

# CARATTERIZZAZIONE DEI GENOTIPI DI CEPPI DEL VIRUS DELLA DIARREA VIRALE BOVINA 2 MEDIANTE SOSTITUZIONI NUCLEOTIDICHE PALINDROMICHE NELLA REGIONE GENOMICA NON TRADOTTA 5'

M. Giangaspero<sup>1</sup> & R. Harasawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli studi, Milano - Italia

<sup>2</sup>Centro Animale per la ricerca biomedica, Facoltà di Medicina, Università di Tokyo, Bankyo-ku, Tokyo - Giappone

## RIASSUNTO

61 ceppi di Pestivirus 2, agente della Diarrea Virale Bovina (BVDV-2), costituiti da 49 isolamenti da bovini ed ovini e da 12 contaminanti avventizi di prodotti biologici, sono stati valutati con il metodo delle sostituzioni nucleotidiche palindromiche in tre loci variabili (V1, V2 e V3) nella regione non tradotta (UTR) 5' del RNA genomico, una procedura di genotipizzazione nuova, semplice e pratica. 2 coppie di basi caratteristiche comuni a tutte le specie BVDV-2, vale a dire una coppia C-G o U-A al locus V1, e la coppia G\*U nel locus V2 sono state osservate in tutti i ceppi esaminati. L'applicazione del metodo PNS ha mostrato 6 genotipi, BVDV-2a, BVDV-2b, BVDV-2c, BVDV-2d, BVDV-2e e BVDV-2f. 25 ceppi hanno mostrato la combinazione specifica del genotipo BVDV-2a, costituita da tre coppie delle seguenti basi: A-U in posizione 1 e C-G o U\*G in posizione 18 in V1 e U-A o U\*G in posizione 4 in V2. 10 ceppi sono stati identificati dalla presenza di un'unica coppia alla posizione 4 dalla base della regione staminale V2, caratteristica questa specifica del genotipo BVDV-2b. 3 ceppi sono stati attribuiti al genotipo BVDV-2c, in seguito all'avvenuto riconoscimento della coppia G\*U alla base della regione staminale V1. La coppia U-A caratteristica del genotipo BVDV-2d in posizione 18 della regione staminale V1, è stata osservata nei 14 ceppi. Il genotipo BVDV-2e, limitato a 6 isolati da bovini sud americani, è caratterizzato in V1 da G-C in posizione 12, U-A in posizione 16 e rigonfiamenti G\_G o G\_A in posizione 18. Un ceppo originario dell'Argentina è stato classificato come genotipo BVDV-2f, mostrando in V1 coppia A-U in posizione 9, A-U in posizione 12, U-A in posizione 16 e rigonfiamento G\_A in posizione 18. Il genotipo di 2 ceppi non è stato determinato a causa della presenza di una sequenza incompleta del locus V1.

## PAROLE CHIAVE

Diarrea virale bovina 2 - Genotipi - Pestivirus - Sostituzioni nucleotidiche palindromiche

## Introduzione

Il virus della diarrea virale bovina 2 (BVDV-2) è una specie nota del genere *Pestivirus* della famiglia *Flaviridae*, insieme al virus della Diarrea virale bovina 1 (BVDV-1), il virus della Border disease (BDV), il virus della Peste suina classica (CSFV) e una specie di classificazione ancora incerta, «Giraffa» (53). La specie BVDV-2 comprende i ceppi isolati da focolai di sindrome emorragica, caratterizzati da trombocitopenia ed alta mortalità, sia negli Stati Uniti d'America (USA) che in Canada (9, 43, 44). I ceppi 890

e CD-87, ipervirulenti, sono stati inclusi precedentemente in un gruppo separato della specie BVDV (43, 45). La sindrome emorragica è stata osservata anche in bovini europei (11, 36, 49). Ceppi differenti sono stati isolati da bovini affetti da forme cliniche lievi (39, 51). E' stata segnalata inoltre la presenza di BVDV-2 come contaminante avventizio di prodotti biologici (3, 24, 29, 31, 32), costituendo quindi un rischio di infezione iatrogena, come dimostrato dal recente verificarsi di un grave incidente in bovini dei Paesi Bassi, ai quali è

## CHARACTERIZATION OF GENOTYPES AMONG BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS 2 STRAINS ACCORDING TO PALINDROMIC NUCLEOTIDE SUBSTITUTIONS IN THE 5' UNTRANSLATED GENOMIC REGION

### Summary

*Pestivirus* bovine viral diarrhoea virus 2 (BVDV-2) strains from 61 isolates from cattle and sheep, and from some adventitious contaminants of biologicals, have been assessed using the palindromic nucleotide substitutions (PNS) method at three variable loci (V1, V2 and V3) located

stato inoculato un vaccino vivo contaminato dal *Pestivirus* (17).

La nomenclatura dei *Pestivirus* deriva, in maniera predominante, dal nome della specie ospite dal quale è stato isolato il virus. Tra le specie esistono reazioni crociate, e, fatta eccezione per la CSFV apparentemente in grado di infettare solo i maiali, le varie specie virali possono valicare la barriera della specie ospite e infettare diverse specie animali. L'applicazione delle analisi genetiche appare l'approccio più appropriato per la diagnosi differenziale, specialmente nel caso di infezioni crociate, in grado di mettere in dubbio i criteri alla base della classificazione delle specie di *Pestivirus* in base alla specie animale che costituisce l'ospite tradizionale.

Il genoma del *Pestivirus*, virus a catena singola, con RNA a polarità positiva, è composto da una sequenza di circa 12.500 nucleotidi che si possono dividere in tre regioni: una regione non tradotta 5' (UTR) che contiene un sito d'entrata ribosomiale interno (IRES), una singola sezione di lettura aperta e di grandi dimensioni che codifica una poliproteina e un 3'-UTR. La 5'-UTR è conservata in tutti i membri del genere *Pestivirus*, risultando quindi utile ai fini della caratterizzazione delle specie o dei genotipi. L'analisi della struttura primaria, per mezzo dell'allineamento sequenziale e della costruzione degli alberi filogenetici, è il metodo più comune per la classificazione degli isolamenti di *Pestivirus*. Comunque è relativamente semplice predire la struttura secondaria, sulla base del legame nucleotidico più probabile, caratterizzato dall'utilizzo di livelli energetici molto bassi utilizzati nel processo di ripiegamento delle proteine. La struttura secondaria della 5'-UTR

può essere divisa in 4 settori, indicati progressivamente con le lettere A-D, con il settore D che racchiude i due terzi nella regione 3' della 5'-UTR per avvolgersi in una struttura palindromica complessa a stelo e ansa (14, 24) una regione critica della 5'-UTR, responsabile nei *Pestivirus* degli eventi traslazionali, trascrizionali e replicativi. Perciò le mutazioni casuali all'interno della 5'-UTR sono molto probabilmente incompatibili con la sopravvivenza virale, il che significa quindi che le variazioni nucleotidiche stabili che si manifestano a questo livello hanno un'importanza decisiva in termini di storia evolutiva del virus. Le sequenze nucleotidiche nelle tre posizioni variabili, V1, V2 e V3, nella 5'-UTR dei *Pestivirus* hanno mostrato di essere di natura palindromica e in grado di formare una struttura stabile a stelo e ansa peculiare ad ogni specie *Pestivirus*. Le sostituzioni nucleotidiche nelle regioni a stelo si verificano sempre per conservare la sequenza palindromica e perciò formano una struttura stabile a stelo e ansa. Così questo tipo di mutazione è riferita alle sostituzioni nucleotidiche palindromiche (PNS). Sulla base delle precedenti considerazioni, l'osservazione delle variazioni nucleotidiche tra i ceppi del virus a livello dei 3 palindromi specifici nella 5'-UTR è diventata un metodo per la genotipizzazione (30). Il metodo, denominato analisi PNS, appare semplice e pratico, fornendo risultati confrontabili con quelli generati da altre procedure basate sul confronto della struttura primaria. I risultati del metodo PNS sono essenzialmente qualitativi e classificano esattamente un isolato, sebbene non offrano valori percentuali per l'omologia tra i genotipi e le specie. Così questo metodo fornisce un quadro chiaro del-

in the 5' untranslated region (UTR) of genomic RNA. This genotyping procedure is new, simple and practical.

Two characteristics of the base pairings common to BVDV-2 species, a C-G or U-A pairing at the V1 locus, and a G\*U pairing at the V2 locus, were observed in isolates tested. The PNS method showed six genotypes: BVDV-2a, BVDV-2b, BVDV-2c, BVDV-2d, BVDV-2e and BVDV-2f. Twenty-five strains showed the BVDV-2a genotype specific combination of three base pairings (A-U in position 1 and C-G or U\*G in position 18 in V1 and U-A or U\*G in position 4 in V2). Ten strains were identified by a single C-G pairing in position 4 from the bottom of the V2 stem region, characteristic to genotype BVDV-2b. Three strains were assigned to genotype BVDV-2c, due to their recognition by a G\*U pairing at the bottom of the V1 stem region. A U-A pairing, characteristic of the BVDV-2d genotype when found in position 18 of the V1 stem region, was observed in fourteen strains. Genotype BVDV-2e, present in only six South American cattle isolates, was characterized by G-C pairing in position 12, by U-A pairing in position 16 and G\_G or G\_A bulges in position 18 in the V1 region. One strain from Argentina was classified as genotype BVDV-2f, showing: A-U pairing in position 9 and 12, U-A in position 16 and G\_A bulge in position 18 in V1 region. Two strains were not characterized due to incomplete sequence of V1 locus.

### Keywords

Bovine viral diarrhea virus 2 - Genotypes - Palindromic nucleotide substitutions - *Pestivirus*.

### Introduction

Bovine viral diarrhea virus 2 (BVDV-2) is an established species of the genus *Pestivirus* of the family Flaviviridae, which includes BVDV-1, Border disease virus (BDV) and Classical swine fever virus (CSFV) and a tentative «Giraffe» species (53). BVDV-2 species includes the strains isolated from the hemorrhagic syndrome as observed in disease

la specie e dei confini del genotipo, in seguito all'esame esclusivo di regioni strategiche e altamente preservate, e conseguentemente è di ausilio nell'evitare una classificazione non chiara. Basandosi sulle sostituzioni nucleotidiche palindromiche, le specie BVDV-1 sono state segregate in 14 genotipi, da BVDV-1a a BVDV-2n (20, 22, 26, M. Giangaspero e R. Harasawa, dati non pubblicati). Basandosi sulla 5'-UTR, lo status tassonomico di un ceppo di giraffa è stato definito come un nuovo gruppo tra le specie appartenenti al genere *Pestivirus* (28).

Nel presente studio, ceppi di *Pestivirus* BVDV-2 derivanti da 61 isolati, provenienti sia da bovini e pecore, che da contaminanti avventizi di prodotti biologici, sono stati valutati mediante analisi PNS nella 5'-UTR, allo scopo di determinare variazione genotipiche nelle specie.

## Materiali e metodi

Le sequenze nucleotidiche nella 5'-UTR di 61 *Pestivirus* sono state ottenute da database DNA o direttamente fornite dagli Autori. I ceppi, confrontati con ceppi di riferimento (*Pestivirus* 1, *Pestivirus* 2, *Pestivirus* 3 o BDV e *Pestivirus* 4 o CSFV), sono stati attribuiti alla specie BVDV-2. Basandosi sull'origine geografica degli isolamenti virali, 14 derivavano dal Nord America, 7 dal Sud America, 31 dall'Europa e 9 dal Giappone.

I ceppi delle sequenze nucleotidiche esaminate sono riportati di seguito, il numero di accesso è riportato tra parentesi. 41 ceppi erano isolati di campo di origine bovina.

Undici ceppi erano caratterizzati da un'alta virulenza, i ceppi MN Fetus, AZ Spl e MAD Spl (45), il ceppo 23025 [AF039172] (51) il ceppo CD87 [L32887],

registrato insieme al ceppo 890 [L32886] da Pellerin *et al.* (43) da focolai di sindrome emorragica in bovini nord-americani, parimenti un'alta virulenza è stata osservata nei ceppi NY93 [AF039173] e 17583-97 [AF039176] isolati negli USA da bovini con BVD (51) e nel ceppo citopatico Giesen-1 [AF104030] (4) isolato durante un focolaio di malattia delle mucose ad esito fatale. Il ceppo Kosice è stato isolato in Slovacchia da un vitello morto a 4 settimane, malformato ed emorragico (57) e il ceppo 37Gr (sequenza non depositata in GenBank) è stato isolato in Austria da una giovenca con diarrea acuta (55).

27 ceppi hanno mostrato una bassa virulenza, tra cui i ceppi 17011-96 [AF039179], 713-2 [AF039177], 552-95 [AF039174] e 7937 [AF039175] isolati negli Stati Uniti, in bovini soggetti ad aborti o infezioni persistenti (51), i ceppi italiani BS-95-II [AJ288903] e 11/Mi/97 [AJ293603] (39). I ceppi giapponesi OY89 [AB003621] (40) e TC Shinozaki NCP/92 [AB042676] (41) sono stati isolati da vitelli infetti in modo persistente, rispettivamente di età compresa tra 8 e 12 mesi, con malattie respiratorie, leucopenia e diarrea lieve.

I ceppi BSE921, BSE341, BSE1239, isolati da animali con sintomatologia neurologica, e il ceppo WVD829 isolato da animali con sintomi respiratori, e il ceppo UVR420, isolato da un intestino di vitello [ALIGN\_000012] (13) sono stati tutti riportati dal Belgio.

I ceppi AF112, B45-5, B50-5, B52-5, B77-5, B5-4, Monaco 1, Monaco 2 e Monaco 3 (7) sono stati isolati in Germania.

I ceppi 4-5174 [AF298063] e 15-103 [AF298055] (58) sono stati isolati in Francia, i dati riguardo i sintomi clinici non erano disponibili.

Sei ceppi sono stati isolati in Sud

outbreaks, characterized by thrombocytopenia and high mortality, in United States of America (USA) and Canada (9, 43, 44). Highly-virulent strains 890 and CD-87 have been classified as BVDV species belonging to a separate cluster (43, 45). The hemorrhagic syndrome has also been reported in European cattle (11, 36, 49). Different strains have been isolated from cattle showing mild clinical forms (39, 51). Furthermore, the presence of the species has been detected in biological products as adventitious contaminant (3, 24, 29, 31, 32), posing a risk of iatrogenic infection, as demonstrated by the recent occurrence of a serious accident in cattle in the Netherlands, who had received a live virus vaccine contaminated with *Pestivirus* (17).

Nomenclature of *Pestivirus* species derives predominantly from the animal host species from which they have been isolated. Cross-reactivity is a common feature and with the exception made of CSFV being apparently restricted to swine, different virus species can cross the host (species) barrier and infect various animal species. Genetic analyses seems the most appropriate approach for differential diagnosis to clear such cross-infections, which may constitute an obstacle to the classification of *Pestivirus* species based on animal host (species).

The single-stranded, positive polarity RNA *Pestivirus* genome is composed of a sequence of about 12,500 nucleotides which can be divided into three regions: a 5'-untranslated region (UTR) containing an internal ribosomal entry site (IRES), a single large open reading frame encoding a polyprotein, and a 3'-UTR. The 5'-UTR is common to all members of the genus *Pestivirus*, thus being useful for the characterization of species or genotypes. Primary structure analysis, by means of sequence alignment and construction of phylogenetic trees, is the most common method for the classification of the *Pestivirus* isolates. However, it is relatively easy to predict the secondary structure, according to the most probable nucleotide binding, the latter linked with the lowest protein-



America, il ceppo 34b [AF244952] (34) in Argentina, i ceppi Soldan [U94914] (C.W. Canal *et al.*, dati non pubblicati), LV-96 [AF410787], VS-260 [AF410788], VS-63 [AF410789] e VS-123.4 [AF10790] (18) in Brasile.

Otto ceppi sono stati isolati da pecore. Il ceppo C413 [AF02227], privo di effetto citopatico in cellule MDBK, è stato originariamente isolato negli USA nord-occidentali da un agnello clinicamente malato; la sequenza è stata depositata da Y. Chen e E.S. Berry (dati non pubblicati), il ceppo BD-78 [U18330] (48) è stato originariamente isolato nel 1978 in Idaho da un agnello di razza Suffolk di 6 settimane, affetto da Border disease (16): sulla base dei polipeptidi era stato in precedenza classificato come Border Disease Virus (BDV) (1). Il ceppo 59386 [U17146] è stato depositato da Becher *et al.* (3), i ceppi Lees [U65051], 167237 [U65055], 168149 [U65056], 173375 [U65059], tutti depositati da Vilcek *et al.* (56), sono stati isolati da focolai di Border disease.

Sono stati scoperti 12 ceppi, contaminanti di colture cellulari e prodotti biologici. Il ceppo SCP [U17148] (3) è stato isolato da una linea cellulare derivante dal plesso della membrana corioidea di pecora, in Inghilterra. Il ceppo IT-1732 [AJ4160189] (M.M. Muscillo, dati non pubblicati) è stato isolato da un vaccino Bayovac IBR-Marker (Bayer), responsabile di focolai nei Paesi Bassi e in Italia (17). Il ceppo WG4622 [ALIGN\_000012] (13) è stato isolato da una linea cellulare SV40 trasformata (macrofagi bovini). I ceppi EBTr [D50817] (31), MMR-T [D26052] (32), Parvo [D26614] e Rubella [D26048] (24), CPA [D50812], CPAE [D50813] e HE727 [D31807] (27) sono stati isolati in Giappone. Il

ceppo 354 [AF244959] (34) è stato isolato in Argentina.

Le strutture secondarie sono state predette secondo l'algoritmo di Zuker e Stiegler (60). L'energia minima libera è stata calcolata mediante il metodo di Freier *et al.*, (19). Sono state usate tre regioni variabili (V1, V2 e V3) presso la 5'-UTR per la genotipizzazione basata sulle sostituzioni nucleotidiche palindromiche (31). Gli accoppiamenti delle basi sono stati identificati numericamente, numerandoli progressivamente dalla base di ogni locus variabile. Le sequenze nucleotidiche sono state allineate per mezzo del Clustal V (33) utilizzando il programma DNASIS (Hitachi Software Engineering, Giappone). È stato costruito un albero filogenetico sulla base del gruppo-coppia non pesato usando il metodo delle medie aritmetiche (UPGMA) sviluppato da Sneath e Sokal (47).

## Risultati

La valutazione delle sequenze nucleotidiche caratterizzanti la 5'-UTR del *Pestivirus* BVDV-2, mediante analisi PNS, ha permesso la corretta distribuzione tra i genotipi della specie.

Tutti i ceppi esaminati condividono i due accoppiamenti delle basi comuni alla specie BVDV-2, vale a dire una coppia C-G o U-A sempre presente nel locus V1 in posizione 16, e una coppia G\*U nel locus V2 in posizione 9. I ceppi sono stati distinti facilmente dalla specie BVDV-1, caratterizzata dalla condivisione di una coppia PNS U-A al locus V1 in posizione 15, una coppia G-C in posizione 5 comune ai loci V2 e V3. Le specie BDV condividono una coppia di basi U-A o U\*G in posizione 2 in V2.

Sulla base del metodo PNS, gli isolati sono stati classificati in 6

folding energies. The 5'-UTR secondary structure can be divided into four domains, marked A to D, with domain D encompassing two-thirds of the 3' region of the above mentioned 5'-UTR, folding itself into a complex palindromic stem-loop (hairpin) structure (14, 24), a critical region of the 5'-UTR, which is responsible for translational, transcriptional and replicational events in *Pestiviruses*. Therefore, random mutations at the 5'-UTR are most likely to be incompatible with viral survival. Thus, stable nucleotide variations at this level are extremely relevant in terms of virus evolutionary history. Nucleotide sequences at the three variable loci, V1, V2 and V3, in the 5'-UTR of *Pestiviruses* have been shown to be palindromic and capable of forming a stable stem-loop (hairpin) structure specific to each *Pestivirus* species. Nucleotide substitutions in the stem regions always maintain the palindromic sequence and thereby form a stable stem-loop (hairpin) structure. Thus, this type of mutation was referred to palindromic nucleotide substitutions (PNS). Based on the above mentioned considerations, the observation of nucleotide variations among virus strains at the level of the three specific palindromes in the 5'-UTR was developed as method for genotyping (31). The method named PNS analysis appears to be simple and practical, generating results comparable with those of other procedures based on the primary structure comparison. PNS results are essentially qualitative and provide the exact species classification of an isolate, although they offer no percentage values for homology among species and genotypes. Consequently, this method, focusing on strategic and highly conserved regions, can provide a clear picture of species and genotype boundaries, and therefore helps to avoid ambiguous classification. According to palindromic nucleotide substitutions, the BVDV-1 species have been divided into fourteen genotypes, from BVDV-1a to BVDV-1n (20, 22, 26) (M. Giangaspero and R. Harasawa, unpublished findings). On the basis of

genotipi all'interno della specie BVDV-2, BVDV-2a, BVDV-2b, BVDV-2c, BVDV-2d, BVDV-2e e BVDV-2f. In Figura 1 vengono mostrati i loci palindromici V1, V2 e V3 nella 5'-UTR della specie *Pestivirus* BVDV-2. I ceppi BVDV-2a 11/Mi/97, WVD829 e 713-2 rappresentano un'eccezione per gli accoppiamenti di basi specifiche del genere: nel locus V1, in posizione 8, invece di C-G, il ceppo 11/Mi/97 possiede la coppia U\*G, e nella stessa posizione il ceppo WVD829 mostra un rigonfiamento G\_G; nel locus V2 invece di C-G in posizione 8, il ceppo 713-2 ha mostrato U al posto di C.

Su 61 ceppi esaminati, 25 (17011-96, 713-2, 5521-95, 7937, CD87, BS-95-II, 11/Mi/97, OY89, 4-5174, Giessen-1, UVR420, WVD829, BSE341, BSE1239, AF112, B45-5, B50-5, B52-2, B77-5, B5-4, Monaco 1, Monaco 2 and Monaco 3, TC Shinzaki NCP/92 e SCP), appartenevano al genotipo BVDV-2a. I ceppi erano caratterizzati dalla combinazione di tre accoppiamenti di basi, specifica del genotipo BVDV-2a (A-U in posizione 1 e Y:G in posizione 18 in V1 e U:R in posizione 4 in V2).

Dieci ceppi, BD-78, 890, WG4622, 23025, NY93, 17583-97, 15-103, Kosice, 37Gr e C413, appartenevano al genotipo BVDV-2b. I ceppi sono stati iden-

tificati da un'unica coppia C-G alla posizione 4 dalla base della regione staminale V2.

Il genotipo BVDV-2c, caratterizzato da uno specifico appaiamento di basi G\*U alla base della regione staminale V1 è stato riconosciuto in tre dei ceppi valutati, AZ Spl, MAD Spl e MN Fetus e sembra essere confinato ai bovini provenienti dagli Stati Uniti.

Quattordici ceppi, EBTr, MMR-T, Parvo, Rubella, CPA, CPAE, HE727, MP, BSE921, Lees, 167 237, 168 149, 173 157 e 175 375 appartengono al genotipo BVDV-2d, mostrando il caratteristico accoppiamento di basi U-A in posizione 18 della regione staminale V1.

Il genotipo BVDV-2e, limitato a sei isolamenti da bovini Sud Americani, (ceppo 34b argentino e i ceppi Soldan, LV-96, VS-260, VS-63 e VS-123.4 isolati in Brasile) è caratterizzato in V1 da G-C in posizione 12, U-A in posizione 16 e rigonfiamenti G\_G o G\_A in posizione 18.

Il genotipo BVDV-2f era rappresentato dal ceppo 354, un contaminante isolato in Argentina, caratterizzato dalla coppia A-U in posizione 9 e 12, U-A in posizione 16 e da un rigonfiamento G\_A in posizione 18 nel locus V1.

Non è stato possibile identificare il genotipo del ceppo 59386, in quanto mancante del locus V1. La presenza dell'appaiamento di

its 5'-UTR, a giraffe strain has been classified as a new cluster among *Pestivirus* species (28).

In the present study, the 5'-UTR of BVDV-2 *Pestivirus* strains, from 61 isolates from cattle and sheep, and from adventitious contaminants of biological products, were classified using PNS analysis to detect genotypic variations among species.

## Materials and methods

The 5'-UTR nucleotide sequences of the 61 *Pestivirus* isolates were obtained from the DNA databases or directly provided by the Authors. The strains, when compared to some *Pestivirus* reference strains (*Pestivirus* 1, *Pestivirus* 2, *Pestivirus* 3 or BDV and *Pestivirus* 4 or CSFV), were allocated to BVDV-2 species. According to the geographical origin of the virus isolates, 14 were reported from North America, 7 from South America, 31 from Europe, and 9 from Japan.

Strains of the nucleotide sequences tested are as follows (the accession number is given in square bracket). Forty-one strains were field isolates from cattle.

Eleven strains showed high virulence. Strains MN Fetus, AZ Spl and MAD Spl (45), strain 23025 [AF039172] (51), strain CD87 [L32887], reported together with strain 890 [L32886] by Pellerin *et al.* (43) from outbreaks of hemorrhagic syndrome in North American cattle, high virulence characterized equally NY93 [AF039173] and 17583-97 [AF039176] strains, isolated from USA cattle affected by BVD (51) and the cytopathic strain Giessen-1

**Tabella 1:** Allineamento di sequenza di RNA 5'-UTR dai ceppi di *Pestivirus* BVDV-2 WG4622 [ALIGN\_000012] e IT-1732 [AJ416018] isolati dallo stesso lotto di vaccino Bayovac IBR-Marker (Bayer), responsabile di focolai nei Paesi Bassi e in Italia. Le sequenze nucleotidiche sono identiche, e mostrano il 100% di nucleotide matching.

**Table 1:** Sequence alignment of 5'-UTR RNA from strains WG4622 [ALIGN\_000012] and IT-1732 [AJ416018] BVDV-2 *Pestivirus* isolated from the same batch of Bayovac IBR-Marker vaccine, responsible for outbreaks in the Netherlands and Italy. The nucleotide sequences are identical, showing 100% nucleotide matching.

Ceppo/Strain	Sequenze nucleotidiche/Nucleotide sequences
WG4622	AAAAGGAGGGGACTAGCGGTAGCAGTGCAGTTCGTTGGATGCCGAACCCCTGAGTACAGGGG
WG4622	AGTCGTCATAGTTCGACACTCCATTAGTCGAGGAGTCTCGAGATGCCATGTGGACGAGGGC
IT-1732	acatccttagtgcaggaggtctcgagatgccatgtggacgagggc
WG4622	ATGCCACGCGACATCTTAACCCGTGCGGGGGTTCGATGGGTGAAAGCGCTATTCGTGGCGT
IT-1732	atgccacgacacatcttaaccctgctgggggttcgatgggtgaaagcgctattcgtggcgt
WG4622	TTATGGACACAGCCTGATAGGGGTAGCAGAGACCTGCTACTCCGCTAGTAAAACTCTGCT
IT-1732	ttatggacacagcctgatagggttagcagagacctgctactccgctagtaaaactctgct

<b>V1</b>					
R	G	G	U	R	G
A U	A U	A Y	A U	R Y	A A
M Y	U Y	C Y	C C	C R	C A
<b>Y:G</b>	<b>U*G</b>	<b>U*G</b>	<b>U-A</b>	<b>G:R</b>	<b>G A</b>
<b>A:W</b>	W:A	A A	A:W	<b>G:Z</b>	<b>G A</b>
<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>U-A</b>	<b>U-A</b>
C-G	C-G	C-G	C-G	C-G	C-G
U-A	U-A	U-A	U-A	U-A	U-A
C-G	C-G	C-G	C-G	C-G	C-G
A-U	A-U	A-U	A-U	<b>G-C</b>	<b>A-U</b>
<b>C C</b>	<b>C C</b>	<b>C C</b>	<b>C C</b>	<b>C C</b>	<b>C C</b>
<b>A-U</b>	<b>A-U</b>	<b>A-U</b>	<b>A-U</b>	<b>A-U</b>	<b>A-U</b>
G-C	G-C	G-C	G:Y	G-C	<b>A-U</b>
<b>B:G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>
<b>U-AG</b>	<b>U-AG</b>	<b>U-AG</b>	<b>U-AG</b>	<b>U-AK</b>	<b>U-AG</b>
.-A	.-A	.-A	.-A	.-A	.-A
<b>U*GU</b>	<b>U*GU</b>	<b>U*GU</b>	<b>U*GU</b>	<b>U*GU</b>	<b>U*GU</b>
<b>G-C</b>	<b>G-C</b>	<b>G-C</b>	<b>G-C</b>	<b>G-C</b>	<b>G-C</b>
G-C	G-C	G-C	G-C	G-C	G-C
U-A	U-A	U-A	U-A	U-A	U-A
5'- <b><u>A-U-3'</u></b>	5'-A-U-3'	5'- <b><u>G*U-3'</u></b>	5'-R:U-3'	5'-R:W-3'	5'-A-U-3'
(BVDV-2a)	(BVDV-2b)	(BVDV-2c)	(BVDV-2d)	(BVDV-2e)	(BVDV-2f)
<b>V2</b>					
G	G	G	G	G	G
G G	G G	G G	G G	G G	G G
G Y	G U	G U	G U	G U	G U
<b>G*U</b>	<b>G*U</b>	<b>G*U</b>	<b>G*U</b>	<b>G*U</b>	<b>G*U</b>
<b>Y:G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>
<b>G-C</b>	<b>G-C</b>	<b>G-C</b>	<b>G-C</b>	<b>G-C</b>	<b>G-C</b>
U-A	Y:R	U-A	U-A	U*G	C-G
R:U	R:U	A-U	A-U	A-U	A-U
<b>U:R</b>	<b>C-G</b>	Y:G	U*G	U-A	U-A
<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>	<b>C-G</b>
C-G	C-G	C-G	C-G	C-G	C-G
5'-R:Y-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'	5'-R:U-3'	5'-A C-3'
(BVDV-2a)	(BVDV-2b)	(BVDV-2c)	(BVDV-2d)	(BVDV-2e)	(BVDV-2f)
<b>V3</b>					
U	U	U	U	Y U	U C
U Y	U C	U C	U C	U G	U A
Y R	U G	U G	U G	U G	U A
A:Y	A-U	A-U	A-U	A-U	A-U
C-G	Y:G	Y:G	C-G	C-G	C-G
C-G	C-G	C-G	C-G	Y:R	C-G
R:Y	G-C	G:Y	G-C	A-U	A-U
C-G	C-G	C-G	C-G	C-G	C-G
G:Y	G*U	G:Y	G*U	R:U	A-U
5'-A-U-3'	5'-A:Y-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'	5'-A-U-3'
(BVDV-2a)	(BVDV-2b)	(BVDV-2c)	(BVDV-2d)	(BVDV-2e)	(BVDV-2f)

**Figura 1:** Loci palindromici V1, V2 e V3 nella 5'-UTR delle specie di *Pestivirus BVDV-2*. Gli accoppiamenti di basi caratteristici del genere (PNS genere specifico) sono genere evidenziati in grassetto. I caratteristici accoppiamenti di basi della specie (PNS specie specifico) sono riportati in corsivo e grassetto. Il PNS genotipo specifico è riportato in grassetto e sottolineato. Gli accoppiamenti di basi Watson-Crick sono indicati da una lineetta (-). Gli accoppiamenti tollerati nella struttura secondaria sono indicati da un asterisco (\*). Gli accoppiamenti di basi intercambiabili sono indicati da due punti (:); M= A o C; R= A o G; W= A o U; Y= C o U; B= C o G o U.

**Figure 1:** V1, V2 and V3 palindromic loci in the 5'-UTR of the BVDV-2 Pestivirus species. Base-pairings characteristic to the genus (PNS genus-specific) are shown in bold. The characteristic base-pairings of the species (PNS species-specific) are represented in bold and italics. PNS genotype specific are shown in bold and underlined. Watson-Crick base pairings are indicated by a dash (-). Tolerated pairings in secondary structure are indicated by an asterisk (\*). Interchangeable base pairings are indicated by a colon (:). M= A or C; R= A or G; W= A or U; Y= C or U; B= C or G or U.

basi U\*G in posizione 4 di V2 non risulta determinante, poiché questo PNS, condiviso con il genotipo BVDV-2d, assume la specificità caratteristica del genotipo 2a solo quando combinato con altre due coppie di basi nel locus V1. Allo stesso modo, l'isolato IT-1732 possiede un PNS caratteristico del BVDV-2, ma il locus V1 era incompleto, così da rendere impossibile determinare l'inserimento del ceppo tra i genotipi BVDV-2. La sequenza possiede accoppiamenti di basi comuni ai genotipi BVDV-2b e BVDV-2c. In ogni modo l'allineamento della sequenza con l'RNA della 5'-UTR ottenuto dal ceppo WG4622, isolato dallo stesso lotto del vaccino Bayovac IBR-Marker, ha mostrato completa identità, con una compatibilità nucleotidica del 100% (Tabella 1), il che suggerisce che i due isolati siano espressione dello stesso ceppo.

I risultati ottenuti con la procedura PNS di genotipizzazione erano confrontabili a quelli ottenuti con l'allineamento di sequenza nucleotidica e con la costruzione dell'albero filogenetico (Figure 2 e 3).

## Discussione

L'osservazione fatta sulle sequenze nucleotidiche dei tre loci variabili al livello della regione genomica 5'-UTR del *Pestivirus* BVDV-2 ha permesso di identificare motivi di consenso condivisi da tutte le specie *Pestivirus*. Le sequenze nucleotidiche palindromiche caratteristiche sono state rispettivamente identificate a livello di genere, specie e genotipo (Tabella 2). 8 coppie di basi genere-specifiche sono state posizionate nei loci V1 e V2. Nella regione V1, sono state osservate diverse coppie comuni nelle posizioni 4 (G-C), 5 (U\*G), 7 (U-A),

8 (C-G), 10 (A-U) e 11 (rigonfiamento C\_C), dal fondo della regione staminale. Il locus variabile V1 sembrava fosse composto da uno stelo comprendente una prima ansa, costruita sul lato destro del palindromo e completata da un'ansa caratterizzata da una sequenza nucleotidica altamente variabile. Nel locus V2, le due coppie comuni C-G erano situate alle posizioni 3 e 8, a partire dal fondo della regione staminale. L'ansa di V2 era formata da una sequenza ben conservata di 5-nucleotidi, 5'-GGGGU-3'. In ogni modo questa sequenza non è caratteristica ed esclusiva del gene *Pestivirus* ed è condivisa con Human herpesvirus 1 (Herpes simplex virus 1, numero d'accesso GenBank D00374), Gallis herpesvirus (virus della malattia di Marek, numero d'accesso GenBank M74523) e Suid herpesvirus 1 (virus della pseudorabbia, numero d'accesso GenBank M34651) (25). Le sequenze nucleotidiche formanti un'ansa nei loci V1 e V3 erano altamente variabili e non adatte alla identificazione di specie, mentre le restanti coppie di basi nelle regioni staminali erano giudicate variabili. Gli accoppiamenti delle basi nella regione staminale del locus V3 non sono risultati utili ai fini della caratterizzazione del genere.

Sessantuno ceppi della specie *Pestivirus* BVDV-2 ottenuti da differenti ospiti animali di diversa origine geografica sono stati classificati secondo il metodo di genotipizzazione PNS applicato alla 5'-UTR. Nella Tabella 3 i ceppi sono elencati incluse le generalità di chi ha depositato la sequenza nell'archivio del DNA. In termini di sostituzioni nucleotidiche specifiche, è possibile differenziare sotto il profilo genetico, chiaramente e senza ambiguità, i ceppi BVDV-2 dalla specie

[AF104030] (4), isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. The strain Kosice was isolated in Slovakia from a dead 4-weeks-old calf, showing hemorrhaging and malformation (57) and strain 37Gr (sequence not deposited in GenBank) was isolated in Austria from a heifer suffering from severe diarrhea (55).

Twenty-seven strains showed low virulence, among which strains 17011-96 [AF039179], 713-2 [AF039177], 5521-95 [AF039174] and 7937 [AF039175] were isolated in the USA, from cattle showing abortions or persistent infection (51). In addition, the Italian strains BS-95-II [AJ288903] and 11/Mi/97 [AJ293603] (39) were characterized with low virulence. Japanese strains OY89 [AB003621] (40) and TC Shinozaki NCP/92 [AB042676] (41) were isolated from persistently infected calves, aged 12 and 8 months, respectively, suffering from respiratory disorders, leukopenia and mild diarrhea.

Strains BSE921, BSE341, BSE1239, isolated from cattle that presented neurological symptoms, strain WVD829, isolated from cattle suffering from respiratory distress, and strain UVR420, isolated from a calf intestine, [ALIGN\_000012], were all reported from Belgium (13).

Strains AF112, B45-5, B50-5, B52-2, B77-5, B5-4, Munich 1, Munich 2 and Munich 3 (7) were isolated in Germany.

Strains 4-5174 [AF298063] and 15-103 [AF298055] (58) were isolated in France. Data on related clinical symptoms were not available.

Six strains were isolated in South America, strain 34b [AF244952] (34) in Argentina, strains Soldan [U94914] (C. W. Canal *et al.*, unpublished findings), LV-96 [AF410787], VS-260 [AF410788], VS-63 [AF410789] and VS-123.4 [AF410790] (18) in Brazil.

Height strains originated from sheep. Strain C413 [AF002227], noncytopathic in cultured MDBK cells was originally isolated from a diseased lamb in north-western USA and deposited by Y. Chen and E.S. Berry (unpublished findings), strain BD-78 [U18330] (48) was originally



		10	20	30	40	50	
BS-95-II	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
CD87	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
Giessen-1	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
OY89	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
TC Shinozaki	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
4-5174	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
17011	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
713	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
17583	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
23025	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
890	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
BD78	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
NY93	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
SCP	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
AzSpl	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
MadSpl	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
MnFetus	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
EBTr	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
HE727	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
Lees	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
MMR-T	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
Parvo	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
Rubella	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
168149	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
173157	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
34b	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
LV-96	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
Soldan	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
VS-260	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50
354	1	AGTCGTC	GGTTCGACA	TCCATCAGT	GAGGAGTCTC	GAGATGCCAT	50

		60	70	80	90	100	
BS-95-II	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
CD87	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
Giessen-1	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
OY89	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
TC Shinozaki	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
4-5174	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
17011	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
713	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
17583	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
23025	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
890	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
BD78	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
NY93	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
SCP	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
AzSpl	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
MadSpl	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
MnFetus	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
EBTr	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
HE727	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
Lees	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
MMR-T	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
Parvo	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
Rubella	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
168149	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
173157	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
34b	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
LV-96	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
Soldan	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
VS-260	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100
354	51	GTGGACGAGG	GCATGCCCAA	GGCACATCTT	AACCTATGGG	GGGGTTGCAT	100

		110	120	130	140	150	
BS-95-II	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
CD87	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
Giessen-1	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
OY89	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
TC Shinozaki	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
4-5174	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
17011	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
713	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
17583	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
23025	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
890	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
BD78	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
NY93	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
SCP	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
AzSpl	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
MadSpl	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
MnFetus	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
EBTr	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
HE727	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
Lees	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
MMR-T	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
Parvo	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
Rubella	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
168149	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
173157	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
34b	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
LV-96	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
Soldan	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
VS-260	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150
354	101	AGGTGAAAGG	GCCATTCGCT	GGCGTTATGG	ACACAGCCTG	A.....	150

Figura 2: Allineamento delle sequenze nucleotidiche nella 5'-UTR dei ceppi BVDV-2. I nucleotidi identici in due delle tre sequenze sono mostrati con caratteri invertiti. I numeri della sequenza nucleotidica derivano da un allineamento di consenso. Le lineeette rappresentano gli spazi tra i nucleotidi adiacenti introdotti per ottenere l'allineamento massimo.

Figure 2: Nucleotide sequence alignment for the 5'-UTR of BVDV-2 strains. Nucleotides that are identical in two out of three sequences are shown as inverted characters. The nucleotide sequence numbers are given from a consensus alignment. Dashes represent spacers between adjacent nucleotides introduced for maximum alignment.



**Tabella 2:** Sostituzioni nucleotidiche palindromiche (PNS) caratteristiche del genere *Pestivirus*, la specie BVDV-2 e i genotipi. La posizione delle coppie di basi è definita numerando a partire dalla base del locus variabile R= A o G; Y= C o U.

**Table 2:** Palindromic nucleotide substitutions (PNS) characteristic to the *Pestivirus* genus, BVDV-2 species and genotypes. The position of base-pairings is defined by numbering from the bottom of the variable locus R= A or G; Y= C or U.

Livello di caratterizzazione PNS PNS characterization level	Locus Locus	Posizione Position	Paia di basi Base pair	Eccezioni Exceptions
PNS caratteristico per il genere Genus characteristic PNS:				
	V1	11	C_C rigonfiamento/ <i>bulge</i>	
		10	A-U	
		8	C-G	BVDV-2a ceppo/ <i>strain</i> 11/Mi/97: U*G; BVDV-2a ceppo/ <i>strains</i> WVD829: G_G rigonfiamento/ <i>bulge</i>
		7	U-A	BVDV-1b ceppo/ <i>strain</i> Sanders: A_A rigonfiamento/ <i>bulge</i>
		5	U*G	
		4	G-C	
	V2	8	C-G	BVDV-2a ceppo/ <i>strain</i> 713-2: U*G
		3	C-G	BVDV-1a ceppo/ <i>strain</i> 20F: U*G BVDV-1b ceppo/ <i>strain</i> F26:U*G
PNS caratteristico per la specie Species characteristic PNS:				
	V1	16	C-G - U-A	
	V2	9	G*U	
PNS caratteristico per il genotipo Genotype characteristic PNS:				
BVDV-2a:	V1	1	A-U	
		18	Y:G	
	V2	4	U:R	
BVDV-2b:	V2	4	C-G	
BVDV-2c:	V1	1	G*U	
BVDV-2d:	V1	18	U-A	
BVDV-2e:	V1	12	G-C	
		16	U-A	
		18	G_G - G_A rigonfiamenti/ <i>bulges</i>	
BVDV-2f:	V1	9	A-U	
		12	A-U	
		16	U-A	
		18	G_A rigonfiamento/ <i>bulge</i>	

BVDV-1. I risultati ottenuti per mezzo del metodo PNS sono risultati confrontabili con quelli ottenuti da analisi eseguite mediante allineamento di sequenza e costruzione degli alberi filogenetici (Figure 2 e 3). BVDV-2 condivide una coppia C-G comune al locus V1, e una coppia G\*U comune al locus V2. 6 genotipi, BVDV-2a, BVDV-2b, BVDV-2c, BVDV-2d, BVDV-2e e BVDV-2f sono stati classificati come appartenenti alla specie BVDV-2 mediante il metodo PNS. BVDV-2b è stato identificato da un'unica coppia C-G in posizione 4. BVDV-2c, limitato ad isolati provenienti da bovini nord americani,

è stato riconosciuto sulla base della coppia G\*U, localizzata alla base della regione staminale V1. Allo stesso modo, BVDV-2d è stato identificato da una coppia U-A in posizione 18 della regione staminale V1. Il genotipo BVDV-2e, limitato ad isolati provenienti da bovini sud americani, è stato caratterizzato in V1 da G-C in posizione 12, U-A in posizione 16 e rigonfiamenti G\_G o G\_A in posizione 18. Il genotipo BVDV-2f, limitato all'Argentina, era caratterizzato in V1 da una coppia A-U in posizione 9 e 12, U-A in posizione 16 e da un rigonfiamento G\_A in posizione 18. Il genotipo BVDV-2a non presentava il

isolated in 1978 from a six-week-old Suffolk lamb from Idaho affected by Border disease (16). It was previously characterized as Border disease virus due to its polypeptides (1). Strain 59386 [U17146] was deposited by Becher *et al.* (3), strains Lees [U65051], 167 237 [U65055], 168 149 [U65056], 173 157 [U65058], 175 375 [U65059], deposited by Vilcek *et al.* (56), were isolated from Border disease outbreaks.

Twelve strains were detected as contaminants of cell cultures and biological products. Strain SCP [U17148] (3), was isolated from a sheep chorioid plexus cell line in England. Strain IT-1732 [AJ416018] (M.M. Muscillo, unpublished findings) was isolated from a Bayovac IBR-Marker vaccine (Bayer), responsible for outbreaks in the Netherlands and

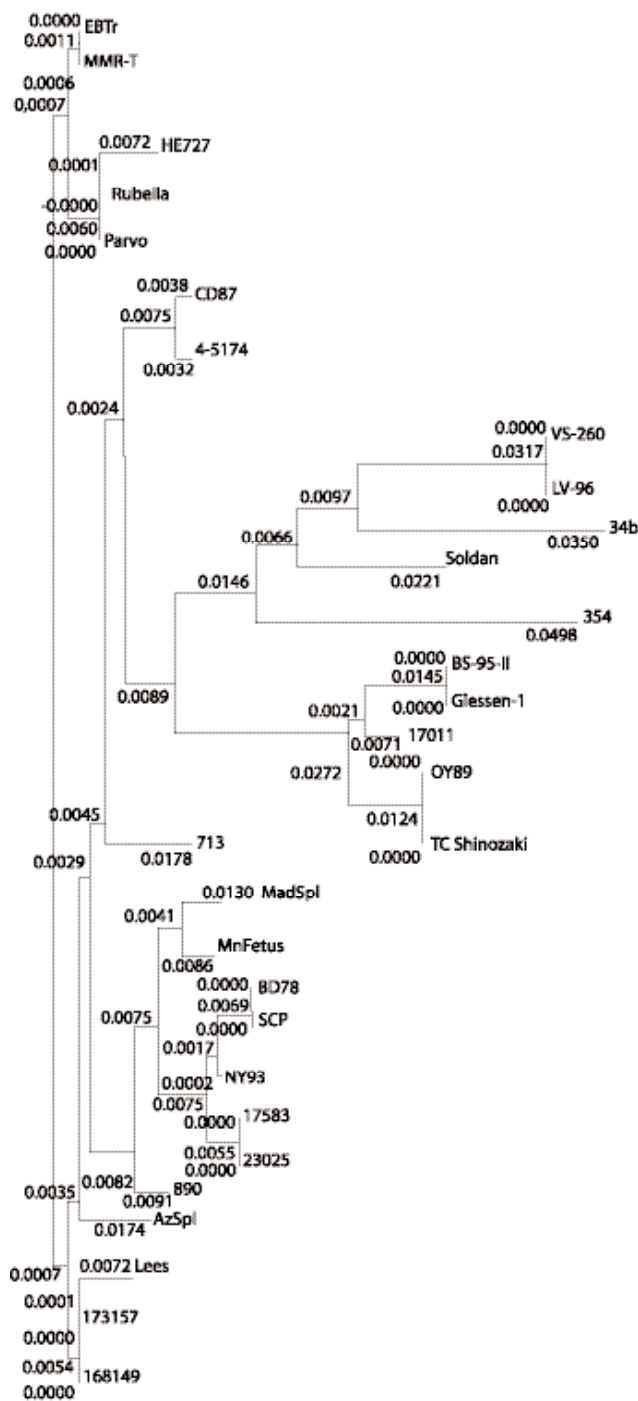
caratteristico accoppiamento delle basi e poteva essere considerato il prototipo nella specie. Allo scopo di definire un criterio di base per la classificazione, questo genotipo è stato identificato mediante una specifica combinazione di coppie di basi all'interno della sequenza; se considerate separatamente le coppie non erano specifiche. La combinazione specifica per l'identificazione del genotipo BVDV-2a consisteva in tre coppie di basi (A-U in posizione 1 e C-G o U\*G in posizione 18 in V1 e U\*G o U-A in posizione 4 in V2).

Nella Figura 1 sono mostrati i loci palindromici V1, V2 e V3 nella 5'-UTR della specie *Pestivirus* BVDV-2. Le coppie di basi caratteristiche del genere (PNS genere specifiche) e quelle caratteristiche per le specie BVDV-2 (PNS specie specifiche) sono rappresentate all'interno dei 6 genotipi BVDV-2a, BVDV-2b, BVDV-2c, BVDV-2d, BVDV-2e e BVDV-2f.

Nel presente studio, applicando l'analisi fondata sulla struttura secondaria presente nella 5'-UTR, i ceppi BVDV-2 provenienti dal Belgio e depositati da Couvreur *et al.*, (13) sono stati attribuiti ai genotipi BVDV-2a (UVR420, WVD829, BVD341 e BVD1239), BVDV-2b (WG4622) e BVDV-2d (MP e BVDV951). L'autore segnala che, utilizzando l'analisi della sequenza primaria nelle regioni 5'-UTR ed E2, non è stato possibile identificare alcun sub-tipo all'interno dei ceppi BVDV-2, persino includendo i ceppi pubblicati SCP e Giessen-1. Becher *et al.*, (2) hanno identificato i due sottotipi 2a e 2b di BVDV-2 sulla base dell'analisi della sequenza primaria di E2 e Npro. I ceppi SCP e Giessen 1 sono stati attribuiti nel sottotipo 2a. Sulla base del metodo PNS, entrambi i ceppi risultano appar-

tenenti al genotipo 2a. In ogni modo la classificazione proposta da Becher attribuisce al sottogruppo 2a i ceppi bovini e ovini isolati negli Stati Uniti, Canada ed Europa; solo 3 ceppi provenienti dal Panama sono stati inclusi nel

Italy (17). Strain WG4622 [ALIGN\_000012] (13) was isolated from the same batch of Bayovac IBR-Marker vaccine and MP [ALIGN\_000012] (13) was isolated from SV40-transformed bovine macrophage cell line. Strains EBTr



**Figura 3:** Albero filogenetico costruito a partire dalla 5'-UTR dei ceppi BVDV-2, segregato in cinque genovars BVDV-2a, BVDV-2b, BVDV-2c, BVDV-2d e BVDV-2e, secondo il metodo UPGMA. I numeri ai nodi delle catene ramificate sono valori bootstrap ottenuti da 1.000 repliche.

**Figure 3:** Phylogenetic tree constructed from the 5'-UTR of BVDV-2 strains, segregated into five genovars, BVDV-2a, BVDV-2b, BVDV-2c, BVDV-2d and BVDV-2e, according to the UPGMA. The numbers at the nodes of branches are bootstrap values obtained from 1,000 replications.

sottogruppo 2b.

Gli isolamenti del Sud America rappresentano due gruppi ben distinti. Variazioni nucleotidiche rilevanti nella struttura secondaria erano evidenti al livello del locus palindromico V1. Ciò corrisponde all'osservazione sull'analisi della struttura primaria riportata da Flores *et al.* (18). L'autore ha segregato i ceppi sud americani nel genotipo 2b e tutti gli altri ceppi provenienti da Asia, Europa e Nord America nel genotipo 2a.

La genotipizzazione basata sulla 5'-UTR dovrebbe essere valida anche per la regione codificante le proteine strutturali, come dimostrato dalla somiglianza della topologia degli alberi costruiti sia dal terminale aminico di E2 che dalla sequenza nucleotidica parziale della 5'-UTR (13). In ogni caso, le analisi basate sulle altre regioni genomiche potrebbero essere di minore significato o generare confusione, se considerate separatamente dalla 5'-UTR. Sulla base della sequenza E2, il ceppo MP divergeva da BVDV-2, caratteristica non osservata nella 5'-UTR ed era efficientemente neutralizzato da anti-sieri anti-BVDV-2 (13). Tuttavia E2 e Npro potrebbero fornire indicazioni preziose nel caso in cui si ottengano risultati non chiari analizzando la 5'-UTR. Inoltre la standardizzazione dei primers per la 5'-UTR eviterebbe la mancanza di importanti frazioni di sequenza e potrebbe creare difficoltà per l'applicazione delle procedure d'identificazione particolarmente nel caso del metodo PNS, a causa dell'assenza parziale o totale del locus V3 o più frequentemente del locus V1.

Nello studio presente, 8 ceppi BVDV-2 erano stati ottenuti da ovini. L'analisi di sequenza ha mostrato che solo BVDV-2b e BVDV-2d, circolavano nelle

pecore, mentre i genotipi BVDV-2a, BVDV-2b e BVDV-2c erano più frequenti nei bovini. I ceppi sono stati isolati da animali affetti da Border disease, con sintomi analoghi a quelli provocati dal BDV, creando in questo modo confusione nella diagnosi. Tra i ceppi BDV precedentemente classificati sulla base della specie ospite, la presenza di altre specie di *Pestivirus* è stata dubitata per lungo tempo (12, 15, 46). Termini tecnici quali "vero" BDV e "BDV atipico" sono stati utilizzati da Thiel e dai suoi colleghi (3, 5, 6) per discriminare i ceppi BDV autentici da quelli falsi. Questa confusione è stata ulteriormente chiarita per mezzo di analisi filogenetiche della regione E2 (gp53), del gene Npro o della 5'-UTR dei *Pestivirus* ovini, ed è stato dimostrato che i ceppi BDV classificati in precedenza includono BVDV (6, 50, 56). In uno studio recente, utilizzando la procedura di genotipizzazione PNS, gli isolati ovini hanno mostrato la struttura palindromica nella 5'-UTR caratteristica di genovars BVDV-1a e BVDV-1b, e di BVDV-2 (21). Il numero di ceppi BVDV-2 isolati da ovini e riportati finora è piuttosto limitato. Inoltre non è escluso che i 5 ceppi ovini riportati da Vilcek *et al.* (56) derivino dalla contaminazione di siero fetale bovino avvenuta durante la coltivazione delle cellule (54). Perciò occorre una particolare attenzione nell'eseguire l'isolamento su cellula. Un approccio utile in presenza di casi clinici di Border disease potrebbe essere il dosaggio RT-PCR per una rapida individuazione del virus in campioni di sangue o in omogenati del tessuto originale senza previo passaggio su cellule.

Dodici ceppi BVDV-2 sono stati individuati come contaminanti di colture di tessuto e pro-

[D50817] (31), MMR-T [D26052] (32), Parvo [D26614] and Rubella [D26048] (24), CPA [D50812], CPAE [D50813] and HE727 [D31807] (27) were isolated in Japan. Strain 354 [AF244959] (34) was isolated in Argentina.

The secondary structures were predicted according to the algorithm of Zuker and Stiegler (60). The minimum free energy was calculated by the method of Freier *et al.* (19). Three variable regions (V1, V2 and V3) at the 5'-UTR were used for genotyping based on palindromic nucleotide substitutions (30). The base-pairings were defined by numbering from the bottom of each variable locus. Nucleotide sequences were aligned by the Clustal V (33) using DNASIS program package (Hitachi Software Engineering, Japan). A phylogenetic tree was constructed by the unweighed pair-group method, using the arithmetic averages method (UPGMA) as developed by Sneath and Sokal (47).

## Results

According to PNS analysis, the evaluation of the BVDV-2 *Pestivirus* strain 5'-UTR nucleotide sequences enabled the correct allocation of the species among genotypes.

All the tested strains shared the characteristic two base-pairings common to BVDV-2 species, a C-G or U-A pairing which was common to the V1 locus in position 16, and a G\*U pairing common to the V2 locus in position 9. They were easily distinguished from the BVDV-1 species which shared a species characteristic PNS U-A pairing, common to the V1 locus in position 15, a G-C pairing in position 5 common to the V2 and V3 loci. BDV species shared a U-A or U\*G base pairing in position 2 in V2.

The isolates were classified within BVDV-2 by the PNS method into six genotypes, namely: BVDV-2a, BVDV-2b, BVDV-2c, BVDV-2d, BVDV-2e and BVDV-2f. Figure 1 shows the V1, V2 and V3 palindromic loci in the 5'-UTR of the BVDV-2 *Pestivirus* species. The strains BVDV-2a 11/Mi/97, WG4622 and 713-2 were exceptions for genus-specific base-pairings. In the V1 locus, instead of C-G in position 8,



**Tabella 3:** Metodo per la valutazione genetica basato su sostituzioni nucleotidiche palindromiche (PNS). Ceppi di *Pestivirus* BVDV-2 classificati secondo il metodo PNS alla regione non tradotta 5' del RNA.

**Table 3:** Palindromic nucleotide substitution (PNS) method for genetic evaluation. BVDV-2 *Pestivirus* strains classified according to the PNS method at the 5' untranslated region of RNA.

Genotipo Genotype	Ceppo Strain	Origine Origin	Paese Country	Accesso Accession	Bibliografia Reference
BVDV-2a	UVR420	Bovino/Cattle	Belgio/Belgium	ALIGN_000012	13
BVDV-2a	WVD829	Bovino/Cattle	Belgio/Belgium	ALIGN_000012	13
BVDV-2a	BSE341	Bovino/Cattle	Belgio/Belgium	ALIGN_000012	13
BVDV-2a	BSE1239	Bovino/Cattle	Belgio/Belgium	ALIGN_000012	13
BVDV-2a	CD87	Bovino/Cattle	Canada	L32887	43
BVDV-2a	4-5174	Bovino/Cattle	Francia/France	AF298063	58
BVDV-2a	Giessen-1	Bovino/Cattle	Germania/Germany	AF104030	4
BVDV-2a	AF112	Bovino/Cattle	Germania/Germany		7
BVDV-2a	B45-5	Bovino/Cattle	Germania/Germany		7
BVDV-2a	B50-5	Bovino/Cattle	Germania/Germany		7
BVDV-2a	B52-2	Bovino/Cattle	Germania/Germany		7
BVDV-2a	B77-5	Bovino/Cattle	Germania/Germany		7
BVDV-2a	B5-4	Bovino/Cattle	Germania/Germany		7
BVDV-2a	Munich 1	Bovino/Cattle	Germania/Germany		7
BVDV-2a	Munich 2	Bovino/Cattle	Germania/Germany		7
BVDV-2a	Munich 3	Bovino/Cattle	Germania/Germany		7
BVDV-2a	OY89	Bovino/Cattle	Giappone/Japan	AB003621	40
BVDV-2a	TC Shinozaki	Bovino/Cattle	Giappone/Japan	AB04267	41
BVDV-2a	BS-95-II	Bovino/Cattle	Italy/Italy	AJ288903	39
BVDV-2a	11/Mi/97	Bovino/Cattle	Italy/Italy	AJ293603	39
BVDV-2a	17011-96	Bovino/Cattle	USA	AF039179	51
BVDV-2a	713-2	Bovino/Cattle	USA	AF039177	51
BVDV-2a	5521-95	Bovino/Cattle	USA	AF039174	51
BVDV-2a	7937	Bovino/Cattle	USA	AF039175	51
BVDV-2a	SCP	Contaminante/Contaminant	Inghilterra/UK	U17148	3
BVDV-2b	37Gr	Bovino/Cattle	Austria		55
BVDV-2b	890	Bovino/Cattle	Canada	L32886	43
BVDV-2b	15-103	Bovino/Cattle	Francia/France	AF298055	58
BVDV-2b	Kosice	Bovino/Cattle	Slovacchia/Slovakia		57
BVDV-2b	23025	Bovino/Cattle	USA	AF039172	51
BVDV-2b	NY93	Bovino/Cattle	USA	AF039173	51
BVDV-2b	17583-97	Bovino/Cattle	USA	AF039176	51
BVDV-2b	BD-78	Pecora/Sheep	USA	U18330	48
BVDV-2b	C413	Pecora/Sheep	USA	AF002227	Y.Chen e E.S.Berry*
BVDV-2b	WG4622	Contaminante/Contaminant	Paesi Bassi/Netherland	ALIGN_000012	13
BVDV-2c	AZ Spl	Bovino/Cattle	USA		45
BVDV-2c	MAD Spl	Bovino/Cattle	USA		45
BVDV-2c	MN Fetus	Bovino/Cattle	USA		45
BVDV-2d	BSE921	Bovino/Cattle	Belgio/Belgium	ALIGN_000012	13
BVDV-2d	Lees	Pecora/Sheep	Inghilterra/UK	U65051	56
BVDV-2d	167 237	Pecora/Sheep	Inghilterra/UK	U65055	56
BVDV-2d	168 149	Pecora/Sheep	Inghilterra/UK	U65056	56
BVDV-2d	173 157	Pecora/Sheep	Inghilterra/UK	U65058	56
BVDV-2d	175 375	Pecora/Sheep	Inghilterra/UK	U65059	56
BVDV-2d	MP	Contaminante/Contaminant	Belgio/Belgium	ALIGN_000012	13
BVDV-2d	EBTr	Contaminante/Contaminant	Giappone/Japan	D50817	31
BVDV-2d	MMR-T	Contaminante/Contaminant	Giappone/Japan	D26052	32
BVDV-2d	Parvo	Contaminante/Contaminant	Giappone/Japan	D26614	24
BVDV-2d	Rubella	Contaminante/Contaminant	Giappone/Japan	D26048	24
BVDV-2d	CPA	Contaminante/Contaminant	Giappone/Japan	D50812	27
BVDV-2d	CPAE	Contaminante/Contaminant	Giappone/Japan	D50813	27
BVDV-2d	HE727	Contaminante/Contaminant	Giappone/Japan	D31807	27
BVDV-2e	34b	Bovino/Cattle	Argentina	AF244952	34
BVDV-2e	Soldan	Bovino/Cattle	Brasile/Brazil	U94914	C.W. Canal et al.*
BVDV-2e	LV-96	Bovino/Cattle	Brasile/Brazil	AF410787	18
BVDV-2e	VS-260	Bovino/Cattle	Brasile/Brazil	AF410788	18
BVDV-2e	VS-63	Bovino/Cattle	Brasile/Brazil	AF410789	18
BVDV-2e	VS-123.4	Bovino/Cattle	Brasile/Brazil	AF410790	18
BVDV-2f	354	Contaminante/Contaminant	Argentina	AF244959	34
BVDV-2 ND	IT-1732	Contaminante/Contaminant	Italia/Italy	AJ416018	M.M. Muscillo*
BVDV-2 ND	59386	Pecora/Sheep	Inghilterra/UK	U17146	3

ND = non determinato/not determined

\* = dati non pubblicati/unpublished

dotti biologici. 4 derivano da segnalazioni europee, 7 provenivano dal Giappone ed 1 dall'Argentina. La contaminazione da BVDV-2 di prodotti biologici, di colture di tessuto, di colture cellulari primarie e linee cellulari, incluse quelle di origine umana (3, 13, 27, 31) e di vaccini per uso veterinario (17, 24) costituisce un problema rilevante. Segnalazioni precedenti indicavano la contaminazione da BVDV in vaccini per uso veterinario (35, 38, 52, 59), ma non erano in grado di specificare le specie di BVDV coinvolte. RNA derivante da *Pestivirus* è stato scoperto in Giappone in vaccini attenuati per uso umano (24, 32). La fonte più probabile di contaminazione sembra sia il siero fetale bovino, comunemente utilizzato come supplemento per le colture cellulari, infettato da BVDV non citopatico (8, 10, 42). Queste scoperte indicano che la contaminazione da *Pestivirus* animali può verificarsi in prodotti biologici per uso veterinario ed umano e che il problema sembra avere diffusione mondiale. Perciò si raccomanda ai produttori di adottare un monitoraggio accurato nei confronti di *Pestivirus* avventizi.

Questo riguarda in particolare l'alta virulenza espressa da alcuni ceppi della specie BVDV-2 agenti causali di sindrome emorragica nel bestiame; caratteristica condivisa anche dai ceppi BVDV-1 della serie Culi (Culi1, Culi4 e Culi6) (23, 36), e i ceppi L256 e Marloie (37). In ogni modo l'infezione sperimentale utilizzando ceppi BVDV-2 ha riprodotto la malattia in vitelli BVDV-free, ma non ceppi BVDV-1 (23), suggerendo che l'induzione di sindromi emorragiche sporadiche ad opera di ceppi BVDV-1 richiede la presenza di numerosi co-fattori, mentre quando la sindrome emorragica

compare in forma epidemica, BVDV ne costituisce la causa primaria. In termini di sequenza nucleotidica ancora non è chiara la definizione della virulenza nelle specie BVDV-2. Analogamente, i ceppi BVDV-1 associati con forme sporadiche di sindrome emorragica non hanno potuto essere raggruppati esclusivamente in nuovi sottogruppi (13).

I loci palindromici rappresentavano, insieme a 77-85 nucleotidi, una porzione molto limitata del genoma virale. All'interno di queste brevi sequenze era sufficiente valutare solo 18 nucleotidi per ottenere con certezza la caratterizzazione del genere. Le specie erano caratterizzate dall'esame di un minimo di 2 fino ad un massimo di 8 nucleotidi. Analogamente il genotipo era definito solamente da 2 a 6 nucleotidi. Questi aspetti particolari confermano l'alta specificità del metodo PNS e l'attendibilità dei risultati forniti.

L'analisi delle sostituzioni nucleotidiche palindromiche nella 5'-UTR si è dimostrata un approccio razionale e semplice per le ricerche virali. Le strutture secondarie predette nelle tre regioni variabili della 5'-UTR hanno mostrato PNS tipici utili per la classificazione o la genotipizzazione dei *Pestivirus*. E' perciò importante comprendere gli aspetti genetici di questi virus, nonché la loro storia evolutiva, a motivo del loro impatto economico negativo e delle difficoltà legate al controllo delle malattie da essi causate. Le variazioni genetiche tra i ceppi di *Pestivirus* all'interno di aree geograficamente circoscritte potrebbero migliorare la nostra comprensione dell'evoluzione del virus. Analogamente, la struttura molecolare di virus isolati da Ruminanti selvatici, quando paragonata a quella dei virus isolati da bovini ed altri ani-

strain 11/Mi/97 showed U\*G; and strain WVD829 a G G bulge; in the V2 locus, instead of C-G in position 8, strain 713-2 showed U instead of C.

Twenty-five strains of the 61 tested, 17011-96, 713-2, 5521-95, 7937, CD87, BS-95-II, 11/Mi/97, OY89, 4-5174, Giessen-1, UVR420, WVD829, BSE341, BSE1239, AF112, B45-5, B50-5, B52-2, B77-5, B5-4, Munich 1, Munich 2 and Munich 3, TC Shinozaki NCP/92 and SCP, belonged to the genotype BVDV-2a. The strains showed the BVDV 2a genotype specific combination of three base pairings (A-U in position 1 and Y:G in position 18 in V1 and U:R in position 4 in V2). Ten strains, BD-78, 890, WG4622, 23025, NY93, 17583-97, 15-103, Kosice, 37Gr and C413, belonged to the BVDV-2b. The strains were identified by a unique C-G pairing at position 4 from the bottom of the V2 stem region.

The BVDV-2c genotype, characterized by a specific base-pairing G\*U at the bottom of the V1 stem was recognized in three strains, AZ Spl, MAD Spl and MN Fetus, and appeared to be confined to cattle from USA. Fourteen strains, EBTr, MMR-T, Parvo, Rubella, CPA, CPAE, HE727, MP, BSE921, Lees, 167 237, 168 149, 173 157 and 175 375, belonged to the BVDV-2d showing characteristic U-A pairing at position 18 of the V1 stem region.

Genotype BVDV-2e, limited to six South American cattle isolates, strain 34b from Argentina and strains Soldan, LV-96, VS-260, VS-63 and VS-123.4 from Brazil, was characterized in V1 by G-C in position 12, U-A in position 16 and G\_G or G\_A bulges in position 18. Genotype BVDV-2f was represented by strain 354, a contaminant isolated in Argentina, characterized by A-U pairing in position 9, A-U in position 12, U-A in position 16 and G\_A bulge in position 18 in the V1 locus.

The genotype of strain 59386 could not be identified, due to the absence of V1 locus. The presence of U\*G base-pairing in position 4 of V2 was not determinant, since this PNS, shared with genotype BVDV-2d, assumes characteristic specificity for genotype 2a only when combined to

mali domestici sensibili, potrebbe rivelare aspetti interessanti, dovuti al frequente spostamento e mescolamento di questi animali. L'identificazione dei tipi o sottotipi virali sulla base di variazioni genetiche potrebbe migliorare la nostra conoscenza dell'epidemiologia dei *Pestivirus* e fornire marcatori per differenze biologiche, quali la virulenza.

## Bibliografia/References

1. Akkina R.K. & K.P. Raisch (1990). - Intracellular virus-induced polypeptide of *pestivirus* border disease virus. *Virus Res.*, **16**: 95-106.
2. Becher P., A.D. Shannon, N. Tautz & H.-J. Thiel (1994). - Molecular characterization of border disease virus, a *pestivirus* from sheep. *Virology*, **198**: 542-551.
3. Becher P., M. König, D.J. Paton & H.-J. Thiel (1995). - Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus *pestivirus*. *Virology*, **209**: 200-206.
4. Becher P., M. Orlich, A.D. Shannon, G. Hornet, M. Koning & H.-J. Thiel (1997). - Phylogenetic analysis of *pestivirus* from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.*, **78**: 1357-1366.
5. Becher P., M. Orlich, M. König & H.-J. Thiel (1999). - Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhoea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J. Virol.*, **73** (7): 5646-5653.
6. Becher P., M. Orlich, A. Kosmidou, M. König, M. Baroth & H.-J. Thiel (1999). - Genetic diversity of *pestiviruses*: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, **262**: 64-71.
7. Beer M., G. Wolf & O.R. Kaaden (2002). - Phylogenetic analysis of the 5' untranslated region of German BVDV type 2 isolates. *J. Vet. Med.*, **49**: 43-47.
8. Bolin S.R., P.J. Matthews & J.F. Ridpath (1991). - Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **3**: 199-203.
9. Bolin S.R. & J.F. Ridpath (1992). - Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *A. J. Vet. Res.*, **53**: 2157-2163.
10. Bolin S.R. & J.F. Ridpath (1998). - Prevalence of bovine viral diarrhoea Virus genotypes and antibody those viral genotypes in fetal bovine Serum. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**: 135-139.
11. Broes A., G. Wellemans & J. Dheedene (1992). - Syndrome hémorragique chez des bovins infectés par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD/MD). *Ann. Méd. Vét.*, **137**: 33-38.
12. Carlsson U. (1991). - Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, **128**: 145-147.
13. Couvreur B., C. Letellier, A. Colard, P. Quenon, P. Dehan, C. Hamers, P.P. Pastoret & P. Kerkhofs (2002). - Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res.*, **85**: 17-28.
14. Deng R. & K.V. Brock (1992). - Molecular cloning and nucleotide sequence of the *pestivirus* genome, non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology*, **191**: 867-879.
15. Edwards S., P.M. Roehle & G. Iyata (1995). - Comparative studies of border disease and closely related virus infections in experimental pigs and sheep. *Brit. Vet. J.*, **151**: 181-188.
16. Evermann J.F. (1996). - Monitoring vaccines, diagnostic reagents and biotherapeutics for contaminating viruses. *Brit. Vet. J.*, **152**: 131-134.
17. Falcone E., M. Tollis & G. Conti (2000). - Bovine Viral Diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine*, **18**: 387-388.
18. Flores E.F., J.F. Ridpath, R. Weiblen, F.S.F. Vogel & L.H.V.G. Gil (2002). - Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.*, **87**: 51-60.
19. Freier S.M., R. Kierzek, J.A. Jaeger, N. Sugimoto, M.H. Caruthers, T. Neilson & D.H. Turner (1986). - Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 9373-9377.
20. Giangaspero M., R. Harasawa & A. Verhulst (1997). - Genotypic characteristics of the 5' untranslated region of a *pestivirus* strain isolated from human leucocytes. *Microbiol. Immunol.*, **40**: 829-834.
21. Giangaspero M., G. Vacirca, R. Harasawa, M. Büttner, A. Panuccio, C. De Giuli Morghen, A. Zanetti, A. Belloli & A. Verhulst (2001). - Genotypes of *Pestivirus* RNA detected in live virus vaccines for human use. *J. Vet. Med. Sci.*, **63** (7): 723-733.
22. Giangaspero M. & R. Harasawa (2002). - Eterogeneità dei *Pestivirus* ovini. *Vet. Ital.*, **38** (45-46): 60-65.
23. Hamers C., B. Couvreur, P. Dehan, C. Letellier, P. Lewalle, P.P. two other base-pairs in V1 locus. Similarly, the isolate IT-1732 showed BVDV-2 characteristic PNS, but the V1 locus was incomplete, thus it was not possible to determine whether the strain belonged to the BVDV-2 genotypes. The sequence showed base-pairs common to genotypes BVDV-2b and BVDV-2c. However, the sequence alignment with the 5'-UTR RNA from strain WG4622, isolated from the same batch of Bayovac IBR-Marker vaccine, showed complete identity, with 100% nucleotide matching (Table I), suggesting that the two isolates were an expression of the same strain.

The results obtained by PNS genotyping were comparable with those obtained by nucleotide sequence alignment and construction of a phylogenetic tree (Fig. 2 and 3).

## Discussion

The observation made on the nucleotide sequences of the three variable loci at the level of the 5'-UTR genomic region of BVDV-2 *Pestivirus* strains enabled the identification of consensus motifs shared by all the *Pestivirus* species. The characteristic PNS were identified at genus, species and genotype levels, respectively (Table II). Eight genus specific base-pairings were positioned in the V1 and V2 loci. In the V1 region, there were several common base-pairings at positions 4 (G-C), 5 (U\*G), 7 (U-A), 8 (C-G), 10 (A-U) and 11 (C\_C bulge) from the bottom of the stem. The V1 variable locus appeared to be composed by a stem including a first loop, constructed on the right side of the palindrome, and completed by a loop with high variable nucleotide sequence. In the V2 locus, two common C-G pairings were located at positions 3 and 8 from the bottom of the stem. The loop of V2 was formed by a well conserved 5-nucleotide sequence, 5'-GGGGU-3'. However, this sequence was not characteristic and exclusive for the genus *Pestivirus* and shared with the Human herpesvirus 1 (Herpes simplex virus 1, GenBank accession D00374), Gallid herpesvirus (Marek's disease virus, GenBank accession M74523) and Suid herpesvirus 1 (Pseudorabies



- Pastoret & P. Kerkhofs** (2000). - Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea viral strains isolated from haemorrhagic syndrome. *Vet. J.*, **160**: 250-258.
24. **Harasawa R.** (1994). - Comparative analysis of the 5' non-coding region of *pestivirus* RNA detected from live virus vaccines. *J. Vet. Med. Sci.*, **56**: 961-964.
25. **Harasawa R.** (1995). - Phylogenetic analysis of *pestivirus* based on the 5' untranslated region. *Acta virol.*, **40**: 49-54.
26. **Harasawa R.** (1996). - Phylogenetic analysis of *pestivirus* based on the 5' untranslated region. *Acta Virol.*, **40**: 49-54.
27. **Harasawa R., K. Hikiji, H. Tanabe, Y. Takada & H. Mizusawa** (1993). - Detection of adventitious *pestivirus* in cell cultures by polymerase chain reaction using nested-pair primers. *Tissue Cult. Res. Comm.*, **12**: 215-220.
28. **Harasawa R. & T. Tomiyama** (1994). - Evidence of *pestivirus* RNA in human virus vaccines. *J. Clin. Microbiol.*, **32**: 1604-1605.
29. **Harasawa R. & H. Mizusawa** (1995). - Demonstration and genotyping of *pestivirus* RNA from mammalian cell lines. *Microbiol. Immunol.*, **39**: 979-985.
30. **Harasawa R. & T. Sasaki** (1995). - Sequence analysis of the 5' untranslated region of *pestivirus* RNA demonstrated in interferons for human use. *Biologicals*, **23**: 263-269.
31. **Harasawa R. & M. Giangaspero** (1998). - A novel method for *pestivirus* genotyping based on palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. *J. Virol. Methods*, **70**: 225-230.
32. **Harasawa R., M. Giangaspero, G. Ibata & P.J. Paton** (2000). - Giraffe strain of *pestivirus*. Its taxonomic status based on the 5' untranslated region. *Microbiol. Immunol.* **44** (11): 915-921.
33. **Higgins D.G., A.J. Bleasby & R. Fouchs** (1992). - Clustal V: Improved software for multiple alignment. *Comp. Appl. Biol. Sci.*, **8**: 189-191.
34. **Jones L.R., R. Zandomeni & E.L. Weber** (2001). - Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Vet. Microbiol.*, **81**: 367-375.
35. **Kreeft H.A.J.G., I. Greser-Wilke, V. Moennig & M.C. Horzinek** (1990). - Attempts to characterize bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle after immunization with a contaminated vaccine. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **97**: 63-65.
36. **Lecomte C., H. Navetat, C. Hamers, M. Lambot, F. Schelcher, P. Cabanie & P.P. Pastoret** (1996). - Isolement du virus de la diarrhoea bovine de deux cas de syndromes hémorragiques chez des bovins de race charolaise. *Ann. Méd. Vet.*, **140**: 435-438.
37. **Letellier C., P. Kerkhofs, G. Wellemans & E. Vanopdenbosch** (1999). - Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet. Microbiol.*, **64**: 155-167.
38. **Loken T., H. Krogsrud & I. Bjerkas** (1991). - Outbreaks of border disease in goats induced by a *pestivirus*-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J. Comp. Pathol.*, **104**: 195-209.
39. **Luzzago C., A. Zecconi, V. Bronzo, C. Bazzocchi, A. Ruggeri & G. Ruffo** (2000). - Bovine viral diarrhoea virus genotype I and II in Italian dairy herd in 1995. In *Veterinary virology in the new millennium*. Proc. 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, August 26-30 August, 397-398.
40. **Nagai M., T. Ito, S. Sugita, A. Genno, K. Takeuchi, T. Ozawa, Y. Sakoda, T. Nishimori, K. Takamura & H. Akashi** (2001). - Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan. *Arch. Virol.*, **146**: 685-696.
41. **Nagai M., M. Sato, H. Nagano, H. Pang, X. Kong, T. Murakami, T. Ozawa & H. Akashi** (1998). - Nucleotide sequence homology to bovine viral diarrhoea virus 2 (BVDV 2) in the 5' untranslated region of BVDVs from cattle with mucosal disease or persistent infection in Japan. *Vet. Microbiol.*, **60** (2-4): 271-276.
42. **Nuttal P.A., P.D. Luther & E.J. Stott** (1977). - Viral contamination of bovine fetal serum and cell cultures. *Nature*, **266**: 835-837
43. **Pellerin C., J. van den Hurk, J. Lecomte & P. Tussen** (1994). - Identification of a new group of bovine diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, **203**: 260-268.
44. **Rebhun W.C., T.W. French, J.A. Perdritz, E.J. Dubovi, S.G. Dill & L.F. Karcher** (1989). - Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. *J. Vet. Int. Med.*, **3**: 42-60.
45. **Ridpath J.F., S.R. Bolin & E.J. Dubovi** (1994). - Segregation of Bovine Viral Diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, **205**: 66-74.
46. **Roehe P.M., M.J. Woodward & S. Edwards** (1992). - Characterization of p20 gene sequences from a border disease like *pestivirus* isolated from pigs. *Vet. Microbiol.*, **33**: 231-238.
47. **Sneath P.H.A. & R.R. Sokal** (1973). - Numerical taxonomy: Principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman Editore, San Francisco.
48. **Sullivan D.G., G.J. Chang, D.W. Trent, R.W. Akkina** (1994). - Nucleotide sequence analysis of the structural gene coding region of the *pestivirus* border disease virus. *Virus Res.*, **33**: 219-228.
- virus, GenBank accession M34651) (25). The nucleotide sequences forming a loop at the V1 and V3 were highly variable and not suitable for species identification, while the remaining base-pairings in the stems were deemed variable. Base-pairings in the stem of the V3 locus were not useful for genus characterization.
- Sixty-one strains of the *Pestivirus* BVDV-2 species were classified according to the PNS genotyping method at the 5'-UTR, obtained from different animal hosts and various geographical origins. In the Table III, the strains are listed including the reference of the depositor of the sequence in the DNA database. The BVDV-2 strains could be clearly differentiated genetically in terms of specific nucleotide substitutions by the BVDV-1 species. The results obtained by the PNS method were comparable to the analyses performed with sequence alignment and construction of phylogenetic trees (Fig. 2 and 3). BVDV-2 shared a C-G pairing which was common to the V1 locus, and a G\*U pairing common to the V2 locus. Six genotypes, BVDV-2a, BVDV-2b, BVDV-2c, BVDV-2d, BVDV-2e and BVDV-2f, were classified within BVDV-2 by the PNS method. BVDV-2b was identified by a unique C-G pairing at position 4. BVDV-2c, limited to North American cattle isolates, was recognized by a G\*U pairing at the bottom of the V1 stem. Similarly, BVDV-2d was identified by a U-A pairing at position 18 of the V1 stem region. Genotype BVDV-2e, limited to South American cattle isolates, was characterized in V1 by G-C in position 12, U-A in position 16 and G\_G or G\_A bulges in position 18. Genotype BVDV-2f, limited to Argentina, was characterized in V1 with A-U pairing in position 9, A-U in position 12, U-A in position 16 and G\_A bulge in position 18. BVDV-2a genotype did not present characteristic base-pairings and could be considered the prototype in the species. To define a rationale, it was identified by a specific combination of base-pairings in the sequence. These base-pairings were non-specific when considered separately. The specific combination for BVDV-2a genotype

49. **Thiel W.** (1993). - Kasuistischer Beitrag zu hämorrhagischen diathesen bei kälbern mit BVD virus infektion. *Tierarz. Praxis*, **21**: 413-416.

50. **Tijssen P., C. Pellerin, J. Lecomte & J. Van den Hurk** (1996). - Immunodominant E2 (gp53) sequences of highly virulent bovine viral diarrhoea group II viruses indicate a close resemblance to a subgroup of border disease viruses. *Virology*, **217**: 356-361.

51. **Topliff C. L. & C.L. Kelling** (1998). - Virulence markers in the 5' untranslated region of genotype 2 bovine viral diarrhoea virus isolates. *Virology*, **250**: 164-172.

52. **Vannier P., Y. Leforban, R. Carnero & R. Cariolet** (1988). - Contamination of a live virus vaccine against pseudorabies (Aujeszky's disease) by an ovine pestivirus pathogen for the pig. *Ann. Rech. Vét.*, **19**: 283-290.

53. **Van Regenmortel M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E. Carstens, M.K. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle & R. Wickner** (2000). - Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Academic Press, New York.

54. **Vilcek O.E., B. Durkovic, M. Bobakova, G. Sharp & D.J. Paton** (2002). - Identification of bovine viral diarrhoea virus 2 in cattle in Slovakia. *Vet. Rec.*, **151**: 150-152.

55. **Vilcek S., I. Greiser-Wilke, B. Durkovic, W. Obritzhauser, A. Deutz & J. Kofer** (2003). - Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the Southern of Austria (Styria). *Vet. Microbiol.*, **91**: 285-291.

56. **Vilcek S., P.F. Nettleton, D.J. Paton & S. Belak** (1997). - Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.*, **78**: 725-735.

57. **Vilcek O.E. & D.J. Paton** (2000). - A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus. *Vet. Res.*, **31**: 435.

58. **Vilcek S., D.J. Paton, B. Durkovic, L. Strojny, G. Ibata, A. Moussa, A. Loitsch, W. Rossmanith, S. Vega, M.T. Scicluna & V. Palfi** (2001). - Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.*, **146** (1): 99-115.

59. **Wensvoort G. & C. Terpstra** (1988). - Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Res. Vet. Sci.*, **45**: 143-148.

60. **Zuker M. & P. Stiegler** (1981). - Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary. *Nucleic Acids Res.*, **9**: 133-148.

identification consisted of three base-pairings (A-U in position 1 and C-G or U\*G in position 18 in V1 and U\*G or U-A in position 4 in V2).

Figure 1 illustrates the V1, V2 and V3 palindromic loci in the 5'-UTR of the BVDV-2 *Pestivirus* species. The base-pairings characteristic to genus (PNS genus-specific) and those characteristic to the BVDV-2 species (PNS species-specific) are represented within the six genotypes BVDV-2a, BVDV-2b, BVDV-2c, BVDV-2d, BVDV-2e and BVDV-2f.

In the present study, applying analysis based on secondary structure in the 5'-UTR, the Belgian BVDV-2 strains deposited by Couvreur *et al.* (13) were assigned to genotype BVDV-2a (UVR420, WVD829, BVD341 and BVD1239), BVDV-2b (WG4622) and BVDV-2d (MP and BVD951). The authors reported that by using primary sequence based analyses in 5'-UTR and E2 regions, no subtypes could be identified within these BVDV-2 strains, even including published strains SCP and Giessen-1. Becher *et al.* (2) identified two subtypes (2a and 2b) of BVDV-2 on the basis of primary sequence analysis of E2 and Npro. Strains SCP and Giessen 1 were placed in subtype 2a. Both strains belonged to genotype 2a according to PNS method. However, the classification proposed by Becher allocated bovine and ovine strains isolated in USA, Canada and Europe in subgroup 2a and only three strains originating from Panama were included in subgroup 2b.

South American isolates represented two very distinct clusters. Relevant nucleotide variations in the secondary structure were evident at the level of the V1 palindromic locus. This corresponds to the observation on the primary structure analysis reported by Flores *et al.* (18). The authors separated South American strains in genotype 2b from all other strains from Asia, Europe and North America in genotype 2a.

Genotyping based on the 5'-UTR should also be valid for region coding for structural proteins as demonstrated by the similarity of the topology of the trees constructed from either the N

terminus of E2 or the partial nucleotide sequence of the 5'-UTR (13). However, analyses based on other genomic regions might be less meaningful or generate confusion when considered separately from 5'-UTR. On the basis of E2, sequence strain MP differed from BVDV-2, however this was not observed with 5'-UTR and was efficiently neutralized by antisera to BVDV-2 (13). Nevertheless, E2 and Npro could provide valuable indication when unclear results are obtained with 5'-UTR. Furthermore, the standardization of the primers for 5'-UTR could avoid lack of important sequence fractions and generate difficulties for the application of identification procedures, and with concern to PNS method, due to the total or partial absence of V3 locus or more frequently of V1 locus.

In the present study, height BVDV-2 strains were ovine isolates. The sequence analysis showed that only BVDV-2b and BVDV-2d were related to virus circulation in sheep, whereas genotypes BVDV-2a, BVDV-2b and BVDV-2c were prevalent in cattle. Strains have been isolated from animals suffering of Border disease, similar symptoms caused by BDV, thus creating confusion in diagnosis. Among BDV strains previously classified according to host animal species, occurrence of other *Pestivirus* species has long been suspected (12, 15, 46). Technical terms «true» BDV and «atypical» BDV were used to discriminate authentic BDV strains from false BDV strains by Thiel and his colleagues (2, 3, 4). This confusion was further clarified by phylogenetic analysis of the E2 (gp53) region, Npro gene or 5'-UTR of ovine pestiviruses, and the BDV strains previously classified were shown to include BVDV (4, 50, 56). In a recent study, by using the PNS genotyping procedure, ovine isolates showed a palindromic structure in the 5'-UTR characteristic of the BVDV-1a and BVDV-1b genovars, and to BVDV-2 (22). The number of BVDV-2 ovine isolates, reported to date, is limited. In addition, it is not excluded that the five ovine strains reported by Vilcek *et al.* (56) are contaminants from fetal

calf serum during cultivation of cells (54). Therefore, particular attention is required in performing isolation on cells. The RT-PCR assay for the rapid recognition of virus in blood samples or original tissue homogenates with no cultivation on cells for clinical cases of Border disease could be a useful approach. Twelve BVDV-2 strains were detected as contaminants from cell cultures and biologicals. Four were reported from investigations performed in Europe, seven originated from Japan and one from Argentina. The occurrence of contamination of biologicals, cell cultures, primary cell cultures and cell lines, including human cells (3, 13, 29, 31) and vaccines for veterinary use (17, 24) by BVDV-2, is a relevant aspect. Previous reports indicated BVDV contamination in vaccines for veterinary use (35, 38, 52, 59) but could not specify the BVDV species involved. Pestiviral RNA was detected in live virus vaccines for human use in Japan (24, 32). The most probable source of contamination was suggested to be non-cytopathic BVDV infected bovine fetal serum commonly used as medium supplement for the cell cultures (8, 10, 42). These findings indicate that contamination by animal pestiviruses may occur in biological products for veterinary and human use and that the problem

seems to be worldwide. Therefore, accurate monitoring for adventitious *Pestivirus* should be recommended to manufacturer. This concern, in particular, the high virulence showed with some BVDV-2 species strains causing haemorrhagic syndrome in cattle; this characteristic shared also with BVDV-1 strains of the Culi series (Culi1, Culi4 and Culi6) (23, 36), and strains L256 and Marloie (37). However, the experimental infection with BVDV-2 strains reproduced disease in naïve calves but not with BVDV-1 strains (23), suggesting that induction of sporadic haemorrhagic syndrome by BVDV-1 strains requires the presence of a number of co-factors, whereas in the epidemic form of the haemorrhagic syndrome, BVDV is the primary cause of the disease. In terms of nucleotide sequence, the definition of virulence activity among BVDV-2 species is still unclear. Similarly, BVDV-1 strains associated with sporadic haemorrhagic syndrome could not be clustered together in exclusively new subgroups (13). With 77-85 nucleotides, the palindromic loci represented a very limited portion of the virus genome. Within these short sequences, the evaluation of only 18 nucleotides was sufficient to characterize the genus with certitude. Species were characterized through the evaluation of only 2 to eight

nucleotides. Similarly, the genotype was defined with only two to six nucleotides. These peculiar aspects confirmed the high specificity of the PNS method and the reliability of results. The palindromic nucleotide substitution analysis in the 5'-UTR demonstrated a rationale and simple approach for viral investigations. Secondary structures predicted at the three variable regions in the 5'-UTR showed typical PNS which were useful for classification or genotyping of *Pestivirus*. Due to the economic negative impact of these viruses and the difficulties encountered in the control of the diseases, it is therefore, important to understand the genetic aspects of the viruses and their evolutionary history. Genetic variations among *Pestivirus* strains within limited geographic area might improve our understanding of virus evolution. Similarly, molecular structure of virus isolates from wild ruminants, when comparing with that of virus from cattle and other susceptible domestic animals, might show interesting aspects, due to the frequent movement and mixing of these animals. The identification of viral types or subtypes based on genetic changes should improve our understanding of *Pestivirus* epizootiology and might provide markers for biological differences, such as in virulence.