

## О КОНТАМИНАЦИИ ИМПОРТИРУЕМОЙ ФЕТАЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПЕСТИВИРУСАМИ КАК ФАКТОРЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ В УСЛОВИЯХ ГЛОБАЛИЗАЦИИ: МИНИ-ОБЗОР

А.Г. ГЛОТОВ, Т.И. ГЛОТОВА, С.В. КОТЕНЕВА

Пестивирусы — важная причина экономического ущерба в молочном и мясном скотоводстве. Болезни, вызываемые этими патогенами, распространены во всем мире (в том числе в России) с разной превалентностью, связанной с региональными особенностями ведения животноводства (А.Г. Глотов с соавт., 2002; М.И. Гулюкин с соавт., 2013; J.F., Ridpath, 2010). Возбудитель вирусной диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (ВД-БС КРС, BVDV, Bovine Viral Diarrhea Virus) считается прототипным членом рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Заболевания у КРС вызывают два разных вируса — BVDV1 и BVDV2. Потенциальный кандидат в члены рода — официально не классифицированный вирус BVDV3 (атипичный пестивирус), проявляющий высокое сходство с BVDV1 и BVDV2. Его присутствие в популяции КРС может компрометировать программы контроля (эрадикации) вирусной диареи (F.V. Bauermann, 2013). Этот вирус требует особого внимания, так как он впервые был выделен в Европе в 2004 году из эмбриональной сыворотки КРС, изготовленной в Бразилии, и в настоящее время актуально изучение его распространения в других регионах мира (H. Schirrmeyer с соавт., 2004). Общепризнано, что вирусы рода *Pestivirus* — наиболее распространенные контаминанты биологических препаратов (сыворотка эмбрионов коров, перевиваемые линии культур клеток, вакцины для животных и человека, интерфероны, трипсин, эмбрионы, стволовые клетки) (B. Makoschey с соавт., 2003; S.Q. Zhang с соавт., 2014). В условиях мировой глобализации быстрое развитие клеточных и биологических технологий приводит к повышению спроса на эмбриональную сыворотку, которую получают как побочный продукт при производстве мяса крупного рогатого скота (G. Gstraunthaler с соавт., 2013). Международное эпизоотическое бюро установило четкие требования, регулирующие проверку всех коммерческих лотов сывороток и клеточных культур на отсутствие двух типов BVDV и их РНК. Сыворотки крови, включая эмбриональные, должны быть свободны от этих вирусов и антител к ним (OIE, 2015). Те же требования должны распространяться на BVDV3. Отсутствие производства эмбриональной сыворотки в нашей стране создает условия для появления на рынке препаратов сомнительного качества. В отечественной литературе описаны случаи контаминации различных клеточных культур и сывороток нецитопатогенными вариантами пестивирусов (С.В. Алексеенкова с соавт., 2013). Вследствие этого культуральные живые вакцины, приготовленные с использованием некачественного сырья, могут быть потенциальным источником вирусов для восприимчивых животных, а контаминированные диагностические антигены — служить причиной ложных результатов исследования. Поэтому совершенствование системы контроля биологического загрязнения рассматривается как чрезвычайно важный этап в производстве вакцин и других биологических препаратов.

**Ключевые слова:** пестивирусы, крупный рогатый скот, вирусы вирусной диареи, атипичный пестивирус, эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота, контаминация.

Пестивирусы — важная причина экономического ущерба в молочном и мясном скотоводстве. Болезни, вызываемые ими, распространены во всем мире, в том числе в России, с разной превалентностью, связанной с региональными особенностями стратегии животноводства (1-3). Возбудитель вирусной диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (ВД-БС КРС, BVDV — Bovine Viral Diarrhea Virus) считается прототипным представителем рода *Pestivirus* (*Flaviviridae*). Заболевания у КРС вызывают два разных вируса — BVDV1 и BVDV2. Первый распространен повсеместно (в настоящее время описан 21 субтип — от 1a до 1u) (4-7), для второго характерно ограниченное распространение, в частности в США и Канаде (8, 9), Южной Америке (Бразилия, Уругвай) (10, 11), в некоторых странах Европы (Германия, Словакия, Италия) (12-14), Азии (Южная Корея, Япония) (15, 16), в Монголии (17). BVDV2 подразделяют на пять субтипов (от 2a до 2e) (18). Кандидатом для отнесения к тому же роду считается не классифицированный официально вирус, который име-

ет несколько названий (BVDV3, Nobli-like pestivirus, атипичный пестивирус) и высокое сходство с BVDV1 и BVDV2. Присутствие этого вируса в популяции КРС может существенно ограничить эффективность программ контроля ВД-БС и эрадикации патогена. BVDV3 впервые выделен в 2004 году из фетальной сыворотки КРС, изготовленной в Бразилии (21), а позже обнаружен у КРС в Южной Америке (22), Азии (23-25) и Европе (26, 27). Представители *Pestivirus* известны как контаминанты сывороток, перевиваемых линий культур клеток, вакцин для медицины и ветеринарии, препаратов интерферона, трипсина, других препаратов для биотехнологических исследований и техник, эмбрионов, стволовых клеток и др. (19, 20). Роль вируса ВД-БС КРС в качестве контаминанта биологических продуктов хорошо известна с 1960-х годов (28), значение атипичного вируса изучено в меньшей степени.

Характерная особенность обсуждаемой группы вирусов заключается в способности вызывать персистентную инфекцию при заражении плода только нецитопатогенным биотипом. Инфицирование происходит на 40-125-е сут внутриутробного развития, когда иммунная система плода еще не сформирована (1). В результате рождаются иммунотолерантные телята, которые служат постоянными источниками патогена для неиммунных животных. Концентрация вируса в крови таких особей, начиная с внутриутробного развития, высока, и они выделяют его в течение всей жизни со всеми секретами и экскретами. Специфические антитела у персистентно инфицированных животных не вырабатываются (3).

Мы обобщили данные о контаминации пестивирусами эмбриональной сыворотки КРС (fetal bovine serum, FBS). Это обстоятельство важно учитывать в связи с угрозой распространения пестивирусов с партиями импортируемой FBS, особенно в связи с ростом потребления FBS в клеточных технологиях, биотехнологии, фармацевтике и медицине.

Фетальная сыворотка. FBS — наиболее распространенная и широко используемая добавка к питательным средам для инициации и повышения скорости роста культур клеток млекопитающих благодаря высокому содержанию в крови плода биологических веществ (28). До сих пор не найдены другие столь универсальные и эффективные стимуляторы роста клеток. FBS представляет естественную смесь факторов, необходимых для адгезии клеток на субстрате, их активного роста и пролиферации (29). В русскоязычной литературе FBS называют эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота, однако в последние годы этот термин пересматривается некоторыми авторами, так как сыворотку получают не в эмбриональный, а в поздний плодный период.

Сыворотку получают в асептических условиях из крови плодов стельных коров мясных пород, предназначенных для уоя и отобранных случайным образом (29). В крупных стадах животные обоих полов свободно выпасаются вместе, поэтому коровы часто оказываются стельными. В Венгрии, странах Балтии и, возможно, в Чехии для получения фетальной сыворотки коров специально осеменяют (30). Обычно биоматериалом служат 6-месячные плоды в возрасте, но фактически их можно использовать уже с 3 мес. Обычно кровь отбирают пункцией сердца, но в Уругвае, Бразилии и Австралии применяют пункцию пупочной или яремной вены (30). Каждая партия коммерческой фетальной сыворотки объединяет материал с разных ферм. В результате вся партия может быть контаминирована, если в нее попадает сыворотка от инфицированных животных (31).

Самый высокий спрос на FBS в США и Европе, где производят большую часть FBS, но при этом используется сырье, которое получают

из Бразилии, Аргентины, стран Центральной Америки, Южной Африки, Австралии и Новой Зеландии (28). Главные экспортеры готовой продукции для культивирования клеток при производстве вакцин и лекарственных препаратов — США, Новая Зеландия и Австралия. Сыворотка для исследовательских целей в основном поступает из Южной Америки, Южной Африки и Бразилии. Так, в 2007 году Бразилия была второй страной по производству и экспорту говядины, в результате в течение этого года 70 % сыворотки, использованной в европейской медицинской промышленности, было завезено из Бразилии (32).

Рынок FBS. Клеточные культуры широко используются в биофармацевтической промышленности, рост которой, в свою очередь, стимулирует развитие производства и расширение продаж FBS. С 2013 года биофармацевтика стала крупнейшим и, согласно прогнозам, быстро растущим сегментом рынка клеточных культур (33). Ожидается, что объем мирового рынка продуктов, связанных с применением клеточных культур (питательные среды, сыворотки и реагенты) в биотехнологии, фармацевтике и медицине, к 2019 году увеличится до 4,1 млрд USD (34). В связи с исследованиями стволовых клеток человека и их использованием для лечения различных расстройств прогнозируют рост рынка продуктов для клеточных культур до 14,8 млрд USD в 2019 году (для сравнения: в 2014 году этот объем рынка составил 6,0 млрд USD) (35). В год в мире продается около 500000 л фетальной сыворотки KPC, для производства которой нужно до 1000000 плодов. Объем продаж FBS растет (28), при этом весь рынок находится под контролем нескольких производителей. Например, в 2014 году это были три американские фирмы — «Thermo Fisher Scientific», «Life Technologies Co.» и «Sigma-Aldrich», совокупная доля продаж которых составляла 80 %, покупателями в основном выступали крупные биофармацевтические компании. На первые две из перечисленных фирм приходится 60 % рынка FBS в США и в мире (30).

В этих условиях важно, чтобы покупатели FBS во всем мире пересмотрели свои отношения с поставщиками и определили стратегию снижения рисков от возможной контаминации FBS эндотоксинами, микоплазмами, прионными белками, вирусами (в частности пестивирусами) с учетом качественных и количественных, географических и сезонных изменений партий FBS (36). Несмотря на то, что ветеринарные специалисты при осмотре отбирают плоды только от животных, пригодных для потребления человеком, общеизвестен тот факт, что FBS служит потенциальным источником многих вирусов. С 1960-х годов известно о контаминации FBS пестивирусами KPC, при этом BVDV наиболее распространен вследствие способности к трансплацентарной передаче с последующей персистенцией у иммунологически незрелых плодов (37). Из-за риска вирусной контаминации было настоятельно рекомендовано в дополнение к прямому тестированию на вирусы инактивировать сыворотку при помощи валидированных и эффективных методов (38), но в последние годы сообщалось о сохранении контаминации даже после применения рекомендованных процедур.

Для обеспечения качества FBS репрезентативные образцы объединенных партий обычно тестируют на стерильность (бактерии, грибы), эндотоксины, иммуноглобулины, вирусы, биохимические показатели и электрофоретические профили. После этого ее стерилизуют фильтрацией и могут обрабатывать  $\gamma$ -излучением или высокими температурами. Эти процедуры, а также окончательное замораживание обеспечивают дополнительную безопасность в отношении вирусов (39). Показателями премиального качества FBS служат низкая концентрация иммуноглобулинов, отсут-

ствии вирусов и эндотоксинов. Однако не всегда все партии сыворотки проходят необходимое тестирование либо оно недостаточно эффективно. После протокола, который сочетал в себе метод культивирования клеток и выявление РНК пестивирусов, В. Makoschey с соавт. (37) показали, что 4 из 7 партий FBS были контаминированы инфекционным BVDV1 нецитопатогенного биотипа.

Н. Xia с соавт. (40), впервые продемонстрировав контаминацию коммерческих FBS разного географического происхождения не только BVDV1 и BVDV2, но и эмерджентным BVDV3, предположили, что эти вирусы имеют более широкое распространение, чем считалось ранее. Анализ 33 партий FBS от 10 производителей методом ОТ-ПЦР (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) выявил BVDV1 в 29 партиях из 11 стран, BVDV2 — в 11 партиях из Южной Америки и BVDV3 — в 13 партиях из Америки, Австралии, Бразилии, Канады и Мексики. S.Q. Zhang с соавт. (31) установили, что китайские препараты FBS из разных регионов страны контаминированы как минимум одним видом пестивирусов (в том числе BVDV1 и BVDV2).

Вирус BVDV3. Хотя происхождение и эмерджентные свойства НоВи-like-вируса неизвестны, согласно одной из гипотез, его появление связано с Южной Америкой, откуда он был занесен в другие страны и на другие континенты посредством контаминированных биологических продуктов, таких как эмбриональная сыворотка и вакцины (23). По данным F.V. Waegmann с соавт. (41), более 30 % партий FBS из Южной Америки, протестированных в Европе, контаминированы этим вирусом.

ПЦР-исследование 26 архивных партий FBS за период с 1992 по 2013 год, прошедших фильтрацию и  $\gamma$ -облучения (27), выявило во всех как минимум по одному типу пестивируса КРС. В 20 партиях обнаружили BVDV1, в 10 — BVDV2, в 15 — вирус НоВи-like. В Южной Америке были произведены 7 партий, в Австралии — одна, для 7 партий происхождение не определили. По результатам филогенетического анализа обнаруженный вирус отнесли к бразильской группе; в Италию он был занесен с FBS (27).

При исследовании 90 серий коммерческой сыворотки, произведенной в США и расфасованной в Европе, авторы сообщили, что вирус не обнаружили, на основании чего было сделано заключение об отсутствии его циркуляции в стране (42). Тем не менее, часть лотов содержала BVDV: филогенетический анализ 20 положительных серий выявил в 19 BVDV1, в одной — BVDV2. Подобный факт указывает на возможность контаминации FBS, маркированных как продукт США, при предпродажной обработке и упаковке, а также на вероятность неправильной маркировки после такой обработки и смешивания с образцами из других географических регионов мира. Это настораживает, так как на рынке FBS чаще всего присутствуют партии, маркированные как произведенные в США или в Австралии, то есть в странах, которые по официальным данным свободны от атипичного пестивируса КРС.

Распространение атипичного пестивируса КРС (в отличие от BVDV1 и BVDV2), возможно, ограничено несколькими регионами. Как отмечалось выше, впервые НоВи-like вирус выделили и охарактеризовали в 2004 году в Германии, проанализировав партию FBS, собранную в Бразилии и расфасованную в Европе (21). Изолят, названный D32/00\_‘НоВи’, был признан прототипным для бразильской группы пестивирусов. После этого несколько авторов идентифицировали его генетически различающиеся подтипы, имеющие региональное распространение, в частности тайский (42). Затем было высказана гипотеза о существовании третьей, индийской

группы штаммов (25). Предполагается наличие четвертой группы вируса, выделенной за пределами Индийского региона, в частности в Италии (27). Таким образом, к настоящему времени идентифицировано четыре генетических группы BVDV3 (3a-d).

Полученные данные подтверждают необходимость постоянно обновлять и совершенствовать методы выявления вирусов КРС, а также выработать правила международной торговли FBS и животными. В последние годы были апробированы некоторые технологии по снижению количества или инактивации вирусов в FBS. В соответствии с директивой Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMEA, Великобритания) BVDV включен в список вирусов, которые могут использоваться для проверки качества процедуры инактивации (30). Хороший эффект дает импульсная обработка FBS ультрафиолетовыми лучами с длинами волн 355 и 266 нм (43). Предложено устройство, в основе действия которого лежит облучение красным светодиодами LED (Light Emitting Diode,  $\lambda = 627$  нм) в течение 45 мин и использование метиленового синего в конечной концентрации 1 мкМ, который эффективен в отношении BVDV (41). Тем не менее, риск контаминации FBS пестивирусами остается реальным, а даже слабая контаминация при использовании FBS в качестве добавки к питательным средам способна привести к инфицированию культур клеток (30).

Правила применения FBS. Учитывая высокую степень контаминации FBS вирусами, невозможно исключить использование ее вирусосодержащих партий при крупномасштабном производстве вакцин (37). Поэтому необходимо проводить инактивацию вируса в каждом лоте и контролировать эффективность процедуры с помощью лабораторных тестов. Для этого разработаны руководства и правила методов инактивации и соответствующих испытаний. В настоящее время правила EMEA применительно к производству препаратов для ветеринарии и медицины предписывают обязательную обработку утвержденными методами (38). Тест на выявление BVDV должен быть одним из первых для оценки контаминации перед инактивацией и после нее. В конечной партии препарата не должен содержаться вирус и антитела к нему (30).

При использовании FBS в производстве ветеринарных препаратов протокол выявления вируса предусматривает не менее трех пассажей в чувствительной культуре клеток и иммуногистохимический анализ с референтной анти-BVDV моноспецифической антисывороткой (поликлональной или содержащей пул моноклональных антител). В случае обнаружения вируса выполняется титрование из партии сыворотки для подтверждения того, что концентрация вируса достаточна для контроля выполненной инактивации с помощью валидированных тестов и не превышает  $10^5$ - $10^6$  ТЦД<sub>50</sub>/мл. Дополнительно для тестирования предлагается использовать ПЦР с электрофоретическим разделением продуктов и в режиме реального времени. Чувствительность и специфичность дополнительных методов должна быть не ниже, чем у стандартных тестов. Кроме того, производитель должен быть в состоянии выяснить, обладает ли обнаруженная РНК инфекционностью. Также существует директива, предписывающая методику, которую следует использовать при подозрении на контаминацию готовой партии сыворотки нуклеиновыми кислотами вируса (30), чтобы установить, кодируются ли этими последовательностями факторы инфекционности вируса. Для этого применяют двойное тестирование, которое включает выявление вируса при помощи ПЦР (преимущественно полуколичественной с внутренним контролем) и обнаружение контаминации вирусом в других тестах. При выяв-

лении вирусной контаминации живых вакцин используют только лабораторные тесты. Для этого конечный продукт инокулируют в чувствительные клетки и проводят не менее трех слепых пассажей с последующим иммунопероксидазным окрашиванием монослоя, а также исследованием методом иммунофлуоресценции или ПЦР. При получении отрицательных результатов *in vitro* с подтверждением в ПЦР тест *in vivo* не проводят, если того не требуют исключительные обстоятельства.

При производстве медицинских биологических препаратов для выявления вируса необходимо использовать методики, эффективно выявляющие оба биотипа вируса. Кроме того, рекомендовано иммунофлуоресцентное окрашивание монослоя культур клеток антителами, меченными флуоресцеином (FA). Прямой метод ПЦР считается менее пригодным для обнаружения инфекционного вируса. При выявлении контаминации ее оценивают количественно (показатель должен быть ниже установленного для эффективной инактивации вируса в проверенных методах). При обнаружении BVDV сыворотку необходимо тестировать повторно, продолжая обработки до получения отрицательного результата.

Стада, в которых коров используют в качестве доноров биоматериала для получения FBS, должны быть четко установлены, а их состояние строго документировано согласно регламенту ЕМЕА (37). В таких стадах рекомендовано не проводить вакцинацию с целью предотвращения какого-либо влияния поствакцинальных антител.

Несмотря на многочисленные усилия по регулированию безопасности FBS, зарегистрирована фальсификация продукта, от которого пострадали добросовестные поставщики и большое количество потребителей сыворотки (36). С 2003 по 2011 год одна фирма добавляла бычий сывороточный альбумин, воду и ростовые добавки в FBS, производимую в США. Некоторые из лотов этой сыворотки (143 серии, 280000 л) до сих пор могут продаваться во всем мире под другими торговыми марками или товарными знаками. На этом основании высказывается мнение, что рынок FBS регулируется недостаточно эффективно и остается возможность для фальсификаций (28). В дополнение к проблемам с составом препарата в этом случае невозможна идентификация производителя. Фальсификат может содержать БСА взрослых животных из США и/или смесь фетальной сыворотки из других источников в Канаде, Аргентине, Бразилии или Мексике. Эти установленные недавно противозаконные действия могут существенно влиять на результаты и достоверность научных экспериментов с культурами клеток и тканей (28) и дискредитировать мировой рынок FBS (30). Вопрос о фальсификации географического происхождения FBS заслуживает отдельного внимания. Еще в 1994 году сообщалось о продаже примерно 30000 л сыворотки из Новой Зеландии по всему миру, но по официальным данным в этой стране ежегодно заготавливали только 15000 л высококачественного продукта (43). Следовательно, потребитель может получать продукт, который по географическому происхождению не соответствует заявленному и произведен в регионе, где инфекционный статус стад-доноров менее благоприятный и стоимость FBS гораздо ниже (30).

Высказывались предположения о том, что в некоторых компаниях допускают смешивание сыворотки в процессе производства и транспортировки (40). При этом нарушается регламент очистки оборудования или среди лотов от разных производителей попадает инфицированный. Также партии FBS могут быть ошибочно помечены страной происхождения, отличной от реальной (39).

Для обеспечения гарантии качества необходимо соблюдать особую

осторожность при подтверждении достоверности информации, предоставленной поставщиком, и проявлять осмотрительность при работе со всеми поставщиками препарата. Качественная поставка означает то, что все показатели, включая историю происхождения и перемещения, должны быть тщательно документированы, полностью прозрачны и подтверждены независимым аудитом. Кроме этого, должна быть доступна другая важная информация. Например, при выделении вируса на результат исследования влияет объем инокулята, используемая линия культур клеток, число пассажей, специфичность антител, использованных в тесте иммунофлуоресценции, корректность подбора праймеров или зондов для ОТ-ПЦР. Также полезно указывать предел обнаружения вируса в принятых для использования международных единицах (например, число инфекционных частиц или копий генома).

Международным эпизоотическим бюро (МЭБ, World Organisation for Animal Health, OIE, Франция) установлен четкий регламент, согласно которому все клеточные культуры перед целевым использованием должны тестироваться на отсутствие BVDV в нескольких пассажах. Сыворотка крови, в том числе фетальная, должна быть свободна не только от вирусов, но и от специфических антител к ним (46, 47). Тем не менее, в России описаны случаи контаминации клеточных культур и сывороток штаммами BVDV нецитопатогенного биотипа (48-50). Вследствие этого культуральные живые вакцины могут оказаться источником вирусов для восприимчивых животных, а контаминированные диагностические антигены служить причиной ложных результатов исследования. Поэтому совершенствование системы контроля, направленного на предотвращение биологического загрязнения, чрезвычайно важно при производстве вакцин и других биологических препаратов (48).

Итак, в условиях глобализации, стремительного развития клеточной биотехнологии, современных направлений ветеринарии и медицины ежегодно повышается спрос на фетальную сыворотку крови крупного рогатого скота (FBS). Проблема контаминации FBS пока существует (в частности, из-за повышенного спроса, наличия недобросовестных производителей и продавцов, несоответствия маркировки товара заявленной и отсутствия унифицированных методик контроля FBS). В связи с расширением рынка FBS факт существования атипичных пестивирусов требует особого внимания. Они были выделены из коммерческих пулов сыворотки крови, используемой для культур клеток и производства биопрепаратов, и представляют опасность из-за возможного распространения в новых регионах. Отсутствие производства FBS в нашей стране создает возможность появления на рынке товара различных производителей сомнительного качества.

*ФГБУН Сибирский федеральный научный центр  
агробиотехнологий РАН, Институт экспериментальной  
ветеринарии Сибири и Дальнего Востока,  
630501 Россия, Новосибирская обл., Новосибирский р-н,  
р.п. Краснообск, СФНЦА РАН, а/я 463,  
e-mail: glotov\_vet@mail.ru ✉, t-glotova@mail.ru, koteneva-sv@mail.ru*

*Поступила в редакцию  
5 июля 2017 года*

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 2, pp. 248-257*

## **PESTIVIRUSES, WHICH CONTAMINATE IMPORTED FETAL BOVINE SERUM, MAY BE A CAUSE OF THE GLOBAL SPREADING OF VIRAL DIARRHEA IN CATTLE — A MINI REVIEW**

*A.G. Glotov, T.I. Glotova, S.V. Koteneva*

*Siberian Federal Scientific Center of Agro-BioTechnologies RAS, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and*

ORCID:

Glotov A.G. [orcid.org/0000-0002-2006-0196](https://orcid.org/0000-0002-2006-0196)

Koteneva S.V. [orcid.org/0000-0003-2649-7505](https://orcid.org/0000-0003-2649-7505)

Glotova T.I. [orcid.org/0000-0003-3538-8749](https://orcid.org/0000-0003-3538-8749)

The authors declare no conflict of interests

Received July 5, 2017

doi: 10.15389/agrobiology.2018.2.248eng

## Abstract

Pestiviruses are an important cause of economic losses in the dairy and beef industry. Diseases caused by them are common around the world with varying prevalence associated with the features of regional strategy of livestock including in Russia (A.G. Glotov et al., 2002; M.I. Gulyukin et al., 2013; J.F. Ridpath, 2010). The bovine viral diarrhoea virus is considered as a prototype member of the genus *Pestivirus*, *Flaviviridae* family. Two distinct viruses designated as BVDV1 and BVDV2 cause the disease in cattle. A candidate member of the genus is BVDV3, the atypical and not classified pestivirus which shows high similarity to BVDV1 and BVDV2. The BVDV3 presence in the cattle population can compromise BVDV control or eradication (F.V. Bauermann, 2013). This virus requires special attention. BVDV was isolated from commercial lots of fetal bovine serum used for cell culture and biologicals, and is dangerous because of possible spread to new regions (H. Schirrmeyer et al., 2004). Viruses of this genus are contaminants of fetal serum, continuous cell line cultures, human and animal vaccines, interferons, trypsin, embryos, stem cells, etc. (B. Makoschey et al., 2003; S.Q. Zhang et al., 2014). Because of globalization and rapid development of cell biotechnology in veterinary and human medicine, the demand for fetal bovine serum, which is a by-product of beef industry, is annually increasing (G. Gstraunthaler et al., 2013). OIE has established product quality standards and regulations according to which all the cell cultures intended to use must be tested for the absence of the virus and its RNA in some passages. Blood serum including fetal serum must be free of the virus and also of the specific antibodies thereto (OIE, 2015). These requirements should also apply to BVDV3. The lack of fetal bovine serum production in Russia creates the possible risk of lots from foreign manufacturers of questionable quality. Special scholar publications report on cases of contamination of different cell cultures and sera by noncytopathic BVDV strains in Russia (S.V. Alekseenkova et al., 2013). The live vaccines prepared using low-quality raw materials can be a potential source of virus for susceptible animals, and contaminated diagnostic antigens can cause false results of the study. Thence, more strict control is extremely important to prevent biological contamination of vaccines and other biologicals.

Keywords: pestiviruses, cattle, bovine viral diarrhoea viruses, atypical pestivirus, fetal bovine serum, contamination.

## REFERENCES

1. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2010, 26(1): 105-121 (doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.007).
2. Glotov A.G., Glotova T.I., Petrova O.G., Nefedchenko A.V., Tatarchuk A.T., Koteneva S.V., Vetrov G.V., Sergeev A.N. *Veterinariya*, 2002, 3: 17-21 (in Russ.).
3. Gulyukin M.I., Yurov K.P., Glotov A.G., Donchenko N.A. *Voprosy virusologii*, 2013, 6: 13-18 (in Russ.).
4. Simmonds P., Becher P., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., Muerhoff S., Pletnev A., Hesse R.R., Smith D.B., Stapleton J.T., ICTV Report Consortium. ICTV virus Taxonomy profiles: *Flaviviridae*. *J. Gen. Virol.*, 2017, 98: 2-3 (doi: 10.1099/jgv.0.000672).
5. Vilcek S., Durkovic B., Kolesarova M., Paton D.J. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine*, 2005, 72: 31-35 (doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.08.004).
6. Pecora A., Malacari D.A., Ridpath J.F., Perez Aguirreburualde M.S., Combessies G., Odeyn A.C., Romera S.A., Golemba M.D., Wigdorovitz A. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res. Vet. Sci.*, 2014, 96(1): 204-222 (doi: 10.1016/j.rvsc.2013.11.004).
7. Deng M., Ji S., Fei W., Raza S., He C., Chen Y., Chen H., Guo A.I. Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in four bovine species in China. *PLoS ONE*, 2015, 10(7): e0134777 (doi: 10.1371/journal.pone.0134777).
8. Evermann J.F., Ridpath J.F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Vet. Microbiol.*, 2002, 89(2-3): 129-139 (doi: 10.1016/S0378-1135(02)00178-5).
9. Carman S., Van Dreumel T., Ridpath J., Hazlett M., Alves D., Dubovi E., Tremblay R., Bolin S., Godkin A., Anderson N. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1998, 10(1): 27-35 (doi: 10.1177/104063879801000106).
10. Silveira S., Weber M.N., Mysena A.C., da Silva M.S., Streck A.F., Pescador C.A., Flores E.F.,



- Weiblen R., Driemeier D., Ridpath J.F., Canal C.W. Genetic diversity of Brazilian bovine pestiviruses detected between 1995 and 2014. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2017, 64: 613-623 (doi: 10.1111/tbed.12427).
11. Maya L., Puentes R., Reolyn E., Acuca P., Riet F., Rivero R., Cristina J., Colina R. Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch. Virol.*, 2016, 161(3): 529-535 (doi: 10.1007/s00705-015-2688-4).
  12. Tajima M., Frey H.R., Yamato O., Maede Y., Moennig V., Scholz H., Greiser-Wilke I. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res.*, 2001, 76(1): 31-42 (doi: 10.1016/S0168-1702(01)00244-1).
  13. Nováčková M., Jacková A., Kolesárová M., Vilcek S. Genetic analysis of a bovine viral diarrhoea virus 2 isolate from Slovakia. *Acta Virologica*, 2008, 52(3): 161-166.
  14. Luzzago C., Lauzi S., Ebranati E., Giammarioli M., Moreno A., Cannella V., Masoero L., Canelli E., Guercio A., Caruso C., Ciccozzi M., De Mia G.M., Acutis P.L., Zehender G., Peletto S. Extended genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. *BioMed Res. Int.*, 2014, 2014: Article ID 147145 (doi: 10.1155/2014/147145).
  15. Oem J.K., Hyun B.H., Cha S.H., Lee K.K., Kim S.H., Kim H.R., Park C.K., Joo Y.S. Phylogenetic analysis and characterization of Korean bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.*, 2009, 139(3-4): 356-360 (doi: 10.1016/j.vetmic.2009.06.017).
  16. Yamamoto T., Kozasa T., Aoki H., Sekiguchi H., Morino S., Nakamura S. Genomic analyses of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005. *Vet. Microbiol.*, 2008, 127(3-4): 386-371 (doi: 10.1016/j.vetmic.2007.08.020).
  17. Ochirkhuu N., Konnai S., Odzaya B., Gansukh S., Murata S., Ohashi K. Molecular detection and characterization of bovine viral diarrhoea virus in Mongolian cattle and yaks. *Arch. Virol.*, 2016, 161(8): 2279-2283 (doi: 10.1007/s00705-016-2890-z).
  18. Giangaspero M., Harasawa R. Characterization of genotypes among bovine viral diarrhoea virus type1 strains according to palindromic nucleotide substitutions in the genomic 5'-untranslated region. *J. Virol. Methods*, 2014, 195: 34-53 (doi: 10.1016/j.jviromet.2013.10.003).
  19. Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R., Flores E.F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2013, 25(1): 6-15 (doi: 10.1177/1040638712473103).
  20. Glotov A.G., Glotova T.I. Atypical bovine pestiviruses (review). *Agricultural Biology*, 2015, 50(4): 399-408 (doi: 10.15389/agrobiol.2015.4.399eng).
  21. Schirrmeyer H., Strebellow 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 (doi: 10.1099/vir.0.80238-0).
  22. Weber M.N., Mosena A.C.S., Simoes S.V.D., Almeida L.L., Pessoa C.R., Budaszewski R.F., Silva T.R., Ridpath J.F., Riet-Correa F., Driemeier D., Canal C.W. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with "HoBi"-like pestivirus in a field outbreak. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2016, 63(1): 92-100 (doi: 10.1111/tbed.12223).
  23. Mao L., Li W., Zhang W., Yang L., Jiang J. Genome sequence of a novel Hobi-like pestivirus in China. *J. Virol.*, 2012, 86(22): 12444 (doi: 10.1128/JVI.02159-12).
  24. 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 (doi: 10.1111/tbed.12218).
  25. 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 (doi: 10.1016/j.vetmic.2014.09.017).
  26. Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Uttenthal A., Polak M.P., Stehl K., Alenius S., Shan H., Yin H., Belák S. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, 17(8): 1549-1552 (doi: 10.3201/eid1708.101447).
  27. Giammarioli M., Ridpath J.F., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., De Mia G.M. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals*, 2015, 43(4): 220-224 (doi: 10.1016/j.biologicals.2015.05.009).
  28. Gstraenthaler G., Lindl T., van der Valk J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology*, 2013, 65(5): 791-793 (doi: 10.1007/s10616-013-9633-8).
  29. Gstraenthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX*, 2003, 20(4): 275-281.
  30. Flatschart R.B., Caldas L.A., Almeida D.O., dos Santos N.C., Boldrini L.C., Granjeiro J.M., Folgueras-Flatschart A.V. The Impact of BVDV presence on fetal bovine serum used in the biotechnology industry. In: *Advances in medicine and biology*. Nova Biomedical, New York, 2016. V. 95: 75-95.
  31. Zhang S.Q., Guo B.T.L., Wang F.X., Zhu H.W., Wen Y.J., Cheng S. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses in commercial bovine serum batches of Chinese origin. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 27: 230-233 (doi: 10.1016/j.meegid.2014.07.021).

32. Häusli P. Fetal Bovine Serum running short. *European Biotechnology — Life Sciences and Industry Magazine*, 2008. Available <http://www.european-biotechnology-news.com>. No date.
33. *Market Research Reports. Cell Culture Market by Equipment — Global Forecast to 2018*. Available <http://www.rnrmarketresearch.com>. No date.
34. *BCC Research. Global Markets for Media, Sera and Reagents in Biotechnology. 2015*. Available <http://www.bccresearch.com>. No date.
35. *Market Research Reports. Cell Expansion Market by Product — Forecast to 2019*. Available <http://www.reportlinker.com>. No date.
36. Davis D., Hirschi S.D. Fetal bovine serum: what you should ask your supplier and why. *BioProcess. J.*, 2014, 13(1): 19–21 (doi: 10.12665/J131.DavisHirschi).
37. Makoschey B., van Gelder P.T., Keijsers V., Goovaerts D. Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. *Biologicals*, 2003, 31(3): 203–208 (doi: 10.1016/S1045-1056(03)00058-7).
38. EMA. *Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products*. 2013. Available [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2013/06/WC500143930.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/06/WC500143930.pdf). Accessed April 09, 2018.
39. Siegel W., Foster L. Fetal bovine serum: the impact of geography. *BioProcess. J.*, 2013, 12(3): 28–30 (doi: 10.12665/J123.Siegel).
40. Xia H., Vijayaraghavan B., Belák S., Liu L. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e28553 (doi: 10.1371/journal.pone.0028553).
41. Bauermann F.V., Harmon A., Flores E.F., Falkenberg S.M., Reecy J.M., Ridpath J.F. In vitro neutralization of HoBi-like viruses by antibodies in serum of cattle immunized with inactivated or modified live vaccines of bovine viral diarrhoea viruses 1 and 2. *Vet. Microbiol.*, 2013, 166(1–2): 242–245 (doi: 10.1016/j.vetmic.2013.04.032).
42. Bauermann F.V., Flores E.F., Falkenberg S.M., Weiblen R., Ridpath J.F. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American foetal bovine serum lots. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2014, 26(1): 10–17 (doi: 10.1177/1040638713518208).
43. Daryany M.K.A., Hosseini S.M., Raie M., Fakharie J., Zareh A. Study on continuous (254 nm) and pulsed UV (266 and 355 nm) lights on BVD virus inactivation and its effects. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, 94(2): 120–124 (doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.10.009).
44. Ceylan C., Severcan F., Ozkul A., Severcan M., Bozoglu F., Taheri N. Biophysical and microbiological study of high hydrostatic pressure inactivation of Bovine Viral Diarrhoea virus type 1 on serum. *Vet. Microbiol.*, 2012, 154(3–4): 266–271 (doi: 10.1016/j.vetmic.2011.07.026).
45. Hodgson J. To treat or not to treat: that is the question for serum. *Bio/Technology*, 1995, 13(4): 333–343 (doi: 10.1038/nbt0495-333).
46. OIE. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. P. 2, S. 2.4. Ch. 2.4.8. Bovine viral diarrhoea*. Paris, France, 2015.
47. Flatschart R.B., Caldas L.A., de Oliveira Almeida D., Correeia dos Santos N., da Cunha Boldrini L., Granjeiro M.J., Flatschart A.V.F. The impact of BVDV presence on foetal bovine serum used in the biotechnology industry. In: *Advances in Medicine and Biology*. L.V. Berhardt (ed.). Nova Science Publishers, Inc., 2016, V. 95, Chapter 4: 75–93.
48. Alekseenkova S.V., Yurov G.K., Gal'nbeq T.V., Kalita I.A., Yurov K.P. *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal*, 2013, 1: 15–18 (in Russ.).
49. Uryvaev L.V., Ionova K.S., Dedova A.V., Dedova L.V., Selivanova T.K., Parasyuk N.A., Mezentsseva M.V., Kostina L.V., Gushchina E.A., Podchernyaeva R.Ya., Grebennikova T.V. *Vo-prosy virusologii*, 2012, 5(57): 15–21 (in Russ.).
50. Koteneva S.V., Maksyutov R.A., Glotova T.I., Glotov A.G. Identification of the bovine atypical pestivirus in biological samples. *Agricultural Biology*, 2017, 52(6): 1259–1264 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1259eng).