10⁴ nukleotydów w jednym cyklu replikacyjnym. Oznacza to, że każdy 12,5 kb nowo zsyntetyzowany genom może różnić się od kolejnego w przybliżeniu o jeden nukleotyd [2].

Wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych można podzielić na biotypy oraz gatunki [35, 42]. Biotyp definiowany jest jako cecha fenotypowa w oparciu o obecność lub brak efektu cytopatycznego w zakażonej hodowli komórkowej obserwowanej w mikroskopie świetlnym [51]. Różnice w biotypach są w dużej mierze wynikiem zmian w wirusowych genomach spowodowanych procesem rekombinacji. Rekombinacja może zachodzić pomiędzy cząsteczkami RNA wirusów albo pomiędzy genomem wirusa, a komórkowym RNA gospodarza [42]. Pojawienie się szczepu o biotypie cytopatycznym (cp) może być również wynikiem transformacji wirusa niecytopatycznego (ncp) do wirusa cp w wyniku duplikacji fragmentu genomu. Izolacja szczepów cp możliwa jest tylko w przypadku osobników z chorobą błon śluzowych (MD) [21]. Choroba ta występuje rzadko, ale śmiertelność wynosi 100%. Dotyczy ona osobników zakażonych trwale szczepem ncp (Persistently Infected – PI), które ulegają nadkażeniu homologicznym szczepem cp w stosunku do szczepu ncp, który jest odpowiedzialny za wystąpienie zakaże-

nia trwałego. Większość osobników chorych na MD pada w ciągu pierwszych 6–24 miesięcy życia. Wirusy cp i ncp izolowane od takich osobników są identyczne antygenowo i określane jako szczepy homologiczne [41].

Zmienność genetyczna BVDV przejawia się w obecności dwóch gatunków tego wirusa: BVDV-1 oraz BVDV-2. Niedawno odkryto przypuszczalnie nowy gatunek: BVDV-3 (HoBi-like) [47].

Na podstawie analizy filogenetycznej regionów 5'UTR, N^{pro} i E2 genomu wirusa wyróżniono do tej pory 21 podtypów BVDV-1 (od BVDV-1a do BVDV-1u) [1, 7, 12, 32, 34, 47, 54]. Na podstawie podobnych analiz tych samych regionów zdefiniowano 4 podtypy gatunku BVDV-2: od 2a do 2d [7, 11, 13, 40]. Obszerny zbiór szczepów BVDV z Włoch poddano genotypowaniu w oparciu o fragmenty 5'UTR oraz N^{pro} i przydzielono je do poszczególnych podtypów. Większość ferm bydła zakażonych było podtypem BVDV-1a, oraz BVDV-1b i BVDV-1e. Pozostałe podtypy występowały sporadycznie. Wykryto obecność 4 dodatkowych podtypów, nie opisanych poprzednio a mianowicie BVDV-1r, BVDV-1s, BVDV-1t [12] oraz 1u [7]. W Niemczech 95% szczepów BVDV zaliczono do gatunku 1. Analiza około 600 szczepów wirusa z lat 2008–2014 wykazała, że podtypy BVDV-1b i BVDV-1d występowały najczęściej [46]. W Austrii większość szczepów należała do podtypów BVDV-1h i BVDV-1f [17]. Szwajcarskie szczepy uzyskane od zwierząt chorych na wirusową biegunkę bydła (BVD) sklasyfikowano jako gatunek 1 z podtypami 1e, 1h, 1k i 1b w porządku malejącym [49]. BVDV izolowane od bydła w Słowenii zaliczono do gatunku 1, a ponad 88% zbadanych szczepów należało do podtypów 1f oraz 1d [53]. Filogenetyczna analiza fragmentów 5'UTR genomów wirusa BVD-1 krążącego w Anglii i Walii, wykazała obecność podtypów 1a, 1b, 1e, 1f oraz 1i. Analiza filogenetyczna sekwencji nukleotydów w regionie N^{pro} potwierdziła wyniki uzyskane dla regionu 5'UTR [50]. Z kolei szczepy japońskie tego wirusa zaliczono do gatunku BVDV-1 i BVDV-2 z dominującymi podtypami 1b i 2a [1]. Podobne wyniki uzyskano badając próbki od bydła w Korei. Większość szczepów należała do podtypów 1a, 1b i 2a [36]. Wszystkie indyjskie szczepy wirusa BVD zaliczono do podtypu 1b [32]. Jako ciekawostkę można podać fakt, że jedyny szczep należący do gatunku 2 wirusa wykryto w Indiach u owcy i był to podtyp 2b [33]. Natomiast w Australii najbardziej rozpowszechnionym wariantem wirusa okazał się podtyp 1c [44]. Dominującymi podtypami wirusa w Brazylii okazały się podtypy BVDV-1a i BVDV-2b [47]. Na tym tle, różnorodność polskich szczepów BVDV jest na podobnym poziomie. Większość z nich zaliczono do dwóch podtypów: 1b i 1d [25]. Natomiast BVDV-2 wykryto w Polsce tylko w jednym gospodarstwie i był to podtyp 2a [40]. Badania przeprowadzone

w Europie, Azji, Afryce Południowej i Brazylii wykazały, że BVDV-2 nie jest ograniczony tylko do Ameryki Północnej, choć występuje tam znacznie częściej w niż w Europie [40, 47].

Badania Vilcka i wsp. pokazują, że procent identyczności sekwencji nukleotydowych pomiędzy szczepami BVDV-2 w obrębie regionu 5'UTR mieści się w zakresie 81–99%. Podobny odsetek uzyskano w przypadku BVDV-1 (76–99%) [55]. Niektóre argentyńskie szczepy zaliczone na podstawie wysoce konserwatywnego regionu 5'UTR do tego samego podtypu 1b wykazywały znaczne zróżnicowanie antygenowe, co sugeruje konieczność uwzględnienia dodatkowych regionów kodujących w badaniach filogenetycznych [39].

Do tej pory opisano co najmniej dziewięć tzw. atypowych pestiwirusów (HoBi-like). Osiem jest prawdopodobnie brazylijskiego pochodzenia, a jeden pochodzenia tajskiego. Analiza filogenetyczna fragmentu regionu 5'UTR genomu tych wirusów wykazała genetyczne zróżnicowanie w obrębie tego gatunku, sugerując istnienie dwóch podgrup [31, 48]. Wirusy HoBi charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa sekwencji nukleotydowych, przekraczającym 93%. Najbardziej zmienny fragment genomu kodujący glikoproteinę E2 wirusów HoBi wykazuje większe podobieństwo do BVDV-2 niż BVDV-1 [4].

4. Znaczenie zmienności genetycznej

Genetyczna zmienność wirusów może prowadzić do dużych zmian w ich właściwościach biologicznych, w tym zmian ich zjadliwości, adaptacji do nowych gospodarzy, a nawet do pojawiania się chorób zakaźnych o nieznanym wcześniej przebiegu klinicznym. Szybka ewolucja wirusów stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Zakażenie zwierząt niektórymi szczepami BVDV-2 prowadzi do ciężkiej choroby, określanej jako zespół krwotoczny (Haemorrhagic Syndrome – HS) [40, 42]. Charakteryzuje się ona znaczną wybroczynowością oraz krwawieniami z miejsc iniekcji z powodu znaczącego spadku liczby trombocytów. Szczepy BVDV-2c prowadzą do pojawiania się objawów klinicznych typowych dla zjadliwych szczepów wirusa CSFV [11]. Podtyp BVDV-1b częściej niż inne podtypy izolowano od bydła z chorobami układu oddechowego. Podobna prawidłowość dotyczyła cieląt z objawami zapalenia płuc [10]. Także podtyp BVDV-1d wiązany jest z chorobami układu oddechowego cieląt. Podtyp BVDV-1e często izolowano od martwo urodzonych cieląt oraz od poronionych płodów, co sugeruje, że podtyp ten może odgrywać istotną rolę w zaburzeniach prenatalnych i okołoporodowych [3]. BVDV-1e wykryto także w próbkach płynu pęcherzykowego jajników u brazylijskich krów. Zjawisko

to budzi obawy w odniesieniu do ryzyka transmisji choroby z zarodkami pozyskiwanymi do transferu [47].

Zmienność genetyczna wirusa BVD utrudnia wdrożenie czułych metod diagnostycznych oraz skutecznych programów profilaktycznych (szczepionek). BVDV jest często izolowany od zwierząt szczepionych przeciw zakażeniu tym patogenem [9] co nasuwa obawy, czy szczepionki, w większości zawierające podtyp 1a, mogą skutecznie chronić bydło przed innymi podtypami wirusa. Wyniki badań wykazały, że aktualnie stosowane szczepionki żywe, atenuowane (MLV) zawierające szczepki BVDV-1a indukują niższe miana przeciwciał dla BVDV-1b [9, 39]. W Polsce wirusy o podtypie 1b i 1f izolowano od zwierząt wykazujących objawy kliniczne, pomimo iż wcześniej zostały poddane szczepieniom z wykorzystaniem szczepionki opartej na podtypie 1a [25, dane nieopublikowane]. Kilka szczepionek, dostępnych w Brazylii zawiera szczepki BVDV-1 i BVDV-2 z USA i Europy, które nie są homologiczne do wirusów, krążących w tym kraju. Biorąc pod uwagę różnice genetyczne opisane powyżej, szczepionki przeznaczone do stosowania w innych krajach prawdopodobnie nie będą skuteczne w Brazylii (odmienne podtypy). Różnice antygenowe ograniczają ochronę krzyżową między odmiennymi gatunkami i podtypami pestiwirusów bydła [1]. Przegląd amerykańskich szczepów BVDV wyizolowanych od bydła oraz z zanieczyszczonych wirusem bydlęcych surowic płodowych (Fetal Bovine Serum – FBS) sugeruje, że odsetek BVDV-2 oraz BVDV-1 zbliżył się w USA do wartości 50/50 [43]. Niektórzy badacze stwierdzają iż może to mieć związek ze stosowaniem szczepionek żywych. Takie szczepionki nigdy nie były stosowane w Słowenii, Szwecji oraz Wielkiej Brytanii, gdzie nie stwierdzono obecności BVDV-2 w populacji bydła [53]. Z drugiej strony brak BVDV-1a w polskich stadach bydła może wskazywać, że prowadzone historycznie szczepienia z użyciem szczepionek opartych na tym podtypie wirusa skutecznie wyeliminowały go z krajowej populacji bydła [25].

Genetyczna zmienność BVDV jest także istotna dla skutecznej diagnostyki laboratoryjnej, która powinna umożliwiać wykrycie jak największej liczby gatunków i podtypów tego wirusa. Mutacje w regionie genu kodującego glikoproteinę E^{rns} gatunku BVDV-2 uniemożliwiają wykrycie antygeny tego wirusa w komercyjnym teście ELISA opartym na E^{rns} BVDV-1 [15]. W przypadku atypowych pestiwirusów rutynowo stosowana izolacja wirusa oraz badania testem ELISA dawały wyniki ujemne [38]. Aby umożliwić wykrywanie nowo pojawiających się podtypów wirusa potrzebne są nowe lub modyfikowane techniki biologii molekularnej [1]. Test PCR w czasie rzeczywistym umożliwia wykrywanie i klasyfikowanie szczepów należących do 1 i 2 gatunku wirusa BVD z użyciem pary starterów

w obrębie wysoce konserwatywnego regionu 5'UTR oraz dwóch sond TaqMan [29]. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) produktów PCR pozwala różnicować polskie podtypy wirusa BVD z wykorzystaniem 3 enzymów restrykcyjnych. W badaniach tą techniką wykorzystano 60 szczepów gatunku BVDV-1, które zawierały podtypy: 1a, 1b, 1d, 1e, 1f i 1g oraz podtyp 2a gatunku BVDV-2 [26]. Zastosowanie RT-PCR z wykorzystaniem dedykowanych starterów dla atypowych pestiwirusów pozwoliło na wykrycie materiału genetycznego HoBi-like wirusów. Opracowano też metodę real-time RT-PCR, pozwalającą na selektywne wykrywanie wirusów HoBi [30] jak również alternatywny test LD-PCR (long distance – PCR) umożliwiający amplifikację całego genomu wirusa [22].

5. Podsumowanie

Podsumowując, wirus biegunki i choroby błon śluzowych bydła charakteryzuje się ogromną różnorodnością genetyczną. Na podstawie analiz filogenetycznych wyróżniono 3 gatunki wirusa obejmujące wiele podtypów. Tak duża zmienność ma swoje odzwierciedlenie w szerokiej gamie objawów klinicznych oraz trudnościach w opracowaniu czułych metod diagnostycznych jak i skutecznych szczepionek. Można przyjąć że w niedalekiej przyszłości zostaną odkryte dodatkowe warianty wirusa BVD, zwiększając tym samym jego zróżnicowanie genetyczne oraz potencjał przetrwania w środowisku.

Piśmiennictwo

1. Abe Y.: Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **78**, 61–70 (2016)
2. Anderson J.P., Daifuku R., Loeb L.A.: Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 183–205 (2004)
3. Bachofen C., Braun U., Hilbe M., Ehrensperger F., Stalder H., Peterhans E.: Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet. Microbiol.* **141**, 258–267 (2010)
4. Bauermann F.V., Flores E.F., Ridpath J.F.: Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: Possible impacts on diagnosis and control. *J. Vet. Diagn. Invest.* **24**, 253–261 (2012)
5. Bauhofer O., Summerfield A., Sakoda Y., Tratschin J.D., Hofmann M.A., Ruggli N.: Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J. Virol.* **81**, 3087–3096 (2007)
6. Becher P., Orlich M., Thiel H.: Mutations in the 5' Nontranslated Region of Bovine Viral Diarrhoea Virus Result in Altered Growth Characteristics. *J. Virol.* **74**, 7884–7894 (2000)
7. Decaro N., Elia G. i wsp.: Evidence for Circulation of Bovine Viral Diarrhoea Virus Type 2c in Ruminants in Southern Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* DOI: 10.1111/tbed (2016)

8. Domingo E., Holland J.: RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 151–178 (1997)
9. Fulton R.W., Ridpath J.F., Confer A.W., Saliki J.T., Burge L.J., Payton M. E.: Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals*, **31**, 89–95 (2003)
10. Fulton R.W., Ridpath J.F., Saliki J.T., Briggs R.E., Confer A.W., Burge L.J., Purdy C.W., Loan R.W., Duff G.C., Payton M.E.: Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Can. J. Vet. Res.* **66**, 181–190 (2002)
11. Gethmann J., Homeier T., Holsteg M., Schirrmeier H., Saßerath M., Hoffmann B., Beer M., Conraths F.J.: BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany. *Heliyon*, **1**, e00019 (2015)
12. Giammarioli M., Ceglie L., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., Petrini S., De Mia G.M.: Increased genetic diversity of BVDV-1: recent Findings and implications thereof. *Virus Genes*, **50**, 147–151 (2015)
13. Giangaspero M., Harasawa R., Weber L., Belloli A.: Genoepidemiological Evaluation of Bovine viral diarrhoea virus 2 Species Based on Secondary Structures in the 5' Untranslated Region. *J. Vet. Med. Sci.* **70**, 571–580 (2008)
14. Gottipati K., Acholi S., Ruggli N., Choi K.: Autocatalytic activity and substrate specificity of the pestivirus N-terminal protease N^{pro}. *Virology*, 452–453, 303–309 (2014)
15. Gripshover E.M., Givens M.D., Ridpath J.F., Brock K.V., Whitley E.M., Sartin E.A.: Variation in Erns viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* **125**, 11–21 (2007)
16. Hausmann, Roman-Sosa G., Thiel H., Rüménapf T.: Classical Swine Fever Virus Glycoprotein Erns Is an Endoribonuclease with an Unusual Base Specificity. *J. Virol.* **78**, 5507–5512 (2004)
17. Hornberg A., Fernandez S.R., Vogl C., Vilcek S., Matt M., Fink M., Kofer J., Schopf K.: Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet. Microbiol.* **135**, 205–213 (2009)
18. Houe H.: Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*, **31**, 137–143 (2003)
19. Isken O., Grassmann C.W., Yu H., Behrens S.E.: Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhoea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA*, **10**, 1637–1652 (2004)
20. Isken O., Langerwisch U., Schönherr R., Lamp B., Schröder K., Duden R., Rüménapf T., Tautz N.: Functional Characterization of Bovine Viral Diarrhoea Virus Nonstructural Protein 5A by Reverse Genetic Analysis and Live Cell Imaging. *J. Virol.* **88**, 82–98 (2014)
21. Jenckel M., Hoper D., Schirrmeier H., Reimann I., Goller K., Beer M.: Mixed Triple: allied viruses in unique isolates of recent highly virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV-2) detected by deep sequencing. *J. Virol.* **88**, 6983–6992 (2014)
22. Jones L.R., Zandomeni R.O., Weber E.L.: A long distance RT-PCR able to amplify the Pestivirus genome. *J. Virol. Methods.* **134**, 197–204 (2006)
23. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J.: Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2012
24. Klemens O., Dubrau D., Tautz N.: Characterization of the Determinants of NS2-3-Independent Virion Morphogenesis of Pestiviruses. *J. Virol.* **89**, 11668–11680 (2015)
25. Kuta A., Polak M.P., Larska M., Żmudziński J.F.: Predominance of bovine viral diarrhoea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland. *Vet. Microbiol.* **166**, 639–644 (2013)
26. Kuta A., Polak M.P., Larska M., Żmudziński J.F.: Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and identification of a new subtype in Poland. *B. Vet. I. Pulawy.* **59**, 19–22 (2015)
27. Lang Y., Gao S., Du J., Shao J., Cong G., Lin T., Zhao F., Liu L., Chang H.: Polymorphic genetic characterization of E2 gene of bovine viral diarrhoea virus in China. *Vet. Microbiol.* **174**, 554–559 (2014)
28. Largo E., Gladue D., Huarte N., Borca M., Nieva J.: Pore-forming activity of pestivirus p7 in a minimal model system supports genus-specific viroporin function. *Antivir. Res.* **101**, 30–36 (2014)
29. Letellier C., Kerkhofs P.: Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods.* **114**, 21–27 (2003)
30. Liu L., Xia H., Belak S., Baule C.: A TaqMan real time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestivirus in clinical and biological products. *J. Virol. Methods.* **154**, 82–85 (2008)
31. Liu L., Xia H., Wahlberg N., Belák S., Baule C.: Phylogeny, classification and evolutionary insight into pestiviruses. *Virology*, **385**, 351–357 (2009)
32. Mishra N., Pattnaik B., Vilcek S., Patil S.S., Jain P., Swamy N., Bhatia S., Pradhan H.K.: Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. *Vet. Microbiol.* **104**, 207–212 (2004)
33. Mishra N., Rajukumar K., Vilcek S., Tiwari A., Satav J.S., Dubey S.C.: Molecular characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolate originating from a native Indian sheep (Oviesaries). *Vet. Microbiol.* **130**, 88–98 (2008)
34. Nagai M., Hayashi M., Sugita S., Sakoda Y., Mori M., Murakami T., Ozawa T., Yamada N., Akashi H.: Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus Res.* **99**, 103–113 (2004)
35. Neill J.D.: Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, **41**, 2–7 (2013)
36. Oem J., Chung J., Roh I., Kim H., Bae Y., Lee K., Jin Y., Lee O.: Characterization and phylogenetic analysis of Bovine viral diarrhoea virus in brain tissues from nonambulatory (downer) cattle in Korea. *J. Vet. Invest.* **22**, 518–523 (2010)
37. Ostachuk A.: Bovine viral diarrhoea virus structural protein E2 as a complement regulatory protein. *Arch. Virol.* **161**, 1769–1782 (2016)
38. Paletto S., Zuccon F., Pitti M., Gobbi E., Marco L., Caramelli M., Masoero L., Acutis P.L.: Detection and phylogenetic analysis of an atypical pestivirus, strain IZSPLV_To. *Res. Vet. Sci.* **92**, 147–150 (2012)
39. Pecora A., Malacari D.A., Ridpath J.F., Aguirreburualde M.S. Perez, Combessies G., Odeón A.C., Romera S.A., Golemba M.D., Widgorovitz A.: First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res. Vet. Sci.* **96**, 204–212 (2013)
40. Polak M. P., Kuta A., Rybałowski W., Rola J., Larska M., Żmudziński J. F.: First report of bovine Viral diarrhoea virus-2 infection in cattle in Poland. *Vet. J.* **202**, 643–645 (2014)
41. Quadros V.L., Mayer S.V., Vogel F.S.F., Welblen R., Brum M.C.S., Arenhart S., Flores E.F.: A search for RNA insertions and NS3 gene duplication in the genome of cytopathic isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **39**, 935–944 (2006)
42. Ridpath J.F.: BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, **31**, 127–131 (2003)
43. Ridpath J.F.: Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev. Vet. Med.* **72**, 17–30 (2005)

44. Ridpath J.F., Fulton R.W., Kirkland P.D., Neill J.D.: Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *J. Vet. Invest.* **22**, 184–191 (2010)
45. Sanjuán R., Domingo-Calap P.: Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol. Sci.* **73**, 4433–4448 (2016)
46. Schirrmeyer H.: Three years of mandatory BVDV control in Germany – lessons to be learned. Proceedings of the 28th World Buiatrics Congress WBC, Australia, 2014
47. Silveira S., Weber M.N., Mosena A.C.S., Silva M.S., Streck A.F., Pescador C.A., Flores E.F., Weiblen R., Driemeier D., Ridpath J.F., Canal C.W.: Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed (2015)
48. Stahl K., Beer M., Schirrmeyer H., Hoffman B., Belak S., Alenius S.: Atypical 'HoBi'-like pestiviruses—Recent findings and implications thereof. *Vet. Microbiol.* **142**, 90–93 (2010)
49. Stalder H.P., Meier P., Pfaffen G., Wageck-Canal C., Rufenacht J., Schaller P., Bachofen C., Marti S., Vogt H.R., Peterhans E.: Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* **72**, 37–41 (2005)
50. Strong R., Errington J., Cook R., Ross-Smith N., Wakeley P., Steinbach E.: Increased phylogenetic diversity of bovine viral diarrhoea virus type 1 isolates in England and Wales since 2001. *Vet. Microbiol.* **162**, 315–320 (2013)
51. Tautz N., Meyers G., Thiel H.J.: Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. *Clin. Diagn. Virol.* **10**, 121–127 (1998)
52. Tews B.A., Meyers G.: The pestivirus glycoprotein Erns is anchored in plane in the membrane via an amphipathic helix. *J. Biol. Chem.* **282**, 32730–32741 (2007)
53. Toplak I., Sandvik T., Barlic-Maganja D., Grom J., Paton D.J.: Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Vet. Microbiol.* **99**, 175–185 (2004)
54. Uttenhal A., Stadejek T., Nylin B.: Genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) in Denmark during a 10-year eradication period. *Acta Path. Micro. Im.* **113**, 536–541 (2005)
55. Vilcek S., Durkovic B., Kolesarova M., Greiser-Wilke I., Paton D.: Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet. Res.* **35**, 609–615 (2004)
56. Weiskircher E., Aligo J., Ning G., Konan K.V.: Bovine viral diarrhoea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Virol. J.* **3**, 185 (2009)
57. Worobey M., Holmes E.: Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **80**, 2535–2543 (1999)