Nowe pestiwirusy zwierząt¹⁾

PAWEŁ MIROSŁAW, MIROSŁAW POLAK

Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 23.07.2018

Zaakceptowano 23.08.2018

Mirosław P., Polak M.

New pestiviruses of animals

Summary

Viruses of the genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae*, are believed to be among the main factors causing economic losses in cattle and pig breeding. Their genomes, consisting of single-stranded RNA with positive polarity and a length of approximately 12.3 kb, have one open reading frame that encodes from 11 to 12 proteins. The virion is surrounded by a lipid membrane. According to the official classification, the genus *Pestivirus* includes four species: bovine viral diarrhea virus-1 (BVDV-1), bovine viral diarrhea virus-2 (BVDV-2), classical swine fever virus (CSFV) and border disease virus (BDV). To date, several genetically related viruses have been identified, but not yet included in the official classification. They include: giraffe pestivirus isolated from an animal with symptoms of mucosal disease and from cell cultures originating from Kenya, Pronghorn virus from an antelope, HoBi-like viruses detected for the first time in fetal bovine serum and Bungowannah virus causing losses in the Australian domestic pig population. It is suspected that new strains detected in Turkish goat and sheep herds and in Tunisian sheep pox vaccines also belong to pestiviruses. Next-generation sequencing has made it possible to identify another atypical pestivirus of pigs, as well as to discover strains infecting other animals beyond the order of Artiodactyla, such as rats or bats. New emerging strains may pose a threat to the livestock industry.

Keywords: classification, pestiviruses, BVDV, CSFV, BDV, new strains

Pierwsze doniesienia o chorobach zwierząt wywołanych przez pestiwirusy pochodzą z początku XIX wieku (40). Pomór klasyczny świń wiązano wtedy z bakteryjnym czynnikiem etiologicznym. Obecnie wirusy te uważa się za jeden z głównych czynników powodujących istotne straty ekonomiczne w hodowli zarówno trzody chlewnej, jak i bydła na całym świecie (22, 38). Aktualnie do rodzaju *Pestivirus* należą 4 gatunki (species), występujące u bydła, małych przeżuwaczy i świń, jednak ze względu na dużą zmienność genetyczną tych wirusów oraz ciągły rozwój narzędzi molekularnych wciąż identyfikuje się nowe, nie ujęte w oficjalnej klasyfikacji patogeny pokrewne genetycznie.

Rodzaj *Pestivirus*, podobnie jak *Flavivirus*, *Hepacivirus* i *Pegivirus* zaliczany jest do rodziny *Flaviviridae* (43). Do flawiwirusów należą przenoszone przez owady patogeny ludzi i zwierząt, takie jak: wirus żółtej febry, wirus Dengi, wirus zachodniego Nilu czy wirus Zika, a także wirusy, których wektorem są kleszcze, na przykład: wirus kleszczowego zapalenia mózgu czy wirus omskiej gorączki krwotocznej (54). Wirus zapalenia wątroby typu C należy do rodzaju *Hepacivirus* i jest głównym patogenem odpowiedzialnym za schorzenia wątroby u człowieka. Rodzaj *Pegivirus* tworzy 11 ga-

tunków wirusów zakażających ssaki. Natomiast rodzaj *Pestivirus* obejmuje 4 gatunki: wirus biegunki bydła, gatunek 1 (BVDV-1, *Pestivirus A*) oraz gatunek 2 (BVDV-2, *Pestivirus B*), wirus choroby granicznej owiec (BDV, *Pestivirus D*), a także wirus klasycznego pomoru świń (CSFV, *Pestivirus C*) (43).

Genomy wirusów z rodziny *Flaviviridae* składają się z jednoniciowego RNA o dodatniej polarności, na końcach 5' i 3' występują regiony niekodujące, nie RNA nie jest poliadenylowana na końcu 3' i zawiera jedną otwartą ramkę odczytu (ORF – Open reading frame), kodującą poliproteinę. Powstająca poliproteina ulega cięciom potranslacyjnym przez wirusowe oraz komórkowe proteazy na pojedyncze białka wirusa (43). Po złożeniu wirionu wirus pozyskuje otoczkę lipidową poprzez pączkowanie przez wewnątrzkomórkowe membrany gospodarza. Średnica wirionu pestiwirusów waha się w granicach 50-65 nm (11). Genom o długości około 12,3 kb koduje 4 białka strukturalne: C (Core protein), E1, E2 i E^{ms} oraz 7-8 białek niestukturalnych: N^{pro}, p7, NS2-3 (NS2, NS3), NS4A, NS4B, NS5A i NS5B. Do regionu niekodującego 5'UTR (UnTranslated Region) nie jest dołączana struktura czapeczki (cap), rozpoznawana przez kompleks inicjujący translację. W przypadku genomów pestiwirusowych na ich wydajną translację pozwala obecność sekwencji wewnętrznego miejsca wiązania rybosomu (IRES; Internal ribosomal entry

¹⁾ Sfinansowano ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowe „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.

site) (7). Pestiwirusy fenotypowo dzielimy na dwa biotypy: cytopatyczny (cp) i niecytopatyczny (ncp), na podstawie występowania lub braku efektu cytopatycznego w zakażonych hodowlach komórkowych (47). Na poziomie molekularnym, u szczepów cp dochodzi do ekspresji białka NS3, w wyniku cięcia białka NS23 na NS2 oraz NS3 (15).

Wirusy RNA charakteryzuje ogromna plastyczność genomu. U przedstawicieli tego samego gatunku mogą występować regiony różniące się nawet o 50%, co jest spowodowane akumulacją pojedynczych mutacji, a także procesami rekombinacyjnymi. Liczba błędów popełnianych przez wirusowe polimerazy RNA zależne od RNA w czasie jednego cyklu replikacyjnego wynosi od 10^{-3} do 10^{-5} (2). Podatność na tak liczne błędy może prowadzić do powstawania wariantów o unikatowych zdolnościach adaptacyjnych. Istnieją doniesienia o nowo pojawiających się wirusach związanych z pestiwirusami, które są genetycznie odrębne i mogą reprezentować dodatkowe gatunki w obrębie rodzaju. Wirusy te izolowano zarówno od zwierząt domowych, jak i dzikich.

W 1967 r. na terenie Kenii od żyrafy z objawami typowymi dla choroby błon śluzowych wyizolowano cytopatyczny szczep nazwany H138 (Giraffe-1) (34). Patogen ten łatwo namnażał się w hodowlach komórek bydlęcych oraz był neutralizowany przez przeciwciała przeciwko szczepowi Oregon BVDV-1 (19). Analizy filogenetyczne oparte na regionie N^{pro}, E2 oraz 5'UTR potwierdzone metodą palindromowych substytucji nukleotydowych (PMS, Palindromic nucleotide substitution) wykazały, że powyższy szczep powinien zostać uznany za oddzielny gatunek pestiwirusa (6, 19). Genom szczepu Giraffe-1 o długości 12 602 nukleotydów jest o około 300 nukleotydów dłuższy niż genomy pestiwirusów niecytopatycznych, co jest wynikiem wstawienia 294-nukleotydowego fragmentu w obrębie genu kodującego proteazę NS2. Podobne insercje obserwuje się u innych szczepów cytopatycznych wirusa BVDV-1 oraz w genomach cytopatycznych szczepów BDV (3).

Kolejny szczep, nazwany PG-2, blisko spokrewniony z H138, zidentyfikowano w latach 90. XX wieku, izolując go z bydlęcych kultur komórkowych pochodzących z Kenii (4). Kompletny genom tego szczepu po zsekwencjonowaniu wykazywał 82% identyczności w stosunku do odkrytego ponad 30 lat wcześniej szczepu H138. Jest on o 338 nukleotydów krótszy głównie z powodu braku insertu fragmentu mRNA gospodarza w regionie NS2 (5). Niewiele wiadomo na temat zjadliwości oraz częstości występowania tych wirusów, nie jest również znany naturalny rezerwuuar tego patogenu. Transmisja takich wirusów na zwierzęta hodowlane może stanowić poważne zagrożenie ekonomiczne dla hodowli zwierząt gospodarskich.

Następny unikalny pestiwirus został wyizolowany od młodej antylopy pronghorn (widłoróg amerykański) w Stanowym Laboratorium Weterynaryjnym w Wyoming (50). Była to pierwsza i jedyna izolacja wirusa Pronghorn. Patogen namnażał się w hodowlach komórek bydlęcych. Badania serologiczne, organizacja

regionu 5'UTR, obecność i długość regionu kodującego N^{pro} oraz obecność konserwatywnych sekwencji nukleotydów kodujących to białko, a także sekwencji flankujących miejsca cięcia pomiędzy wirusowymi polipeptydami N^{pro}/C i C/E^{ms} sugerowały przynależność tego wirusa do rodzaju *Pestivirus*. Z drugiej strony, badania filogenetyczne oparte na regionach 5'UTR, N^{pro} i E2 wskazały na znaczący dystans genetyczny (50). W 2014 r. cały genom wirusa Pronghorn został zsekwencjonowany (30). Przeprowadzone analizy sekwencji białek niestrukturalnych wirusa Pronghorn oraz pełnych sekwencji genomowych wykazały, że wirus ten należy uznać za odrębny gatunek wśród pestiwirusów.

Kolejnego atypowego pestiwirusa zidentyfikowano w Europie w płodowej surowicy bydlęcej (FBS – Fetal bovine serum) wyprodukowanej w Brazylii, określając go jako D32/00 'HoBi' (39). Opublikowano kilka doniesień o genetycznie podobnych wirusach zanieczyszczających FBS i linie komórkowe (44, 45). Najbardziej wydajną replikację wirusa obserwowano w przypadku linii komórek bydlęcych. Niektóre przeciwciała monoklonalne, swoiste jedynie dla BVDV-1 i BDV, nie reagowały z antygenami tego patogenu, w przeciwieństwie do przeciwciał swoistych dla pestiwirusów, które reagowały ze wszystkimi analizowanymi szczepami. Brak reaktywności z przeciwciałami specyficznymi dla glikoproteiny E2, przy jednoczesnym ich wiązaniu z przeciwciałami swoistymi dla E^{ms}, sugerują pokrewieństwo ze szczepami BVDV-2 i szczepem Giraffe-1 (39). Analizy filogenetyczne oparte na regionach 5'UTR, N^{pro}, E2 oraz NS3 wykazały znaczące różnice w stosunku do pozostałych gatunków (25). Wyniki te sugerują konieczność klasyfikacji atypowych pestiwirusów bydlęcych jako nowego gatunku, dla którego zaproponowano nazwę BVDV-3 (lub Hobo-podobne), ze względu na najbliższe pokrewieństwo do wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych. Procent podobieństwa pomiędzy BVDV-3 a BVDV-1 i BVDV-2 w regionie 5'UTR wynosił, odpowiednio, 75% i 80% (32). Podejrzewa się, że naturalnym rezerwuarem tego zarazka może być bawół wodny, gdyż u połowy badanych zwierząt tego gatunku, pochodzących z północno-wschodniego regionu Argentyny, wykryto obecność przeciwciał swoistych przeciwko BVDV-3 (33). Obecnie wirusy HoBi-podobne są najczęściej izolowanymi pestiwirusami w dwóch północno-wschodnich stanach Brazylii: Maranhão oraz Rio Grande do Norte. Fakt ten oznacza, że północno-wschodnia Brazylia może być naturalnym rezerwuarem tych patogenów (42). Ta grupa bydlęcych pestiwirusów prawdopodobnie oddzieliła się wcześniej od wspólnego przodka (BVDV-1 i BVDV-2) i wyewoluowała niezależnie w Ameryce Południowej i w południowo-wschodniej Azji (Tajlandia) (25), skąd pochodzi szczep Th/04_KhonKhaen, spokrewniony ze szczepem HoBi (44). Płodowe surowice bydlęce zanieczyszczone wirusami HoBi-podobnymi mogą sprzyjać rozprzestrzenianiu się tego wirusa na inne regiony świata. Naturalne zakażenia tym atypowym pestiwirusem u bydła obserwowano we Włoszech (14), Indiach (28),

Brazylii (13), Tajlandii (44) i Bangladeszu (18). Na poziomie genetycznym włoski szczep wykazywał najwyższą homologię sekwencji ze szczepami brazylijskimi. Istnieją podejrzenia, że wirus został wprowadzony na kontynent europejski poprzez szczepionki lub inne produkty uzyskiwane z wykorzystaniem zanieczyszczonej surowicy bydłowej. Objawami klinicznymi infekcji były: gorączka, kaszel, przyspieszone tętno, zwiększona liczba oddechów, wyciek z nosa i leukopenia. Większość zwierząt zdrowiała w okresie 2 tygodni (14).

Na jednej z australijskich ferm w Nowej Południowej Walii w 2003 r. odnotowano ognisko nowej choroby świń (27). Początkowo jej jedynymi objawami były nagłe upadki 3-4-miesięcznych prosiąt z następowym wyraźnym wzrostem liczby poronień. Schorzenie zostało zdefiniowane jako zespół zapalenia mięśnia sercowego świń (PMC – porcine myocarditis syndrome) (23). Badania laboratoryjne wykluczyły obecność większości znanych czynników zakaźnych (27). Wyizolowany z krwi kwas nukleinowy poddano amplifikacji przy użyciu jednego startera (SISPA – Sequence independent single primer amplification). Uzyskano sekwencje zbliżone do fragmentów genomu pestiwirusów, choć przeciwciała monoklonalne, specyficzne dla pestiwirusów, nie reagowały z antygenami tego wirusa. Nowo odkryty patogen nazwano wirusem Bungowannah (23). Sekwencjonowanie całego genomu tego wirusa wykazało, że może to być odległy filogenetycznie pestiwirus. Jego genom był o około 300-400 nukleotydów dłuższy od genomu pestiwirusów, pomimo że długość otwartej ramki odczytu była podobna. Sekwencje kodujące poszczególne białka miały podobną długość do analogicznych sekwencji u innych gatunków pestiwirusów z wyjątkiem insercji 27 nukleotydów na początku genu N^{pro} . Ponadto, wykryto kilka charakterystycznych elementów w regionie niekodującym 3'UTR, w tym insercję 234 par zasad oraz większą liczbę kodonów stop (24). Analizę pokrewieństwa filogenetycznego z innymi pestiwirusami przeprowadzono przy użyciu szkieletu BVDV-1 z podstawionymi białkami otoczki wirusa Bungowannah (E^{ms} , E1, E2 – tzw. komplementacja heterologiczna) (37). Okazało się, że jedynie obecność heterodimera E1-E2 miała istotne znaczenie dla efektywnego namnażania się i uzyskiwania najwyższych mian wirusa. Gorszy efekt uzyskano, stosując inne kombinacje białek E^{ms} , E1 oraz E2, wprowadzane do szkieletu BVDV-1. Co ciekawe, kinetyka namnażania się wirusa chimericznego E1-E2 była najwyższa i porównywalna zarówno w hodowli komórkowej pochodzenia świńskiego, jak i bydłowego. W związku z tym zasugerowano, że wirus mógł pierwotnie występować w populacji wolno żyjących jeleniowatych z następową adaptacją do świń. Historia przeżuwaczy na kontynencie australijskim jest krótka, więc tak szybka ewolucja wirusa budzi wątpliwości. Nie można wykluczyć wprowadzenia Bungowannah z produktami szczepionkowymi (24). Nie udało się jednak stwierdzić naturalnych zakażeń wywołanych przez ten patogen poza Australią (1). W dalszych badaniach wykazano,

że wirus Bungowannah jest zdolny do namnażania się *in vitro* w liniach komórkowych kotawca sawannowego (małpa z rodziny koczkodanowatych), nietoperzy, człowieka oraz myszy, wykazując odmienny tropizm w stosunku do klasycznych i atypowych pestiwirusów (36). Badania te jako pierwsze dowiodły, że pestiwirus może skutecznie zakażać komórki małp, nietoperzy i ludzi. Ponieważ wirus Bungowannah szybko namnażał się do wysokich mian w liniach komórkowych nietoperzy, przedstawiono kolejną hipotezę, że pochodzi on od tej grupy zwierząt, a w dalszej kolejności adaptował się do świń.

Sekwencjonowanie następnej generacji pozwoliło na zidentyfikowanie nowego atypowego pestiwirusa świń – APPV (Atypical porcine pestivirus). Sekwencje sześciu fragmentów cDNA charakteryzowały się podobieństwem do sekwencji pestiwirusów, a hipotetyczna poliproteina wykazywała 40% podobieństwo względem poliproteiny klasycznych gatunków: BVDV, BDV czy CSFV z 80% stopniem pokrycia. Ogólne podobieństwo do genomów poznanych pestiwirusów oraz obecność zarówno białka N^{pro} , jak i E^{ms} sugerują, że APPV powinien zostać zaliczony do rodzaju *Pestivirus*. Z drugiej strony, sekwencja białka N^{pro} tego wirusa nie była podobna do żadnej innej znanej sekwencji i według analizy BLASTP (21) wskazywała jedynie na 9-18% identyczność aminokwasową w stosunku do białek N^{pro} innych pestiwirusów. Test ELISA z zastosowaniem rekombinowanego białka E^{ms} APPV wykrył przeciwciała w 94% próbek krwi świń pochodzących z USA, co pozwala przypuszczać, że wirus ten występuje powszechnie w amerykańskich populacjach świń (21). Niektórzy badacze uważają, że zakażenie atypowym pestiwirusem świń może mieć związek z zaburzeniami neurologicznymi u nowo narodzonych prosiąt (35). Wirus został zidentyfikowany także we Włoszech (35), w Niemczech (9), Wielkiej Brytanii (52), Brazylii (29) oraz w Chinach (41).

Próbki krwi od owiec i kóz z ośmiu małych stad z tureckich prowincji Aydın i Burdur zostały przebadane na obecność pestiwirusów z zastosowaniem testu ELISA wykrywającego antygeny tych wirusów (31). Dodatkowo wyniki uzyskano dla zwierząt wykazujących objawy klinicznie w postaci niedowładu i porażenia kończyn miedniczych, mimowolnego drżenia mięśni i zaburzonej koordynacji ruchowej. Obserwowano także ronienia i zmiany w wyglądzie okrywy włosowej (runa) w postaci długich i prostych włosów. Antygen wirusa wykryto w mózdzku, półkulach mózgowych i śródmózgowiu. Udało się zidentyfikować dwa izolaty, które poddano genotypowaniu w obrębie regionów 5'UTR i N^{pro} . Wykazano, że oba należą do nowego podtypu wirusa choroby granicznej owiec (BDV) i tworzą wyraźnie oddzielną podgrupę na drzewie filogenetycznym w stosunku do znanych podtypów BDV-1 – BDV-6. Kolejnych informacji dostarczyło sekwencjonowanie całego genomu szczepu Aydın/04-TR (8). Okazało się, że jest on genetycznie bliżej spokrewniony z wirusem klasycznego pomoru świń niż z wirusem choroby

granicznej. Wstępna analiza sekwencji całego genomu tego wirusa sugeruje, że może on reprezentować nowy gatunek pestiwirusa.

Dziewięć pestiwirusów wyizolowanych z różnych partii zanieczyszczonych tunezyjskich szczepionek przeciwko ospie owiec zbadano na poziomie antygenowym i molekularnym. Testy antygenowe wykazały, że tunezyjskie szczepy były bliżej spokrewnione ze szczepami referencyjnymi BDV niż CSFV czy BVDV. Tunezyjskie izolaty tworzą oddzielną gałąź między BDV i CSFV na drzewie filogenetycznym powstałym na podstawie sekwencji nukleotydowych 5'UTR, N^{pro} oraz E2 i w konsekwencji możliwe, że są to nowe gatunki w obrębie rodzaju *Pestivirus* (48). Poza północną Afryką podobne pestiwirusy zostały zidentyfikowane we Włoszech (12) oraz Francji (26).

Badania metagenomiczne dostarczyły dowodów na występowanie atypowych pestiwirusów poza rzędem parzystokopytnych (*Artiodactyla*). Z próbek pochodzących od nowojorskich szczurów (*Rattus norvegicus*) wyizolowano szczep NrPV. Szczegółowe badania ujawniły wiele podobieństw genomu NrPV do genomów pestiwirusowych (między innymi region 5'UTR miał podobną długość i zawierał strukturę IRES). Przewidywana sekwencja aminokwasowa poliproteiny NrPV wykazywała około 60% identyczności w stosunku do klasycznych pestiwirusów. Pomimo niewielkiego podobieństwa sekwencji w regionie N^{pro}, udało się zidentyfikować konserwatywne miejsca katalityczne (His49 i Cys69), obecne w pozycjach His158 i Cys176, niezbędne dla aktywności proteolitycznej tego białka (16). Analiza wiromu (ogół materiału genetycznego pochodzenia wirusowego związanego z określonym środowiskiem) nietoperza – podkowca pośredniego (*Rhinolophus affinis*), pozwoliła na zidentyfikowanie częściowej sekwencji genomu szczepu RaPV, która kodowała białka E2, p7, NS2-3 i NS4A oraz część sekwencji NS4B. Sekwencje te wykazywały 47% podobieństwo nukleotydowe z innymi pestiwirusami (53). Co ciekawe, najbardziej filogenetycznie pokrewnym wirusem w stosunku do RaPV wydaje się APPV – przewidywana poliproteina APPV wykazuje 68% identyczności do poliproteiny RaPV (21). Ponadto, wirus wykazujący pewną homologię do pestiwirusów został wyizolowany również z niciania – mątwika sojowego (*Heterodera glycines*) (10).

Pestiwirusy zakażają świnie i przeżuwacze. Przeciwciała specyficzne w stosunku do wirusa BVD zidentyfikowano w surowicy ponad 50 gatunków w 7 z 10 rodzin rzędu parzystokopytnych (51). Liczba potencjalnie nowych gatunków przypisanych do rodzaju *Pestivirus*

Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne utworzone w oparciu o fragment genomu kodujący białka E2, p7, NS2-3, NS4A oraz częściowo NS4B

Numerzy referencyjne z bazy GenBank: NADL [AJ133738.1], Singer [DQ088995.2], Oregon [AF041040.1], New York'93 [AF502399.1], H138 [AF144617.2], PG-2 [KJ660072.1], Pronghorn [AY781152.3], Th/04_KhonKaen [FJ040215.1], D32/00_'HoBi' [AB871953.1], Bungowannah [EF100713.2], APPV [KX929062.1], Aydin/04-TR [JX428945.1], Alfort/187 [X87939.1], X818 [AF037405.1], NrPV [KJ950914.1], Rhinolophus affinis pestivirus (RaPV) [JQ814854.1], Gifhorn [KF925348.1]

sukcesywnie się powiększa (ryc. 1). Ostatnio, również dzięki najnowszym osiągnięciom biologii molekularnej, takim jak sekwencjonowanie następnej generacji, udało się odkryć pestiwirusowe warianty, zakażające nowych gospodarzy należących do innych rzędów (16, 53). Nie stwierdzono dotychczas, aby pestiwirusy zakażały ludzi. Istnieje natomiast kilka doniesień wskazujących, że wirusy BVD oraz Bungowannah są w stanie namnażać się w ludzkich liniach komórkowych (20, 24). Zanieczyszczenie szczepionek przeznaczonych dla ludzi i zwierząt pestiwirusami (17, 46) poprzez zanieczyszczoną wirusem BVD surowicę bydlęcą (49) może zwiększać prawdopodobieństwo przekroczenia bariery gatunkowej przez te patogeny.

Piśmiennictwo

1. Abrahante J. E., Zhang J. W., Rossow K., Zimmerman J. J., Murtaugh M. P.: Surveillance of Bungowannah pestivirus in the upper Midwestern USA. *Transbound. Emerg. Dis.* 2014, 61, 375-377.
2. Anderson J. P., Daifuku R., Loeb L. A.: Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu. Rev. Microbiol.* 2004, 58, 183-205.
3. Avalos-Ramirez R., Orlich M., Thiel H. J., Becher P.: Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 2001, 286, 456-465.
4. Becher P., Avalos-Ramirez R., Orlich M., Cedillo Rosales S., König M., Schweizer M., Stalder H., Schirmer H., Thiel H. J.: Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implication for classification. *Virology* 2003, 311, 96-104.
5. Becher P., Fischer N., Grundhoff A., Stalder H., Schweizer M., Postel A.: Complete genome sequence of bovine pestivirus strain PG-2, a second member of the tentative pestivirus species giraffe. *Genome Announc.* 2014, 2, e00376, <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00376-14>.
6. Becher P., Orlich M., Kosmidou A., König M., Baroth M., Thiel H. J.: Genetic diversity of pestiviruses: Identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 1999, 262, 64-71.

7. Becher P., Orlich M., Thiel H.: Mutations in the 5'Nontranslated Region of Bovine Viral Diarrhea Virus Result in Altered Growth Characteristics. *J. Virol.* 2000, 74, 7884-7894.
8. Becher P., Schmeiser S., Oguzoglu T. C., Postel A.: Complete genome sequence of a novel pestivirus from sheep. *J. Virol.* 2012, 86, 11412.
9. Beer M., Wernike K., Dräger C., Höper D., Pohlmann A., Bergermann C., et al.: High prevalence of highly variable atypical porcine pestiviruses found in Germany. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017, 64, 22-26.
10. Bekal S., Domier L. L., Gonfa B., McCoppin N. K., Lambert K. N., Bhalerao K.: A novel flavivirus in the soybean cyst nematode. *J. Gen. Virol.* 2014, 95, 1272-1280.
11. Callens N., Brügger B., Bonnafous P., Drobecq H., Gerl M. J., Krey T., Roman-Sosa G., Rümenapf T., Lambert O., Dubuisson J., Rouillé Y.: Morphology and Molecular Composition of Purified Bovine Viral Diarrhea Virus Envelope. *PLoS Pathog.* 2016, 12, e1005476.
12. Ciulli S., Purpari G., Agnello S., Di Marco P., Di Bella S., Volpe E., Mira F., de Aguiar Saldanha Pinheiro A. C., Vullo S., Guercio A.: Evidence for Tunisian-Like Pestiviruses Presence in Small Ruminants in Italy Since 2007. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017, 64, 1243-1253.
13. Cortez A., Heinemann M. B., de Castro A. M. M. G., Soares R. M., Pinto A. M. V., Alfieri A. A., Flores E. F., Leite R. C., Richtzenhain L. J.: Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5-UTR region. *Pesq. Vet. Bras.* 2006, 26, 211-216.
14. Decaro N., Lucente M. S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Camero M., Sciarretta R., Losurdo M., Lorusso E., Buonavoglia C.: Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, 8, 1549-1552.
15. 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. *Am. J. Vet. Res.* 1987, 48, 1549-1554.
16. Firth C., Bhat M., Firth M. A., Williams S. H., Frye M. J., Simmonds P., Conte J. M., Ng J., Garcia J., Bhuvu N. P., Lee B., Che X., Quan P. L., Lipkin W. I.: Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *MBio.* 2014, 5, e01933-14.
17. Giangaspero M., Vacirca G., Harasawa R., Büttner M., Panuccio A., De Giuli Morghen C., Zanetti A., Belloli A., Verhulst A.: Genotypes of pestivirus RNA detected in live virus vaccines for human use. *J. Vet. Med. Sci.* 2001, 63, 723-733.
18. Haider N., Rahman M. S., Khan S. U., Mikolon A., Gurley E. S., Osmani M. G., Shanta I. S., Paul S. K., Macfarlane-Berry L., Islam A., Desmond J., Epstein J. H., Daszak P., Azim T., Luby S. P., Zeidner N., Rahman M. Z.: Identification and epidemiology of a rare HoBi-like pestivirus strain in Bangladesh. *Transbound. Emerg. Dis.* 2014, 61, 193-198.
19. Harasawa R., Giangaspero M., Ibata G., Paton D. J.: Giraffe strain of pestivirus: Its taxonomic status based on the 5'-untranslated region. *Microbiol. Immunol.* 2000, 44, 915-921.
20. Harasawa R., Mizusawa H.: Demonstration and genotyping of pestivirus RNA from mammalian cell lines. *Microbiol. Immunol.* 1995, 39, 979-985.
21. Hause B., Collin E. A., Peddireddi L., Yuan F., Chen Z., Hesse R. A., Gauger P. C., Clement P. C., Fang Y., Anderson G.: Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the United States. *J. Gen. Virol.* 2015, 96, 2994-2998.
22. Houe H.: Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 2003, 31, 137-143.
23. Kirkland P. D., Frost M. J., Finlaison D. S., King K. R., Ridpath J. F., Gu X.: Identification of a novel virus in pigs – Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. *Virus. Res.* 2007, 129, 26-34.
24. Kirkland P. D., Frost M. J., King K. R., Finlaison D. S., Hornitzky C. L., Gu X., Richter M., Reimann I., Dauber M., Schirrmeier H., Beer M., Ridpath J. F.: Genetic and antigenic characterization of Bungowannah virus, a novel pestivirus. *Vet. Microbiol.* 2015, 178, 252-259.
25. Liu L., Xia H., Wahlberg N., Belák S., Baule C.: Phylogeny, classification and evolutionary insight into pestiviruses. *Virology* 2009, 385, 351-357.
26. Martin C., Duquesne V., Adam G., Belleau E., Gauthier D., Champion J. L., Saegerman C., Thiéry R., Dubois E.: Pestiviruses infections at the wild and domestic ruminants interface in the French Southern Alps. *Vet. Microbiol.* 2015, 175, 341-348.
27. McOrist S., Thornton E., Peake A., Walker R., Robson S., Finlaison D., Kirkland P., Reece R., Ross A., Walker K., Hyatt A., Morrissey C.: An infectious myocarditis syndrome affecting late-term and neonatal piglets. *Aust. Vet. J.* 2004, 82, 509-511.
28. Mishra N., Rajukumar K., Pateriya A., Kumar M., Dubey P., Behera S. P., Verma A., Bhardwaj P., Kulkarni D. D., Vijaykrishna D., Reddy N. D.: Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet. Microbiol.* 2014, 174, 239-246.
29. Mósena A. C. S., Weber M. N., da Cruz R. A. S., Cibulski S. P., da Silva M. S., Puhl D. E., Hammerschmitt M. E., Takeuti K. L., Driemeier D., de Barcellos D. E. S. N., Canal C. W.: Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018, 65, 22-26.
30. Neill J. D., Ridpath J. F., Fischer N., Grundhoff A., Postel A., Becher P.: Complete genome sequence of pronghorn virus, a pestivirus. *Genome Announc.* 2014, 2, e00575-14, doi:10.1128/genomeA.00575-14.
31. Oguzoglu T. C., Tan M. T., Toplu N., Demir A. B., Bilge-Dagalp S., Karaoglu T., Ozkul A., Alkan F., Burgu I., Haas L., Greiser-Wilke I.: Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup? *Vet. Microbiol.* 2009, 135, 374-379.
32. Paletto S., Zuccon F., Pitti M., Gobbi E., Marco L., Caramelli M., Masoero L., Acutis P. L.: Detection and phylogenetic analysis of an atypical pestivirus, strain IZSPLY-To. *Res. Vet. Sci.* 2012, 92, 147-150.
33. Pecora A., Pérez Aguirreburualde M. S., Malacari D. A., Zabal O., Sala J. M., Konrad J. L., Caspe S. G., Bauermann F., Ridpath J., Dus Santos M. J.: Serologic evidence of HoBi-like virus circulation in Argentinean water buffalo. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2017, 29, 926-929.
34. Plowright W.: Other virus diseases in relation to the JP15 programme, [w:] Joint Campaign Against Rinderpest, Proceedings of the First Technical Review Meeting, Phase IV, Mogadiscio, Organization of African Unity, Kenya 1969, 19-23.
35. Postel A., Meyer D., Cagatay G. N., Feliziani F., De Mia G. M., Fischer N., Grundhoff A., Miličević V., Deng M. C., Chang C. Y., Qiu H. J., Sun Y., Wendt M., Becher P.: High Abundance and Genetic Variability of Atypical Porcine Pestivirus in Pigs from Europe and Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, 23, 2104-2107.
36. Richter M., Reimann I., Schirrmeier H., Kirkland P. D., Beer M.: The viral envelope is not sufficient to transfer the unique broad cell tropism of Bungowannah virus to a related pestivirus. *J. Gen. Virol.* 2014, 95, 2216-2222.
37. Richter M., Reimann I., Wegelt A., Kirkland P. D., Beer M.: Complementation studies with the novel „Bungowannah” virus provide new insights in the compatibility of pestivirus proteins. *Virology* 2011, 418, 113-122.
38. Saatkamp H. W., Berentsen P. B. M., Horst H. S.: Economic aspects of the control of classical swine fever outbreaks in the European Union. *Vet. Microbiol.* 2000, 73, 221-237.
39. Schirrmeier H., Strebelow G., Depner K., Hoffmann B., Beer M.: Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 3647-3652.
40. Schweinitz E. A. de, Dorset M.: A form of hog cholera not caused by hog-cholera bacillus. *US Bureau of Animal Industry* 1903, 41.
41. Shen H., Liu X., Zhang P., Wang L., Liu Y., Zhang L., Liang P., Song C.: Identification and characterization of atypical porcine pestivirus genomes in newborn piglets with congenital tremor in China. *J. Vet. Sci.* 2018, 19, 468-471.
42. Silveira S., Baumbach L. F., Weber M. N., Mósena A. C. S., da Silva M. S., Cibulski S. P., Borba M. R., Maia R. D., Coimbra V. C. S., de Moraes G. M., Ridpath J. F., Canal C. W.: HoBi-like is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017, 65, 113-120.
43. Simmonds P., Becher B., Bukh J., Gould E. A., Meyers G., Monath T., Muerhoff S., Pletnev A., Rico-Hesse R., Smith D. B., Stapleton J. T.: ICTV Report Consortium: ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 2017, 98, 2-3.
44. Stahl K., Kampa J., Alenius S., Persson Wadman A., Baule C., Aiumlamai S., Belák S.: Natural infection of cattle with an atypical 'HOBI'-like pestivirus – implications for BVD control and for the safety of biological products. *Vet. Res.* 2007, 38, 517-523.
45. Stalder H. P., Meier P., Pfaffen G., Wageck-Canal C., Rüfenacht J., Schaller P., Bachofen C., Marti S., Vogt H. R., Peterhans E.: Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 2005, 72, 37-41.
46. Studer E., Bertoni G., Candrian U.: Detection and characterization of pestivirus contaminations in human live viral vaccines. *Biologicals* 2002, 30, 289-296.
47. Tautz N., Meyers G., Thiel H. J.: Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. *Clin. Diagn. Virol.* 1998, 10, 121-127.
48. Thabti F., Letellier C., Hammami S., Pépin M., Ribière M., Mesplède A., Kerkhofs P., Russo P.: Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch. Virol.* 2005, 150, 215-229.
49. Uryvaev L. V., Dedova A. V., Dedova L. V., Ionova K. S., Parasjuk N. A., Selivanova T. K., Bunkova N. I., Gushina E. A., Grebennikova T. V., Podchernjaeva R. J.: Contamination of cell cultures with bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012, 153, 77-81.
50. Vilcek S., Ridpath J. F., Van Campen H., Cavender J. L., Warg J.: Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res.* 2005, 108, 187-193.
51. Walz P. H., Grooms D. L., Passler T., Ridpath J. F., Tremblay R., Step D. L., Callan R. J., Givens M. D.: American College of Veterinary Internal Medicine. Control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants. *J. Vet. Intern. Med.* 2010, 24, 476-486.
52. Williamson S.: Congenital tremor associated with atypical porcine pestivirus. *Vet. Rec.* 2017, 180, 42-43.
53. Wu Z., Ren X., Yang L., Hu Y., Yang J., He G., Zhang J., Dong J., Sun L., Du J., Liu L., Xue Y., Wang J., Yang F., Zhang S.: Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J. Virol.* 2012, 86, 10999-11012.
54. Zuckerman A. J., Banatvala J. E., Schoub B. D., Griffiths P. D., Mortimer P.: Principles and Practice of Clinical Virology, Sixth Edition, John Wiley & Sons Ltd. 2009, s. 669-696.