

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA O
DIAGNÓSTICO E DIFERENCIAÇÃO DOS
*PESTIVIRUS***

CLÁUDIO WAGECK CANAL

ORIENTADORA
AOI MASUDA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre
1997

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas e amigos que participaram da elaboração desta tese.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Fundação Nacional de Pesquisa da Suíça pelas bolsas de estudo e financiamento dos projetos.

INDÍCE

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 SIGNIFICÂNCIA, TAXONOMIA E PROPRIEDADES GERAIS DOS PESTIVÍRUS	8
1.2 DOENÇAS CAUSADAS PELOS PESTIVÍRUS	9
1.2.1 Diarréia vírica dos bovinos e doença das mucosas	10
1.2.2 Doença da fronteira.....	12
1.2.3 Peste suína clássica	13
1.3 PROPRIEDADES DOS VÍRIONS	13
1.4 A POLIPROTEÍNA: LOCALIZAÇÃO, GERAÇÃO, ESTRUTURA E FUNÇÃO.....	14
1.5 RELACIONAMENTO ENTRE OS PESTIVÍRUS.....	20
1.6 EPIDEMIOLOGIA	24
1.7 DIAGNÓSTICO.....	28
2. OBJETIVOS GERAIS	31
3. OBJETIVOS CONTIDOS NO ARTIGO 1	32
4. ARTIGO 1	33
5. OBJETIVOS CONTIDOS NO ARTIGO 2.....	40
6. ARTIGO 2	42
6.1 TITLE	42
6.2 AUTHORS.....	42
6.3 POSTAL ADDRESS OF AFFILIATIONS	42
6.4 TELEPHONE AND FAX NUMBER OF THE CORRESPONDING AUTHOR	43
6.5 ADDRESS TO WHICH THE PROOFS SHOULD BE SENT.....	43
6.6 SUMMARY	43

6.7 KEY WORDS	44
6.8 INTRODUCTION.....	44
6.9 MATERIALS AND METHODS	45
6.9.1 Cells and viruses	45
6.9.2 Preparation of antigen for ELISA.....	46
6.9.3 ELISA protocol	46
6.9.4 Serum neutralisation assay (SN).....	47
6.9.5 Cattle sera.....	47
6.9.6 Statistical analyses of ELISA results.....	47
6.9.7 RNA extraction and RT-PCR.....	48
6.9.8 Sequencing and phylogenetic analysis.....	48
6.10 RESULTS	49
6.10.1 Validation of the ELISA.....	49
6.10.2 Analysis of Brazilian cattle sera	49
6.10.3 Sequence analysis.....	50
6.11 DISCUSSION	50
6.12 ACKNOWLEDGEMENTS.....	52
6.13 REFERENCES	53
6.14 FIGURE CAPTIONS	56
7. OBJETIVOS E INTRODUÇÃO DO ANEXO I	60
8. ANEXO 1.....	62
8.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	62

8.1.1 Determinação da seqüência de nucleotídeos de partes do genoma da linhagem R1935/72 do BVDV	62
8.1.1.1 Linhagens virais e cultivos celulares	62
8.1.1.2 Extração do RNA	62
8.1.1.3 Amplificação de seqüências genômicas.....	63
8.1.1.4 Seqüenciamento dos produtos de PCR.....	63
8.1.2 Expressão de proteínas da linhagem R1935/72 do BVDV em baculovírus	64
8.1.2.1 Clonagem no vetor de transferência de baculovírus.....	64
8.1.2.1.1 Iniciadores	64
8.1.2.1.2 Preparação dos amplicons para a clonagem	65
8.1.2.1.3 Clonagem propriamente dita.....	66
8.1.2.1.4 Seleção dos clones recombinantes de pCR TM Bac	66
8.1.2.1.5 Seqüenciamento dos clones recombinantes de pCR TM Bac	66
8.1.2.2 Cultivo das células de <i>Spodoptera frugiperda</i>	67
8.1.2.3 Co-transfecção das células de <i>S. frugiperda</i>	67
8.1.2.4 Purificação dos clones recombinantes de baculovírus.....	68
8.1.2.5 Seleção dos clones recombinantes de baculovírus.....	69
8.1.2.6 Produção dos estoques virais de alto título	69
8.1.2.7 Detecção das proteínas recombinantes.....	70
8.1.2.8 Otimização da expressão	71
8.1.2.9 Purificação das proteínas recombinantes.....	72
8.1.3 Ensaio de ELISA.....	73
8.2 RESULTADOS.....	75

8.2.1 Determinação da seqüência de nucleotídeos de genes da linhagem R1935/72 do BVDV	75
8.2.2 Expressão de proteínas da linhagem R1935/72 do BVDV em baculovírus	90
8.2.2.1 Clonagem e seleção do vetor de transferência recombinante	90
8.2.2.2 Produção de estoques virais de alto título e otimização da expressão	92
8.2.2.3 Purificação das proteínas recombinantes.....	94
8.2.3 Ensaio de ELISA.....	95
8.3 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	97
8.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
9. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	105
9.1 ARTIGO 1	105
9.2 PERSPECTIVAS CONTIDAS NO ARTIGO 1	106
9.3 ARTIGO 2	106
9.4 PERSPECTIVAS CONTIDAS NO ARTIGO 2.....	107
9.5 ANEXO 1	108
9.6 PERSPECTIVAS CONTIDAS NO ANEXO 1	108
10. ABSTRACT	111
11. RESUMO	113
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas pelos pestivírus afetam os membros da família dos Suidae e várias espécies de ruminantes, incluindo bovinos, ovinos, caprinos e ruminantes silvestres. A peste suína clássica (“classical swine fever”= CSF) foi descrita pela primeira vez em 1833 em Ohio (EUA) e especulou-se que era uma doença nova dos suínos na época. A diarreia vírica dos bovinos (“bovine viral diarrhea”= BVD), a doença das mucosas (“mucosal disease”= MD) e a doença da fronteira (“border disease”= BD) foram descritas nas décadas de 1940 e 1950. A BVD e a MD ocorrem ambas em bovinos, mostram distintos cursos clínicos e são causadas pelo mesmo vírus, denominado vírus da BVD (“bovine viral diarrhea virus”= BVDV). O achado de que os agentes causais da CSF e BVD eram sorologicamente relacionados (DARBYSHIRE, 1960) lançou a base para o estabelecimento dos pestivírus como um grupo. O gênero *Pestivirus* fazia parte da família *Togaviridae* e compreende as espécies BVDV, vírus da CSF (“classical swine fever virus”= CSFV) e vírus da BD (“border disease virus”= BDV) (WESTAWAY *et. al.*, 1985).

Embora os pestivírus causem doenças economicamente importantes e interessantes do ponto de vista biológico, pesquisas em aspectos básicos destes vírus fizeram pouco progresso por vários anos depois da descoberta de seu relacionamento. Isto ocorreu devido a dificuldades inerentes a estes vírus que crescem em títulos baixos em cultivos de tecidos e cujas tentativas de obter preparações virais altamente purificadas fracassaram (MOENNIG; PLAGEMANN, 1992). Desta maneira, nem proteínas nem ácidos nucléicos virais eram disponíveis em quantidade e qualidade suficientes para análises. Maiores avanços ocorreram quando técnicas de biologia molecular foram aplicadas em

seu estudo. A clonagem e seqüenciamento de seus genômas, bem como a expressão de partes definidas de suas poliproteínas permitiram conclusões cruciais a respeito da estratégia de expressão genômica, organização genômica, composição dos vírions e relacionamento entre as três espécies ao nível molecular. Neste ponto mostrou-se justificado reclassificar os *Pestivirus* como um novo gênero da família *Flaviviridae* (WENGLER *et al.*, 1995).

1.1 Significância, taxonomia e propriedades gerais dos pestivírus

Os pestivírus compreendem agentes causais de doenças que têm um impacto econômico negativo para a agropecuária em todo mundo. O gênero *Pestivirus* compreende 3 espécies, nomeadas de acordo com o hospedeiro do qual eles foram isolados: 1) o CSFV, também chamado “hog cholera virus” ou “European swine fever virus”, 2) o BVDV e o 3) BDV dos ovinos (WENGLER *et al.*, 1995). Os pestivírus eram classificados como membros da família *Togaviridae* (WESTAWAY *et al.*, 1985), mas resultados sobre a estratégia de expressão gênica e organização genômica levaram a reclassificação como um gênero adicional da família *Flaviviridae*. Previamente, esta família consistia somente do gênero *Flavivirus*. Recentemente, os *Hepatitis C-like Viruses* (HCV) também foram incluídos como um terceiro gênero nesta família (WENGLER *et al.*, 1995). Características comuns a todos os seus membros são: a) o genoma RNA fita simples de polaridade positiva com um tamanho geralmente entre 9,5 e 12,5 kb, b) a presença de uma única grande fase aberta de leitura (“open reading frame”=ORF), a qual é traduzida numa hipotética poliproteína que é processada durante ou após a tradução por proteases celulares e virais, c) a localização genômica e função

similar de várias proteínas estruturais e não estruturais, d) o tamanho e composição dos vírions com 2 a 3 glicoproteínas associadas ao envelope e uma proteína no nucleocapsídeo. Maiores detalhes sobre os membros dos gêneros *Flavivirus* e *Hepatitis C-like Viruses* podem ser obtidos em CHAMBERS *et al.* (1990); RICE (1996); HOUGHTON (1996); MONATH; HEINZ (1996).

1.2 Doenças causadas pelos pestivírus

Todos os pestivírus são capazes de atravessar a placenta e infectar o feto (MOENNIG; PLAGEMANN, 1992). Neste contexto, deve ser notado que a placenta dos ruminantes e suínos não permite a transferência de anticorpos do animal prenhe para o feto. O período da gestação no qual a infecção intra-uterina ocorre determina as conseqüências para o feto. Estas infecções intra-uterinas podem levar ao aborto, nascimento precoce, malformação fetal, ou ao nascimento de animais fracos ou aparentemente normais. No último caso, o feto pode ter sido infectado na fase final da gestação e montado uma resposta imune efetiva contra o vírus. De particular importância é a capacidade dos pestivírus não citopatogênicos de estabelecer infecções persistentes nos fetos ainda não competentes imunologicamente (THIEL *et al.*, 1996). Estes animais adquirem imunotolerância ao vírus e eles persistem virêmicos pelo resto de suas vidas. Em ruminantes, infecções persistentes podem permanecer clinicamente inaparentes e durar por vários anos, enquanto suínos persistentemente infectados invariavelmente adoecem e morrem. Animais persistentemente infectados excretam o vírus continuamente e têm um grande impacto na epidemiologia das doenças produzidas pelos pestivírus (THIEL *et al.*, 1996).

Infecções pós-natais de ruminantes com BVDV e BDV são geralmente consideradas pouco nocivas. Uma exceção é a recentemente descrita síndrome hemorrágica dos bovinos (ver a seguir). A infecção de suínos com CSFV, contudo, é usualmente caracterizada por doença aguda e algumas vezes por altas taxas de mortalidade (PEARSON, 1992).

1.2.1 Diarréia vírica dos bovinos e doença das mucosas

Estudos soroepidemiológicos tem demonstrado que a maioria dos bovinos contrai o BVDV durante sua vida. Isolamentos de campo mostram que na maioria dos casos, o biótipo não-citopático induz estes anticorpos. Estas infecções agudas podem ser associadas à leucopenia transiente, febre, diarréia moderada, doenças do trato respiratório e imunossupressão. A grande maioria das infecções pelo BVDV não apresenta sinais clínicos aparentes (THIEL *et al.*, 1996). Contudo, um severo quadro clínico associado com BVDV foi recentemente descrito, onde a doença é caracterizada por trombocitopenia e hemorragias (CORAPI *et al.*, 1989; REBHUN *et al.*, 1989; PELLERIN *et al.*, 1994; RIDPATH *et al.*, 1994). Os sintomas lembram os de outras doenças hemorrágicas, como a CSF. O agente causal não é citopatogênico e pertence a um “novo” grupo de pestivírus de ruminantes.

A doença das mucosas (MD) é uma doença esporádica do gado que geralmente ocorre entre 6 e 24 meses de idade. É caracterizada por alta mortalidade, geralmente nas 2 primeiras semanas após o aparecimento dos sintomas (BAKER, 1987). Ulcerações extensivas do trato gastrintestinal são as lesões mais proeminentes (BAKER, 1987; MOENNIG; PLAGEMANN, 1992).

Desde sua primeira descrição, há 40 anos atrás, a ocorrência esporádica da MD tem intrigado os investigadores. A MD ocorre somente em gado que foi infectado com BVDV não-citopático durante o primeiro trimestre de gestação (LIESS *et al.*, 1974). Os fetos infectados adquirem tolerância imunológica em relação à linhagem infectante e desenvolvem uma infecção persistente. A imunotolerância é restrita ao tipo particular de vírus e não existe indicação de que haja formação de anticorpos ou células citotóxicas contra o vírus infectante (MEYERS; THIEL, 1996).

Um grande avanço consistiu na observação de que ambos biótipos virais, BVDV citopático e não-citopático, eram consistentemente isolados de animais que morriam de MD (MCKERCHER *et al.*, 1968; MCCLURKIN *et al.*, 1985; WILHELMSSEN *et al.*, 1991). Para um dado animal com MD, o vírus não-citopático junto com o vírus citopático é chamado de “par viral”. Em contraste com a conhecida variabilidade de isolados do BVDV, os membros destes “pares” são antigenicamente relacionados. Este achado levou à hipótese de que durante a patogênese da MD, o vírus citopatogênico origina-se do não-citopático por algum tipo de mutação (HOWARD *et al.*, 1987; CORAPI *et al.*, 1988). A MD pode ser reproduzida experimentalmente pela superinfecção de animais persistentemente virêmicos com um BVDV citopático. Existem evidências de que o vírus citopático utilizado para a superinfecção tem que ser antigenicamente relacionado com a linhagem não citopática do BVDV “endógena” (BROWNLIE *et al.*, 1984; BOLIN *et al.*, 1985; MOENNIG *et al.*, 1993).

Tecidos de bovinos que morreram com MD foram analisados com respeito a replicação de vírus citopáticos e não-citopáticos. Uma conclusão interessante foi de que os vírus citopatogênicos replicavam eficientemente nos órgãos que eram mais

danificados em casos de MD, como, por exemplo os tecidos linfóides do trato gastrointestinal (LIEBLER *et al.*, 1991). Em contraste, os vírus não-citopáticos encontravam-se distribuídos em quase todos os tecidos dos animais afetados.

Alguns bovinos infectados com BVDV sofrem da doença clínica por um período longo de tempo, uma condição chamada de “doença crônica” ou “MD crônica”. Esta doença não foi reproduzida experimentalmente mas existem evidências de casos naturais, de que os animais afetados são persistentemente virêmicos. Foi sugerido que esta doença crônica pode ocorrer quando animais virêmicos são superinfectados com um BVDV citopático com homologia parcial em relação ao BVDV “endógeno” não-citopático (BROWNLIE, 1991; MOENNIG *et al.*, 1993).

1.2.2 Doença da fronteira

As infecções dos ovinos pelo BDV lembram em vários aspectos as infecções dos bovinos com o BVDV. Infecções agudas após o nascimento levam a sintomas leves ou inaparentes (SHAW *et al.*, 1967; VANTSIS *et al.*, 1979). Como os outros pestivírus, o BDV cruza a placenta de animais prenhes, causando morte fetal, malformações ou infecção persistente (BARLOW, 1972). Animais persistentemente infectados com BDV podem parecer saudáveis. Alternativamente, estes animais podem apresentar a síndrome de “hairy shaker”, a qual é caracterizada por perda de lã, baixo peso ao nascer, tremores e ataxia (NETTLETON *et al.*, 1992). Como no BVDV, foi descrita a ocorrência de uma síndrome como a MD em associação com a presença do BDV citopático (NETTLETON *et al.*, 1992).

1.2.3 Peste suína clássica

De acordo com as descrições do século passado, a CSF era uma doença aguda ou hiperaguda com um curto período de incubação e altas taxa de mortalidade (DUNNE, 1973). O curso da doença tem mudado dramaticamente ao longo do tempo. Atualmente, a forma hiperaguda desapareceu e a forma aguda não atinge mais altas taxas de mortalidade. Contudo, formas crônicas da doença são comuns (WENSVOORT; TERPSTRA, 1985). A doença é caracterizada por alta febre, leucopenia, hemorragias da pele e órgãos internos (VAN OIRSCHOT, 1992). O CSFV pode ser dividido em grupos de virulência alta, moderada e baixa ou inaparente. Linhagens não virulentas são utilizadas como vacinas atenuadas (BAKER, 1946; KOPROWSKI *et al.*, 1946). A base molecular da atenuação do CSFV ainda não é conhecida.

1.3 Propriedades dos vírions

Os pestivírus crescem em títulos baixos em cultivos de tecidos celulares, e tendem a permanecer dentro das células infectadas. Vírions liberados para o meio de cultivo associam-se com componentes originários do soro e das células, propriedades que dificultam sua purificação e o seu exame por microscopia eletrônica (LAUDE, 1977). Adicionalmente, a baixa densidade dos pestivírus torna difícil sua purificação por métodos físicos, como centrifugação de equilíbrio (RÜMENAPF *et al.*, 1991). Em suspensões de vírions concentrados, partículas envelopadas com diâmetros entre 40 e 60 nm foram observadas (MOENNIG; PLAGEMANN, 1992). Vírions purificados consistem do RNA, da proteína C e de um envelope com três glicoproteínas associadas (proteínas E) (THIEL *et al.*, 1991). Por microscopia imunoeletrônica foi demonstrado

que a E^{ms} e a E2 estão localizadas na superfície dos vírions (WEILAND *et al.*, 1992). O envelope circunda um centro elétron denso e provavelmente hexagonal com um diâmetro de aproximadamente 30 nm (HORZINEK *et al.*, 1967). Os vírions provavelmente maturam em membranas intra-citoplasmáticas e sua liberação ocorre por exocitose de vesículas de membrana contendo os vírus (BIELEFELDT OHMANN; BLOCH, 1981; GRAY; NETTLETON, 1987; BIELEFELDT OHMANN, 1988a; BIELEFELDT OHMANN, 1988b).

1.4 A poliproteína: localização, geração, estrutura e função

O genoma dos pestivírus consiste de uma região 5' não-traduzida (5'NTR) de quase 400 nucleotídeos que contém vários códons AUG, uma longa fase de leitura aberta (ORF) que codifica aproximadamente 4000 aminoácidos e uma região 3' não-traduzida de mais de 200 nucleotídeos (COLLETT *et al.*, 1988a; MEYERS *et al.*, 1989; MOORMANN *et al.*, 1990). A ORF do HCV codifica uma poliproteína de 3000 aminoácidos; a 5'NTR tem aproximadamente 340 nucleotídeos com vários códons de iniciação e uma região 3' não-traduzida de até 42 nucleotídeos (RICE, 1996). Já os membros do gênero *Flavivirus* têm uma ORF com aproximadamente 3400 códons, similar aos outros dois gêneros. Contudo, nos *Flavivirus* as regiões 5' e 3'NTR possuem 95-132 nucleotídeos e 114-624 nucleotídeos, respectivamente (RICE, 1996). Em geral, a extremidade 3' do genoma dos membros da família *Flaviviridae* não possui poliadenilação. Como nos RNAs mensageiros eucarióticos, a 5'NTR possui uma estrutura de "cap" e o início da tradução ocorre pela sondagem do ribossomo. No entanto, nos HCV e pestivírus o início da tradução ocorre de uma maneira independente da estrutura

de “cap”. Análises da 5’NTR de ambos os grupos sugere a presença de estruturas secundárias nesta região, semelhantes às estruturas encontradas nos picornavírus. Estes achados, e especialmente a presença de vários AUG antes do real códon de iniciação, indicam a existência de um sítio interno de entrada do ribossomo nos HCV e pestivírus (POOLE *et al.*, 1995; RICE, 1996).

A poliproteína hipotética traduzida dessa grande ORF é processada durante e após a tradução por proteases celulares e virais, resultando em 11 a 12 proteínas maduras (Figura 1). A primeira clivagem, durante a biogênese da proteína viral, é realizada pela atividade autoproteolítica da protease N-terminal chamada N^{pro} , a qual cliva entre a N^{pro} e a proteína do nucleocapsídeo (C)(WISKERCHEN *et al.*, 1991; STARK *et al.*, 1993). Este sítio de clivagem foi determinado para o CSFV através de seqüenciamento N-terminal da proteína do capsídeo, ocorrendo entre a Cys-168 e a Ser-169 (STARK *et al.*, 1993). A presença de uma região altamente conservada na região que precede a Ser-169 nos leva a assumir que este processamento pela N^{pro} ocorre no mesmo sítio em todos os pestivírus. Comparações com proteases celulares e codificadas por outros vírus de RNA fita simples positiva mostraram homologia entre N^{pro} e o grupo de cisteino-proteases do tipo papaina (STARK *et al.*, 1993). A N^{pro} pertence a um grupo de proteases-líder acessórias identificadas em vírus de animais e de plantas (GORBALENYA *et al.*, 1991). A N^{pro} parece ser responsável somente pela liberação de si mesma do polipeptídeo nascente.

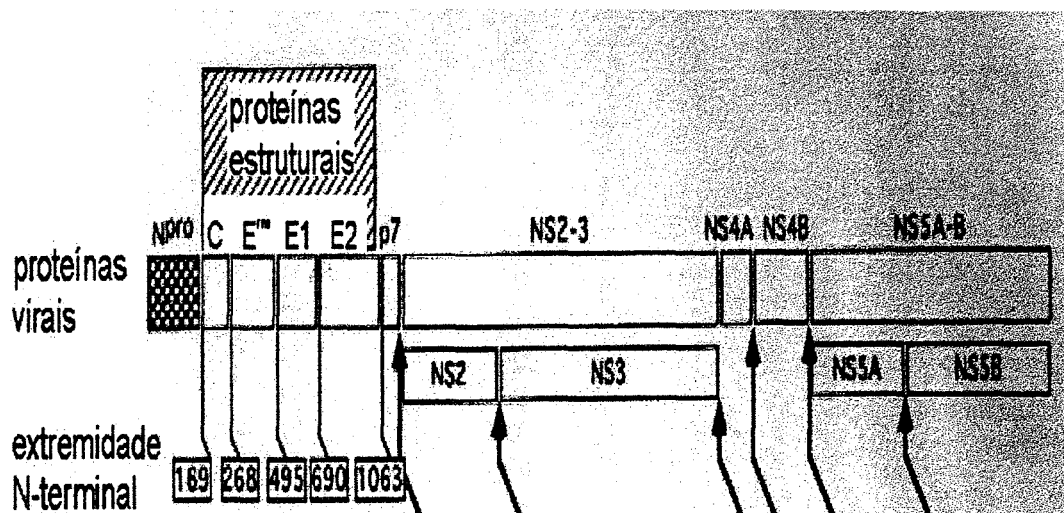


Figura 1: Organização genômica dos pestivírus. Estão indicadas as proteínas estruturais e não estruturais, os aminoácidos amino-terminais das proteínas estruturais e da p7 (em relação a poliproteína do CSFV) (THIEL; MEYERS, 1996).

A proteína do nucleocapsídeo (C) é seguida por uma seqüência sinal que media a translocação das glicoproteínas estruturais (E) na ordem E^{ms}, E1 e E2. No passado, as glicoproteínas eram nomeadas de acordo com o seu peso molecular aparente. Desta maneira, proteínas análogas de pestivírus diferentes possuíam nomes diferentes. A nomenclatura padronizada evita confusão quando comparam-se diferentes trabalhos e, especialmente uma nomenclatura baseada nas analogias dos diferentes gêneros dos *Flaviviridae*, facilita as comparações dentro da família.

As proteínas E1 e E2 possuem seqüências de aminoácidos que as ancoram à membrana celular (VAN ZIJL *et al.*, 1991; RÜMENAPF *et al.*, 1993). O mecanismo de associação da E^{ms} ao virion não é conhecido. Todas as 3 glicoproteínas estão presentes

nos vírions e membranas celulares como complexos intermoleculares ligados por pontes de dissulfeto: um E^{ms} homodímero, um E1-E2 heterodímero e um E2 homodímero (WEILAND *et al.*, 1990; THIEL *et al.*, 1991). Os resíduos de cisteína das glicoproteínas são altamente conservados entre todos os pestivírus seqüenciados (WEILAND *et al.*, 1990). De acordo com um modelo proposto, cisteínas da porção carboxi-terminal da E2 fariam pontes inter-moleculares dissulfeto com a E1 ou a E2, enquanto cisteínas da porção N-terminal fariam estas pontes intra-moleculares (VAN RIJN *et al.*, 1994).

A E^{ms}, que não tem similar nos outros membros da família *Flaviviridae*, possui regiões de significativa homologia com certas ribonucleases de plantas e fungos (SCHNEIDER *et al.*, 1993; HULST *et al.*, 1994). Embora as similaridades na seqüência sejam limitadas a duas pequenas regiões da E^{ms}, elas incluem todos os presupostos resíduos catalíticos. Experimentos conduzidos com a E^{ms} purificada de células infectadas com CSFV mostraram que a E^{ms} possui atividade de RNase (SCHNEIDER *et al.*, 1993). A caracterização bioquímica da E^{ms} expressada em células de inseto demonstrou que nem a formação de homodímeros nem a presença de carboidratos são pré-requisitos para esta atividade (WINDISH *et al.*, 1996). É interessante que anticorpos monoclonais que efetivamente neutralizam o CSFV também exercem inibição na atividade de ribonuclease. Esta correlação sugere que a atividade ribonucleásica da E^{ms} determina um importante papel no ciclo de vida do CSFV (WINDISH *et al.*, 1996). A presença de uma proteína no envelope viral com atividade intrínseca de RNase é única aos pestivírus (SCHNEIDER *et al.*, 1993).

Em relação à poliproteína, a E2 é seguida de uma proteína de 7 kDa denominada p7. Recentemente, a p7 foi identificada em células infectadas, mas não em vírions

(ELBERS *et al.*, 1996). A clivagem entre E2 e p7 não é completa, originando duas formas da E2 com diferentes extremidades carboxi-terminais. Esta situação é similar ao que ocorre no HCV, onde 2 formas da E2, bem como uma proteína correspondente a p7 foram observadas (RICE, 1996). No CSFV, a extremidade amino-terminal das proteínas estruturais e da p7 foi determinada (RÜMENAPF *et al.*, 1993; ELBERS *et al.*, 1996), sendo os respectivos sítios de clivagem aparentemente conservados em todos pestivírus. O primeiro passo na síntese das glicoproteínas é a translocação do peptídeo-sinal localizado após a proteína C. A clivagem entre C e a nascente E^{ms}12 ocorre rapidamente e é provavelmente efetuada pelas signalases celulares (RÜMENAPF *et al.*, 1993). Não é conhecido se a seqüência sinal é parte integral de C, como descrito para os flavivírus. A clivagem entre E1, E2 e p7 ocorre presumivelmente devido à atividade de signalases e provavelmente ocorre durante a translocação. Já o processamento entre a E^{ms} e a E1 ocorre de maneira mais retardada num local abaixo da seqüência similar comumente utilizada por signalases (RÜMENAPF *et al.*, 1993).

Os dois terços carboxi-terminais da ORF codificam exclusivamente proteínas não estruturais (Figura 1). Abaixo da p7, o próximo produto de clivagem é representado pela NS2-3, a qual pode ser clivada parcialmente na maioria dos pestivírus, gerando a NS2 e NS3 (COLLETT *et al.*, 1988b; MEYERS *et al.*, 1991; MEYERS *et al.*, 1992). Todavia, há casos em que a infecção de células com BVDV não-citopático geram somente NS2-3 e nenhum produto de processamento pode ser detectado (DONIS; DUBOVI, 1987; POCOCK *et al.*, 1987). Algumas linhagens do BVDV expressam a NS3 a partir de uma região genômica duplicada e sua NS2-3 não é clivada (COLLETT *et al.*, 1991). O grau de clivagem da NS2-3 difere entre os pestivírus. Em células infectadas com BVDV

citopático, a quantidade de NS3 é pelo menos tão alta quanto a quantidade de NS2-3. Após a infecção com BDV ou CSFV não-citopáticos, somente uma pequena quantidade de NS3 pode ser detectada em relação a NS2-3 (THIEL *et al.*, 1991; BECHER *et al.*, 1994). Enquanto a NS2 é uma proteína hidrofóbica, a NS3 é majoritariamente hidrofílica. Baseado neste fato, foi sugerido que a localização intracelular da NS2-3 e de seus produtos de clivagem é diferente (WISKERCHEN; COLLETT, 1991).

A NS3 dos pestivírus possui motivos característicos de proteínas análogas dos outros membros dos *Flaviviridae*. Atividades enzimáticas de serino-protease, NTPase e helicase foram demonstradas diretamente (WISKERCHEN; COLLETT, 1991; TAMURA *et al.*, 1993; WARRENER; COLLETT, 1995). Os três resíduos preditos para a tríade catalítica da protease estão localizados na extremidade amino-terminal e os motivos de NTPase e helicase são encontrados no centro da NS3. A atividade de serino-protease é responsável pelas clivagens que ocorrem na sua própria extremidade carboxi-terminal e outras mais abaixo na poliproteína. Entretanto, para uma linhagem do BVDV foi determinado que a NS3 cliva também entre NS2 e NS3 (WISKERCHEN; COLLETT, 1991), o que não ocorre em outras linhagens testadas. Por exemplo, em linhagens do BVDV citopáticas, com seqüências que codificam ubiquitina inseridas na NS2-3 (Osloss e CP14), uma protease celular é responsável pela geração da extremidade amino da NS3. Em várias outras linhagens não são conhecidos nem o sítio de clivagem, nem a protease responsável pela clivagem do sítio entre NS2 e NS3 (THIEL; MEYERS, 1996). Já no HCV, a clivagem deste sítio é catalisada por uma metalo-protease dependente de zinco codificada pelo vírus, a qual é diferente da NS3 e parece ocorrer somente no gênero *Hepatitis C-like Viruses* (RICE, 1996).

As proteínas não estruturais NS4 e NS5 estão localizadas após a NS3 na poliproteína e, como no HCV, ambas são processadas em NS4A, NS4B e NS5A e NS5B (COLLETT *et al.*, 1988b; COLLETT *et al.*, 1991; MEYERS *et al.*, 1992). Parece provável que a clivagem entre a NS3 e a NS4A ocorre somente em cis. Os sítios abaixo da NS4A, contudo, são provavelmente clivados em trans. No HCV e presumivelmente nos pestivírus, a NS4A parece servir como um cofator, sendo requerido para certas clivagens realizadas pela NS3 (RICE, 1996). A função da NS4B não é conhecida.

Os produtos de clivagem da NS5 exibem diferentes meia-vidas. Enquanto a NS5A é uma proteína estável, a NS5B tem uma meia-vida muito curta (COLLETT *et al.*, 1991). A presença de motivos característicos sugere que a NS5B seja a RNA polimerase RNA dependente (MEYERS *et al.*, 1989).

Recentemente foi descrita a produção de clones de cDNA infecciosos do BVDV e CSFV, os quais permitirão o emprego de novas técnicas para o estudo da biologia molecular dos pestivírus e, em particular, a elucidação das bases moleculares da atenuação e citopatogenicidade (MEYERS *et al.*, 1996a; MEYERS *et al.*, 1996b; RUGGLI *et al.*, 1996).

1.5 Relacionamento entre os pestivírus

A relação antigênica entre o BVDV e CSFV foi demonstrada em investigações que empregaram imunodifusão com soros policlonais (DARBYSHIRE, 1960; DINTER, 1963). Subseqüentemente, reagentes sorológicos foram utilizados para detectar não só o relacionamento, mas também as diferenças entre espécies e linhagens de pestivírus (PETERS *et al.*, 1986; CAY *et al.*, 1989; EDWARDS *et al.*, 1989; WENSVOORT *et*

al., 1989; MOENNIG; PLAGEMANN, 1992; WEILAND *et al.*, 1992). Para isto, ensaios de neutralização cruzada com soros policlonais e outros sistemas em conjunto com anticorpos monoclonais (Mabs) foram utilizados para a identificação e a caracterização de proteínas individuais. Os Mabs descritos até hoje são específicos para a E^{ms}, E2 e NS3 (CORAPI *et al.*, 1990; GREISER-WILKE *et al.*, 1990; WEILAND *et al.*, 1990; GREISER-WILKE *et al.*, 1991; PATON *et al.*, 1991; WEILAND *et al.*, 1992). Também soros contra proteínas de fusão bacterianas e peptídeos sintéticos que compreendem regiões definidas da poliproteína foram utilizados para estabelecer relações antigênicas entre as espécies de pestivírus.

Mabs dirigidos contra a NS3 geralmente reconhecem epítomos conservados, e seu padrão de reatividade é considerado panpestivírus-específico (PETERS *et al.*, 1986; EDWARDS *et al.*, 1989). Em contraste, Mabs dirigidos contra a E^{ms} e E2 têm sido utilizados para discriminar entre espécies e também entre linhagens da mesma espécie (CAY *et al.*, 1989; WENSVOORT *et al.*, 1989; WEILAND *et al.*, 1992; KOSMIDOU *et al.*, 1994). Mabs contra a E2 também foram utilizados para mapear os respectivos epítomos através de ensaios de competição, ensaios de captura de antígeno, ensaios de vírus-neutralização, produção de mutantes e neutralização de mutantes que escaparam à neutralização (MOENNIG *et al.*, 1988; WENSVOORT, 1989; PATON *et al.*, 1992; VAN RIJN *et al.*, 1993). Embora a E2 pareça representar o principal alvo de anticorpos neutralizantes, Mabs contra a E^{ms} também causam neutralização (BOLIN *et al.*, 1988; DONIS *et al.*, 1988; WENSVOORT *et al.*, 1989; GREISER-WILKE *et al.*, 1990; WEILAND *et al.*, 1990; WEILAND *et al.*, 1992). Como observado no HCV, a E2 dos pestivírus é altamente variável em sua porção amino-terminal, onde a maioria dos

epítos neutralizantes está localizada. Até o momento não foi demonstrada neutralização cruzada entre espécies de pestivírus por Mabs.

Seqüências de nucleotídeos de genômas inteiros estão disponíveis para BVDV e CSFV. Para o BDV, somente seqüências parciais foram determinadas (BECHER *et al.*, 1994; BECHER *et al.*, 1995; BECHER *et al.*, 1996). Análises de nucleotídeos e suas seqüências deduzidas de aminoácidos permitiram a avaliação da similaridade total entre linhagens do BVDV e CSFV; da homologia de regiões definidas, bem como do relacionamento entre proteínas individuais (COLLETT *et al.*, 1988a; MEYERS *et al.*, 1989; MOORMANN *et al.*, 1990; DENG; BROOK, 1992; DE MOERLOOZE *et al.*, 1993; RIDPATH; BOLIN, 1995; ISHIKAWA *et al.*, 1995; MEYERS *et al.*, 1996b). Por exemplo, mostrou-se um alto grau de variabilidade na glicoproteína estrutural E2, cujas identidades de aminoácidos foram de apenas 80% dentro de uma espécie e menores que 60% entre as três espécies (BECHER *et al.*, 1994). Somente a p7 é menos conservada, na qual o grau de identidade de aminoácidos entre as espécies pode ser tão baixo quanto 43% (ELBERS *et al.*, 1996). Em contraste, a NS3 é a proteína mais conservada dentre os pestivírus (MEYERS *et al.*, 1989), atingindo valores de identidade ao nível de aminoácidos maiores do que 90% entre as espécies.

A comparação de seqüências de nucleotídeos tem demonstrado que a região 5' não traduzida do genoma (5'NTR) é particularmente apropriada para identificar os pestivírus por PCR. Além disso, o seqüenciamento provê informação suficiente para a sua diferenciação (DE MOERLOOZE *et al.*, 1993; HOFMANN *et al.*, 1994; HARASAWA; TOMIYAMA, 1994). Já a comparação de seqüências de aminoácidos da E2 tem sido utilizada para demonstrar variabilidade entre os pestivírus (BECHER *et al.*, 1994,

HERTIG *et al.*, 1995). Estes estudos levaram à identificação de dois grupos de pestivírus de ovinos, chamados de linhagens do tipo BVDV e linhagens do BDV verdadeiras. Recentemente, um terceiro grupo de pestivírus derivados de ovinos foi identificado por PCR e seqüenciamento dos nucleotídeos da região 5'NTR, N^{PRO} e C (BECHER *et al.*, 1995). Curiosamente, este terceiro grupo do BDV tem alta homologia com um “novo” grupo de linhagens do BVDV identificadas principalmente por RT-PCR e seqüenciamento da 5'NTR (PELLERIN *et al.*, 1994; RIDPATH *et al.*, 1994). Estas linhagens bovinas podem causar um grave quadro de sintomas chamado de síndrome hemorrágica. Estes achados demonstraram que a taxonomia atualmente utilizada, que classifica os pestivírus de acordo com o hospedeiro e com a doença não é adequada, especialmente porque infecções cruzadas ocorrem freqüentemente. Foi sugerido que a homologia de seqüências de nucleotídeos seja utilizada na diferenciação dos pestivírus e que eles sejam divididos em tipos, chamados pestivírus tipo 1 (linhagens clássicas do BVDV), pestivírus tipo 2 (linhagens do CSFV), pestivírus tipo 3 (linhagens “verdadeiras” do BDV) e pestivírus tipo 4 (“novo” grupo de linhagens de bovinos e ovinos) (Figura 2) (BECHER *et al.*, 1995). Contudo, a descoberta de novos tipos de pestivírus não pode ser descartada, principalmente através da análise de isolados de pestivírus de animais selvagens.

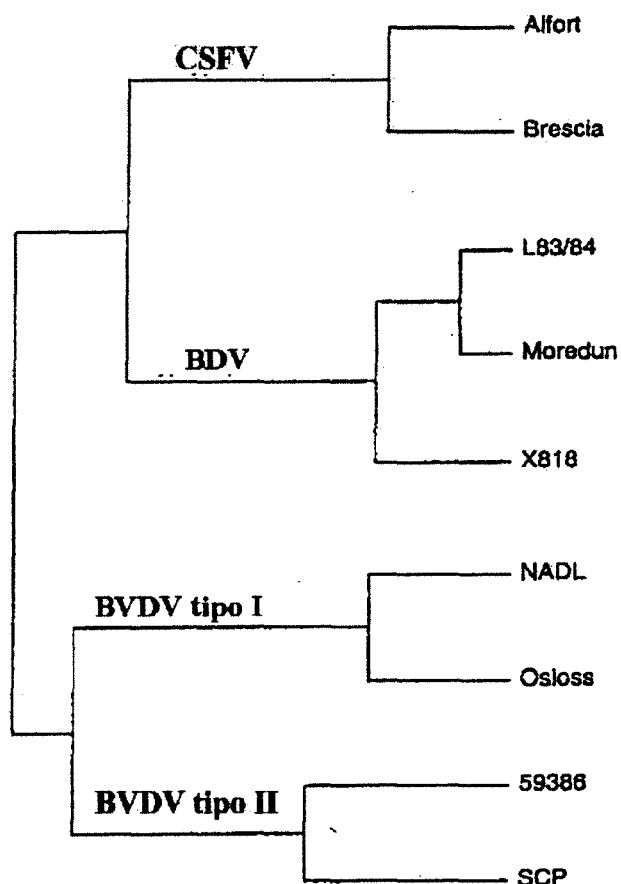


Figura 2: Diagrama comparando seqüências de aminoácidos da autoprotease N^{pro} de diferentes pestivírus. Quatro grupos distintos de pestivírus podem ser distinguidos. Foi sugerido que eles sejam denominados tipo 1 (BVDV), tipo 2 (CSFV), tipo 3 (BDV “verdadeiro”) e tipo 4 (grupo de pestivírus recentemente identificado que foi isolado de bovinos e ovinos) (BECHER *et al.*, 1995).

1.6 Epidemiologia

A prevalência de infecções por pestivírus pode ser expressa como a prevalência de animais portadores de anticorpos ou a prevalência de animais persistentemente

infectados (PI). Como os títulos de anticorpos obtidos por infecção natural decrescem vagarosamente (BROWNLIE *et al.*, 1987), uma vez que um animal é infectado, ele possivelmente terá anticorpos contra o BVDV pelo resto de sua vida. Exceto nas áreas que utilizam vacinação, a prevalência de portadores de anticorpos reflete a proporção de animais previamente expostos ao vírus em algum momento de sua vida. O número de animais PI produzidos é determinado pela incidência de infecções agudas entre animais sem anticorpos contra pestivírus no primeiro terço de gestação e pela transmissão vertical dos próprios animais PI. A prevalência de animais PI é dada pelo número de animais PI produzidos, reduzidos do número de fetos e animais PI que morrem. Uma boa associação tem sido demonstrada entre a incidência da infecção no primeiro terço de gestação e a prevalência de animais PI menores que um ano de idade (HOUE; MEYLING, 1991). A maioria das infecções agudas não resulta em animais PI, seja porque a fêmea não estava no ponto crítico de gestação, ou porque a imunidade adquirida naturalmente previne a infecção fetal posterior (ORBAN *et al.*, 1983). Devido a estes fatos, a prevalência de animais portadores de anticorpos é muito maior do que a de animais PI com pestivírus.

O animal PI é o principal transmissor do vírus, embora a disseminação feita pelo homem possa ter um importante papel, através da inseminação artificial, transferência de embriões e vacinas (LIESS *et al.*, 1987; REVELL *et al.*, 1988; WENSVOORT; TERPSTRA, 1988).

Infecções pelo BVDV ocorrem em todos os países estudados até hoje, embora existam diferenças entre rebanhos, regiões e países. Populações bovinas são soropositivas numa média de 60% à 90% (HARKNESS *et al.*, 1978; STECK *et al.*,

1980; LIESS *et al.*, 1983; PAISLEY *et al.*, 1996), enquanto que animais PI são encontrados numa média de 0,5% à 1,4% (BOLIN *et al.*, 1985; PETERS *et al.*, 1987; HOUE; MEYLING, 1991). Contudo, devido ao fato de que algumas linhagens do BVDV/BDV são muito bem adaptadas aos seus hospedeiros, animais PI sem sinais clínicos podem produzir várias gerações de progênie PI (LIESS *et al.*, 1983). Entre rebanhos porém, estes números variam consideravelmente. Em um rebanho pequeno com pelo menos um animal PI, provavelmente 100% dos animais serão soropositivos, com exceção do animal PI. Já em rebanhos sem animais PI há vários anos, provavelmente nenhum animal será soropositivo. Situações intermediárias poderão ser encontradas em rebanhos em que os animais PI foram retirados ou em grandes rebanhos onde não haja contato direto entre todos os animais (HOUE, 1995).

As principais vias de transmissão naturais do CSFV é a oral ou nasal (DUNNE *et al.*, 1959; RESSANG, 1973). A disseminação do vírus ocorre principalmente pela movimentação de animais infectados entre rebanhos, em exposições e feiras de animais, contribuindo significativamente para a disseminação da CSF por longas distâncias (PICARD, 1989). Suínos selvagens, como o javali na Europa, têm sido apontados como causadores de surtos de CSF (LEFORBAN; CARIOLET, 1992). Leitões PI excretam grandes quantidades do vírus e são eficientes veículos na transmissão do CSFV. Os suínos e seus produtos são reservatórios do CSFV e têm um importante papel na transmissão e manutenção da doença (SAVI *et al.*, 1965).

A disseminação da doença em rebanhos suínos pode tomar diferentes rumos, dependendo da virulência do vírus. Linhagens altamente virulentas do CSFV multiplicam-se eficientemente em seu hospedeiro e grandes quantidades de vírus são

excretadas por descargas oronasais e pelas fezes, sendo sua disseminação relativamente rápida. Em contraste, devido à baixa replicação do vírus e à produção de anticorpos neutralizantes, a excreção de linhagens de baixa virulência é menos eficiente. Desta maneira, a disseminação deste tipo de infecção numa pocilga é mais vagarosa, e a CSF é freqüentemente diagnosticada somente 6 a 8 semanas após a introdução do vírus (VAN OIRSCHOT, 1992). Atualmente, as epidemias que ocorrem no campo são causadas por um grande espectro de linhagens com baixa à alta virulência (WENSVOORT; TERPSTRA, 1985).

O CSFV está presente em todos os continentes, porém foi erradicado nos Estados Unidos da América, Canadá, Austrália, e países da Comunidade Européia (VAN OIRSCHOT; TERPSTRA, 1989), com a ocorrência de algumas epizootias de CSF nestes países após a sua erradicação (WILLIAMS; MATTHEWS, 1988; KOENEN *et al.*, 1996). A importância da CSF está diretamente correlacionada à densidade da população suína, ao nível técnico da criação e ao emprego de legislação para o controle de doenças infecciosas. As perdas econômicas diretas e indiretas causadas por surtos de CSF podem ser significativas (TERPSTRA, 1988). Análises de custo/benefício indicam que a erradicação da CSF é justificada (ELLIS *et al.*, 1977). A erradicação gradual da CSF e a declaração de regiões livres da doença é desejada por organizações internacionais (OIE e FAO) e é substancialmente incentivada pela Comissão das Comunidades Européias (LIESS, 1981).

Uma das restrições dos mercados consumidores de produtos de origem suína, onde a CSF foi erradicada, relaciona-se à sua existência nos países produtores. Com o objetivo de ganhar acesso a estes mercados, está em andamento o "Programa de Controle e

Erradicação da Peste Suína Clássica" na Região Sul do Brasil. Este programa conta com a participação de criadores e indústrias de produtos suínos juntamente com o Ministério e Secretarias de Agricultura.

1.7 Diagnóstico

A variabilidade nos sinais clínicos requer que os casos suspeitos de infecção por pestivírus sejam confirmados por exames laboratoriais. Os exames laboratoriais podem ser baseados na detecção dos antígenos virais ou na detecção dos anticorpos gerados contra o vírus (PEARSON, 1992).

Os pestivírus podem ser isolados de leucócitos, plasma, soro ou suspensões de órgãos de animais virêmicos e cultivados em células do respectivo hospedeiro. Como a maior parte das linhagens é de biótipo não-citopático, a utilização de anticorpos é um pré-requisito para a detecção da infecção viral no cultivo celular e identificação de isolados virais.

O diagnóstico rápido das infecções por CSFV é baseado na detecção dos antígenos virais em seções de tecidos usando anticorpos conjugados para imunofluorescência direta. Os tecidos mais apropriados são as tonsilas, baço, rim, íleo e linfonodo mandibular. Alternativamente, suspensões destes órgãos ou leucócitos podem ser cultivadas em células suínas suscetíveis com a detecção subsequente dos antígenos virais. Para a diferenciação dos pestivírus de ruminantes, pode-se utilizar anticorpos monoclonais específicos conjugados com peroxidase (WENSVOORT *et al.*, 1986) ou ensaios de neutralização comparada (JENSEN, 1981).

Para a identificação dos pestivírus de ruminantes, a detecção do vírus ou de seus antígenos é de fundamental importância, já que os animais virêmicos (PI) são normalmente soronegativos e o mais eficiente meio de reserva e transmissão do vírus (BOLIN *et al.*, 1985; HOWARD *et al.*, 1986; EDWARDS *et al.*, 1987). O isolamento do vírus a partir de leucócitos em cultivos celulares é a prática rotineira. Vários ensaios imunoenzimáticos foram desenvolvidos para a demonstração direta de antígenos em lisados de leucócitos periféricos de ovinos e bovinos (FENTON *et al.*, 1990; FENTON *et al.*, 1991; SHANNON *et al.*, 1991; GOTTSCHALK *et al.*, 1992; STRASSER *et al.*, 1995).

A detecção dos ácidos nucléicos virais tem se tornado uma opção adicional no diagnóstico laboratorial. Vários investigadores desenvolveram testes diagnósticos baseados em RT-PCR para o BVDV (SCHROEDER; BALASSU-CHAN, 1990; LOPEZ *et al.*, 1991; HERTIG *et al.*, 1991; BELÁK; BALLAGI-PORDÁNY, 1991; HOOFT VAN IDEKINGE *et al.*, 1992; ALANSARI *et al.*, 1993; LOPEZ *et al.*, 1993; SCHMITT *et al.*, 1994), para o CSFV (LIU *et al.*, 1991; HARDING *et al.*, 1994) ou ambos (ROEHE; WOODWARD, 1991; BOYE *et al.*, 1991). Nenhum destes testes foi projetado ou avaliado para o diagnóstico diferencial dos pestivírus. Devido a região 5'NTR ser altamente conservada, a amplificação é obtida de todos pestivírus. O subsequente seqüenciamento desta região ou a utilização de iniciadores que amplificam outras regiões variáveis do genoma permite a discriminação entre as diferentes espécies de pestivírus (DE MOERLOOZE *et al.*, 1993; WIRZ *et al.*, 1993; KATZ *et al.*, 1993; HOFMANN *et al.*, 1994).

A sorologia é o método mais adequado para a vigilância de áreas aparentemente livres da CSF ou para assegurar que não existem focos residuais desta durante programas de erradicação (PEARSON, 1992). Com este propósito, testes de neutralização e de ELISA são amplamente utilizados. Contudo, anticorpos gerados contra pestivírus de ruminantes podem ser detectados por ambos sistemas. Para esta discriminação, testes de neutralização cruzada e testes de ELISA que detectam anticorpos específicos contra a E2 do CSFV são utilizados (MOENNIG; PLAGEMANN, 1992). O teste de soro neutralização determina a capacidade do soro testado neutralizar a infectividade de uma quantidade fixa do vírus. Ele necessita mais tempo e é mais difícil de executar do que os outros testes sorológicos, mas ainda é um método oficial em muitos países. Vários testes de ELISA foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos contra o CSFV. O teste de MOENNIG *et al.* (1990) é um ELISA indireto em que a placa é sensibilizada com um anticorpo monoclonal contra o CSFV, seguido da adição do antígeno do CSFV, o soro teste e o anticorpo anti-IgG suína conjugado com peroxidase. O teste de LEFORBAN *et al.* (1990) é um ELISA de bloqueio que utiliza soro polivalente preparado em coelhos. O terceiro teste é um ELISA complexo de bloqueio e captura, que utiliza dois anticorpos monoclonais, e que mede a capacidade do soro-teste inibir a ligação de um dos anticorpos monoclonais à um epítipo específico (WEENSVOORT *et al.*, 1988). O quarto teste é um ELISA direto, que utiliza a E2 recombinante (MOSER *et al.*, 1996). A especificidade e a sensibilidade destes testes de ELISA têm sido descritas como maiores do que para os testes de neutralização, além de serem executados em menor tempo.

O diagnóstico sorológico das infecções causadas por pestivírus de ruminantes também é realizado por soroneutralização e ELISA (JUNTII *et al.*, 1987). A principal

importância destes testes está no monitoramento sorológico dos rebanhos e no acompanhamento de programas recentes de erradicação e controle destes vírus em países do norte da Europa. Para seu acompanhamento, tem sido empregados testes de ELISA para a detecção de anticorpos a partir dos tanques de depósito do leite (NISKANEN *et al.*, 1991).

2. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de métodos para a detecção e diferenciação dos pestivírus, bem como sua utilização em estudos epidemiológicos. Esse objetivo geral originou três diferentes estudos:

- Artigo 1: Differentiation of Classical Swine Fever Virus from ruminant pestiviruses by Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), publicado na revista *Veterinary Microbiology*.

- Artigo 2: Detection of antibody to Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) and characterization of BVDV genomes from Brazil, a ser submetido a revista *Veterinary Record*.

- Anexo 1: Artigo em elaboração, no qual foi descrita a produção de três proteínas recombinantes do BVDV em baculovírus, com o fim de serem utilizadas em testes de ELISA.

Maiores detalhes sobre os objetivos de cada um dos estudos serão descritos a seguir.

3. OBJETIVOS CONTIDOS NO ARTIGO 1

Métodos de isolamento em cultura celular têm provado serem efetivos e sensíveis na detecção genérica dos pestivírus (PEARSON, 1992). Contudo, num programa de controle e erradicação da CSF, como o que está em andamento na região Sul do Brasil, é fundamental a diferenciação das infecções causadas pelo CSFV das causadas pelo BVDV e BDV, já que as infecções causadas pelos pestivírus de ruminantes não requerem as mesmas medidas de controle tomadas quando das infecções causadas pelo CSFV. Para a diferenciação dos pestivírus, podem ser utilizados painéis de anticorpos monoclonais, mas é necessária a utilização de um grande número de anticorpos monoclonais caracterizados e pessoal treinado para a interpretação dos resultados.

Recentemente, a disponibilidade de seqüências genômicas de pestivírus em bancos de dados permitiu o desenvolvimento de técnicas de amplificação gênica e sondas para a detecção dos pestivírus. Contudo, a maioria destes testes não foi projetada ou avaliada para o diagnóstico diferencial dos pestivírus.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um RT-PCR com capacidade para detectar e diferenciar os pestivírus isolados em cultivo celular, o que o tornaria significativamente mais rápido do que os métodos convencionais de detecção e diferenciação dos pestivírus.

4. ARTIGO 1



ELSEVIER

Veterinary Microbiology 48 (1996) 373–379

**veterinary
microbiology**

Short communication

Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)

Cláudio Wageck Canal ^a, Isidro Hotzel ^a, Laura Lopes de Almeida ^a,
Paulo Michel Roehe ^c, Aoi Masuda ^{a,b,*}

^a Centro de Biotecnologia from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Biotecnologia from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Microbiologia from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Accepted 28 July 1995

Abstract

A reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was designed to allow the differentiation of pestiviruses by the expected size of the amplified fragments. One oligonucleotide primer, conserved amongst pestiviruses, and two others specific for either classical swine fever virus (CSFV) or bovine viral diarrhoea virus (BVDV), were designed from the 5' non-coding region of the genome. CSFV infected cultures (10 strains) amplified a fragment of an expected size of 200 bp; BVDV cultures (23 strains) or border disease virus (BDV) (2 strains) amplified a fragment of an expected size of 260 bp. The specificity of the amplified fragments was confirmed by restriction enzyme analysis. The threshold of sensitivity was 100 TCID₅₀ for CSFV and 1 TCID₅₀ for BVDV. The RT-PCR described here provides a rapid and sensitive diagnostic tool for the detection and differentiation of CSFV from ruminant pestiviruses.

Keywords: Pestivirus; Hog cholera virus; Classical swine fever virus; Bovine viral diarrhoea virus; Border disease virus; Polymerase chain reaction; Diagnosis

1. Introduction

Classical swine fever virus (CSFV), bovine viral diarrhoea virus (BVDV), and border disease virus (BDV) are the three single-stranded, positive-polarity RNA viruses which

* Corresponding author, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421 - Campus do Vale - C.P. 15005, CEP 91501-970 - Porto Alegre - RS - Brasil. Tel: 55 51 3363777. Fax: 55 51 3362779. E-mail: CANAL@DNA.CBIOT.UFRGS.BR.

comprise the genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae* (Horzinek, 1991). Pestiviruses are the causative agents of economically relevant animal diseases, such as classical swine fever (CSF), bovine viral diarrhoea and mucosal disease of cattle, and border disease of sheep and goats. BVDV and BDV are probably endemic worldwide, and while CSFV is still a major concern for pig farming, it has been eradicated in some countries (Dahle and Liess, 1992). In countries where eradication of CSFV has been achieved, the discrimination between CSFV and ruminant pestiviruses is of paramount relevance, since BVDV and BDV also infect swine and can give rise to a misleading diagnosis of CSF. Pestiviruses are closely related, both antigenically and structurally (Becher et al., 1994). Polyclonal antisera against pestiviruses generally fail to distinguish them (Pearson, 1992). More recently, panels of monoclonal antibodies have been used for pestivirus differentiation (Wensvoort et al., 1988; Cay et al., 1989). However, these tests require the availability of a number of monoclonal antibodies and expert technique to avoid doubtful interpretations.

The molecular cloning and sequencing of the genomes of CSFV and BVDV strains (Renard et al., 1987; Collett et al., 1988; Meyers et al., 1989; Moormann et al., 1990; Deng and Brock, 1992; Muyltermans et al., 1993) allowed the development of nucleic acid probes and gene amplification techniques for the detection of and differentiation between members of the genus (Katz et al., 1993; Wirz et al., 1993).

The purpose of the present study was to evaluate the ability of RT-PCR to differentiate CSFV from the other ruminant pestivirus by means of the expected size of the amplification product.

2. Materials and methods

2.1. *Pestivirus strains and isolates*

The CSFV strains Alfort 187, HCV 331, Baker ‘‘A’’, Glentorf, the BVDV strain Singer and the BDV strains Weybridge and M2 were a kind gift from Dr. Steven Edwards from the Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey, UK. Castro, EVI 100, EVI 136, EVI 192, and PSCPORCO are Brazilian isolates of CSFV (Edwards and Sands, 1990). Apart from that, two vaccinal strains of CSFV (‘‘Chinese strains’’) were obtained from commercial suppliers (Laboratório Hertape and Salsbury Laboratórios).

The BVDV strains and isolates used were: Singer, Osloss 2482, Oregon C24V, Illinois, New York-1, 7443, NADL, Nebraska, New Zealand, Indiana 1061, McCann, A1138/69, Sturgis, 5960, and isolates R10988/91, R3535/93, R3200/94, R4182/94, R4833/94, R5000/94, R5561/94, R3572/94, and 735/1. With the exception of the Singer strain, they were kindly provided by Dr. Ernst Peterhans and Dr. Marc Strasser from the Institute of Veterinary Virology, Berne University, Switzerland.

2.2. *Virus propagation*

Pestiviruses were grown in Eagle’s Minimal Essential Medium (E-MEM) supplemented with 5% calf serum (CSFV) or 5% horse serum (BVDV and BDV) and 50 mg/l of gentamicin. Ruminant pestiviruses were grown in MDBK cells (ATCC, CCL 22) and

CSFV in PK-15 cells (ATCC, CCL 33), following standard methods (Roehle, 1991). The 50% tissue culture infective doses (TICD₅₀) of non cytopathic strains were determined by the Peroxidase Linked Assay (Afshar et al., 1989). For cytopathic viruses, end points were calculated by the presence of cytopathic effect.

2.3. Oligonucleotide primers

Oligonucleotide primers were designed from the 5' non-translated genome sequences with the program Oligo (Rychlik and Rhoads, 1989). The common antisense primer (P3) was complementary to all known pestivirus genomes. The two sense primers (P1 and P2) were specific for either CSFV or BVDV, designed from genomic regions with a low degree of homology between those viruses. The primers used were as follows:

P1, 5'-GGCCGAAAAGAGGCTAGCCATGCCC-3';

P2, 5'-CGTAGTGGCGAGCTCCCTGGGTGG-3';

P3, 5'-TGGGCTCTGCAGCACCTATCAGG-3'.

2.4. RNA extraction and cDNA synthesis

The acid guanidinium-phenol-chloroform (AGPC) method (Chomczynski and Sacchi, 1987) was used to isolate RNA from cell culture supernatants. The pellet obtained was washed with 75% ethanol, dried and suspended in 10 μ l of 10 mM DTT and 10 units of placental ribonuclease inhibitor (GIBCO-BRL). It was heated at 65°C for 5 min, chilled on ice and used immediately thereafter. When the cDNA synthesis was performed without prior RNA extraction, 2 μ l of cell culture supernatant were heated at 80°C for 5 min and added without further treatment to the reverse transcription reaction. Reverse transcription was performed in a 20 μ l reaction mixture containing 10 mM Tris.HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM of each of the four dNTPs (Sigma), 2.5 μ M of the reverse primer (P3), and 10 units of M-MLV reverse transcriptase (GIBCO-BRL) with incubation at 37°C for 30 min.

2.5. Polymerase chain reaction

The PCR amplification was performed in a reaction volume of 100 μ l containing 10 mM Tris.HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each of the four dNTPs, 0.5 μ M of each of the three primers, and 0.8 unit of *Taq* DNA Polymerase (CENBIOT), which was overlaid with 100 μ l of mineral oil (Sigma). Amplification was performed for 35 cycles in a programmable thermal controller PTC-100 (MJ Research) with pre-heating at 94°C for 3 min, denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 65°C for 1 min, and amplification at 72°C for 1 min.

2.6. Amplification product analysis

The amplification products were analyzed by electrophoresis of 15 μ l on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide, and examined under ultraviolet light. The specificity of the amplification reaction was also checked by digestion with restriction endonucleases *Taq*

I (CSFV) and *Dde* I (BVDV) based on conserved sites present in the published sequences. The cleaved fragments were electrophoresed in 12% acrylamide denaturing gels stained with ethidium bromide and the relative mobility compared with a 100 bp DNA ladder (GIBCO-BRL).

All RT-PCR reactions included RNA or cell culture supernatants from mock infected cell cultures as negative controls.

3. Results

Total RNA extracted from infected cells or cell culture supernatants was submitted to RT-PCR. All of the 35 pestivirus strains gave rise to amplification products of the expected size. The RT-PCR of CSFV infected material (10 strains) gave rise to a fragment of 200

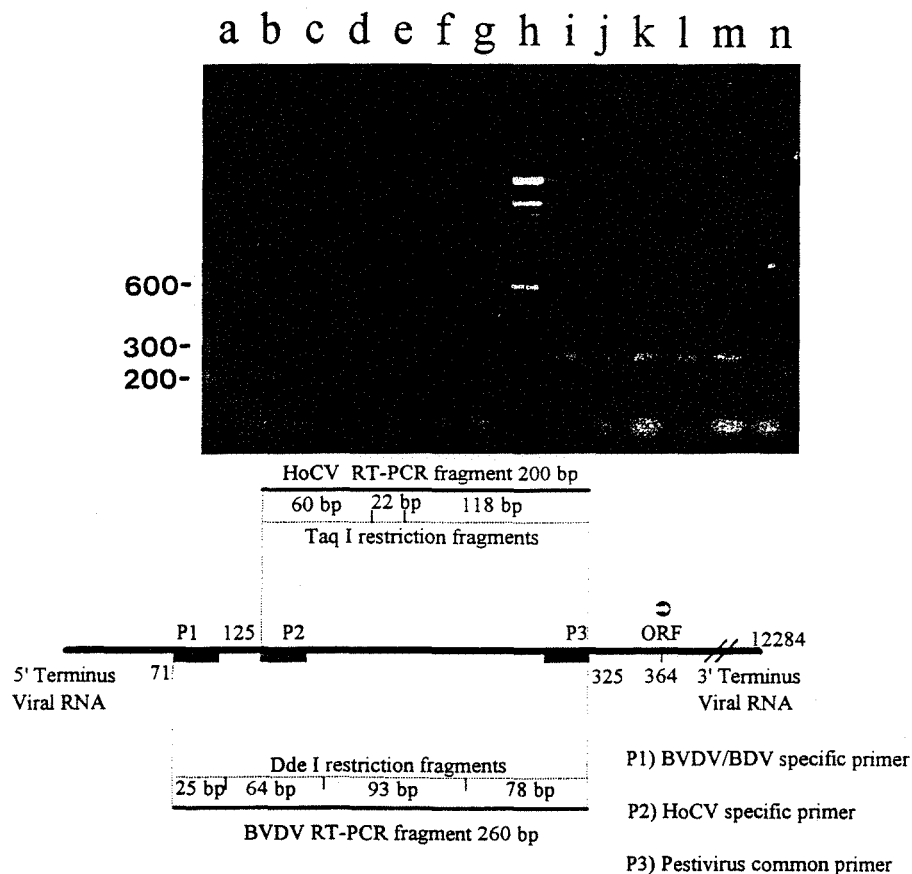


Fig. 1. Agarose 2% gel stained with ethidium bromide from amplification products of CSFV, BVDV, and BDV RNA extracted from infected cell culture supernatant. CSFV 200 bp segment amplified from extracted RNA of cell culture supernatant of strains: a- Alfort, b- Baker "A", c- Castro, d- Glentorf, e- Chinese, f- EVI 100, g- mock infected; h- 100 bp DNA ladder, BVDV 260 bp segment amplified from extracted RNA of cell culture supernatant of strains: i- NADL, j- Osloss, k- Oregon C24V, l- New Zealand, m- R3200/94, and n- mock infected.

bp in 2% agarose gel stained with ethidium bromide, whereas for BVDV (23 strains) or BDV (2 strains), a product of 260 bp was amplified. CSFV and BVDV/BDV could easily be distinguished by the size of the stained fragment (Fig. 1).

In order to confirm the specificity of the amplified fragments, internal restriction digests of the amplified fragment of five strains of CSFV and five strains of BVDV were performed. After cleavage with *Taq* I, the 200 bp amplified fragments of CSFV produced the predicted 22, 60, and 118 bp fragments. The 260 bp amplified fragments of BVDV resulted in 25, 64, 78, and 93 bp fragments when cleaved with *Dde* I, as expected (data not shown).

The threshold of sensitivity of the test was 100 TCID₅₀ for the four CSFV strains and 1 TCID₅₀ for the four BVDV strains tested, as determined by amplifications from tenfold dilution of the viruses. When cell culture supernatants were used without prior RNA extraction, the sensitivity was 10 times less (data not shown).

4. Discussion

The differential identification system designed here was able to discriminate between CSFV and the ruminant pestiviruses by means of the expected size of the amplification product.

Since nucleotide sequences of pestivirus genomes were made available, several RT-PCR-based diagnostic tests have already been reported for BVDV and CSFV (Schroeder and Balassu-Chan, 1990; Belák and Ballagi-Pordány, 1991; Boye et al., 1991; Hertig et al., 1991; Liu et al., 1991; Lopez et al., 1991; Roehe and Woodward, 1991; Hoof van Iddekinge et al., 1992; Alansari et al., 1993; Harding et al., 1994). More recently, two PCR-based tests have been designed for differential diagnostic purposes (Wirz et al., 1993; Katz et al., 1993). Both assays based their primer design on conserved regions at the 5' untranslated region of the genome, so as to detect all pestiviruses ('pan-reactive' primers). We adopted the same principle for the selection of our pan-reactive primer (P3), which was used for reverse transcription. P3 is completely conserved among the pestivirus sequences analysed. Moreover, it is also conserved in hepatitis C virus (Han et al., 1991), recently classified as a member of the Flaviviridae family (Horzinek, 1991). It was later found to be partially homologous to primers designed by others (Katz et al., 1993; Wirz et al., 1993), as is P2 (Katz et al., 1993).

On the other hand, primers P1 and P2 were able to selectively amplify ruminant pestiviruses and CSFV, respectively, confirming the presence of either CSFV- or BVDV/BDV-specific regions at the 5' untranslated region of the genome. The combination of a pan-reactive, anti-sense primer plus two specific differential primers made the distinction between CSFV and ruminant pestiviruses possible in one single PCR reaction. As an advantage, the method employed here allowed the use of three primers in a single reaction, instead of 4 primers in 2 separate reactions, as described by others (Wirz et al., 1993; Katz et al., 1993).

Our RT-PCR protocol was able to amplify the expected products directly from cell culture supernatants, which makes it significantly faster to perform (6 h), even though the sensitivity was reduced when compared with the RT-PCR performed with extracted RNA. Wirz et al. (1993) tested their primers' ability to amplify genome segments from organ extracts and

cell cultures without prior RNA isolation. The sensitivity was almost the same as virus isolation in tissue culture and detection by immunofluorescence. Katz et al. (1993) described a nested-amplification approach to detect virus RNA grown in cell culture. The specificity of the amplified DNA was checked by enzyme restriction analyses, but the sensitivity of the test was not addressed. Cell culture isolation methods have proven to be rapid, reliable and sensitive for the generic detection of pestiviruses (Pearson, 1992). We have demonstrated the ability of the PCR to presumptively differentiate CSFV from other pestiviruses grown in cell culture. Such differentiation is not conveniently achieved by conventional methods, unless a series of time consuming cross-neutralization tests are performed. Monoclonal antibodies have also proven useful in such differentiation, but present the disadvantage of requiring a large pannel of monoclonal antibodies (Cay et al., 1989). The RT-PCR technique described here offers an alternative for the differentiation between CSFV and ruminant pestiviruses.

Acknowledgements

We thank Dr. E. Peterhans and Dr. M. Strasser from the Institute of Veterinary Virology of the Berne University for donating BVDV strains and isolates. We thank J.S. Fernandes, L.P. Braga and H.M.M. Maia from CENBIOT for kindly providing the *Taq* DNA Polymerase. We thank I. Vaz Junior for excellent technical assistance. This work was supported by grants from FAPERGS and CNPq.

References

- Afshar, A., Dulac, G.C. and Bouffard, A., 1989. Application of peroxidase labelled antibodies to hog cholera and bovine viral diarrhoea viruses. *J. Virol. Methods*, 23: 253–262.
- Alansari, H., Brock, K.V. and Potgieter, L.N.D., 1993. Single and double polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhoea virus in tissue culture and sera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 148–153.
- Becher, P., Shannon, A.D., Tautz, N. and Thiel, H.-J., 1994. Molecular characterization of Border Disease Virus, a pestivirus from sheep. *Virology*, 198: 542–551.
- Belák, S. and Ballagi-Pordány, A., 1991. Bovine viral diarrhoea virus infection: rapid diagnosis by the polymerase chain reaction. *Arch. Virol., Suppl.* 3: 181–190.
- Boye, M., Kamstrup, S. and Dalsgaard, K., 1991. Specific sequence amplification of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequence of BVDV nucleic acid. *Vet. Microbiol.*, 29: 1–13.
- Cay, B., Chappuis, G., Coulibaly, C., Dinter, Z., Edwards, S., Greiser-Wilke, I., Gunn, M., Have, P., Hess, G., Juntti, N., Liess, B., Mateo, A., McHugh, P., Moennig, V., Nettleton, P. and Wensvoort, G., 1989. Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: Report of an international workshop. *Vet. Microbiol.*, 20: 123–129.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162: 156–159.
- Collett, M.S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D.K. and Purchio, A.F., 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, 165: 191–199.
- Dahle, J. and Liess, B., 1992. A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 15: 203–211.
- Deng, R. and Brock, K.V., 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence of a Pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology*, 191: 867–879.

- Edwards, S. and Sands, J.J., 1990. Antigenic comparisons of hog cholera virus isolates from Europe, America and Asia using monoclonal antibodies. *Dtsch. tierarztl. Wschr.*, 97: 79–81.
- Han, J.H., Shyamala, V., Richman, K.H., Brauer, M.J., Irvine, B., Urdea, M.S., Tekamp-Olson, P., Kuo, G., Choo, Q.-L. and Houghton, M., 1991. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: Identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1711–1715.
- Harding, M., Lutze-Wallace, C., Prud'Homme, I., Zhong, X. and Rola, J., 1994. Reverse transcriptase-PCR assay for detection of Hog Cholera Virus. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 2600–2602.
- Hertig, C., Pauli, U., Zanoni, R. and Peterhans, E., 1991. Detection of bovine viral diarrhea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, 26: 65–76.
- Hoof van Iddekinge, B.J.L., Van Wamel, J.L.B., Van Gennip, H.G.P. and Moormann, R.J.M., 1992. Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.*, 30: 21–34.
- Horzinek, M.C., 1991. Pestiviruses – taxonomic perspectives. *Arch. Virol., Suppl.* 3: 1–5.
- Katz, J.B., Ridpath, J.F. and Bolin, S.R., 1993. Presumptive diagnostic differentiation of Hog Cholera Virus from Bovine Viral Diarrhea and Border Disease viruses by using a cDNA nested-amplification approach. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 565–568.
- Liu, S.-T., Li, S.N., Wang, D.-C., Chang, S.-F., Chiang, S.-C., Ho, W.-C., Chang, Y.-S. and Lai, S.-S., 1991. Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 35: 227–236.
- Lopez, O.J., Osorio, F.A. and Donis, R.O., 1991. Rapid detection of bovine diarrhea virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 578–582.
- Meyers, G., Rumenapf, T. and Thiel, H.-J., 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*, 171: 555–567.
- Moormann, R.J., Warmerdam, P.A., Van der Meer, B., Schaaper, W.M., Wensvoort, G. and Hulst, M.M., 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of Hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology*, 177: 184–198.
- Muyldermans, G., San Gabriel, M.C., Caij, A., De Smet, A. and Hamers, R., 1993. PCR-mediated cloning and in vitro translation of the genes coding for the structural proteins of Hog Cholera Virus. *Arch. Virol.*, 132: 429–435.
- Pearson, J.E., 1992. Hog Cholera diagnostic techniques. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 15: 213–219.
- Renard, A., Dina, D., Martial, J.A., 1987. Complete nucleotide sequence of bovine viral diarrhoea virus genome and its fragment, useful for making antigenic proteins useful in therapy and diagnosis. European Patent Application No. 0208672.
- Roehe, P.M. and Woodward, M.J., 1991. Polymerase chain reaction amplification of segments of pestivirus genomes. *Arch. Virol., Suppl.* 3: 231–238.
- Rychlik, W. and Rhoads, R.E., 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 17: 8543–8551.
- Schroeder, B.A. and Balassu-Chan, T.C., 1990. Specific sequence amplification of bovine viral diarrhea virus nucleic acid. *Arch. Virol.*, 111: 239–246.
- Wensvoort, G., Bloemraad, M. and Terpstra, C., 1988. An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, 17: 129–140.
- Wirz, B., Tratschin, J.-D., Muller, H.K. and Mitchell, D.B., 1993. Detection of Hog Cholera Virus and differentiation from other pestiviruses by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 1148–1154.

5. OBJETIVOS CONTIDOS NO ARTIGO 2

Este artigo, a ser submetido à revista *Veterinary Record*, possuiu três objetivos principais. Vários grupos de pesquisa têm divulgado testes de ELISA para a detecção de anticorpos contra o BVDV em soro bovino baseados em antígenos produzidos em cultivos de células infectadas com BVDV. Porém, os protocolos desenvolvidos descrevem métodos para o preparo do antígeno e formatos complexos. Com o objetivo de produzir um teste de ELISA com preparação do antígeno e formatos mais simples que os descritos anteriormente, foi desenvolvido o protocolo descrito neste artigo. A correlação do teste de ELISA desenvolvido com o teste de SN foi testada com um número de soros de bovinos igual ou superior aos descritos anteriormente.

Estudos epidemiológicos têm servido de base para cálculos de perdas econômicas e para o desenvolvimento de medidas de controle e erradicação da BVD em países da Europa e EUA. Existem poucos trabalhos com dados epidemiológicos do BVDV em países de clima tropical. Não foi encontrado nenhum trabalho sobre BVDV para a região sul do País na literatura indexada. Pode-se especular que a prevalência de bovinos soropositivos seja diferente da descrita em outras regiões por diferenças de clima, manejo e outros fatores. Para a obtenção de dados preliminares, utilizamos o ELISA descrito na análise de 420 soros de bovinos originários do Rio Grande do Sul e 10 soros originários da Argentina.

Outra informação importante em dados epidemiológicos sobre o BVDV é o conhecimento dos genótipos presentes na área estudada, porque eles determinam as conseqüências da doença, e podem ocasionar falhas em testes diagnósticos. Para isto, foi utilizado um teste de RT-PCR seguido do seqüenciamento da região genômica

amplificada, utilizando-se de iniciadores parcialmente homólogos aos descritos no Artigo 1. As seqüências obtidas dos BVDVs originários do Rio Grande do Sul e da linhagem utilizada na produção do antígeno do ELISA foram colocadas em uma árvore filogenética com outras seqüências representativas da literatura.

6. ARTIGO 2

6.1 Title

Detection of antibody to Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) and characterization of BVDV genomes from Brazil

6.2 Authors

Cláudio Wageck Canal^{2,4}

Marc Strasser¹

Christian Hertig¹

Aoi Masuda^{2,3}

Ernst Peterhans¹

6.3 Postal address of affiliations

Institute of Veterinary Virology¹ from the University of Bern. Langgass-Strasse 122, CH-3012, Bern, Switzerland.

Centro de Biotecnologia² and Departamento de Biotecnologia³ from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

Departamento de Bioquímica⁴ from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

6.4 Telephone and fax number of the corresponding author

Ernst Peterhans

Phone: [++41] 31-631-25-13

Fax: [++41] 31-631-25-34

6.5 Address to which the proofs should be sent

Ernst Peterhans

Institute of Veterinary Virology

University of Bern

Langgass-Strasse 122

CH - 3012 - Bern - Switzerland

E-mail: Peterhans@ivv.unibe.ch

6.6 Summary

An ELISA based on cell culture antigens of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) was designed to detect anti-BVDV antibodies in bovine serum. Compared to serum neutralization this ELISA had a sensitivity of 97.5% and a specificity of 99.2%. Serum samples obtained from 430 adult cattle on 19 farms of the State of Rio Grande do Sul (Brazil) and 1 farm from Corrientes (Argentina) were tested with this ELISA. The resulting prevalence of 56% \pm 15.1% corresponds to reports for other countries. Sequence analysis of the 5' untranslated region revealed BVDV type I and type II isolates to be present in this region of South America.

6.7 Key words

Pestivirus - Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) - ELISA - Reverse-Transcription (RT) - Polymerase Chain Reaction (PCR) - epidemiology - phylogenetic analyses.

6.8 Introduction

Bovine viral diarrhea virus (BVDV), classical swine fever virus (CSFV), and border disease virus (BDV) are the three single-stranded, positive-polarity RNA viruses comprising the genus *Pestivirus* of the *Flaviviridae* family (Horzinek, 1991). Pestiviruses cause economically important diseases in ruminants and pigs. BVDV and BDV are endemic world-wide, whereas CSFV has been eradicated in some countries (Dahle and Liess, 1992).

Exposure of cattle to BVDV may result in acute transient or persistent infection. Postnatal infection leads to transient viremia followed by antibody production. Antibody titers against BVDV usually decrease very slowly (Brownlie and others, 1987) and correlate with lifelong immunity. Therefore, the prevalence of antibody-positive animals reflects the proportion of animals previously exposed to BVDV (Houe, 1995). Animals infected in the early stages of pregnancy may transmit virus to the fetus. Such fetuses develop immunotolerance to the infecting BVDV strain and may be born normal despite being persistently infected. Such persistently infected animals are of epidemiological concern because they shed large quantities of virus and serve as a major reservoir of infection.

The main clinical manifestations of acute BVDV infection are mild diarrhea, fever and respiratory symptoms (Radostits and Littlejohns, 1988), but recently severe

thrombocytopenia with a fatal outcome has also been reported (Hibberd and others, 1993; Ridpath and others, 1994; Pellerin and others, 1994).

On the basis of epidemiological studies, economic losses due to BVDV infections have been estimated to be 15 to 20 million dollars per million calvings (Bennett and Done, 1986; Houe and others, 1993). Denmark, Finland, Norway and Sweden are currently conducting BVDV eradication programs (Houe, 1995).

In this work, we have used a newly-developed ELISA to determine the prevalence of infection in selected cattle herds in Brazil. Genotyping of two viral isolates suggests that BVDV of both genotypes I and II exist in Brazil.

6.9 Materials and methods

6.9.1 Cells and viruses

The BVDV cytopathic strain R1935/72 was propagated in embryonic bovine turbinate cells, cultured in Earle's minimal essential medium (Gibco BRL, Grand Island, NY) with 1 % non-essential amino acids, antibiotics (Penicillin, 100IU/ Streptomycin, 100µg/ml) (Seromed, Biochrom KG, Berlin, Germany), 1.25% L-Glutamine (Gibco BRL) and 2% fetal calf serum free of anti-BVDV antibodies and BVDV (Seromed). Uninfected cell cultures were used as negative controls.

The cytopathic BVDV strain Soldan was isolated from an animal with mucosal disease-like symptoms that had died in Eldorado do Sul (State of Rio Grande do Sul) in 1992. The non-cytopathic strain BR275 was isolated from the serum of an antibody negative animal originating from the Capão do Leão province. The non-cytopathic strain

was demonstrated by immunoperoxidase staining of infected bovine embryonic turbinate cells (Meyling, 1984).

6.9.2 Preparation of antigen for ELISA

Cells infected with BVDV strain R1935/72 showing an approximately 80% cytopathic effect were harvested after three cycles of rapid freezing and thawing followed by centrifugation at 48000 x g for 4 hours. Pellets containing virus and cell debris were resuspended in PBS, 2% Tween 20, pH 7.2 and incubated by gentle shaking on a minishaker at 37°C for two hours and then sonicated for 30 seconds (output 6.5, pulse mode 60%) (Branson sonifier, Branson, USA). The suspension was clarified by centrifugation at 1000 x g for 30 minutes and the supernatant was stored in aliquots at -80°C. Uninfected cell cultures processed as described above were used as negative control antigen.

6.9.3 ELISA protocol

Virus and negative control antigens were diluted to 4-8 mg/ml total protein in 0.1 M Na-carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 and used for coating of microtitration plates (100µl/well) (Maxisorp, A/S Nunc, Kamstrup, Denmark). After an incubation period of 14 hours at 4°C in a humid chamber, plates were washed three times with washing buffer (0.1M NaCl; 0.02M Tris; 0.05% Tween 20; pH 7.4). Serum diluted 1:10 in washing buffer containing 1% skim milk powder was added to the plates. After incubation for 90 min. at room temperature in a humid chamber the plates were washed as described above. Goat anti-bovine IgG (heavy chain specific) peroxidase labelled (Kirkegaard & Perry Labs. Inc., Gaithersburg, USA) was used for detecting bound antibodies. Plates were incubated in a humid chamber for 90 min. After washing three times in washing

buffer the chromogen solution 2,2'-azinodi(ethylbenzothiazolinesulfonic acid) (ABTS) (Boehringer, Mannheim, Germany) was added and plates were incubated for 20 min. at room temperature. Optical density was measured by means of an ELISA reader (Titertek multiscan MC) at a wavelength of 405 nm. Sera reaching more than 50% of a positive control serum were considered positive. The negative cutoff limit was set at less than 20% of a positive control serum.

6.9.4 Serum neutralisation assay (SN)

The test was carried out according to a standard microtiter procedure (Steck and others, 1980) using embryonic bovine turbinate cells, doubling dilutions of heat inactivated sera and 100 TCID₅₀ of virus R1935/72. The serum neutralizing titer is expressed as the reciprocal of the serum dilution to inhibit 50% of the viral cytopathic effect (cpe).

6.9.5 Cattle sera

Serum samples obtained from 940 cattle from Switzerland were used to establish the correlation of antibody levels between SN and ELISA.

The 430 bovine serum samples used in the prevalence study for Brazil were collected from adult animals in abattoirs in Rio Grande do Sul State with the exception of 10 sera which were collected in Corrientes (Argentina). The 12 samples from the Aratiba region were obtained from breeding animals.

6.9.6 Statistical analyses of ELISA results

The confidence interval for the Brazilian prevalence of anti-BVDV antibodies was corrected for clustering. It was determined according to the method of Donald and

Donner (1987). The software package Statistica (StatSoft, Oklahoma) was used for calculation.

6.9.7 RNA extraction and RT-PCR

TRIzol LS Reagent (Gibco BRL) was used to isolate RNA from 250 µl of cell culture supernatants or 50 µl of serum. The cDNA was synthesized according to standard protocols (Sambrook and others, 1989) using antisense primer P43 (5'-AGACGAATTCTCAACTCCATGTGCCATGTAC-3', nucleotide position 395 to 374 of the published NADL sequence (Collett and others, 1988; added *Eco R I* restriction site is underlined) and Superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL) in a 20 µl reaction. PCR was performed according to standard procedures using primer P43 and sense primer P41 (5'-TTCATCTAGAGAGGCTAGCCATGCCCTTAG-3', nucleotide position 98 to 117 of published NADL sequence (Collett and others, 1988; added *Xba I* restriction site is underlined).

6.9.8 Sequencing and phylogenetic analysis

The amplification products were purified from a 1,5 % agarose gel with the Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Both strands were sequenced using the ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Perkin-Elmer, Foster, CA) with primers P41 and P43. The extension products were purified on Centri-Sep columns (Princeton Separations, Adelphia, NJ) and loaded on a ABI PRISM 310 Genetic Analyser. The GCG software package (Genetics Computer Group, Madison, WI) was used for sequence analysis, which included a 247 bp fragment of R1935, BR275, Soldan and published sequences of genotype I and II BVD viruses (Renard and others, 1987; Collett and others, 1988; Deng and Brock, 1992; Pellerin and others, 1994). Distances

between sequences were calculated by using the Jukes-Cantor index. The phylogenetic tree was constructed using the unweighted pair-group arithmetic averaging method (UPGMA).

6.10 Results

6.10.1 Validation of the ELISA

Serum samples from 940 cattle were assayed for antibodies against BVDV by serum neutralization and ELISA (Table 1). Concordant results were observed for 923 of the sera (98.2%). Fifteen serum samples (1,6%) were negative in ELISA but positive in SN. We were able to isolate BVDV from the buffy coat of four of these samples. Two samples (0.2%) were ELISA-positive but SN-negative. These samples showed a positive reaction when tested by SN using BVDV strain R56/74, a virus isolated from a cow in Switzerland (Steck and others, 1980). The ELISA has a sensitivity of 97.5% and a specificity of 99,2% compared to serum neutralization.

6.10.2 Analysis of Brazilian cattle sera

430 cattle sera derived from 19 farms of the Rio Grande do Sul State and from 1 farm in the Corrientes State of Argentina were analyzed by means of the ELISA (Table 2). The average prevalence of antibodies to BVDV was 56.0%, confidence interval \pm 15.1%, adjusted for clustering (Donald and Donner, 1987), and varying from 0 % (47 sera from Santa Vitória do Palmar 2) to 100 % (12 sera from Aratiba).

6.10.3 Sequence analysis

The last two thirds of the 5' UTR of the genome of the BVDV strain R1935 and the Brazilian isolates BR275 and Soldan were sequenced directly from RT-PCR reactions. The results of sequencing and the dendrogram (Figure 1) showed these viruses to be of the two different types described for BVDV. The BR275 isolate and the R1935 strain cluster with type Ia strains. With the exception of 1 base, BR275 is identical to the SD-1 strain, whereas R1935 relates to the Oregon strain. However, the Soldan isolate clusters with type II viruses and is more distantly related to the strains in the group previously described.

6.11 Discussion

BVDV has a worldwide distribution (Houe, 1995) and previous reports showed infection with the virus in Brazil (Brown and others, 1989; Rweyemann and others, 1990). Since BVDV strains are genetically highly heterogeneous, particularly in the genes encoding the surface glycoproteins responsible for the induction of neutralizing antibodies (Weiland and others, 1990), we decided to use in our study an assay that detects antibodies to conserved antigens such as the nonstructural proteins of the virus. The broad reactivity of the ELISA antigen was validated using antigen prepared from BVDV strain R1935/72. This strain is closely related to the North American Oregon strain and routinely used for the demonstration of neutralizing antibodies to BVDV in Switzerland. Potentially, conserved antigens of this strain should permit the detection of antibodies to even more diverse strains of BVDV than is possible in the neutralization test. Testing by ELISA yielded concordant results with SNT in 98.2% of all sera, which clearly demonstrates that this ELISA is a suitable tool for serological

investigations. Of particular interest are animals positive in SNT but negative in ELISA. Diverse reasons may account for this difference, the most obvious being a slightly reduced sensitivity of ELISA compared to SNT. However, alternative explanations, related to the unique biology of the interaction between BVDV and its host are possible. Since the surface glycoproteins of BVDV strains, in particular, are antigenically diverse, superinfection of persistently infected animals with BVDV strains that differ from the persisting tolerated strain is more likely to lead to the formation of neutralizing antibodies than those directed against conserved nonstructural antigens. Hence, such superinfected animals may be positive in SNT but negative in ELISA. The isolation of BVDV from 4 of the 15 animals in this group supports this interpretation.

The results of the serological survey showed antibodies in 56% of the serum sample investigated. Although the confidence interval of our study is relatively wide ($\pm 15\%$), it seems that the prevalence of BVDV infection in the region analyzed is similar to that in other regions of the world (Harkness and others, 1978, Meyling, 1984, Houe and Meyling, 1991, Bolin and others, 1985). Interestingly, the antibody prevalence varied considerably between different herds, the extremes being 0% (i.e. no evidence of previous contact with BVDV) and 100%. In our experience, this situation clearly differs from that in Switzerland where the overall antibody prevalence is similar but differences between individual farms are smaller (unpublished observation). Differences in management practices may explain the more heterogeneous antibody prevalence in Brazilian as opposed to Swiss farms. For example, in Switzerland young animals originating from different farms commonly spend the summer together grazing in the Alps. This increases the risk of contracting the infection from persistently infected

animals and results in a more homogeneous prevalence of antibody-positive animals on individual farms.

The analysis of part of the 5' untranslated region of the two Brazilian isolates available for this study revealed that the Soldan strain clusters with the group of BVDV genotype II viruses. Interestingly, the Soldan strain considerably broadened the heterogeneity of the BVDV genotype II viruses, with a drop in the extent of similarity from approximately 95% to 88%. It will be interesting to analyze additional isolates from the geographical area of origin of this isolate to obtain evidence that genotype II viruses are indeed genetically more heterogeneous than indicated by the nucleotide sequences of the previous isolates. The second strain analyzed, BR 275, is very closely related to SD-1, a noncytopathic North American strain for which the full-length sequence was published in 1992 (Deng and Brock, 1992).

Future work will be aimed at obtaining more precise information on the epidemiology of BVDV in Southern Brazil and on extending descriptive epidemiology by genetic analysis of viruses circulating within the cattle population of this region.

6.12 Acknowledgements

Jurg Rüfenacht and Patrick Schaller for the statistical and epidemiological analysis, H. Stalder and K.L. Haag for the phylogenetic tree, Dr. P.M. Roehle for the Soldan isolate, Dr. A. Zaha and I. Vaz Junior for the Brazilian cattle sera. C.W. Canal had a scholarship from CNPq-RHAE.

6.13 References

- BENNETT, R.M., DONE, J.T. (1986) Control of BVDV: A case for social cost-benefit analysis? In Proceedings of the annual meeting of the Society of Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine, Scotland, Edinburgh, pp. 54
- BOLIN, S.R., MCCLURKIN, A.W., CORIA, M.F. (1985) Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *Am. J. Vet. Res.* 46, 2385
- BROWN, C.C., OLANDER, H.J., CASTRO, A.E., BEHYMER, D.E. (1989) Prevalence of antibodies in goats in north-eastern Brazil to selected viral and bacterial agents. *Trop Anim Health Prod* 21(3), 167-9 1989
- BROWNLIE, J., CLARKE, M.C., HOWARD, C.J. (1987) Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rech. Vét.* 18, 157
- COLLETT, M.S., LARSON, R., GOLD, C., STRICK, D., ANDERSON, D.K., PURCHIO, A.F. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165, 191
- DAHLE, J., LIESS, B. (1992) A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 203
- DENG, R., BROCK, K.V. (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence of a Pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology* 191, 867

DONALD, A., DONNER, A. (1987) Adjustments to the Mantel-Haenszel chi-square statistic and odds ratio variance estimator when the data are clustered. *Statistics in Medicine* 6, 491

EDWARDS, S., SANDS, J.J. (1990) Antigenic comparisons of hog cholera virus isolates from Europe, America and Asia using monoclonal antibodies. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 97(2), 79

HARKNESS, J.W., SANDS, J.J., RICHARDS, M.S. (1978) Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. *Res. Vet. Sci.* 24, 98

HIBBERD, R.C., TURKINGTON, A., BROWNLIE, J. (1993) Fatal bovine viral diarrhoea virus infection of adult cattle. *Vet. Rec.* 132, 227

HORZINEK, M.C. (1991) Pestiviruses - taxonomic perspectives. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 1

HOUE, H. (1995) Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am Food Anim. Pract.*, 11 (3): 521

HOUE, H., MEYLING, A. (1991) Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev. Vet. Med.* 11, 9

HOUE, H., PEDERSEN, K.M., MEYLING, A. (1993) A computerised spread sheet model for calculating total annual losses due to bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds and sensitivity analysis of selected parameters. In Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses, Annecy, France, pp. 179

MEYLING, A. (1984) Detection of BVD virus in viremic cattle by an indirect immunoperoxidase technique. In McNulty, M.S., MacFerran, J.B. (eds.): Recent advances in virus diagnosis. Boston, Martinus Nijhoff Publishers, pp. 37

PELLERIN, C., VAN DEN HURK, J., LECOMTE, J., TIJSSEN, P. (1994) Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260

RADOSTITS, O.M., LITTLEJOHNS, I.R. (1988) New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. *Can. Vet. J.* 29, 513

RENARD, A., DINA, D., MARTIAL, J.A. (1987) Complete nucleotide sequence of bovine viral diarrhoea virus genome and its fragment, useful for making antigenic proteins useful in therapy and diagnosis. European Patent Application No. 0208672.

RIDPATH, J.F., BOLIN, S.R., DUBOVI, E.J. (1994) Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205, 66

RWEYEMAMU, M.M., FERNANDEZ, A.A., ESPINOSA, AM., SCHUDEL, AA., LAGER, I.A., MUELLER, S.B. (1990) Incidence, epidemiology and control of bovine virus diarrhoea virus in South America. *Rev Sci Tech* 9(1), 207-21

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.

STECK, F., LAZARY, S., FEY, H., WANDELER, A., HUGGLER, C., OPPLIGER, G., BAUMBERGER, H., KADERLI, R., MARTIG, J. (1980) Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine virus diarrhoea-mucosal disease. Zbl. Vet. Med. B 27, 429

WEILAND, E., STARK, R., HAAS, B., RÜMENAPF, T., MEYERS, G., THIEL, H.-J. (1990) Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. Journal of Virology 64, 3563

6.14 Figure captions

Table 1: Comparison of antibody response in the ELISA and serum neutralisation (SN) assay using bovine field sera (n=940). In 98.2% a concordance between the two tests is demonstrated. In 1.6% a negative reaction in ELISA and positive reaction in SN is shown whereas in 0.2% the reaction is positive in ELISA and negative in SN. The sensitivity is 97.5% and the specificity is 99,2% when compared to serum neutralization.

Table 2: Number of positive and negative sera for each farm. The farms are identified by the region where sera came from and the numbers following the names are used to differentiate different farms from the same region.

Figure 1: Dendogram analysis of the partial 5' untranslated region sequences of BVDV strains. The horizontal branch lengths in the clusters are proportional to the similarity between the sequences.

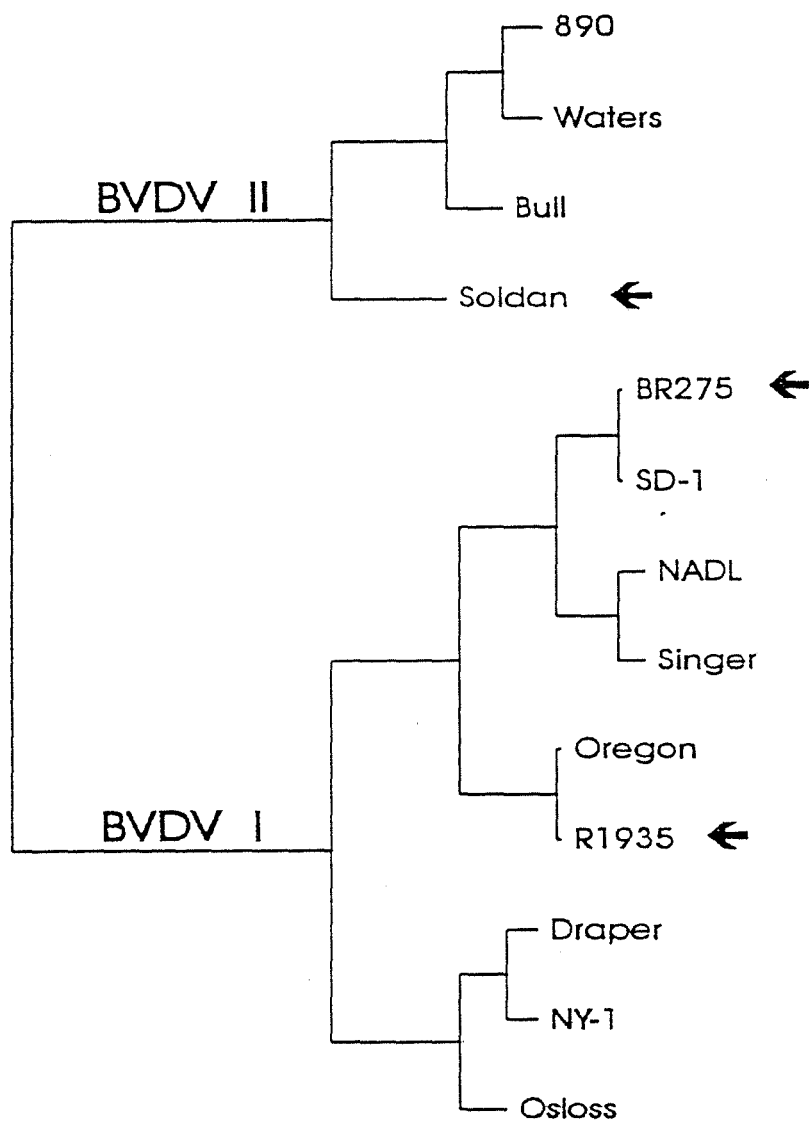
Table 1

TEST	ELISA		
SN	Positive	Negative	Total
Positive	600	15	615
Negative	2	323	325
Total	602	338	940

Table 2

REGION	Negative	Positive
Aratiba	0	12
Barra do Ribeiro	10	11
Candelária	6	15
Capão do Leão	1	24
Carazinho	2	4
Corrientes (Argentina)	0	10
Eldorado do Sul	9	28
Livramento	36	11
Mostardas	4	19
Pedro Osório	1	21
Piratini 1	0	2
Piratini 2	6	19
Rio Grande 1	18	17
Rio Grande 2	2	12
Rio Grande 3	1	19
Santa Vitória do Palmar 1	14	13
Santa Vitória do Palmar 2	47	0
São Lourenço do Sul 1	3	2
São Lourenço do Sul 2	1	14
São Sepé	16	0
TOTAL	177	253

Figure 1



7. OBJETIVOS E INTRODUÇÃO DO ANEXO I

Este trabalho teve como objetivo a caracterização dos genes e a produção e purificação das proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem R1935/72 do BVDV no sistema de baculovírus. As proteínas purificadas foram avaliadas comparativamente em testes de ELISA para detectar anticorpos anti-BVDV no soro de bovinos. Foi selecionada a linhagem R1935/72 do BVDV devido ao fato de ser esta a linhagem de referência do Instituto de Virologia Veterinária da Universidade de Berna (Suíça), onde foi realizado este trabalho. Os testes de ELISA desenvolvidos com as proteínas recombinantes foram comparados com o teste de ELISA que utiliza extratos de células infectadas como antígeno (Artigo 2) e em testes de SN que utilizaram esta linhagem do BVDV. Assim, eliminaram-se variáveis que seriam introduzidas com a utilização de outras linhagens devido à heterogeneidade da seqüência de aminoácidos destas proteínas. Estas três proteínas foram selecionadas pois parecem ser as mais imunogênicas dos pestivírus uma vez que os anticorpos monoclonais gerados até hoje são contra a E^{ms}, E2 e NS3 (CORAPI *et al.*, 1990; GREISER-WILKE *et al.*, 1990; WEILAND *et al.*, 1990; GREISER-WILKE *et al.*, 1991; PATON *et al.*, 1991; WEILAND *et al.*, 1992), a E^{ms} e a E2 conferem imunidade contra o CSFV quando utilizadas como vacina (HULST *et al.*, 1993; KÖNIG *et al.*, 1995) e os anticorpos anti-NS3 são imunodominantes no soro de gado convalescente de BVD ou vacinado (DONIS; DUBOVI, 1987; BOLIN, 1988).

Apesar da E^{ms} e da E2 do CSFV terem sido expressas no sistema de baculovírus e a E2 ter sido utilizada com sucesso em testes de ELISA (WEENSVOORT *et al.*, 1988;

MOENNIG *et al.*, 1990; MOSER *et al.*, 1996), o mesmo não foi realizado com estas proteínas do BVDV até o presente momento.

Em relação à NS3 do BVDV, vários grupos a expressaram em sistemas heterólogos e a utilizaram em testes para a detecção de anticorpos anti-BVDV (KWANG *et al.*, 1991; PETRIC *et al.*, 1992; VANDERHEIJDEN *et al.*, 1993), o que não foi feito com a NS3 do CSFV. Não existem trabalhos comparando as proteínas E^{ms}, E2 e NS3 de um mesma espécie de pestivírus quanto a sua capacidade de detectar anticorpos em testes diagnósticos.

O objetivo deste trabalho foi o seqüenciamento dos genes que codificam para as proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem R1935/72 do BVDV, sua expressão em um sistema eucarionte e o estabelecimento e comparação de ELISAs para a detecção de anticorpos anti-BVDV em soros de bovinos.

8. ANEXO 1

8.1 Materiais e métodos

8.1.1 Determinação da seqüência de nucleotídeos de partes do genoma da linhagem R1935/72 do BVDV

8.1.1.1 Linhagens virais e cultivos celulares

Utilizou-se a linhagem citopática do BVDV R1935/72, derivada da linhagem A1138/62, cedida pelos Drs. B. Liess e V. Moennig do Instituto de Virologia da Faculdade de Veterinária da Universidade de Hanôver, Alemanha. O vírus foi multiplicado em cultivos primários de células embrionárias de corneto bovino. Como meio utilizou-se Earle's Minimal Essential Medium (Gibco BRL) com 1% de aminoácidos não essenciais, antibióticos (100 U.I./ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina), 1,25% L-glutamina e 2% soro fetal bovino livre de anticorpos anti-BVDV (Seromed). Os sobrenadantes dos cultivos celulares infectados foram titulados e os antígenos virais detectados por coloração com imunoperoxidase (MEYLING, 1984). Cultivos celulares não infectados foram utilizados como contrôles.

8.1.1.2 Extração do RNA

Os ácidos ribonucléicos (RNA) foram purificados utilizando-se o protocolo padrão do Trizol LS (Gibco BRL), modificado a partir do método descrito por CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987. A extração foi realizada a partir de 250 µl de sobrenadante de cultivo celular e o sedimento de RNA obtido foi ressuspenso em 25 µl.

de H₂O, incubado 30 minutos no gelo e 10 minutos a 70 °C, resfriado no gelo e adicionado à reação de transcrição reversa.

8.1.1.3 Amplificação de seqüências genômicas

Aos 25 µl de RNA foram adicionados 25 µl da reação de transcrição reversa (RT) de Superscript II (Gibco BRL) 2 vezes concentrada com 200 U da enzima e 0,2 pmol do iniciador reverso ou 10 ng de hexâmeros sintetizados ao acaso. As reações foram incubadas a 45 °C por 2 horas e alíquotas de 2 µl da reação foram utilizados para a PCR (INNIS *et al.*, 1990). À PCR foram adicionados 20 pmol dos iniciadores direto e reverso, 0,8 U *Taq DNA Polimerase* bem como seu respectivo tampão (CENBIOT Enzimas, UFRGS) e desoxi-nucleotídeos (Pharmacia). Numa primeira etapa, foram utilizadas 56 combinações de iniciadores desenhados para a amplificação de genes de outras linhagens do BVDV, que poderiam anelar à seqüências adjacentes aos genes de interesse. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose corado com brometo de etídeo e comparados com marcadores de peso molecular (Gibco BRL).

8.1.1.4 Seqüenciamento dos produtos de PCR

As reações de PCR com o amplicon do tamanho esperado foram utilizadas para seqüenciamento após purificação em gel de agarose preparativo corado com brometo de etídeo. As bandas foram cortadas do gel e purificadas pelo protocolo do Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e quantificadas através da comparação com marcadores de massa molecular (Gibco BRL) em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Pelo menos duas reações independentes de RT-PCR foram utilizadas para determinar a seqüência consenso das regiões genômicas que codificam para as proteínas E^{ms}, E2 e

NS3. Ambas as fitas foram seqüenciadas utilizando-se os reagentes e o protocolo do ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Perkin-Elmer, Foster, CA) com os mesmos iniciadores utilizados para a PCR ou iniciadores complementares a regiões internas do amplicon. Os produtos de extensão foram purificados através de colunas de gel filtração Centri-Sep (Princeton Separations, Adelphia, NJ) e a leitura das seqüências de nucleotídeos foi feita por um ABI PRISM 310 Genetic Analyser e AutoAssembler DNA Sequence Assembly Software (Perkin-Elmer). As seqüências obtidas foram utilizadas para desenhar iniciadores específicos para o seqüenciamento total dos genes.

8.1.2 Expressão de proteínas da linhagem R1935/72 do BVDV em baculovírus

8.1.2.1 Clonagem no vetor de transferência de baculovírus

8.1.2.1.1 Iniciadores

Iniciadores foram desenhados para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem do BVDV R1935/72 e sua posterior clonagem e expressão no sistema de baculovírus. Suas seqüências foram baseadas na seqüência consenso obtida de acordo com o item 8.1.1.4. Nos iniciadores diretos, foram introduzidos códons de iniciação, no contexto de uma seqüência consenso de O'Reilly (O'REILLY *et al.*, 1992), aperfeiçoamento da seqüência de Kozak (KOZAK, 1987) para genes abundantemente transcritos de baculovírus. Nos iniciadores reversos foram introduzidos códons para seis histidinas, seguidos de um códon de parada de tradução. Os iniciadores foram sintetizados pela empresa Microsynth (Balgach, Suíça). Os iniciadores estão discriminados na Tabela 1.

Proteína	Dir./Rev	Sítio	Seqüência
E ^{ms}	Dir.	1136	5'-ATTATGGCATTATTGGCATGGGCA-3'
E ^{ms}	Rev.	1897	5'- TTAATGGTGATGATGATGATGATGCGCATATGCTCCAAA
E2	Dir.	2363	5'-ACCATGACCACAGCATTCTTAGT-3'
E2	Rev.	3583	5'-TTAATGATGATGATGATGATGGTTCGGTGACCT-3'
NS3	Dir.	5297	5'-AGTATGGGCCTGGAGACTGGCTG-3'
NS3	Rev.	7351	5'- TTAATGATGATGATGGTGGTGGGTGGTGTCTTCTA

Tabela 1: Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem R1935/72 do BVDV. Estão discriminados sua orientação (Dir.=direto ou “forward”, Rev.=reverso ou “reverse”), o sítio de anelamento no genoma em relação à linhagem SD-1 (DENG; BROCK, 1992), e a seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem R1935/72 e sua posterior clonagem e expressão no sistema de baculovírus.

8.1.2.1.2 Preparação dos amplicons para a clonagem

Os iniciadores diretos foram fosforilados previamente à PCR para permitir sua posterior clonagem de forma orientada no vetor de transferência de baculovírus. Os procedimentos adotados e os reagentes utilizados foram os do Baculovirus TA Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA) (MEAD *et al.*, 1991). Os iniciadores reversos foram utilizados na transcrição reversa, como descrito no item 8.1.1.3. Na PCR foram utilizados os iniciadores reversos juntamente com os iniciadores diretos fosforilados. Os produtos de PCR relativos às seqüências de DNA que codificam para as proteínas E^{ms},

E2 e NS3 foram quantificados em gel de agarose corado com brometo de etídeo e comparados com padrão de massa molecular.

8.1.2.1.3 Clonagem propriamente dita

Foram ligados o dobro do número de moléculas do amplicon a 60 ng do vetor pCRTMBac em um volume final de 10 µl por 16 horas à 14 °C. A transformação foi feita por choque térmico de células de *E. coli* One ShotTMTOP10F', às quais adicionou-se 2 µl da reação de ligação. De um volume final de 0,5 ml da transformação, foram semeados 20 e 200µl em placas contendo LB sólido com 100 µg/ml de ampicilina, as quais foram incubadas a 37°C por 16 horas.

8.1.2.1.4 Seleção dos clones recombinantes de pCRTMBac

Seis colônias isoladas de *E. coli* resistentes à ampicilina de cada transformação, foram semeadas em LB líquido com 50 µg/ml de ampicilina e crescidas a 37 °C por 16 horas. As células foram sedimentadas por centrifugação à 10.000 x g por 10 minutos e o meio de cultivo removido. O DNA dos plasmídeos foi purificado com os reagentes e procedimentos descritos no manual técnico do WizardTM Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega). A presença e o tamanho dos insertos clonados foram determinados por clivagem com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Eco* RI (Gibco BRL), seguida de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo e comparação com padrões de peso molecular.

8.1.2.1.5 Seqüenciamento dos clones recombinantes de pCRTMBac

Dois clones recombinantes de pCRTMBac de cada gene a ser expresso tiveram ambas as fitas de DNA seqüenciadas como descrito no item 8.1.1.4. Para isto, foram

utilizados os mesmos iniciadores usados na determinação da seqüência consenso dos genes que codificam para as proteínas E^{ms}, E2 e NS3. Também foram utilizados os iniciadores Polyhedrin Forward Sequencing e Baculovirus (+15) Reverse Sequencing do Baculovirus TA Cloning Kit (Invitrogen), os quais são complementares à região que circunda o sítio de inserção do gene no vetor de transferência.

8.1.2.2 Cultivo das células de *Spodoptera frugiperda*

A linhagem celular Sf9, clone do isolado IPLBSF21 (Sf21) derivado de tecidos do ovário de pupas da mariposa *Spodoptera frugiperda* (O'REILLY *et al.*, 1992), foi utilizada para a transfeção, purificação em placa, geração dos estoques de alto título viral e expressão das proteínas recombinantes. As células foram cultivadas em meio Grace's Insect, ao qual foram adicionados extrato de fungo e hidrolisado de lactoalbumina concentrados, 10 µg/ml de gentamicina e 10% soro fetal bovino livre de anticorpos contra pestivirus e BVDV (Gibco BRL). O meio de cultivo completo, descrito acima, chamou-se de TNM-FH. As células foram incubadas a 27 °C e repicadas a cada 4 dias, quando estavam confluentes, sendo que o deslocamento das células das garrafas de cultivo feito pela aspersão de TNM-FH com auxílio de pipeta de Pasteur. Todos os demais procedimentos utilizados foram os descritos no manual técnico Insect Cell Lines (Invitrogen) para células aderentes.

8.1.2.3 Co-transfecção das células de *S. frugiperda*

A co-transfecção das células de *S. frugiperda* com o vetor de transferência recombinante e o DNA do vírus da poliedrose múltipla nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) foi realizada com os reagentes e procedimentos descritos no

manual de instruções do MaxBac® 2.0 Transfection and Expression Kit. Brevemente, 4 µg do plasmídeo de transferência recombinante ou controles foram adicionados a 10 µg de Bac-N-Blue™ DNA, 1 ml de meio Grace's Insect e 20 µl de lipossomos Insectin™, agitados vigorosamente por 10 segundos e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. Após, a mistura de transfeção foi adicionada gota a gota à placas de 60 mm semeadas com 2×10^6 células Sf9 e as placas incubadas à temperatura ambiente com agitação. Quatro horas depois, adicionou-se 1 ml de TNM-FH e as placas foram incubadas a 27°C. O sobrenadante das placas foi colhido e utilizado para a purificação dos clones recombinantes de baculovírus 72 horas após a transfeção.

8.1.2.4 Purificação dos clones recombinantes de baculovírus

A seleção e purificação dos clones recombinantes de baculovírus foi feita por Ensaio de Placa, realizado com os reagentes e procedimentos descritos no manual de instruções do MaxBac® 2.0 Transfection and Expression Kit. Resumidamente, os sobrenadantes colhidos foram diluídos em série por um fator de 10 vezes. Um mililitro das diluições de 10^{-1} a 10^{-5} foram adicionados à 5×10^6 células semeadas previamente em placas de cultivo de 100 mm e incubadas com agitação à temperatura ambiente. Após 1 hora, o meio de cultivo foi removido e adicionou-se uma solução de 0,6% de agarose em TNM-FH com 150 µg/ml do substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidase (X-Gal). As placas foram incubadas a 27 °C por uma semana. Os baculovírus recombinantes eram detectados pela coloração azul no local em que o tapete celular foi infectado.

8.1.2.5 Seleção dos clones recombinantes de baculovírus

Com auxílio de pipeta de Pasteur, os baculovírus recombinantes foram inoculados em placas de cultivo com 6 poços onde haviam sido semeadas previamente 10^6 células/poço. Quando 90% das células estavam lisadas, o meio de cultivo celular era colhido e clarificado a $2.000 \times g$ por 5 minutos à temperatura ambiente. Este sobrenadante era chamado de P1 e foi estocado a 4°C no escuro para utilização após sua análise por PCR. Para a PCR, 0,75 ml do sobrenadante foi adicionado a 0,75 ml de solução de 20% de polietileno glicol (PEG) 8.000 em 1 M NaCl, incubado 30 minutos no gelo e centrifugado a $12.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C para precipitação dos vírions. O meio foi removido e o DNA viral purificado através do protocolo do DNAzol (Gibco BRL). O sedimento de DNA obtido foi dissolvido em 20 μl de H_2O e utilizado na PCR para determinar o tamanho do fragmento de DNA inserido por recombinação homóloga e a presença de contaminação por baculovírus de tipo selvagem. Para isto, 5 μl de DNA foram adicionados à reação de PCR (item 8.1.1.3). De 6 à 12 clones recombinantes foram analisados para cada transfeção, bem como controles positivos (baculovírus de tipo selvagem e recombinantes) e negativos (cultivos celulares não infectados). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose corado com brometo de etídeo e comparados com padrão de peso molecular.

8.1.2.6 Produção dos estoques virais de alto título

Os estoques P1 que apresentaram o tamanho do amplicon esperado e ausência de amplicon do tamanho do baculovírus de tipo selvagem, foram utilizados para a produção dos estoques P2. Para isto, 20 μl do estoque P1 foram adicionados a cada uma de duas garrafas de cultivo celular com 25 cm^2 . As garrafas foram incubadas por 8-10 dias a

27 °C, até apresentarem mais de 90% das células lisadas. As células foram raspadas e o meio de cultivo clarificado a 2.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante do cultivo celular infectado desta maneira foi chamado de P2, o qual foi estocado a 4 °C no escuro (JARVIS; GARCIA, 1994). Duzentos µl do P2 foram utilizados para infectar cada uma de 10 garrafas de 150 cm² com células Sf9 com 75-90% de confluência em 20 ml de TNM-FH. O material destas garrafas foi colhido e estocado como descrito para o P2, passando a chamar-se de P3 ou estoque viral de alto título. Antes de sua utilização, os estoques P2 e P3 foram caracterizados por PCR, como descrito no item 8.1.2.5. O título de vírus do P3 foi determinado por Ensaio de Placa feito com diluições de 10⁻⁵ a 10⁻⁸, como descrito no item 8.1.2.4, com a exceção de que as placas de lise foram visualizadas através de cobertura com solução de Vermelho Neutro com agarose uma semana após o plaqueamento.

8.1.2.7 Detecção das proteínas recombinantes

A detecção das proteínas recombinantes foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) e Western blot (TOWBIN *et al.*, 1979), utilizando-se anticorpos monoclonais gerados contra as proteínas E^{ms}, E2 e NS3 do BVDV (Tabela 2). Foram utilizados SDS-PAGE com 10% de acrilamida para a eletroforese do material que continha a E^{ms} e a E2, e com 8% de acrilamida para a NS3. Quatro microlitros de amostra foram adicionados a um igual volume de tampão de amostra desnaturante com redução e incubados por 5 minutos em água fervente antes de serem aplicados 8 µl por canaleta do gel.

Mab	Proteína	Linhagem viral	Referência
C42	E ^{ms}	NADL	KOERKE, 1989
210	E ^{ms}	Oregon C24V	EDWARDS et al., 1988
CT3	E2	A1138/69	PETERS et al., 1986
49AD72H2	E2	NADL	IVV
49EG71B6	NS3	NADL	IVV
49DE92D4	NS3	NADL	IVV

Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados na detecção das proteínas recombinantes da linhagem do BVDV R1935/72. Estão discriminadas a denominação do anticorpo monoclonal (Mab), a proteína reconhecida por ele, a linhagem do BVDV utilizada na preparação do antígeno utilizado para a geração do anticorpo monoclonal, bem como a referência bibliográfica ou o laboratório de origem dos anticorpos monoclonais testados na detecção das proteínas recombinantes. IVV= Instituto de Virologia Veterinária da Universidade de Berna, Suíça.

8.1.2.8 Otimização da expressão

A otimização da expressão, quanto à multiplicidade de infecção (“multiplicity of infection” =MOI), bem como ao tempo do curso de expressão, foi feito de acordo com o manual de instruções do MaxBac® 2.0 Transfection and Expression Kit. Brevemente, placas de cultivo de 6 poços com células Sf9 confluentes foram infectadas com MOIs de 5 e 10 com cada um dos estoques de alto título viral. Foram utilizados como controles, células não infectadas ou infectadas com baculovírus de tipo selvagem. Nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, as células de cada tratamento foram raspadas, centrifugadas a 800 x g por 10 minutos a 4 °C e o sedimento (P1) e o sobrenadante do cultivo celular

(S1) estocados a - 70 °C para posterior análise. Para a análise, as células foram resuspensas em 100 µl de salina tamponada com fosfatos pH 7,4 com 0,1% Triton X-100 e Complete Protease Inhibitor Cocktail™ (Boehringer Mannheim). Os tratamentos foram mantidos em gelo por 30-45 minutos, com agitação vigorosa a cada 10 minutos e a determinação da lise celular foi feita com solução de Azul de Tripán. A seguir, o material solubilizado (S2) foi removido por centrifugação à 1.000 x g por 10 minutos a 4 °C, e o sedimento (P2) solubilizado em 100 µl de tampão de amostra de SDS-PAGE. Todos os tratamentos e suas frações foram analisados por SDS-PAGE e Western blot para a determinação do tempo e da MOI que produziram a maior quantidade da proteína recombinante.

8.1.2.9 Purificação das proteínas recombinantes

Uma garrafa de cultivo de 150 cm² infectada pela MOI e tempo de expressão ótimos para cada um dos estoques de alto título viral ou seus controles (infectada com vírus tipo selvagem ou não infectada), foi utilizada como material de partida. A cada um dos sedimentos protéicos P1 (NS3) e P2 (E^{ms} e E2), bem como seus respectivos controles, foram adicionados 2 ml de tampão de ligação (20 mM fosfatos pH 7,4, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, 8 M uréia). A seguir foram sonicados 4 vezes por 30 segundos com 2 minutos de intervalo com um sonicador Branson (Branson, Danbury, USA) com micro ponteira, controle de saída 5 e modo de pulso de 50% no gelo. O sonicação foi clarificado a 2.000 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante filtrado com filtro de 0,45 µm antes da cromatografia de afinidade. Para isto, foram utilizadas colunas de 1 ml HisTrap™ (Pharmacia Biotech) preparadas e utilizadas de acordo com as instruções do fornecedor. Brevemente, a amostra foi aplicada, a coluna lavada com 10 ml de tampão

de ligação e as proteínas eluídas em tampão de ligação com 500 mM de imidazol. Foram coletadas frações de 1 ml do material que passou pela coluna, as quais foram analisadas por SDS-PAGE e Western blot. A fração que continha as proteínas recombinantes purificadas foi dialisada contra 20 mM fosfatos pH 7,4, 0,5 M NaCl e centrifugada a 2.000 x g por 10 minutos a 4 °C para retirar o material insolúvel. Os sobrenadantes foram utilizados nos ensaios de ELISA.

8.1.3 Ensaios de ELISA

Foram realizados ensaios preliminares de ELISA, para determinar a melhor marca de placas de ELISA, tipo e concentração do conjugado e melhor agente para o bloqueio das placas. Foram comparadas as placas de ELISA das marcas Corning, Dynatech, Greiner, Imuno e MaxiSorp (Nunc). Os agentes de bloqueio comparados foram 2% de leite em pó desnatado, 2% de soro de cabra livre de anticorpos anti-BVDV e 2% de soro equino, bem como combinações deles. Os conjugados testados foram diluições de IgG de cabra anti-IgG bovina (cadeia leve e pesada) conjugado à peroxidase e IgG de cabra anti-IgG bovina (γ específica) conjugada à peroxidase (Kirkegaard Perry Labs. Inc.).

Numa segunda etapa foram testadas diluições das 3 proteínas recombinantes purificadas ou não contra soros padrão-negativos, fracamente positivos e fortemente positivos, em diluições de 1:10, 1:40 e 1:100.

Na terceira etapa, as proteínas recombinantes purificadas foram testadas em paralelo com antígenos produzidos em cultivo celular infectado com BVDV (Artigo 2) com 24 soros bovinos de acordo com o protocolo abaixo.

a) Cem microlitros de diluições dos extratos protéicos ou proteínas recombinantes purificadas em tampão de sensibilização (0,1 M Na-carbonato-bicarbonato pH 9,6)

foram adicionadas à placas de ELISA (Maxisorp, Nunc, Kkamstrub, Dinamarca) que foram incubadas em câmara úmida a 4 °C por 16 horas.

b) As placas foram lavadas 3 vezes com 100 µl de tampão de lavagem (0,1 M NaCl, 0,02 M Tris pH 7,4, 0,05% Tween 20), com intervalos de 3 minutos entre cada lavagem.

c) O bloqueio foi realizado com tampão de bloqueio (tampão de lavagem com 2% de soro de cabra livre de anticorpos para BVDV e 2% de leite em pó desnatado) por 30 minutos à temperatura ambiente.

d) As amostras de soro a serem testadas foram diluídas 1:9 em tampão de bloqueio por 90 minutos à temperatura ambiente.

e) As placas foram lavadas como em b).

f) Adicionou-se o conjugado: IgG de cabra anti-IgG bovina (γ específica) conjugada a peroxidase (Kirkegaard Perry Labs. Inc.) diluído 1:2000 em tampão de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente.

g) As placas foram lavadas como em b).

h) Adicionou-se a solução cromógena de ácido 2,2'-azinodi (etilbenzotiazolinesulfônico) (ABTS) (Boehringer, Mannheim, Alemanha), e as placas foram incubadas de 20 à 30 minutos à temperatura ambiente. As densidades óticas foram determinadas em leitora de ELISA (Titertek multiscan MC) com um comprimento de onda de 405 nm.

Foram considerados positivos para a presença de anticorpos anti-BVDV os soros que apresentaram densidade ótica 2 vezes maior nos poços que continham as proteínas

recombinantes, quando comparados com a densidade ótica dos poços que continham as proteínas controle.

8.2 Resultados

8.2.1 Determinação da seqüência de nucleotídeos de genes da linhagem R1935/72 do BVDV

A seqüência de nucleotídeos das proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem R1935/72 do BVDV foi determinada com o fim de projetar iniciadores específicos para a amplificação, clonagem e expressão destas proteínas em baculovírus. A seqüência de nucleotídeos foi determinada após a amplificação por RT-PCR de partes do genoma (Figura 3), utilizando-se diversas combinações de iniciadores. Não foram encontradas diferenças de nucleotídeos entre os seqüenciamentos realizados a partir de 2 reações de RT-PCR independentes. As seqüências obtidas para os genes que codificam para as proteínas E^{ms}, E2 e NS3 foram depositadas no Genbank sob os números de acesso U96332, U96333 e U96334, respectivamente.

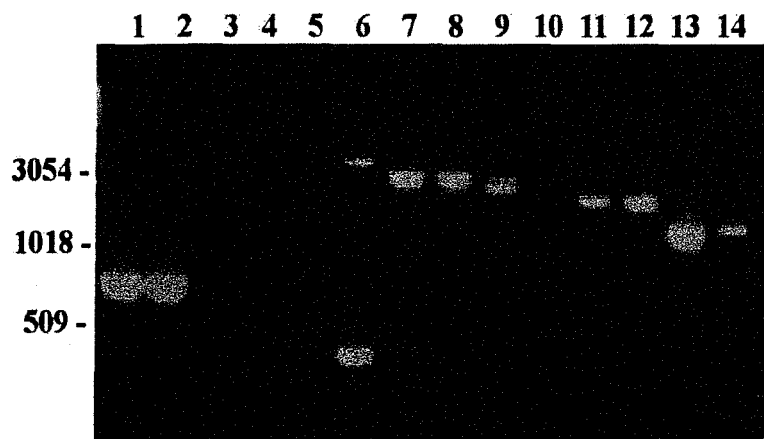


Figura 3: Gel de agarose corado com brometo de etídio com algumas reações de RT-PCR seqüenciadas. O tamanho dos amplicons e a proteína codificada pela região genômica amplificada foram: 1 e 2) 818 pb da NS3, 3 e 4) sem amplificação, 5 e 6) 2570 pb da NS3, 7 e 8) 2152 pb da região 5'NTR até E1, 9 e 10) 2014 pb da C até E1, 11 e 12) 1736 pb da E1 até NS2, 13 e 14) 1375 pb da E2 até NS2. Não estão mostrados os controles negativos.

A seqüência de nucleotídeos do gene que codifica para a proteína E^{ms} da linhagem R1935/72 possui maior homologia com a da linhagem 2724 (92%), seguido da linhagem SD-1 (90%), NADL (89%) e Osloss (81%) do BVDV de tipo I. O gene E^{ms} possui 70% de homologia com a linhagem 890 do BVDV de tipo II e BDV-BD31 e BD78 do BDV, sendo que as linhagens do CSFV com maior homologia foram a CAP e a Chinesa com 68%. A seqüência deduzida de aminoácidos da linhagem R1935/72 apresenta todos os supostos sítios de glicosilação e as 9 cisteínas, descritas como conservadas dentro do gênero *Pestivirus*. A seqüência de nucleotídeos que codifica para a proteína E^{ms} alinhada com seqüências retiradas de bancos de dados de genes está na Figura 4.

R1935	(1)	GCATTATTGGCATGGGCAATATTGGCTATGGTTTTAATTCAAGCTACAAT
2724	(184)GCA..C..G.....T.....
SD-1	(1142)G.....CG.A..C..G...G...T.....
NADL	(1142)G.....G.....A.A.....A.....GT.....T.....
R1935	(51)	GGGTGAAAACATAACACAGTGGAAATCTACAAGACAACGGGACAGAAGGGA
2724	(234)T.....C.....G..T..T.....
SD-1	(1192)	...A.....T.....CT.....T.....
NADL	(1192)	...A.....C.....T..T.....G.....
R1935	(101)	TACAACGGGCAATGTTCAAAAGGGGGTGAACAGAAGTCTACACGGCATC
2724	(284)C.....G...
SD-1	(1242)TC.....A...
NADL	(1242)C.....T.....T.....T...T..A...
R1935	(151)	TGGCCAGAGAAAATCTGTACAGGTGTCCCTTCCCATCTAGCCACTGATGT
2724	(334)GA.....C...A.
SD-1	(1292)G.....C.....
NADL	(1292)T..C.....C...A.
R1935	(201)	GGAGCTAAAACAATCCATGATATGATGGATGCAAGTGAAAAGACCAACT
2724	(384)	...A.....G.....G.....
SD-1	(1342)G.....
NADL	(1342)	A..A.....T...G.....G.....
R1935	(251)	ACACGTGTTGTAGACTTCAACGCCATGAGTGGAACAAGCATGGTTGGTGC
2724	(434)	.T.....C.....
SD-1	(1392)C..C.....
NADL	(1392)C.....
R1935	(301)	AACTGGTACAATATCGAACCTTGGATTTTAATCATGAACAGAACCCAAGC
2724	(484)T.....C.....T.....
SD-1	(1442)T..G.....T.....
NADL	(1442)T.....C.....C..G.....T.....
R1935	(351)	CAATCTTACTGAGGGCCAACCACCAAGAGAATGCGCAGTCACTTGCAGAT
2724	(534)T.....G.....T..G.
SD-1	(1492)C.....T.....T.....G.....G.
NADL	(1492)C.....A.....G..G.....T..G.

R1935	(401)	ATGACAGGGATAGTGACCTAAACGTGGTAACACAAGCTAGAGATAGCCCC
2724	(584)T..A.....T..G..T.....
SD-1	(1542)T.....T.....C..T...
NADL	(1542)T....C.....T.....
R1935	(451)	ACGCAATTGACAGGCTGCAAGAAAGGGAAAAATTTTTCTTTTGCAGGAAT
2724	(634)	..A.C.....T.....C.....C..
SD-1	(1592)C..A.....A....C..C.....T..CG.
NADL	(1592)	..A.CC..A....T.....A..G..C..C.....C..
R1935	(501)	ATTGATGCGGGGTCCCTGCAACTTTGAAATAGCTGCGAGTGATGTGTTGT
2724	(684)C.....C.....
SD-1	(1642)	.C...C.....T.....A....
NADL	(1642)C.....A.....A..A.
R1935	(551)	ACAAAGAACATGACTGCACCAGTATGTTTCAGGACACTGCCATTACCTC
2724	(734)	T.....G....A.....C.....T....G.....
SD-1	(1692)	T.....A....TG..G.....T....T.....T
NADL	(1692)	T.....AC...TT.....C.....T..CA.T.T.....T
R1935	(601)	GTTGACGGGATGACCAACTCCTTGGAAAGTGCCAGACAGGGGACCGCCAA
2724	(784)T...C.....A.....T..
SD-1	(1742)G.....T..A....G.....A....A..T..
NADL	(1742)T.....A...G.....A..A....T..
R1935	(651)	ACTGACAACCTGGTTAGGCAAGCAGCTCGGGAGATTAGGAAAAAATTGG
2724	(834)G.....T....T.C.....
SD-1	(1792)	.T.....A.....TCC....G....G....
NADL	(1792)T.C.....G....
R1935	(701)	AAAACAAGAGCAAGACGTGGTTTGGAGCATATGCG
2724	(884)A.....C..T
SD-1	(1842)T..A.....A.....T....A
NADL	(1842)T.....C..T

Figura 4: Alinhamento da seqüência de nucleotídeos que codifica para a proteína E^{ms} da linhagem R1935/72 do BVDV com a das linhagens 2724 (SILVA-KROTT *et al.*, 1994), SD-1 (DENG; BROCK, 1992) e NADL (COLLETT *et al.*, 1988) do BVDV de tipo I.

A seqüência de nucleotídeos que codifica para a proteína E2 da linhagem R1935/72 possui maior homologia com a da linhagem R2727 do BDV (90%), seguida das linhagens SD-1 (89%), NADL (86%) e Singer (85%) do BVDV de tipo I. Já a homologia com linhagens do BVDV de tipo II e do CSFV foram menores do que 70%. A seqüência deduzida de aminoácidos da linhagem R1935/72 apresenta os quatro supostos sítios de N-glicosilação e as 18 cisteínas conservadas entre as linhagens do BVDV. A seqüência de nucleotídeos que codifica para a proteína E2 alinhada com seqüências retiradas de bancos de dados de genes está na Figura 5.

R1935	(1)	ACTACTGCATTCCTAGTATGCCTTGTTAAGATGGTCAGGG
R2727	(517)TT.....A.....
SD-1	(2369)	..C..A.....T....G.....AA.....
NADL	(2369)T..TT.....A.....
R1935	(41)	GCCAGATGGTACAGGGCATCCTATGGCTACTACTGATAAC
R2727	(557)T..T.....T.
SD-1	(2409)G.....T..G...T.....
NADL	(2409)T..G.....T.....
R1935	(81)	AGGAGTGCAGGGGCACCTAGACTGCAAACCTGAATACTCA
R2727	(597)	...G..A..A.....T.
SD-1	(2449)	...G..A..A.....
NADL	(2449)	...G..A..A.....T.G..T.....T...G
R1935	(121)	TATGCCATAGCCAAGAGTGATAGAATTGGCCTACAAGGAG
R2727	(637)	..C.....C....C..T.....
SD-1	(2489)	..C.....A.....G.....C..T.....
NADL	(2489)A...GAC..A.....T.A..TG..G.
R1935	(161)	CTGAAGACCTTACTACTGTCTGGAAGGATTACTCACATGG
R2727	(677)G...A..C.....T.....G..A
SD-1	(2529)GA.....C..C..T.....C..T.....A
NADL	(2529)G.....C..CACT.....A.....C...

R1935	(201)	AATGACACTGGAAGACACAATGGTCATAGCATGGTGCAA
R2727	(717)GTG.....T.....
SD-1	(2569)AG.....T.....T.....
NADL	(2569)AG.....T..T.....G..
R1935	(241)	GATGGTAAGTTAACATATTATGCAAGGTGCACTAGGGAAA
R2727	(757)T.....CCTCC.....T..A..A....
SD-1	(2609)	.G...C.....T..G..CCTCT.....A..A....
NADL	(2609)G.....TG..CCTCCA...A.....G..A....
R1935	(281)	CCAGATATCTTGCAATTTTGCATTCAGGAGCCTTACCGAC
R2727	(797)G.....A.....C....A..
SD-1	(2649)C..T..C..A.....A.....
NADL	(2649)C.....C.....A..A.....G.....
R1935	(321)	CAGTGTGGTATTCAAAAACTTTTCGAGGGGCAAGGGCAA
R2727	(837)AA...TG.....G.....T.A.....
SD-1	(2689)G.....T..A.....AA....
NADL	(2689)C..T..T...G.AA....
R1935	(361)	GAGGACACAGTCGAAATGGATGACAACCTTGAATTTGGAC
R2727	(877)
SD-1	(2729)G.....T.
NADL	(2729)TGT.....A.C.....
R1935	(401)	TCTGCCCATGCGATGCCAAACCCATAGTAAGAGGGATTTA
R2727	(917)T.....G.....AA..
SD-1	(2769)	.T.....T.....AG.T
NADL	(2769)T.....AG.T
R1935	(441)	CAATACAACACTGCTAAACGGACCAGCCTTCCAGATGGTA
R2727	(957)	...C.....G.....T..T.....
SD-1	(2809)G.....A.....
NADL	(2809)G.....G.....G.....
R1935	(481)	TGCCCCATAGGTTGGACAGGGACTGTGAGCTGTATGTTAG
R2727	(997)T.....
SD-1	(2849)A.....
NADL	(2849)A.....A.....C..C.T

R1935	(521)	CTAATAGAGACACCCTAGACACAGCAGTAGTACGGACGTA
R2727	(1037)	T.....G.....T.....GT...
SD-1	(2889)G..T.....
NADL	(2889)	TC....TG.....T...C....A.T..G.....A..
R1935	(561)	TAGAAGGTCCAGACCATTCCCTTATAGGCAAGGCTGTATT
R2727	(1077)	...G.....A.....C..C.....C
SD-1	(2929)	C..G.....GT.....C.....G.....C
NADL	(2929)T.A.....C.....C
R1935	(601)	ACCCAAAAGACCCTGGGGGAGGATCTCTATGACTGTATTC
R2727	(1117)T.....C.....CA.....C.A.
SD-1	(2969)A..T.....GCC.
NADL	(2969)AT.....C..A....C..C.
R1935	(641)	TTGGAGGAAACTGGACTTGTGTAAGTGGGGACCAACTACA
R2727	(1157)G.....A.T.....G.....
SD-1	(3009)	.C.....C..G.....GTC..G
NADL	(3009)T.....GC....A.....T
R1935	(681)	ATACACAGGAGGCTCTGTTGAATCTTGCAAGTGGTGTGGT
R2727	(1197)T...A.C.....C.....
SD-1	(3049)CT.A.C.....C..T.....
NADL	(3049)A...G.....A.....C
R1935	(721)	TTTAAATTCAAAAAAGTGAGGGACTACCACACTACCCCA
R2727	(1237)	.A.....T.....GT.....T.
SD-1	(3089)	.A.....T.....GT....G.....T.
NADL	(3089)	.A.C....TA..G.G.....
R1935	(761)	TTGGCAAGTGTAGGTTGAAAAACGAGACTGGCTACAGATT
R2727	(1277)G.G..T..A.....T...C.
SD-1	(3129)T.....T..T..A.....
NADL	(3129)AA...G.G.....T....GC.
R1935	(801)	CGTGGACGGTACCTCTTGCAACAGAGAAGGTGTGGCCATA
R2727	(1317)	T..A...AA.....
SD-1	(3169)	A..A..T.AC.....G.....
NADL	(3169)	A..A...A.....T.....

R1935	(841)	GTGCCACAAGGACTGGTAAAGTGTAAGATAGGAGACACAA
R2727	(1357)	..A..G..T..G.A.....
SD-1	(3209)	..A.....T..G.....G.....
NADL	(3209)	..A.....GACAT.....C.....A.A....
R1935	(881)	TTGTACAGGTCATAGCTCTTGACACCAAACCTGGGCCTAT
R2727	(1397)A.G.....T.....G.....
SD-1	(3249)	C.....AC.....
NADL	(3249)	C.....A.G..T.....C..A.....
R1935	(921)	GCCTTGCAAGCCATATGAGATCATAACCAAGCGAGGGCCT
R2727	(1437)C.....T...T.....
SD-1	(3289)A..C.....T...T.....
NADL	(3289)GA.....A.....T...T.....
R1935	(961)	GTGGAAAAGACGGCGTGCACCTTCAACTACACAAGGACAT
R2727	(1477)	..A.....G.....
SD-1	(3329)	A.A.....A..A.....T.....G.....
NADL	(3329)	..A.....A.....T..T.....T.A.....
R1935	(1001)	TGAAAAATAAATATTTTGAGCCCAGAGACAGTTACTTCCA
R2727	(1517)	.A.....
SD-1	(3369)	.A.....A.....
NADL	(3369)	.A.....G.....C.....T..
R1935	(1041)	ACAATATATGCTAAAAGGACAGTATCAATACTGGTTTGAC
R2727	(1557)	G.....C.....G.....
SD-1	(3409)	G.....C.....G...G.T.....
NADL	(3409)	G.....C.....G.....
R1935	(1081)	CTGGAGGTCACCGACCATCATCGGGATTACTTCGCCGAGT
R2727	(1597)A....T.....C.....
SD-1	(3449)T.....T.....
NADL	(3449)G..T.....C.....T....
R1935	(1121)	CCATATTAGTGGTGGTGGTAGCCCTCCTGGGTGGTAGATA
R2727	(1637)A.A.....T.....
SD-1	(3489)T..T..A.....
NADL	(3489)A.....T.....C.....

R1935	(1161)	CGTGCTCTGGTTACTAGTCACATATATGGTTCTATCAGAA
R2727	(1677)CC.T.....
SD-1	(3529)	T..A.....G.....C.....
NADL	(3529)	T..A..T.....G..T.....C.....CT.....
R1935	(1201)	CAAAGGGCCTCAGGG
R2727	(1717)
SD-1	(3569)A.....
NADL	(3569)	..G.A.....T....

Figura 5: Alinhamento da seqüência de nucleotídeos que codifica para a proteína E2 da linhagem R1935/72 do BVDV com a das linhagens R2727 do BDV (BECHER *et al.*, 1994), SD-1 (DENG; BROCK, 1992) e NADL (COLLETT *et al.*, 1988) do BVDV de tipo I.

O gene que codifica para a proteína NS3 da linhagem R1935/72 possui maior homologia com o da linhagem Oregon (100%) diferindo em apenas cinco bases, seguido das linhagens SD-1 (93%), NCP1 e CP1 (93%), Singer (91%), NADL (90%), CP7, Osloss e NY-1 (84%) do BVDV de tipo I. A tríade catalítica His, Asp e Ser presentes nas posições 1658, 1659 e 1752 da poliproteína da linhagem SD-1 também foram encontrados na seqüência deduzida de aminoácidos da linhagem R1935/72. Também foi seqüenciada a região que codifica para a porção carboxi-terminal da proteína NS2, onde nas linhagens citopáticas do BVDV NADL e Osloss encontram-se inserções de seqüências celulares. Não foram encontradas quaisquer alterações no número de nucleotídeos desta região (dados não mostrados). A seqüência de nucleotídeos que codifica para a proteína NS3 alinhada com seqüências retiradas de bancos de dados de genes está na Figura 6.

R1935	(307)	GGCCTGGAGACTGGCTGGGCTTATACGCACCAAGGTGGGA
OREGON	(2007)
SD-1	(5303)	..T..A.....T.....A.....
NADL	(5573)	..T.....C.....C..A.....C....
R1935	(347)	TAAGTTCAGTCGACCATGTAACCGCAGGCAAAGATCTATT
OREGON	(2047)
SD-1	(5343)C.
NADL	(5613)C..A.....C.
R1935	(387)	GGTCTGTGACAGCATGGGGAGAACCAGAGTGGTCTGCCAG
OREGON	(2087)T.....
SD-1	(5383)T.....A.....T.....
NADL	(5653)AC.....T.....T.....A
R1935	(427)	AGCAACAACAGGCTAACTGATGAGACAGAGTATGGTGTCA
OREGON	(2127)
SD-1	(5423)T.A.T.....
NADL	(5693)T.G..C.....C....
R1935	(467)	AGACTGACTCAGGGTGCCAGATGGTGCCAGATGTTACGT
OREGON	(2167)
SD-1	(5463)A.....
NADL	(5733)C.....T..
R1935	(507)	GCTGAATCCAGAGGCAGTCAACGTTTCAGGATCCAAAGGG
OREGON	(2207)
SD-1	(5503)G.....A.A..G..T.....
NADL	(5773)	.T.A.....C..T...A.A.....
R1935	(547)	GCAGTCGTACACCTCCAAAAGACAGGTGGGGAATTCACGT
OREGON	(2247)
SD-1	(5543)C.....
NADL	(5813)T.....A.....
R1935	(587)	GTGTCACTGCATCAGGCACGCCAGCCTTCTTTGATCTAAA
OREGON	(2287)
SD-1	(5583)C.....A..G..T.....
NADL	(5853)C.....A..G..T....C..C....

R1935	(627)	GAAC TTGAAGGGATGGTCGGGCCTGCCCATATTTGAAGCC
OREGON	(2327)
SD-1	(5623)	A.....A..T.....
NADL	(5893)	A.....A.....A..T...T.....
R1935	(667)	TCCAGTGAAGGGTGGTTGGCAGGGTCAAAGTAGGGAAGA
OREGON	(2367)
SD-1	(5663)C.....T..A..T..G..G.....
NADL	(5933)C..G.....A.....
R1935	(707)	ATGAAGAGTCCAAACCCACAAAGATAATGAGTGGTATCCA
OREGON	(2407)
SD-1	(5703)A.....G.....C.....
NADL	(5973)T.....T.....A.....A.....
R1935	(747)	GACCGTCTCGAAGAGCACAGCAGATCTGACTGAGATGGTC
OREGON	(2447)
SD-1	(5743)A...A.....C.....
NADL	(6013)A..A.A..G.....C.....C.....
R1935	(787)	AAGAAGATTACCAGTATGAACAGGGGAGACTTTAAGCAAA
OREGON	(2487)
SD-1	(5783)A..T.....T.....C.....G..
NADL	(6053)A.....C.....C.....G..
R1935	(827)	TAAC TTTGGCAACTGGGGCAGGAAAAACCACAGAACTTCC
OREGON	(2527)
SD-1	(5823)	...A..A...A.....G.....
NADL	(6093)	.T.....A.....C.....C..
R1935	(867)	AAAAGCAGTGATAGAGGAAATAGGAAGACACAAGCGAGTG
OREGON	(2567)G.....
SD-1	(5863)	...G.....G.....T.....
NADL	(6133)T.....G.....A...A
R1935	(907)	TTAGTCCTTATACCATTAAGGGCAGCGGCAGAGTCAGTCT
OREGON	(2607)
SD-1	(5903)	C.....C.G.....A.....
NADL	(6173)T.....

R1935	(947)	ACCAGTATATGAGATTGAAACACCCAAGTATATCCTTTAA
OREGON	(2647)T.....
SD-1	(5943)C..T.....
NADL	(6213)C..C..T.....
R1935	(987)	CCTAAGGATAGGGGATATGAAAGAAGGGGACATGGCAACC
OREGON	(2687)
SD-1	(5983)G..G.....T
NADL	(6253)C.....G.....
R1935	(1027)	GGGATAACTTATGCATCATAACGGGTACTTCTGCCAGATGC
OREGON	(2727)
SD-1	(6023)C.....
NADL	(6293)C.....A.....
R1935	(1067)	CTCAACCAAAGCTTAGAGCAGCTATGGTAGAATACTCATA
OREGON	(2767)
SD-1	(6063)T.....G..
NADL	(6333)C.....T.....
R1935	(1107)	CATATTCTTAGATGAATACCACTGTGCCACTCCTGAACAA
OREGON	(2807)
SD-1	(6103)C.....G
NADL	(6373)T.....
R1935	(1147)	CTGGCAATTATTGGAAAAATCCACAGATTCTCAGAGAGTA
OREGON	(2847)
SD-1	(6143)	T.....C.....T.....
NADL	(6413)C..G..G.....T.....
R1935	(1187)	TAAGAGTGGTTGCCATGACTGCCACCCCGGCAGGGTCAGT
OREGON	(2887)
SD-1	(6183)T.....A.....G..
NADL	(6453)G..T..C.....G..A.....G..
R1935	(1227)	AACCACAACAGGACAAAAGCACCCAATAGAGGAATTCATA
OREGON	(2927)
SD-1	(6223)T.....
NADL	(6493)	G.....T.....

R1935	(1267)	GCCCCCGAAGTGATGAAAGGGGAAGACCTAGGCAGCCAGT
OREGON	(2967)
SD-1	(6263)G.....G.....T.....
NADL	(6533)G..A.....G..T..T..T....
R1935	(1307)	TCCTTGACATAGCGGGGCTAAAAATCCCCGTGGATGAGAT
OREGON	(3007)
SD-1	(6303)T.....
NADL	(6573)T.....A...T.....A..A.....
R1935	(1347)	GAAAGGTAACATGTTGGTTTTTGTACCCACGAGAAACATG
OREGON	(3047)
SD-1	(6343)	...G.....C..G.....
NADL	(6613)C..T.....A.....
R1935	(1387)	GCTGTTGAGGTGGCAAAGAACTAAAAGCTAAGGGCTACA
OREGON	(3087)
SD-1	(6383)	..A.....T.....G.....
NADL	(6653)	..A..A....A.....G.....T.
R1935	(1427)	ATTCTGGGTACTACTACAGTGGAGAGGATCCAGCTAACCT
OREGON	(3127)
SD-1	(6423)T.....T..
NADL	(6693)	.C.....A.....T.....C..T..
R1935	(1467)	GAGAGTTGTAACATCACAGTCCCCTTATGTAATTGTAGCC
OREGON	(3167)
SD-1	(6463)C.....G...
NADL	(6733)G.....A.....C.....C..G..T
R1935	(1507)	ACGAATGCCATTGAATCAGGAGTGACATTACCAGATTTGG
OREGON	(3207)
SD-1	(6503)C..G..G.....C....
NADL	(6773)	..A.....T.....C.....
R1935	(1547)	ACACGGTCGTGGACACAGGGTTGAAGTGTGAAAAGAGGGT
OREGON	(3247)
SD-1	(6543)	...A.....T.....A.....A..
NADL	(6813)TA.A....G.....A.....

R1935	(1587)	GAGGGTTTCATCAAAGATACCCTTCATTGTAACAGGCCTT
OREGON	(3287)
SD-1	(6583)G..G.....A.....C.....
NADL	(6853)A.....C.....
R1935	(1627)	AAGAGGATGGCCGTCACCTGTGGGTGAACAGGCTCAACGTA
OREGON	(3327)
SD-1	(6623)T..A.....C.....C..
NADL	(6893)G.....G.....G..G....
R1935	(1667)	GAGGCAGAGTAGGTAGAGTGAAGCCCGGGAGATATTACAG
OREGON	(3367)
SD-1	(6663)	.G..T.....A.....T..
NADL	(6933)	.G.....A.....G.....T..
R1935	(1707)	GAGCCAGGAAACAGCAACCGGGTCAAAGGACTACCACTAC
OREGON	(3407)
SD-1	(6703)A.....T.....T
NADL	(6973)A.....T
R1935	(1747)	GACCTCTTGCAGGCACAAAGATACGGTATTGAGGACGGGA
OREGON	(3447)
SD-1	(6743)G.....T..A..
NADL	(7013)G.....T..A..
R1935	(1787)	TCAACGTAACAAAATCCTTCAGAGAAATGAATTATGATTG
OREGON	(3487)
SD-1	(6783)G.....C..C..
NADL	(7053)G..G.....T..G..G.....C.....
R1935	(1827)	GAGTCTATATGAGGAGGACAGCCTGCTAATAACCCAGTTA
OREGON	(3527)
SD-1	(6823)C.....
NADL	(7093)	...C....C.....A.....C.G
R1935	(1867)	GAGATACTAAATAATTTACTCATATCAGAAGACTTGCCAG
OREGON	(3567)
SD-1	(6863)	..A.....C.....T.....G..
NADL	(7133)	..A.....C.....C.....

R1935	(1907)	CCGCTGTCAAGAATATAATGGCCAGGACTGATCACCCAGA
OREGON	(3607)
SD-1	(6903)C.....
NADL	(7173)T.....C.....
R1935	(1947)	GCCAATCCAACCTTGCATACAACAGCTACGAGGTCCAGGTC
OREGON	(3647)
SD-1	(6943)	...G.....
NADL	(7213)T..A.....
R1935	(1987)	CCAGTGCTGTTCCCAAAAATAAGGAATGGAGAAGTCACTG
OREGON	(3687)G.....
SD-1	(6983)C.....A.
NADL	(7253)	..G..C..A.....A.
R1935	(2027)	ACACCTACGAAAACACTACTCATTCTAAACTCCAGAAAAGTT
OREGON	(3727)
SD-1	(7023)T.....G.T....A..
NADL	(7293)T.....G.....TG.....
R1935	(2067)	GGGAGAGGACGTGCCAGTGTACATCTATGCCACTGAAGAT
OREGON	(3767)
SD-1	(7063)	A.....T.....T..T.....
NADL	(7333)	A..G.....T.....C.....T.....C..T.....
R1935	(2107)	GAGGACCTGGCGGTTGACCTCCTAGGGCTAGACTGGCCCCG
OREGON	(3807)
SD-1	(7103)A.....A.....
NADL	(7373)T.....A.....T.....T.....
R1935	(2147)	ATCCTGGGAATCAACAGGTCGTGGAGACTGGTAAGGCACT
OREGON	(3847)C.....
SD-1	(7143)C.....T.....A.....A.....
NADL	(7413)C..G.....A.....A.....
R1935	(2187)	GAAGCAAGTGGCCGGTTGTCTTCAGCTGAGAATGCTTTA
OREGON	(3887)
SD-1	(7183)	A.....C.....CC.G
NADL	(7453)A.....C..G.....A.....CC..

R1935	(2227)	CTCGTGGCTTTATTTCGGGTATGTAGGTTACCAAGCTCTAT
OREGON	(3927)T.....
SD-1	(7223)T...
NADL	(7493)	..A.....T.....G.....G.....C.
R1935	(2267)	CAAAGAGGCATGTCCCGATGATCACAGATATATACACTAT
OREGON	(3967)
SD-1	(7263)A..C.....A.....C..
NADL	(7533)A.....A.....C.....T..C..
R1935	(2307)	AGAGGACCAGAGACTAGAAGACACCACCCACCTCC
OREGON	(4007)
SD-1	(7303)
NADL	(7573)	C.....

Figura 6: Alinhamento da seqüência de nucleotídeos que codifica para a proteína NS3 da linhagem R1935/72 do BVDV com a das linhagens Oregon (PELLERIN *et al.*, 1995), SD-1 (DENG; BROCK, 1992) e NADL (COLLETT *et al.*, 1988) do BVDV de tipo I.

8.2.2 Expressão de proteínas da linhagem R1935/72 do BVDV em baculovírus

8.2.2.1 Clonagem e seleção do vetor de transferência recombinante

A presença e o tamanho dos genes que codificam para as proteínas do BVDV clonadas no vetor pCRTMBac foram determinados por clivagem com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Eco* RI. Seis clones com gene do tamanho esperado foram obtidos para a proteína E^{ms}, cinco para a E2 (Figura 7), e para a NS3 foi necessário sondar 40 clones para obter dois recombinantes. Dois clones recombinantes para cada gene foram seqüenciados, e foi selecionado o plasmídeo que possuía o gene com a seqüência deduzida de aminoácidos idêntica à seqüência consenso determinada para cada gene.

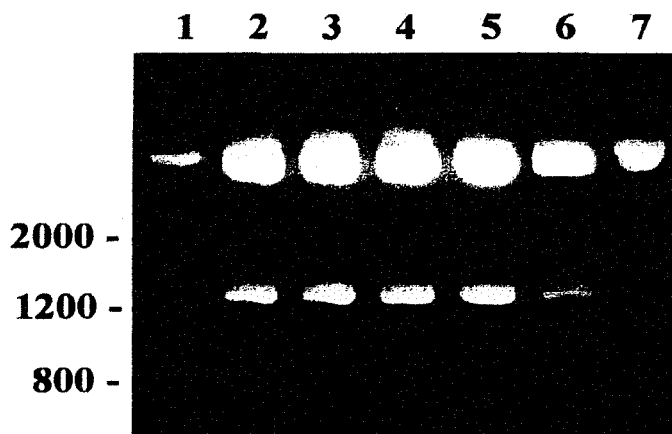


Figura 7: Gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos de clivagem com *Bam* HI e *Eco* RI de pCR™Bac purificados de colônias de *E. coli* resistentes a ampicilina. 1, 7) pCR™Bac selvagem linearizado; 2, 3, 4, 5, 6) pCR™Bac com insertos de tamanho esperado para o gene que codifica para a proteína E2.

O vetor de transferência recombinante selecionado para cada gene foi utilizado na co-transfecção de células da linhagem Sf9 com o DNA de AcMNPV. Os baculovírus recombinantes obtidos foram selecionados por PCR (Figura 8).

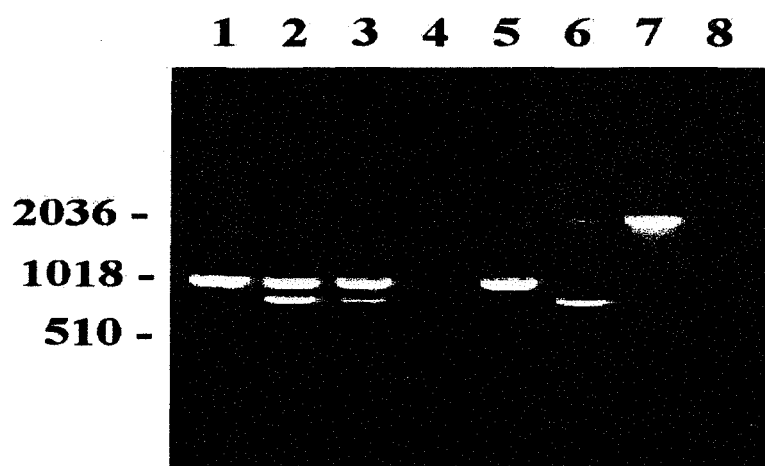


Figura 8: Gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos de PCR obtidos da seleção dos baculovírus recombinantes. Produtos de PCR obtidos a partir de: 1 e 5) recombinantes para o gene que codifica para a proteína E^{ms} sem baculovírus de tipo selvagem; 2 e 3) recombinantes para o gene que codifica para a proteína E^{ms} com baculovírus de tipo selvagem; 4) não houve amplificação; 6) recombinante para o gene que codifica para a proteína NS3 com baculovírus de tipo selvagem; 7) recombinante para o gene que codifica para a proteína NS3 sem baculovírus de tipo selvagem; 8) controle a partir de células não infectadas.

8.2.2.2 Produção de estoques virais de alto título e otimização da expressão

Foram produzidos 200 ml dos estoques virais de alto título de cada baculovírus recombinante para os genes que codificam para as proteínas E^{ms}, E2 e NS3 do BVDV. Na Tabela 3 estão descritos os títulos obtidos nestes estoques, bem como os melhores MOI e tempo de expressão para cada proteína recombinante.

Recombinante	Título	MOI	Tempo
E ^{ms}	1 x 10 ⁹	20	72 horas
E2	1 x 10 ⁸	10	72 horas
NS3	5 x 10 ⁸	5	48 horas

Tabela 3: Descrição dos estoques de alto título viral. Estão discriminados os títulos (número de partículas virais infecciosas por mililitro do estoque); a MOI e o tempo após a infecção em que foi detectada a maior quantidade de proteína recombinante.

A proteína E^{ms} foi detectada por SDS-PAGE corado com Azul de Coomassie e em Western blot, onde se utilizou o anticorpo monoclonal C42. A E^{ms} possui massa molecular de 48 kDa e alguns peptídeos de menor massa molecular. A proteína foi solubilizada do sedimento protéico P2 após utilização de tampão com uréia. A maior quantidade da proteína E^{ms} recombinante foi detectada 72 horas após a infecção dos cultivos celulares onde se utilizou uma MOI de 20.

A proteína E2 foi detectada por SDS-PAGE corado com Azul de Coomassie mas não foi detectada por nenhum dos anticorpos monoclonais utilizados em Western blot. A E2 possui massa molecular de 56 kDa e alguns peptídeos de menor massa molecular. A proteína foi solubilizada do sedimento protéico P2 após utilização de tampão com uréia. A maior quantidade da proteína E2 recombinante foi detectada 72 horas após a infecção dos cultivos celulares onde se utilizou uma MOI de 10.

A proteína recombinante NS3 foi detectada em Western blot onde se utilizou os anticorpos monoclonais 49EG71B6 e 49DE92D4. A NS3 possui massa molecular de 78 kDa e vários peptídeos de menor massa molecular. Não foi possível detectá-la em SDS-PAGE corado com Azul de Coomassie. A proteína foi solubilizada do sedimento

protéico P1 após utilização de tampão sem uréia. A maior quantidade da proteína NS3 recombinante foi detectada 48 horas após a infecção dos cultivos celulares onde se utilizou uma MOI de 5.

8.2.2.3 Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes, bem como seus controles, foram purificadas por cromatografia de afinidade (item 8.1.2.9) e as frações analisadas por Western blot (Figura 9) e SDS-PAGE (Figura 10). Após a diálise das frações eluídas, aproximadamente metade da proteína purificada a partir de células infectadas com baculovírus recombinantes para a E2 não foi solúvel.

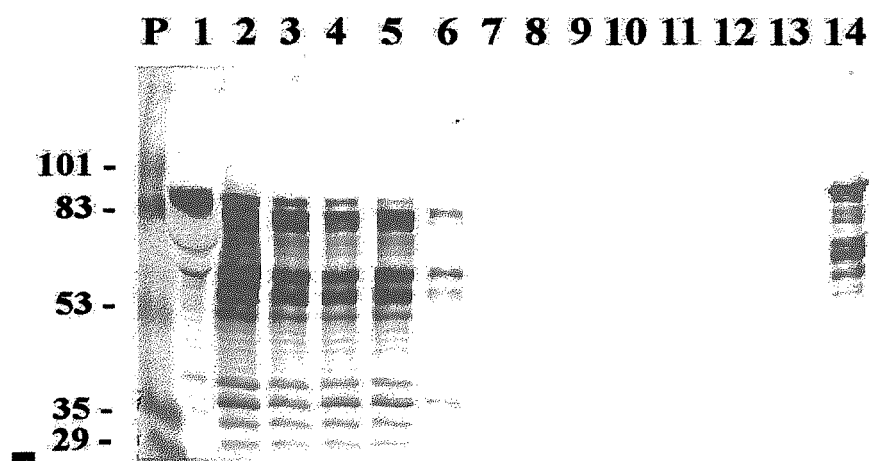


Figura 9: Western blot com as frações da cromatografia de afinidade com níquel da purificação da proteína NS3 recombinante. P) marcadores de peso molecular; 1) sobrenadante do cultivo celular após coleta das células; 2) extrato protéico preparado para cromatografia; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13) extrato protéico não retido na coluna; e 14) extrato protéico eluído da coluna.

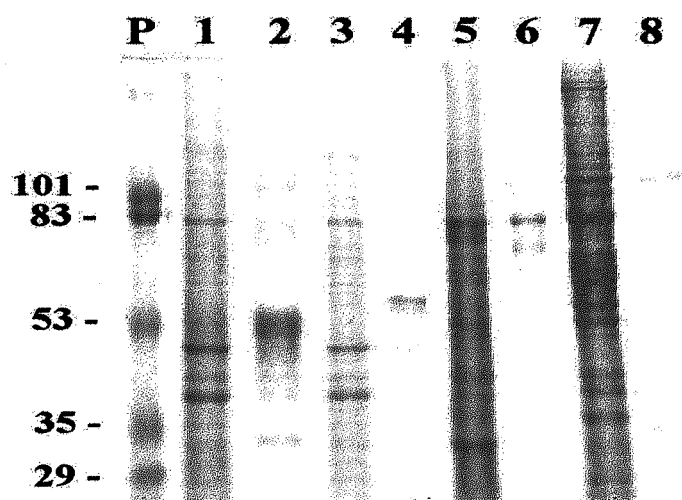


Figura 10: SDS-PAGE corado com Azul de Coomassie com as proteínas recombinantes purificadas e os extratos protéicos aplicados na cromatografia de afinidade de níquel. Extratos protéicos preparados a partir de células infectadas com baculovírus recombinantes para a 1) E^{ms}, 3) E2, 5) NS3 e 7) controle não infectado da NS3; e as frações eluídas a partir deste material da 2) E^{ms}, 4) E2, 6) NS3 e 8) controle não infectado da NS3 para a cromatografia e P) marcadores de peso molecular.

8.2.3 Ensaios de ELISA

Ensaios de ELISA prévios determinaram que a placa de ELISA com maior relação sinal/ruído para os antígenos recombinantes E^{ms}, E2 e NS3 foi a MaxiSorp (Nunc). O melhor agente de bloqueio foi a combinação de 2% de leite em pó desnatado com 2% de soro de cabra livre de anticorpos anti-BVDV. O melhor conjugado foi IgG de cabra anti-IgG bovina (γ específica) conjugada à peroxidase na diluição de 1:2000. Estes reagentes e condições foram utilizados nos ensaios subseqüentes.

Determinou-se que a diluição dos soros padrão com a maior relação sinal/ruído foi de 1:10. As proteínas recombinantes purificadas apresentaram um maior sinal e um

menor ruído, quando comparadas aos extratos protéicos brutos que as continham. Quando se comparam diluições de uma mesma proteína recombinante purificada, o melhor sinal foi obtido na diluição de 1:10 em relação ao volume de cultivo celular original. As proteínas recombinantes purificadas não foram quantificadas.

A análise de 24 soros bovinos para a presença de anticorpos anti-BVDV por ELISA foi realizada com os antígenos produzidos em cultivo celular infectado com a linhagem R1935/72 (Artigo 2) e pelos três ELISAS onde se utilizou as proteínas purificadas produzidas por baculovírus recombinantes para a E^{ms} (Tabela 4), E2 (Tabela 5) e NS3 (Tabela 6).

De maneira geral, as densidades óticas dos ELISAS onde se utilizaram as proteínas recombinantes foram maiores do que as densidades óticas do ELISA do Artigo 2. Para a proteína recombinante E^{ms}, somente um soro positivo não foi detectado (falso negativo) e dois soros foram falsos positivos. Para as proteínas recombinantes E2 e NS3 não foram detectados falsos negativos, mas os mesmos três soros foram falsos positivos.

ELISA E ^{ms}	ELISA cultivo		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	17	2	19
Negativo	1	4	5
Total	18	6	24

Tabela 4: Comparação da análise de soros bovinos para anticorpos anti-BVDV por ELISA com diferentes antígenos. Análise de 24 soros bovinos para a presença de anticorpos anti-BVDV por ELISA onde utilizou-se antígenos produzidos em cultivo celular infectado com a linhagem R1935/72 (Artigo 2) comparada com ELISA onde se utilizou as proteínas purificadas produzidas por baculovírus recombinante para a E^{ms}.

ELISA E2	ELISA cultivo		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	18	3	21
Negativo	0	3	3
Total	18	6	24

Tabela 5: Comparação da análise de soros bovinos para anticorpos anti-BVDV por ELISA com diferentes antígenos. Análise de 24 soros bovinos para a presença de anticorpos anti-BVDV por ELISA onde utilizou-se antígenos produzidos em cultivo celular infectado com a linhagem R1935/72 (Artigo 2) comparada com ELISA onde se utilizou as proteínas purificadas produzidas por baculovírus recombinante para a E2.

ELISA NS3	ELISA cultivo		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	18	3	21
Negativo	0	3	3
Total	18	6	24

Tabela 6: Comparação da análise de soros bovinos para anticorpos anti-BVDV por ELISA com diferentes antígenos. Análise de 24 soros bovinos para a presença de anticorpos anti-BVDV por ELISA onde utilizou-se antígenos produzidos em cultivo celular infectado com a linhagem R1935/72 (Artigo 2) comparada com ELISA onde se utilizou as proteínas purificadas produzidas por baculovírus recombinante para a NS3.

8.3 Discussão e conclusões

Este Anexo descreveu o seqüenciamento dos genes e a produção e purificação das proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem R1935/72 do BVDV no sistema de baculovírus e sua utilização em ensaios preliminares de ELISA.

O seqüenciamento dos genes que codificam para as proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem R1935/72 mostrou que esta linhagem é um BVDV de tipo I, semelhante à linhagem Oregon. Esta homologia já havia sido detectada quando do seqüenciamento da região 5'NTR no Artigo 2.

A expressão das proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem do BVDV R1935/72 foi otimizada em células de *S. frugiperda* através do sistema de baculovírus, e apresentam peso molecular semelhante aos descritos para as proteínas nativas. As proteínas E^{ms} e E2 apresentam peptídeos de peso molecular heterogêneo, provavelmente devido a glicosilação heterogênea e/ou proteólise, e são insolúveis em tampão sem uréia. A NS3 apresentou diversos peptídeos de menor peso molecular, provavelmente devido à proteólise, e foi solúvel em tampão sem uréia. A maior quantidade relativa das proteínas recombinantes foi obtida na ordem E2 > E^{ms} > NS3.

Dois grupos utilizaram a proteína estrutural E^{ms} do CSFV expressada em baculovírus para demonstrar sua atividade de RNase (HULST *et al.*, 1994; WINDISCH *et al.*, 1996) e para demonstrar que sua utilização como vacina confere imunidade a suínos contra o CSFV (HULST *et al.*, 1993; KÖNIG *et al.*, 1995). Como no presente trabalho, a E^{ms} recombinante do grupo de Hulst era insolúvel, ao contrário da produzida pelo grupo de Windisch e König, que era secretada para o meio. Curiosamente, a construção do gene da E^{ms} do BVDV feita no presente estudo foi baseada na construção descrita por KÖNIG *et al.* (1995) para o CSFV.

MOSER *et al.* (1996) descreveram a produção da proteína E2 glicosilada ou não da linhagem Alfort 187 do CSFV em baculovírus, e sua utilização de forma purificada ou não em um ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti-CSFV em suínos.

Demonstraram que a E2 glicosilada e purificada foi superior a forma não glicosilada. Como a E2 recombinante aqui descrita, a proteína produzida por MOSER *et al.* (1996) foi solúvel somente em tampões com uréia. WEENSVOORT *et al.* (1988) descreveram um ELISA complexo de bloqueio e captura que utiliza dois anticorpos monoclonais, o qual mede a capacidade do soro teste inibir a ligação de um dos anticorpos monoclonais a um epítipo específico da E2 do CSFV expressada em células de *S. frugiperda*. MOENNIG *et al.* (1990) desenvolveram um ELISA indireto em que a placa é sensibilizada com um anticorpo monoclonal contra o CSFV, seguido da adição da E2 produzida no sistema de baculovírus, do soro teste e do anticorpo anti-IgG suína conjugado com peroxidase. A especificidade e a sensibilidade destes testes de ELISA têm sido descritas como iguais a dos testes de neutralização, além de serem executados em menos tempo.

Apesar da E^{ms} e E2 do CSFV terem sido expressadas no sistema de baculovírus e da E2 ter sido utilizada com sucesso em testes de ELISA (WEENSVOORT *et al.*, 1988; MOENNIG *et al.*, 1990; MOSER *et al.*, 1996), o mesmo não havia sido realizado com estas proteínas do BVDV até o presente momento.

Com relação à proteína NS3 do BVDV, vários grupos já a haviam expressado em sistemas heterólogos. VANDERHEIJDEN *et al.* (1993) expressaram a NS3 da linhagem Osloss do BVDV em células de *E. coli* e *S. frugiperda* e compararam a sua capacidade de detectar anticorpos anti-BVDV em soro de gado, utilizando um ELISA de captura e bloqueio baseado em anticorpos monoclonais. O maior nível de expressão ocorreu na NS3 produzida em *E. coli* e, como no presente estudo, a proteína somente foi detectada em extratos de *S. frugiperda* com o auxílio de Western blot. Contudo, os autores

demonstraram que a melhor correlação com SN foi obtida no ELISA que utilizou o antígeno expressado no sistema de baculovírus.

PETRIC *et al.* (1992) expressaram a NS3 do BVDV em *S. frugiperda* e utilizaram seus extratos em um ELISA indireto. Como no presente trabalho, 24 soros bovinos foram testados, sendo que quatro soros foram negativos no ELISA e positivos em SN.

KWANG *et al.* (1991) expressaram a parte amino-terminal do gene da NS3 do BVDV em *E. coli* em fusão com a glutationa-S-transferase e utilizaram a proteína parcialmente purificada em testes de Western blot. Foi determinada uma baixa correlação com SN mas uma alta correlação com ensaios de rádio-imuno-precipitação destes soros em lisados de cultivos celulares infectados com BVDV.

Os resultados preliminares obtidos neste estudo com um ELISA indireto indicam que as três proteínas recombinantes poderão ser utilizadas no estabelecimento de testes para a detecção de anticorpos anti-BVDV em soro bovino.

Como objetivos imediatos para a conclusão deste estudo, pretendemos diminuir o ruído nos testes de ELISA, através da otimização da purificação destas três proteínas recombinantes ou do estabelecimento de testes de ELISA de bloqueio utilizando extratos de cultivos de *S. frugiperda* infectados com cada um dos três baculovírus recombinantes. Algumas alternativas para a purificação seriam a utilização de nova cromatografia de afinidade com níquel ou cromatografia de afinidade utilizando-se de anticorpos policlonais ou monoclonais. Após a purificação, as proteínas recombinantes serão padronizadas em relação à concentração de proteína e comparadas em testes de ELISA, tomando-se como referência os resultados com o ELISA descrito no Artigo 2 e com testes de SN. Serão utilizados soros gerados por infecção natural com BVDV de tipo I e

II, bem como soros gerados contra linhagens definidas por infecção experimental, para o estabelecimento da especificidade e sensibilidade destas proteínas recombinantes do BVDV em testes de ELISA. Desta forma, poderá ser definido qual o antígeno ou as combinações de antígenos mais adequadas para a utilização rotineira em testes de ELISA para a detecção de anticorpos contra o BVDV.

8.4 Referências bibliográficas

- BECHER, P.; SHANNON, A.D.; TAUTZ, N.; THIEL, H.-J. Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology*, v.198, p.542, 1994.
- BOLIN, S.R. Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *American Journal of Veterinary Research*, v.49, p.1040, 1988.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, v.162, p.156, 1987.
- COLLETT M.S.; LARSON R.; GOLD C.; STRICK D.; ANDERSON D.K.; PURCHIO A.F. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, v.165, p.191, 1988.
- CORAPI, W.V.; DONIS, R.O.; DUBOVI, E.J. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.51, p.1388, 1990.
- DENG, R.; BROCK, K.V. Molecular cloning and nucleotide sequence of a Pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology*, v.191, p.867, 1992.
- DONIS, R. O.; DUBOVI, E. J. Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus biotypes. *American Journal of Veterinary Research*, v.48, p.1549, 1987.
- EDWARDS, S.; SANDS, J.J.; HARKNESS, J.W. The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. *Archives of Virology*, v.102, p.197, 1988.

- GREISER-WILKE, I.; LIESS, B.; SCHEPERS, J.; STAHL-HENNIG, C.; MOENNIG, V. Correlation of bovine viral diarrhoea virus induced cytopathic effects with expression of a biotype-specific marker. **Archives of Virology**, supl.3, p.55, 1991.
- GREISER-WILKE, I.; MOENNING, V.; COULIBALY, C.O.Z.; LEDER, L.; DAHLE, J.; LIESS, B. Identification of conserved epitopes on a hog cholera virus protein. **Archives of Virology**, v.111, p.213, 1990.
- HULST, M.M.; HIMES, G.; NEWBIGIN, E.; MOORMANN, R.J.M. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. **Virology**, v.200, p.558, 1994.
- HULST, M.M.; WESTRA, D.F.; WENSVOORT, G.; MOORMANN, R.J.M. Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. **Journal of Virology**, v.67, p.5435, 1993.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (eds.). **PCR protocols, a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990.
- JARVIS, D.L.; GARCIA, A. Long-term stability of baculoviruses stored under various conditions. **Biotechniques**, v.16, p.1761, 1994.
- KOERKE, J. **Herstellung und charakterisierung von monoklonalen antikörpern gegen den stamm a 1138/69 de virus der bovinen virusdiarrhoe**. Dissertação de Medicina Veterinária, Hânover, Alemanha: Faculdade de Medicina Veterinária, 1989.
- KÖNIG, M.; LENGSELD, T.; PAULY, T.; STARK, R.; THIEL, H.-J. Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. **Journal of Virology**, v.69, p.6479, 1995.
- KOZAK, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. **Nucleic Acids Research**, v.15, p.8125, 1987.
- KWANG, J.; BOLIN, S.; LITLEDIKE, E.T.; DUBOVI, E.J.; DONIS, R.O. Expression of the p80 region of bovine viral diarrhea virus and identification of specific antibodies to this recombinant protein in bovine sera. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.178, p.1326, 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680, 1970.
- MEAD, D.A.; PEY, N.K.; HERRNSTAD, C.; MARCIL, R.A.; SMITH, L.M. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. **Bio/Technology**, v.9, p.657, 1991.

- MEYLING, A. Detection of BVD virus in viremic cattle by an indirect immunoperoxidase technique. In: MCNULTY, M.S.; MACFERRAN, J.B. (eds.) **Recent advances in virus diagnosis**, Boston: Martinus Nijhoff Publishers, p.37, 1984.
- MOENNIG, V.; SCHAGEMANN, G.; DAHLE, J.; GREISER-WILKE, I.; LEDER, L. A new approach for the diagnosis of hog cholera. **Deutsche Tierärztlich Wochenschrift**, v.97, p.91, 1990.
- MOSER, C.; RUGGLI, N.; TRATSCHIN, J.-D.; HOFMANN, M.A. Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2. **Veterinary Microbiology**, v.51, p.41, 1996.
- O'REILLY, D.R., MILLER, L.K., LUCKOW, V.A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. New York (N.Y.): W.H. Freeman and Company, 1992.
- PATON, D.J.; SANDS, J.J. ROEHE, P.M. BVD monoclonal antibodies: relationship between viral protein specificity and viral strain specificity. **Archives of Virology**, v.3, p.47, 1991.
- PELLERIN, C.; MOIR, S.; LECOMTE, J.; TIJSSEN, P. Comparison of the p125 coding region of bovine viral diarrhoea viruses. **Veterinary Microbiology**, v.45, p.45, 1995.
- PETERS, W.; GREISER-WILKE, I.; MOENNIG, V.; LIESS, B. Preliminary serological characterization of bovine viral diarrhoea virus strains using monoclonal antibodies. **Veterinary Microbiology**, v.12, p.195, 1986.
- PETRIC, M.; YOLKEN, R.H.; DUBOVI, E.J.; WISKERCHEN, M.A.; COLLETT, M.S. Baculovirus expression of pestivirus non-structural proteins. **Journal of General Virology**, v.73, p.1867, 1992.
- SILVA-KROTT, I.U.; KENNEDY, M.A.; POTGIETER, L.N. Cloning, sequencing, and in vitro expression of glycoprotein gp48 of a noncytopathogenic strain of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v.39, p.1, 1994.
- TOWBIN, A.S.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.76, p.4350, 1979.
- VANDERHEIJDEN, N.; DE MOERLOOZE, L.; VANDENBERGH, D.; CHAPPUIS, G.; RENARD, A.; LECOMTE, C. Expression of the bovine viral diarrhoea virus Osloss p80 protein: its use as ELISA antigen for cattle serum antibody detection. **Journal of General Virology**, v.74, p.1427, 1993.

- WEILAND, E., STARK, R., HAAS, B., RÜMENAPF, T., MEYERS, G., THIEL, H.-J. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. **Journal of Virology**, v.64, p.3563, 1990.
- WEILAND, E.; AHL, R.; STARK, R.; WEILAND, E.; THIEL, H.-J. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. **Journal of Virology**, v.66, p.3677, 1992.
- WENSVOORT, G.; BLOEMRAAD, M.; TERPSTRA C. An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. **Veterinary Microbiology**, v.17, p.129, 1988.
- WINDISCH, J.M.; SCHNEIDER, R.; STARK, R.; WEILAND, E.; MEYERS, G.; THIEL, H.-J. Rnase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. **Journal of Virology**, v.70, p.352, 1996.

9. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

9.1 Artigo 1

a) A utilização do RT-PCR permitiu a amplificação de um segmento de DNA de 200 pares de bases (pb), quando se utilizou material proveniente de culturas celulares infectadas com linhagens do CSFV, e de 260 pb, quando se utilizou material proveniente de culturas celulares infectadas com linhagens do BVDV e do BDV. Desta maneira, pode-se diferenciar o CSFV dos pestivírus de ruminantes a partir de material obtido de cultura celular, através do tamanho do fragmento amplificado.

b) O RT-PCR foi capaz de amplificar os produtos esperados a partir de RNA extraído de cultivo celular infectado ou diretamente do sobrenadante destas culturas, o que o torna significativamente mais rápido de executar do que os métodos convencionais de detecção e diferenciação.

c) O RT-PCR foi capaz de amplificar especificamente o material proveniente de cultivo celular infectado, gerando segmentos específicos dos pestivírus.

d) O RT-PCR possui uma sensibilidade igual ou um pouco menor do que o teste de peroxidase ligada à anticorpos (PLA).

e) O protocolo aqui desenvolvido possui a vantagem de usar três iniciadores em uma única reação, já que protocolos semelhantes (WIRZ et al., 1993; KATZ et al., 1993) utilizam quatro iniciadores em duas reações.

9.2 Perspectivas contidas no Artigo 1

O protocolo desenvolvido também poderá ser testado na detecção e diferenciação do CSFV dos pestivírus de ruminantes diretamente de soro ou órgãos de animais com infecções com pestivírus. Isto evitará a necessidade do prévio isolamento do vírus em cultivo celular antes da realização do RT-PCR. Contudo, isto ainda não foi realizado até o presente momento, devido à ausência de instalações próximas e adequadas para a infecção experimental de suínos e de ruminantes.

9.3 Artigo 2

a) O método de preparo do antígeno e o formato do ELISA descritos foram mais simples do que os encontrados na literatura.

b) O ELISA aqui descrito possui uma especificidade de 99,2% e uma sensibilidade de 97,5%, quando comparado ao teste de soro neutralização (SN). Estes resultados são equivalentes ou melhores do que os encontrados na literatura, indicando que o ELISA aqui desenvolvido pode ser utilizado na detecção de anticorpos anti-BVDV em soro bovino.

c) Soros de 430 bovinos adultos de 19 propriedades do Estado do Rio Grande do Sul e de 1 propriedade de Corrientes (Argentina) foram testados com o presente ELISA. A frequência de $56\% \pm 15,1\%$ dos animais com anticorpos anti-BVDV corresponde a dados encontrados na literatura para outros países.

d) As linhagens BR275 e R1935/72 agruparam com os BVDV de tipo Ia na árvore filogenética reconstruída com as seqüências obtidas da região 5' não traduzida do genoma (5'NTR).

e) A linhagem Soldan agrupa com linhagens do BVDV de tipo II, o que está de acordo com a descrição do caso clínico do qual o vírus foi isolado. No entanto, a homologia nesta região, que é de 95% entre as BVDV de tipo II, cai para 88% quando a linhagem Soldan é incluída na análise. A exemplo do grupo do BVDV de tipo I, esse fato justificaria a subdivisão dos BVDV de tipo II em IIa e IIb.

9.4 Perspectivas contidas no Artigo 2

O teste de ELISA descrito está sendo utilizado em exames de rotina para a detecção de anticorpos anti-BVDV e em pesquisas que visam avaliar o impacto econômico da BVD na Suíça pelo Instituto de Virologia Veterinária da Universidade de Berna, o qual é o laboratório de referência para BVDV naquele País. Este teste também está em processo de transferência da tecnologia para uma empresa francesa, visando seu lançamento no mercado.

O estudo da frequência de bovinos com anticorpos anti-BVDV no Estado do Rio Grande do Sul poderá ser ampliado no número de amostras, de propriedades e na área abrangida. Também um maior número de isolados do BVDV poderão ser parcialmente seqüenciados. Estes dados poderão ser utilizados para cálculos do impacto econômico da doença, o que poderia justificar ou não campanhas de controle e erradicação da BVD em nosso País. Um grande número de países europeus estão desenvolvendo ou estão em vias de desenvolver campanhas de erradicação do BVDV, o que poderá afetar as exportações brasileiras de bovinos e seus produtos para a Europa, a exemplo do que já ocorreu com a febre aftosa. Devido a estes fatos, é fundamental que se estude melhor a doença em nosso meio.

9.5 Anexo 1

a) O seqüenciamento dos genes que codificam para as proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem R1935/72 demonstrou que ela é um BVDV de tipo I. A mesma já havia sido caracterizada como sendo mais relacionada à linhagem Oregon pelo seqüenciamento da região 5'NTR (Artigo 2).

b) A expressão das proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem do BVDV R1935/72 foi otimizada em células de *S. frugiperda* através do sistema de baculovírus e estas apresentaram peso molecular semelhante aos descritos para as proteínas nativas. As proteínas E^{ms} e E2 apresentaram peptídeos de peso molecular heterogêneo, provavelmente devido à glicosilação heterogênea e/ou proteólise, e foram insolúveis em tampão sem uréia. A NS3 apresentou diversos peptídeos de menor peso molecular, provavelmente devido à proteólise, e foi facilmente solubilizada em tampão sem uréia. A maior quantidade relativa das proteínas recombinantes foi obtida na ordem E2 > E^{ms} > NS3.

c) Resultados preliminares em um ELISA indireto indicaram que as três proteínas recombinantes poderão ser utilizadas em testes para a detecção de anticorpos anti-BVDV em soro bovino.

9.6 Perspectivas contidas no Anexo 1

Como objetivos imediatos para a conclusão deste estudo, pretende-se diminuir o ruído nos testes de ELISA, através da otimização da purificação destas três proteínas recombinantes ou do estabelecimento de um teste de ELISA de bloqueio utilizando extratos de cultivos de *S. frugiperda* infectados com os baculovírus recombinantes para

as proteínas E^{ms}, E2 e NS3. Algumas alternativas para esta purificação seriam a utilização de uma nova cromatografia de afinidade com níquel ou de uma cromatografia de afinidade utilizando-se de anticorpos policlonais ou monoclonais. Após a purificação, as proteínas recombinantes serão padronizadas em relação a concentração de proteína e comparadas entre si em testes de ELISA, tomando-se como referência os resultados com o ELISA descrito no Artigo 2 e com testes de SN. Serão utilizados soros gerados por infecção natural com BVDV de tipo I e II, bem como soros gerados contra linhagens definidas por infecção experimental, para o estabelecimento da especificidade e sensibilidade destas proteínas recombinantes do BVDV em testes de ELISA. Desta forma, poderá ser definido qual o antígeno ou quais combinações de antígenos são mais adequados para a utilização rotineira em testes de ELISA para a detecção de anticorpos contra o BVDV.

A médio e longo prazo, estes antígenos recombinantes poderão ser utilizados para a produção de anticorpos monoclonais e policlonais monoespecíficos, os quais poderão ser utilizados em vários estudos básicos e aplicados. Os próprios antígenos recombinantes também poderão ser utilizados diretamente em estudos básicos, como na determinação dos receptores celulares para o BVDV.

Também foram produzidos baculovírus recombinantes para as proteínas E2 das linhagens 890 (RIDPATH; BOLIN, 1995) e Soldan (Artigo 2) do BVDV do tipo II, bem como para as proteínas E2 e NS3 da linhagem Castro do CSFV (resultados não mostrados). Foram produzidos os estoques de alto título viral para estes baculovírus recombinantes, embora sua expressão não tenha sido determinada. O objetivo da produção da proteína E2 das linhagens do BVDV de tipo II é a sua comparação em

testes de ELISA com a mesma proteína da linhagem R1935/72 do BVDV de tipo I, quanto a sua capacidade relativa de detectar anticorpos gerados contra os dois tipos do BVDV. Desta maneira, talvez seja possível estabelecer um teste sorológico para a diferenciação das infecções causadas por BVDV de tipo I e II, importante recurso em estudos epidemiológicos das infecções causadas por estes pestivírus. Outra opção seria a inclusão das proteínas recombinantes E2 do BVDV de tipo I e II em um mesmo teste, com o fim de detectar os anticorpos gerados contra estes dois tipos do BVDV. Escolheu-se a proteína E2 pelo fato de ser, entre as proteínas com valor diagnóstico, a mais heterogênea nas linhagens de pestivírus.

Quanto às proteínas recombinantes E2 e NS3 da linhagem Castro do CSFV, o objetivo é o estabelecimento de um teste de ELISA para a detecção de anticorpos contra o CSFV em suínos. A linhagem Castro é uma linhagem do CSFV isolada no Brasil e utilizada como linhagem de referência em nosso País. As proteínas recombinantes E2 e NS3 serão comparadas em ELISA quanto ao seu valor diagnóstico, a exemplo do que será feito com as três proteínas do BVDV. Até o momento, somente a proteína E2 recombinante foi testada em testes de ELISA para CSFV, ao contrário do que ocorre com BVDV, onde somente a proteína recombinante NS3 foi testada.

As perspectivas de trabalho descritas acima serão efetuadas em estreita colaboração com o Instituto de Virologia Veterinária da Universidade de Berna (Suíça).

10. ABSTRACT

Pestiviruses represent causative agents of diseases that have a significant negative financial impact for the livestock industry worldwide. The genus *Pestivirus* comprises three species named according to the host from which they were isolated and where they cause disease: classical swine fever virus (CSFV), bovine viral diarrhoea virus (BVDV), and border disease virus (BDV) of sheep. This thesis had the general objective of developing and applying tests for the diagnosis and differentiation of pestiviruses.

Article 1 described a reverse transcription followed by polymerase chain reaction test designed to detect and differentiate CSFV from ruminant pestivirus by the expected size of the amplified fragments of DNA. CSFV infected cultures (10 strains) amplified a fragment of an expected size of 200 bp; BVDV cultures (23 strains) or BDV (2 strains) amplified a fragment of an expected size of 260 bp. The specificity of the amplified fragments was confirmed by restriction enzyme analysis. The threshold of sensitivity was 100 TCID₅₀ for CSFV and 1 TCID₅₀ for BVDV.

Article 2 described an ELISA based on cell culture antigens of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) was designed to detect anti-BVDV antibodies. This ELISA has a sensitivity of 97.5% and specificity of 99.2% compared to serum neutralization. Sera from 430 adult cattle on 19 farms of the State of Rio Grande do Sul (Brazil) and 1 farm from Corrientes (Argentina) were tested in the ELISA. The resulting prevalence of 56% ± 15,1% corresponds to reports for other countries. Two isolates of BVDV from the same region were amplified in the 5' untranslated region of the genome by Reverse Transcription followed by Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The amplification

products were sequenced and compared to available *Pestivirus* sequence data. The phylogenetic analyses showed that BVDV type I and type II are present in these area.

Annex 1 describes the characterization of the genes and the production and purification of the proteins E^{ms}, E2 and NS3 from strain R1935/72 of BVDV in the baculovirus system in order to use them in ELISA tests to detect anti-BVDV antibodies from cattle. The ELISA tests developed with the recombinant proteins were compared with the ELISA test from Article 2. The sequences obtained from genes to proteins E^{ms}, E2 and NS3 showed that strain R1935/72 is a BVDV type I. Preliminary results in indirect ELISAS indicate that the three recombinant proteins can be used in tests for the detection of antibody positive cattle to BVDV.

11. RESUMO

Os pestivírus compreendem agentes causais de doenças que têm um impacto econômico negativo para a agropecuária no mundo. O gênero *Pestivirus* compreende três espécies, nomeadas de acordo com o hospedeiro do qual eles foram isolados: o vírus da peste suína clássica (CSFV), o vírus da diarréia vírica dos bovinos (BVDV) e o vírus da doença da fronteira (BDV) dos ovinos. Esta tese teve como objetivos gerais o desenvolvimento e aplicação de testes para o diagnóstico e diferenciação dos pestivírus.

O Artigo 1 descreveu o desenho e a utilização de um teste de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) que permitiu a detecção e a diferenciação do CSFV dos pestivírus de ruminantes através do tamanho do fragmento amplificado de DNA. Foi amplificado um segmento de DNA de 200 pares de bases (pb), quando se utilizou material proveniente de culturas celulares infectadas com dez linhagens do CSFV, e de 260 pb, quando se utilizou material proveniente de culturas celulares infectadas com 23 linhagens do BVDV e duas linhagens do BDV. A especificidade dos fragmentos amplificados foi confirmada por clivagem com enzimas de restrição. A sensibilidade foi igual ou um pouco menor do que o teste de peroxidase ligada à anticorpos.

O Artigo 2 descreveu o estabelecimento de um teste de ELISA para a detecção de anticorpos anti-BVDV em soros de bovinos e a sua utilização na determinação da frequência de bovinos soropositivos para o BVDV em 19 propriedades do Rio Grande do Sul e uma da Argentina. Também foi sequenciada a região 5' não traduzida do genoma de isolados da mesma região para a determinação dos tipos do BVDV presentes

nesta área. O método de preparo do antígeno e o formato do ELISA descrito foram mais simples do que os descritos na literatura. O ELISA desenvolvido possui uma especificidade de 99,2% e uma sensibilidade de 97,5% quando comparado ao teste de soro neutralização (SN). A frequência de 56% \pm 15,1% dos animais com anticorpos anti-BVDV foi similar aos valores encontrados na literatura para outros países. A análise dos genótipos indicou que existem BVDV de tipo I e de tipo II nesta região.

O Anexo 1 descreveu a caracterização dos genes e a produção e purificação das proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem R1935/72 do BVDV no sistema de baculovírus, e sua utilização em testes preliminares de ELISA para detectar anticorpos anti-BVDV no soro de bovinos. Os testes de ELISA desenvolvidos com as proteínas recombinantes foram comparados com o que utiliza extratos de células infectadas como antígeno (Artigo 2). O seqüenciamento dos genes que codificam para as proteínas E^{ms}, E2 e NS3 da linhagem R1935/72 demonstrou que esta linhagem é um BVDV de tipo I. Resultados preliminares em um ELISA indireto indicaram que as três proteínas recombinantes poderão ser utilizadas em testes para a detecção de anticorpos anti-BVDV em soros de bovinos.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALANSARI, H.; BROCK, K.V.; POTGIETER, L.N.D. Single and double polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhoea virus in tissue culture and sera. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.148, 1993.
- BAKER, J.A. Serial passage of hog cholera in rabbits. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v.63, p.183, 1946.
- BAKER, J.C. Bovine viral diarrhoea virus: a review. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.190, p.1449, 1987.
- BARLOW, R.M. Experiments in border disease virus. IV. Pathological changes in ewes. **Journal of Comparative Pathology**, v.82, p.151, 1972.
- BECHER, P.; KÖNIG, M.; PATON, D. J.; THIEL, H.-J. Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. **Virology**, v.209, p.200, 1995.
- BECHER, P.; MEYERS, G.; SHANNON, A.D.; THIEL, H.-J. Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. **Journal of Virology**, v.70, p.2992, 1996.
- BECHER, P.; SHANNON, A.D.; TAUTZ, N.; THIEL, H.-J. 1994. Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. **Virology**, v.198, p.542, 1994.
- BELÁK, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A. Bovine viral diarrhoea virus infection: rapid diagnosis by the polymerase chain reaction. **Archives of Virology**, suppl.3, p.181, 1991.
- BIELEFELDT OHMANN, H.; BLOCH, B. Electron microscopic studies of bovine viral diarrhoea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. **Archives of Virology**, v.71, p.74, 1981.
- BIELEFELDT OHMANN, H. BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.29, p.77, 1988a.
- BIELEFELDT OHMANN, H. In situ characterization of mononuclear leucocytes in skin and digestive tract of persistently bovine viral diarrhoea virus-infected clinically healthy calves with mucosal disease. **Veterinary Pathology**, v.25, p.304, 1988b.
- BOLIN, S.; MOENNIG, V.; KELSO GOURLEY, N.E.; RIDPATH, J. Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups. **Archives of Virology**, v.99, p.117, 1988.

- BOLIN, S.R.; MCCLURKIN, A.W.; CORIA, M.F. Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.2385, 1985.
- BOLIN, S.R.; MCCLURKIN, A.W.; CUTLIP, R.C.; CORIA, M.F. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.573, 1985.
- BOYE, M.; KAMSTRUP, S.; DALSGAARD, K. Specific sequence amplification of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. **Veterinary Microbiology**, v.29, p.1, 1991.
- BROWNLIE, J. The pathways of bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of the disease. **Archives of Virology**, suppl.3, p.79, 1991.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. **Veterinary Record**, v.114, p.535, 1984.
- BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. **Annales de Recherches Veterinaires**, v.18, p.157, 1987.
- CAY, R.; CHAPPUIS, G.; COULIBALY, C.; DINTER, Z.; EDWARDS, S.; GREISER-WILKE, I.; GUNN, M.; HAVE, P.; HESS, G.; JUNTTI, N.; LIESS, B.; MATEO, A.; McHUGH, P.; MOENNIG, V.; NETTLETON, P.; WENSVOORT, G. Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: report of an international workshop. **Veterinary Microbiology**, v.20, p.123, 1989.
- CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. **Annual Review of Microbiology**, v.44, p.649, 1990.
- COLLETT M.S.; LARSON R.; BELZER, S.; RETZEL, E. Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genome organization of a pestivirus. **Virology**, v.195, p.200, 1988b.
- COLLETT, M.S.; LARSON, R.; GOLD, C.; STRICK, D.; ANDERSON, D.K.; PURCHIO, A.F. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine. **Virology**, v.165, p.191, 1988a.
- COLLETT, M.S.; WISKERCHEN, M.A.; WELNIAK, E.; BELZER, S.K. Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. **Archives of Virology**, suppl.3, p.19, 1991.
- CORAPI, W.V.; DONIS, R.O.; DUBOVI, E.J. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. **Journal of Virology**, v.62, p.2823, 1988.

- CORAPI, W.V.; DONIS, R.O.; DUBOVI, E.J. Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.51, p.1388, 1990.
- CORAPI, W.V.; FRENCH, T.W.; DUBOVI, E.J. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virology**, v.63, p.3934, 1989.
- DARBYSHIRE, J.H. A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. **Veterinary Record**, v.72, p.331, 1960.
- DE MOERLOOZE, L.; LECOMTE, C.M.; BROWN-SHIMER, S.L.; SCHMETZ, D.; GUIOT, C.; VANDENBERGH, D.J.; ALLAER, D.; ROSSIUS, M.; CHAPPUIS, G.; DINA, D.; RENARD, A.; MARTIAL, J.A. Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. **Journal of General Virology**, v.74, p.1433, 1993.
- DENG, R.; BROCK, K.V. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. **Virology**, v.191, p.867, 1992.
- DINTER, Z. Relationship between bovine virus diarrhoea virus and hog cholera virus. **Zentralblatt fuer Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene A**, v.188, p.475, 1963.
- DONIS, R.O.; DUBOVI, E.J. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. **Virology**, v.158, p.168, 1987.
- DONIS, R.O.; CORAPI, W.; DUBOVI, E.J. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56k to 58k glycoprotein. **Journal of General Virology**, v.69, p.77, 1988.
- DUNNE, H.W. Hog cholera (European swine fever). **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.17, p.315, 1973.
- DUNNE, H.W.; HOKANSON, J.F.; LUEDKE, A.J. The pathogenesis of hog cholera: I. Route of entrance of the virus into the animal body. **American Journal of Veterinary Research**, v.20, p.615, 1959.
- EDWARDS, S.; DREW, T.W.; BUSHNELL, S.E. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viremia. **Veterinary Record**, v.17, p.71, 1987.
- EDWARDS, S.; SANDS, J.J.; HARKNESS, J.W. The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. **Archives of Virology**, v.102, p.197, 1989.

- ELBERS, K.; TAUTZ, N.; BECHER, P.; STOLLO D.; RÜMENAPF, T.; THIEL, H.-J. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of the nonstructural proteins p7 and E2-p7. **Journal of Virology**, v.70, p.4131, 1996.
- ELLIS, P.R.; JAMES, A.D.; SHAW, A.P. Studies on the epidemiology economics of swine fever eradication in the EEC. In: COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Brussels, **Publication EUR 5738**, 1977.
- FENTON, A.; ENTRICAN, G.; HERRING, J.A.; NETTLETON, P.F. An Elisa for detecting pestivirus antigen in the blood of sheep persistently infected with border disease virus. **Journal of Virological Methods**, v.27, p.253, 1990.
- FENTON, A.; NETTLETON, P.F.; ENTRICAN, G.; HERRING, J.A.; MALLOY, C.; GREIG, A.; LOW, J.C. Identification of cattle infected with bovine virus diarrhoea virus using a monoclonal antibody capture ELISA. **Archives of Virology**, suppl.3, p.169, 1991.
- GORBALENYA, A.E.; KOONIN, E.V.; LAI, M.M.-C. Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. **FEBS Letters**, v.288, p.201, 1991.
- GOTTSCHALK, E.E.; GREISER-WILKE, I.; FREY, H.-R.; LIESS, B.; MOENNIG, V. An antigen capture test for the detection of cattle viremic with bovine viral diarrhoea virus - a comparison with BVDV virus isolation from buffy coat cells in bovine kidney cells. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.39, p.467, 1992.
- GRAY, E.W.; NETTLETON, P.F. The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and BVD. **Journal of General Virology**, v.68, p.2339, 1987.
- GREISER-WILKE, I.; LIESS, B.; SCHEPERS, J.; STAHL-HENNIG, C.; MOENNIG, V. Correlation of bovine viral diarrhoea virus induced cytopathic effects with expression of a biotype-specific marker. **Archives of Virology**, suppl 3, p.55, 1991.
- GREISER-WILKE, I.; MOENNING, V.; COULIBALY, C.O.Z.; LEDER, L.; DAHLE, J.; LIESS, B. Identification of conserved epitopes on a hog cholera virus protein. **Archives of Virology**, v.111, p.213, 1990.
- HARASAWA, R.; TOMIYAMA, T. Evidence of pestivirus RNA in human virus vaccines. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1604, 1994.
- HARDING, M.; LUTZE-WALLACE, C.; PRUD'HOMME, I.; ZHONG, X.; ROLA, J. Reverse transcriptase-PCR assay for detection of hog cholera virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.2600, 1994.
- HARKNESS, J.W.; SANDS, J.J.; RICHARDS, M.S. Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. **Research in Veterinary Science**, v.24, p.98, 1978.

- HERTIG, C.; PAULI, U.; ZANONI, R.; PETERHANS, E. Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v.26, p.65, 1991.
- HERTIG, C.; STALDER, H.; PETERHANS, E. Genetic heterogeneity within the coding regions of E2 and NS3 in strains of bovine viral diarrhoea virus. **Gene**, v.153, p.191, 1995.
- HOFMANN, M.A.; BRECHTBÜHL, K.; STÄUBER, N. Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. **Archives of Virology**, v.139, p.217, 1994.
- HOOFT VAN IDEKINGE, B.J.L.; VAN WAMEL, J.L.B.; VAN GENNIP, H.G.P.; MOORMANN, R.J.M. Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.30, p.21, 1992.
- HORZINEK, M.C.; RECZKO, E.; PETZOLDT, K. On the morphology of hog cholera virus. **Archiv fuer die Gesamte Virusforschung**, v.21, p.475, 1967.
- HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. In: BAKER, J.C.; HOUE, H. (eds.), **Veterinary Clinics of North America: Food animal practice**, v.11, n.3, p.521, 1995.
- HOUE, H., MEYLING, A. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. **Preventive Veterinary Medicine**, v.11, p.9, 1991.
- HOUGHTON, M. Hepatitis C viruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds.), **Fields Virology** (3rd ed.), Philadelphia: Lippincott-Raven, p.1035, 1996.
- HOWARD, C.J.; BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C. Comparison by the neutralization assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. **Veterinary Microbiology**, v.13, p.361, 1987.
- HOWARD, C.J.; BROWNLIE, J.; THOMAS, L.H. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viraemia in cattle in the UK. **Veterinary Record**, v.119, p.628, 1986.
- HULST, M.M.; HIMES, G.; NEWBIGIN, E.; MOORMANN, R.J.M. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. **Virology**, v.200, p.558, 1994.

- ISHIKAWA, K.; NAGAI, H.; KATAYAMA, K.; TSUTSUI, M.; TANABAYASHI, K.; TAKEUCHI, K.; HISHIYAMA, M.; SAITOH, A.; TAKAGI, M.; GOTOH, K.; MURAMATSU, M.; YAMADA, A. Comparison of the entire nucleotide and deduced amino acid sequences of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE and the wild-type parental strain ALD. *Archives of Virology*, v.140, p.1385, 1995.
- JENSEN, M.H. Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.22, p.85, 1981.
- JUNTII, N.; LARSSON, B.; FOSSUM, C. The use of monoclonal antibodies in enzyme linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Medicine*, v.34, p.356, 1987.
- KATZ, J.B.; RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhoea and border disease viruses by using a cDNA nested-amplification approach. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p.565, 1993.
- KOENEN, F.; VAN CAENEGEM, G.; VERMEERSCH, J.P.; VANDENHEEDE, J.; DEKUYKER, H. Epidemiological characteristics of an outbreak of classical swine fever in an area of high pig density. *Veterinary Record*, v.139, p.367, 1996.
- KOPROWSKI, H.; JAMES, T.R.; COX, H.R. Propagation of hog cholera virus in rabbits. *Proceedings. Society for Experimental Biology and Medicine*, v.63, p.178, 1946.
- KOSMIDOU, A.; AHL, R.; THIEL, H.-J.; WEILAND, E. Differentiation of classical swine fever virus (CSFV) strains using monoclonal antibodies against structural glycoproteins. *Veterinary Microbiology*, v.47, p.111, 1994.
- LAUDE, H. Improved method for the purification of hog cholera virus grown in tissue culture. *Archives of Virology*, v.54, p.41, 1977.
- LEFORBAN, Y.; CARIOLET, R. Characterization and pathogenicity for pigs of a hog cholera virus strain isolated from wild boars. *Annales de Recherches Veterinaires*, v.23, p.93, 1992.
- LEFORBAN, Y.; EDWARDS, S.; IBATA, G.; VANNIER, P. A blocking ELISA to differentiate hog cholera virus antibodies in pig sera from those due to other pestiviruses. *Annales de Recherches Veterinaires*, v.21, p.119, 1990.
- LIEBLER, E.M.; WASCHBÜSCH, J.; POHLENZ, J.F.; MOENNIG, V.; LIESS, B. Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *Archives of Virology*, v.3, p.109, 1991.

- LIESS, B.; FREY, H.R.; ORBAN, S.; HAFEZ, S.M.; Bovine virusdiarrhoe (BVD) - "mucosal disease": persistente BVD-feldvirusinfektionen bei serologisch selektierten rinder. **Deutsche Tierärztlich Wochenschrift**, v.90, p.249, 1983.
- LIESS, B. Hog cholera. In: GIBBS, B.P. (ed.) **Virus diseases of food animals. A world geography of epidemiology and control**, London: Academic Press. v.II, p.627, 1981.
- LIESS, B.; FREY, H.R.; GRAMBOW, H.; STAHL, C. Embryotransfer und BVD virusinfektion bei rindern. **Deutsche Tierärztlich Wochenschrift**, v.94, p.506, 1987.
- LIESS, B.; FREY, H.R.; KITTSTEINER, H.; BAUMANN, F.; NEUMANN, W. Beobachtungen und untersuchungen über die "Mucosal Disease" des rindes einer immunbiologisch erklärbaren spätform der BVD-MD-virusinfektion mit kriterien einer "slow virus infection"? **Deutsche Tierärztlich Wochenschrift**, v.81, p.481, 1974.
- LIU, S.-T.; LI, S.-N.; WANG, D.-C.; CHANG, S.-F.; CHIANG, S.-C.; HO, W.-C.; CHANG, Y.-S.; LAI, S.-S. Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v.35, p.227, 1991.
- LOPEZ, O.J.; OSORIO, F.A.; DONIS, R.O. Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.578, 1991.
- LOPEZ, O.J.; OSORIO, F.A.; KELLING, C.L.; DONIS, R.O. Presence of bovine viral diarrhoea virus in lymphoid cell populations of persistently infected cattle. **Journal of General Virology**, v.74, p.925, 1993.
- MCCLURKIN, A.W.; BOLIN, S.R.; CORIA, M.F. Isolation of cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.186, p.568, 1985.
- MCKERCHER, D.G.; SAITO, J.K.; CRENSHAW, G.L.; BUSHNELL, R.B. Complications in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.152, p.1621, 1968.
- MEYERS, G.; RÜMENAPF, T.; THIEL, H.-J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. **Virology**, v.171, p.555, 1989.
- MEYERS, G.; TAUTZ, N.; BECHER, P.; THIEL, H.J.; KÜMMERER, B. Recovery of citopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. **Journal of Virology**, v.70, p.000, 1996b.

- MEYERS, G.; TAUTZ, N.; DUBOVI, E.J.; THIEL, H.J. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. **Virology**, v.180, p.602, 1991.
- MEYERS, G.; TAUTZ, N.; STARK, R.; BROWNLIE, J.; DUBOVI, E.J.; COLLETT, M.S.; THIEL, H.-J. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. **Virology**, v.191, p.368, 1992.
- MEYERS, G.; THIEL, H.-J.; RÜMENAPF, T. Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles. **Journal of Virology**, v.70, p.1588, 1996a.
- MOENNIG, V.; GREISER-WILKE, I.; FREY, H.R.; HAAS, L.; LIEBLER, E.; POHLENZ, J.; LIESS, B. Prolonged persistence of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in a persistently viremic cattle. **Journal of Veterinary Medicine**, v.40, p.371, 1993.
- MOENNIG, V.; MATEO, A.; GREISER-WILKE, I.; BOLIN, S.R.; KELSO, N.E.; LIESS, B. Abstracts of the 89th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, p.326, 1988.
- MOENNIG, V.; PLAGEMANN, G.W. The pestiviruses. **Advances in Virus Research**, v.41, p.53, 1992.
- MOENNIG, V.; SCHAGEMANN, G.; DAHLE, J.; GREISER-WILKE, I.; LEDER, L. A new approach for the diagnosis of hog cholera. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.97, p.91, 1990.
- MONATH, T.P.; HEINZ, F.X. Flaviviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds.), **Fields Virology** (3rd ed.), Philadelphia: Lippincott-Raven, p.961, 1996.
- MOORMANN, R.J.; WARMERDAM, P.A.; VAN DER MEER, B.; SCHAPER, W.M.; WENSVOORT, G.; HULST, M.M. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and location in the genome of the sequence encoding envelope protein E1. **Virology**, v.177, p.184, 1990.
- MOSER, C.; RUGGLI, N.; TRATSCHIN, J.-D.; HOFMANN, M.A. Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2. **Veterinary Microbiology**, v.51, p.41, 1996.
- NETTLETON, P.F.; GILMOUR, J.S.; HERRING, J.A.; SINCLAIR, J.A. The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.15, p.179, 1992.

- NISKANEN, R.; ALENIOUS, S.; LARSSON, B.; JACOBSSON, S.-O. Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. **Archives of Virology**, suppl. 3, p.245, 1991.
- ORBAN, S.; LIESS, B.; HAFEZ, S.M. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus. I. Inoculation of pregnant cows 15 to 90 days before parturition (190th to 265th day of gestation). **Zentralblatt fuer Veterinaermedizin. Reihe B**, v.30, p.619, 1983.
- PAISLEY, L.G.; WELLS, S.; SCHMITT, B.J. Prevalence of bovine viral diarrhea antibodies in 256 U.S. cow-calf operations: a survey. **Theriogenology**, v.46, p.1313, 1996.
- PATON, D.J.; LOWINGS, J.P.; BARRETT, A.D.T. Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhea virus. **Virology**, v.190, p.763, 1992.
- PATON, D.J.; SANDS, J.J. ROEHE, P.M. BVD monoclonal antibodies: relationship between viral protein specificity and viral strain specificity. **Archives of Virology**, v.3, p.47, 1991.
- PEARSON, J.E. Hog cholera diagnostic techniques. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v.15, p.231, 1992.
- PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TIJSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, v.203, p.260, 1994.
- PETERS, W.; GREISER-WILKE, I.; MOENNIG, V.; LIESS, B. Preliminary serological characterization of bovine viral diarrhea virus strains using monoclonal antibodies. **Veterinary Microbiology**, v.12, p.195, 1986.
- PETERS, W.; LIESS, B.; FREY, H.R.; TRAUTWEIN, G. Incidence and impact of persistent infections with BVD virus in the field. In: COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Brussels, **Publication EUR10238 EN**, p.133, 1987.
- PICARD, M. Classical and african swine fever in France and in Europe in 1988. **Epidemiologie et Sante Animale**, v.16, p.27, 1989.
- POCOCK, D.H.; HOWARD, C.J.; CLARKE, M.C.; BROWNLIE, J. Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhea virus. **Archives of Virology**, v.94, p.43, 1987.
- POOLE, T.L.; WANG, C.; POPP, A.; POTGIETER, L.N.D.; SIDDIQUI, A.; COLLETT, M.S. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. **Virology**, v.206, p.750, 1995.

- REBHUN, W.C.; FRENCH, T.W.; PERDRIZET, J.A.; DUBOVI, E.J.; DILL, S.J.; KARCHER, L.F. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. **Journal of Veterinary Medicine**, v.3, p.42, 1989.
- RESSANG, A.A. Studies on the pathogenesis of hog cholera. I. Demonstration of hog cholera virus subsequent to oral exposure. **Zentralblatt fuer Veterinaermedizin. Reihe B.**, v.20, p.71, 1973.
- REVELL, S.G.; CHASEY, D.; DREW, T.W.; EDWARDS, S. Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. **Veterinary Record**, v.123, p.122, 1988.
- RICE, C.M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds.), **Fields Virology** (3rd ed.), Philadelphia: Lippincott-Raven, p.961, 1996.
- RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R.; DUBOVI, E.J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v.205, p.66, 1994.
- RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. **Virology**, v.212, p.39, 1995.
- ROEHE, P.M.; WOODWARD, M.J. Polymerase chain reaction amplification of segments of pestivirus genomes. **Archives of Virology**, suppl.3, p.231, 1991.
- RUGGLI, N.; TRATSCHIN, J.-D.; MITTELHOZER, C.E.; HOFMANN, M.A. Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. **Journal of Virology**, v.70, p.3478, 1996.
- RÜMENAPF, T.; STARK, R.; MEYERS, G.; THIEL H.-J. Molecular characterization of hog cholera virus. **Archives of Virology**, suppl.3, p.7, 1991.
- RÜMENAPF, T.; UNGER, G.; STRAUSS, J.H.; THIEL H.-J. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. **Journal of Virology**, v.67, p.3288, 1993.
- SAVI, P.; TORLONE, V.; TITOLI, F. Recherches sur la survie du virus de la peste porcine classique dans certains produits de charcuterie. **Bulletin. Office International des Epizooties**, v.63, p.87, 1965.
- SCHMITT, B.J.; LOPEZ, O.J.; RIDPATH, J.F.; GALEOTA-WHEELER, J.; OSORIO, F.A. Evaluation of PCR for diagnosis of bovine viral diarrhoea virus in tissue homogenates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p.44, 1994.
- SCHNEIDER, R.; UNGER, G.; STARK, R.; SCHNEIDER-SCHERZER, E.; THIEL, H.-J. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. **Science**, v.261, p.1169, 1993.

- SCHROEDER, B.A.; BALASSU-CHAN, T.C. Specific sequence amplification of bovine viral diarrhea virus nucleic acid. **Archives of Virology**, v.111, p.239, 1990.
- SHANNON, A.D.; RICHARDS, S.G.; KIRKLAND, P.D.; MOYLE, A. An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. **Journal of Virological Methodos**, v.34, p.1, 1991.
- SHAW, I.G.; WINKLER, C.E.; TERLECKI, S. Experimental reproduction of hypomyelinogenesis congenita in lambs. **Veterinary Record**, v.81, p.115, 1967.
- STARK, R.; MEYERS, G.; RÜMENAPF, T.; THIEL, H.-J. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. **Journal of Virology**, v.67, p.7088, 1993.
- STECK, F.; LAZARY, S.; FEY, H.; WANDELER, A.; HUGGLER, C.; OPPLIGER, G.; BAUMBERGER, H.; KADERLI, R.; MARTIG, J. Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine virus diarrhea-mucosal disease. **Zentralblatt fuer Veterinaermedizin. Reihe B**, v.27, p.429, 1980.
- STRASSER, M.; VOGT, H.-R.; PFISTER, H.; GERBER, H.; PETERHANS, E. Detection of bovine virus diarrhea virus (BVDV) in peripheral blood, cell cultures and tissue using a monoclonal antigen-capture ELISA. In: **Procedures of the 3rd Congress of the European Society of Veterinary Virology**, p.311, 1995.
- TAMURA, J.K.; WARRENER, P.; COLLETT, M.S. RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. **Virology**, v.193, p.1, 1993.
- TERPSTRA, C. Epizootiology of hog cholera. In: LIESS, B. (ed.) **Classical swine fever and related viral infections**, Boston: Martinus Nijhoff Publishing, p.201, 1988.
- THIEL, H.-J.; STARK, R.; WEILAND, E.; RÜMENAPF, T.; MEYERS, G. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. **Journal of Virology**, v.65, p.4705, 1991.
- THIEL, H.-J.; PLAGEMANN, P.G.W.; MOENNIG, V. Pestiviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds.), **Fields Virology** (3rd ed.), Philadelphia: Lippincott-Raven, p.1059, 1996.
- THIEL, H.-J.; MEYERS, G. Molecular characterization of pestiviruses. **Advances in Virus Research**, v.47, p.53, 1996.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Hog cholera. In: LEMAN *et al.* (eds.) **Diseases of swine**, 7th ed. Ames, IA: Iowa State University Press, p.274, 1992.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; TERPSTRA, C. Hog Cholera Virus. In: PENSAERT, M.B. (ed.) **Virus Infections of Porcines**, Amsterdã: Elsevier, 1989.

- VAN RIJN, P.A.; MIEDEMA, K.W.; WENSVOORT, G.; GENNIP, H.G.P.; MOORMANN, R.J.M. Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. **Journal of Virology**, v.68, p.3934, 1994.
- VAN RIJN, P.A.; VAN GENNIP, H.G.P.; DE MEIJER, E.J.; MOORMAN, R.J.M. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia. **Journal of General Virology**, v.74, p.2053, 1993.
- VAN ZIJL, M.; WENSVOORT, G.; DE KLUYVER, E.; HULST, M.; VAN DER GULDEN, H.; GIELKENS, A.; BERNS, A.; MOORMANN, R. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. **Journal of Virology**, v.65, p.2761, 1991.
- VANTSIS, J.T.; LINKLATER, K.A.; RENNIE, J.C.; BARLOW, R.M. Experimental challenge infection of ewes following a field outbreak of border disease. **Journal of Comparative Pathology**, v.89, p.331, 1979.
- WARRENER, P.; COLLETT, M.S. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. **Journal of Virology**, v.69, p.1720, 1995.
- WEILAND, E.; STARK, R.; HAAS, B.; RÜMENAPF, T.; MEYERS, G.; THIEL, H.-J. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. **Journal of Virology**, v.64, p.3563, 1990.
- WEILAND, E.; AHL, R.; STARK, R.; WEILAND, E.; THIEL, H.-J. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. **Journal of Virology**, v.66, p.3677, 1992.
- WENGLER, G.; BRADLEY, D.W.; COLLETT, M.S.; HEINZ, F.X.; SCHLESINGER, R.W.; STRAUSS, J.H. Virus taxonomy. In: R.A. MURPHY, C.M. FAUQUET, D.H.L. BISHOP, S.A. GHABRIAL, A.W. JARVIS, G.P. MARTELLI, M.A. MAYO, M.D. SUMMERS (eds.) **Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, New York: Springer-Verlag, p.415, 1995.
- WENSVOORT, G. Topographical and functional mapping of epitopes on hog cholera virus with monoclonal antibodies. **Journal of General Virology**, v.21, p.9, 1989.
- WENSVOORT, G.; BLOEMRAAD, M.; TERPSTRA, C. An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. **Veterinary Microbiology**, v.17, p.129, 1988.
- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; BOONSTRA, J.; BLOEMRAAD, M.; VAN ZAANE, D. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. **Veterinary Microbiology**, v.12, p.101, 1986.

- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. **Research in Veterinary Science**, v.45, p.143, 1988.
- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C. The changing clinical picture of swine fever. **Tijdschrift voor Diergeneeskunde**, v.110, p.263, 1985.
- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; DE KLUIJVER, E.P.; KRAGTEN, C.; WARNAAR, J.C. Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. **Veterinary Microbiology**, v. 21, p.9, 1989.
- WESTAWAY, E.G.; BRINTON, M.A.; GAIDAMOVICH, S.Y.A.; HORZINEK, M.C.; IGARASHI, A.; KÄÄRIÄINEN, L.; LVOV, D.K.; PORTERFIELD, J.S.; RUSSEL, P.K.; TREND, D.W. Togaviridae. **Intervirology**, v.24, p.125, 1985.
- WILHELMSSEN, C.L.; BOLIN, S.R.; RIDPATH, J.F.; CHEVILLE, N.F.; KLUGE, J.P. Lesions and localization of viral antigens in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhea. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.275, 1991.
- WILLIAMS, D.R.; MATTHEWS, D. Outbreaks of classical swine fever in Great Britain in 1986. **Veterinary Record**, v.112, p.479, 1988.
- WINDISCH, J.M.; SCHNEIDER, R.; STARK, R.; WEILAND, E.; MEYERS, G.; THIEL, H.-J. Rnase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. **Journal of Virology**, v.70, p.352, 1996.
- WIRZ, B.; TRATSCHIN, J.-D.; MULLER, H.K.; MITCHELL, D.B. Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.1148, 1993.
- WISKERCHEN, M.A.; BELZER, S.K.; COLLETT, M.S. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. **Journal of Virology**, v.65, p.4508, 1991.
- WISKERCHEN, M.A.; COLLETT, M.S. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. **Virology**, v.184, p.341, 1991.