

**Обзоры, проблемы**

УДК 636.22/.28:619:578.833.3:615.37

doi: 10.15389/agrobiology.2024.2.179rus

**ПЕСТИВИРУСЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА — КОНТАМИНАНТЫ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ\***

(обзор)

**А.Г. ГЛОТОВ, Т.И. ГЛотова<sup>✉</sup>, С.В. КОТЕНЕВА, А.В. НЕФЕДЧЕНКО,  
О.В. СЕМЕНОВА**

Пестивирусы крупного рогатого скота становятся возбудителями вирусной диареи — болезни слизистых оболочек, широко распространенной и экономически значимой инфекции (J.F. Ridpath, 2010; С.А. Evans с соавт., 2019). К таким вирусам относятся прототипный вид *Pestivirus A* (вирус вирусной диареи крупного рогатого скота 1 вида; BVDV-1), *Pestivirus B* (вирус вирусной диареи крупного рогатого скота 2 вида; BVDV-2) и *Pestivirus H* (Hobi-like pestivirus, HoBiPeV; вирус вирусной диареи крупного рогатого скота 3 вида; BVDV-3) (P. Simmonds с соавт., 2017; ICTV, 2019). Все агенты представлены цитопатогенным (Цп) и нецитопатогенным (Нцп) биотипами. Нцп биотип, в отличие от Цп, не вызывает видимых морфологических разрушений культур клеток и представляет более 90 % популяции вирусов (P.H. Walz с соавт., 2020). Число известных субтипов BVDV-1 составляет 22 (от а до v), BVDV-2 — 4 (а, b, c, d) и BVDV-3 — 4 (а, b, c, d) (N. Su с соавт., 2023). В России установлена циркуляция 12 субтипов BVDV-1, трех субтипов BVDV-2 и одного субтипа BVDV-3 (А.Г. Глотов с соавт., 2022). Одним из путей распространения возбудителей в популяциях крупного рогатого скота могут быть биопрепараты, полученные с использованием контаминированных фетальных сывороток (Л.В. Урываев с соавт., 2012; А.Г. Глотов с соавт., 2018), культур клеток и трипсина (O. Lung с соавт., 2021), а именно ветеринарные вакцины и интерфероны. Агенты могут распространяться со спермой быков-производителей и эмбрионами (J.A. Gard с соавт., 2007; K. Gregg с соавт., 2010). Значительную проблему могут представлять контаминированные вакцины медицинского назначения (Giangaspero M. с соавт., 2004), а также биотехнологические материалы (L. Djemal с соавт., 2021), стволовые клетки (S. Viau с соавт., 2019). Контаминация вакцин происходит при их производстве Нцп штаммами всех видов пестивирусов, которые заносятся в культуры клеток случайным образом из непроверенной фетальной сыворотки (B. Makoschey с соавт., 2003; Pastoret P.P., 2010). Существующие методы деконтаминации не всегда могут обеспечить полную инактивацию агентов (W.P. Raim с соавт., 2021). Дополнительную проблему вносит увеличивающееся число видов и субтипов вирусов (С. Luzzago с соавт., 2021). Контаминация культур клеток млекопитающих может привести к ложным результатам диагностических исследований, заражению биологических препаратов и передаче их реципиентам. Антитела к пестивирусам крупного рогатого скота обнаруживали в 40 % проб сыворотки крови, взятых у близнецов с шизофренией (M. Giangaspero, 2013), а их антигены — в 23,6 % образцов фекалий от детей с гастроэнтеритом (R. Yolken с соавт., 1989). Только тщательный рутинный контроль и выбраковка животных, используемых для получения фетальной сыворотки или для получения органов для культур клеток, всех серий сыворотки, культур клеток и биопрепаратов на ее основе, может предотвратить потенциально опасную контаминацию пестивирусами. При этом необходимо учитывать пластичность вирусов и появление новых видов и субтипов.

**Ключевые слова:** пестивирусы, крупный рогатый скот, контаминация, эмбриональная сыворотка, культуры клеток, вакцины, биопрепараты, сперма, эмбрионы.

В настоящее время классификация рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* претерпела изменения. В 2017 году Интернациональный комитет по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV, <https://ictv.global/>) предложил включение семи новых видов в дополнение к четырем, существовавшим ранее. Предложены названия, вне зависимости от принадлежности к основному хозяину с использованием формата *Pestivirus X*. При этом изменились названия видов, но изоляты по-прежнему обозначаются по их первоначальным названиям. Прототипный вид рода — вирус вирусной диареи крупного рогатого скота вида 1 (bovine viral diarrhea virus 1, BVDV-1) переименован в *Pestivirus A*, вирус вирусной диареи крупного рогатого скота вида 2 (bovine viral diarrhea virus 2, BVDV-2) — в *Pestivirus B*,

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-26-00006 «Генетическая изменчивость и разнообразие пестивирусов крупного рогатого скота, основные риски заноса новых генетических вариантов на территорию Российской Федерации».

вирус классической чумы свиней (classical swine fever virus, CSFV) — в *Pestivirus C*, вирус пограничной болезни овец (border disease virus, BDV) — в *Pestivirus D*. Новые виды включают в себя *Pestivirus E* (пестивирус вилорога, pronghorn pestivirus), *Pestivirus F* (вирус Bungowannah), *Pestivirus G* (пестивирус жирафа, giraffe pestivirus), *Pestivirus H* (Hobi-like pestivirus, HoBiPeV; вирус вирусной диареи крупного рогатого скота вида 3, bovine viral diarrhoea virus 3, BVDV-3), *Pestivirus I* (Aydin-like pestivirus), *Pestivirus J* (пестивирус крыс, rat pestivirus) и *Pestivirus K* (атипичный пестивирус свиней, atypical porcine pestivirus) (1).

Для крупного рогатого скота (КРС) основное значение имеют три вида: *Pestivirus A*, *Pestivirus B* и *Pestivirus H*, представленные цитопатогенным (Цп) и нецитопатогенным (Нцп) биотипами. Нцп, в отличие от Цп, не вызывает видимых морфологических разрушений культур клеток и представляет более 90 % популяции вируса (2). Агенты служат возбудителями вирусной диареи — болезни слизистых оболочек (ВД—БС), широко распространенной и экономически значимой инфекции КРС (2-6).

Число известных к настоящему времени субтипов BVDV-1 составляет 22 (от а до v), BVDV-2 — 4 (a, b, c, d) и BVDV-3 — 4 (a, b, c, d) (7, 8). В России установлена циркуляция 12 субтипов BVDV-1 (от 1a до 1r), трех субтипов BVDV-2 (2a, 2b, 2c) и одного субтипа BVDV-3 (3a) (9). Болезнь распространена во всем мире и чаще встречается в странах с высокой плотностью животных, где не применяются систематические меры ее контроля и возбудители длительное время сохраняются в популяциях КРС (5).

Характер эпизоотической ситуации и стационарность очагов инфекции поддерживается в основном за счет циркуляции и постоянной эволюции энзоотических штаммов или заноса новых. Во втором случае возможно проявление широкого набора симптомов, описанных в литературе, и вирус может рассматриваться как эмерджентный (10-13).

У восприимчивых животных все виды рода *Pestivirus* вызывают сходную патологию, а именно острые инфекции с иммуносупрессией, энтериты, рассасывание эмбрионов, аборт на всех стадиях стельности, врожденные уродства плода, рождение слабых телят, бесплодие, респираторную патологию и болезнь слизистых оболочек (14-16).

Характерная особенность представителей рода *Pestivirus* — способность формировать персистентную форму инфекции (ПИ) при заражении плода только Нцп биотипом вируса с 40-х по 125-е сут внутриутробного развития, когда иммунная система плода еще не сформирована (5). Это приводит к рождению иммунотолерантных телят, которые становятся постоянными источниками возбудителя для неиммунных животных. Инфекционная активность вируса в крови таких особей, начиная с внутриутробного развития, высокая (до  $10^6$  ТЦД<sub>50</sub>/мл), и они выделяют его в течение всей жизни со всеми секретами и экскретами организма, в том числе с кровью. Выработки специфических антител у них не происходит (17-20). Превалентность персистентной инфекции в общей популяции КРС находится в пределах 2-3 % (21, 22).

Пестивирусы могут быть контаминантами биологических препаратов (фетальная сыворотка, культуры клеток, вакцины для медицины и ветеринарии, интерфероны, трипсин, биотехнологические препараты, стволовые клетки, сперма быков-производителей, эмбрионы и др.) (23-25).

Существенную роль в распространении возбудителей в популяциях КРС играют контаминированные вакцины. Контаминация биопрепаратов происходит при производстве Нцп штаммами пестивирусов, которые заносятся в культуры клеток случайным образом из непроверенной эмбриональной

сыворотки, используемой для размножения вакцинных штаммов (26, 27). В связи с этим исследования на вирусы-контаминанты включены в руководство по использованию фетальной сыворотки при производстве биологических лекарственных средств (28).

Цель настоящего обзора — краткий анализ инфицированности пестивирусами крупного рогатого скота ряда биологических препаратов, включая медицинские вакцины, и рисков, связанных с использованием контаминированных вакцин и биотехнологических продуктов.

Фетальная сыворотка крупного рогатого скота. Сыворотка плодов коров (*fetal bovine serum, FBS*) — наиболее распространенная и широко используемая добавка к питательным средам для инициации и повышения скорости роста культур клеток млекопитающих (29). FBS представляет собой естественную смесь факторов для прикрепления клеток, стимуляции их роста и пролиферации (30). FBS — товар биотехнологической промышленности и побочный продукт мясной индустрии (31-33).

Сыворотку получают из крови плодов стельных коров мясных пород, предназначенных для убоя на мясо и отобранных случайным образом. В крупных стадах животные обоих полов свободно выпасаются вместе и, как следствие, многие коровы оказываются стельными во время убоя. При убое их плоды отделяют, а кровь собирают в асептических условиях. Используют плоды в возрасте 6 мес. Каждая партия коммерческой FBS оказывается сборной со многих ферм, поэтому возможна контаминация Нцп вирусами на этапе смешивания препарата из различных источников вследствие попадания в общую партию сывороток от персистентно инфицированных плодов (34). Наибольшим спросом FBS пользуется в США и Европе, а основными источниками сырья служат Бразилия, Аргентина, Австралия, Новая Зеландия и Центральная Америка (29). Главные экспортеры готовой продукции для культивирования клеток при производстве вакцин и лекарственных препаратов — США, Новая Зеландия и Австралия (34, 35).

В 1960-х годах было обнаружено, что фетальная сыворотка может быть контаминирована многими вирусами, а вирус ВД—БС среди них наиболее распространен (36). По мере открытия новых видов и субтипов вируса проводилось выявление их присутствия в коммерческих партиях препарата. Из-за риска вирусной контаминации было настоятельно рекомендовано в дополнение к прямому тестированию на вирусы инактивировать сыворотку при помощи валидированных методов. Несмотря на эти процедуры, риск контаминации сыворотки сохраняется до сих пор (37, 38).

Для обеспечения качества FBS репрезентативные образцы, отобранные от объединенных партий, тестируют на стерильность (бактерии, грибы), эндотоксины, иммуноглобулины, вирусы, биохимические показатели и электрофоретические профили. После этого ее стерилизуют фильтрацией и воздействуют гамма-излучением или высокими температурами. Эти процедуры, а также окончательное замораживание обеспечивают дополнительную безопасность в отношении вирусов. Премиум-качеством FBS считается низкое содержание иммуноглобулинов, отсутствие вирусов и эндотоксинов (36, 39, 40).

Однако не всегда все партии сыворотки проходят необходимое тестирование, либо оно оказывается недостаточно эффективным. Так, В. Makoschey с соавт. (26) показали, что 4 из 7 партий FBS после обработки были контаминированы инфекционным Нцп BVDV-1. Н. Xia с соавт. (41) впервые продемонстрировали, что коммерческие продукты FBS различного географического происхождения контаминированы не только BVDV-1 и BVDV-2, но и эмерджентным BVDV-3. Анализ методом ОТ-ПЦР 33 партий FBS от 10

производителей выявил BVDV-1 в 29 партиях, полученных из 11 стран. В 11 партиях из Южной Америки обнаружили BVDV-2. BVDV-3 выявили в 13 партиях из Австралии, Бразилии, Канады и Мексики. S.Q. Zhang с соавт. (42) в 2014 году установили, что и китайская сыворотка КРС из разных регионов страны контаминирована как минимум одним видом пестивирусов, включая BVDV-1 и BVDV-2.

В настоящее время считается, что *Pestivirus H* зародился в Бразилии и был занесен в другие страны и на континенты с контаминированной фетальной сывороткой и вакцинами. По данным F.V. Bauermann с соавт. (43), более 30 % партий FBS из Южной Америки, тестированных в Европе, содержали вирус. M. Giannarioli с соавт. (44) исследовали образцы 26 архивных партий препарата, полученных в 1992-2013 годах, которые прошли процесс фильтрации и гамма-облучения. Методом ПЦР во всех образцах выявили как минимум по одному пестивирусу КРС, 20 из них содержали BVDV-1, 10 — BVDV-2, 15 — BVDV-3 «бразильской группы». Семь партий были произведены в Южной Америке, одна — в Австралии, а для семи происхождения не определили.

C. Luzzago с соавт. (45) считают, что распространению пестивирусов в Италии во многом способствовало использование контаминированной фетальной сыворотки и вакцин. F.V. Bauermann с соавт. (46) после проверки 90 серий коммерческой сыворотки, произведенной в США, но расфасованной в Европе, не обнаружили BVDV-3 и сделали вывод об отсутствии его циркуляции в стране. Однако в других 19 лотах присутствовал BVDV-1, а в одном BVDV-2. T. Kozasa с соавт. (47) выявили геном BVDV-1 в 28 из 49 исследованных образцов в Японии. O. Zabal с соавт. (36) обнаружили BVDV-1 в двух из 20 коммерческих пулов сыворотки в Аргентине. В России А.Г. Глотов с соавт. (9) и С.В. Котенева с соавт. (48) выявили BVDV-3 итало-бразильской группы (3а) в 7 лотах эмбриональной сыворотки, используемой в нескольких медицинских и ветеринарных НИИ.

Таким образом, вероятность контаминации FBS пестивирусами остается реальным. Этот факт в сочетании с использованием сыворотки в качестве добавки к питательным средам создает риск инфицирования культур клеток даже при низком содержании вируса. Полученные данные подтверждают необходимость постоянного обновления и совершенствования методов выявления пестивирусов КРС, а также разработки правил международной торговли FBS и животными.

Учитывая возможное многообразие пестивирусов в коммерческих партиях FBS, в последние годы ветеринарные специалисты апробировали некоторые технологии, направленные на снижение количества или инактивацию вируса с целью его элиминации. В соответствии с директивой Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA, <https://www.ema.europa.eu/en/homepage>) вирус включен в список тестируемых при проверке качества процедуры инактивации (28). Совершенствуются методы инактивации вируса. Получен хороший эффект от импульсной обработки FBS ультрафиолетовыми лучами с  $\lambda = 355$  и 266 нм (31, 49).

**Культуры клеток.** Клеточные и тканевые культуры — незаменимый инструмент в ветеринарных, биомедицинских исследованиях и биотехнологии, где линии культур клеток животного происхождения используются при производстве биологических продуктов (32). Клеточные и тканевые культуры нашли широкое применение во многих областях ветеринарии и медицины — например, в лабораторной диагностике, при производстве биофармацевтических препаратов и вакцин, изучении онкологических заболеваний, скрининге и разработке лекарственных препаратов, в генной

и клеточной терапии, тканевой инженерии, при искусственном оплодотворении, а также в испытаниях на токсичность (50, 51).

В отличие от контаминации бактериями и микоплазмами, которые выявляются относительно легко, вирусная контаминация представляет серьезную угрозу из-за сложности обнаружения некоторых вирусов и отсутствия эффективных методов деконтаминации инфицированных клеточных культур. Контаминация происходит только нецитопатогенными штаммами вирусов, размножение которых не вызывает видимой деструкции клеток, но приводит к снижению их энергетического потенциала. Вирус, размноженный в таких клеточных линиях, потенциально опасен для других клеточных культур в исследовательских лабораториях из-за перекрестного заражения, а также для животных и человека в случае производства инъекционных биологических препаратов. Единственный способ защитить клеточные культуры для исследований, разработок и биотехнологической промышленности от вирусов — предотвратить такое заражение. Культуры клеток могут контаминироваться при подготовке первично трипсинизированных культур (поскольку источник уже был инфицирован, например, трипсин или эмбриональная сыворотка), из-за использования контаминированного сырья или при пассажах через животных (52-54).

Высокой чувствительностью к инфицированию нецитопатогенным биотипом вируса обладают как первично трипсинизированные, так и перевиваемые линии культур клеток, полученные из тканей КРС, а также других видов животных. В литературе описана контаминация стволовых клеток человека (55).

Тестирование 41 линии культур клеток из банка American Type Culture Collection (ATCC) в 1994 году показало высокую степень контаминации пестивирусами культур клеток овец, коз, кроликов, кошек, крупного рогатого скота. Свободными от вирусов оказались культуры клеток свиного происхождения (56, 57). Линии клеток обезьян (LLC MK2) были переменного восприимчивыми, но линия клеток почки зеленой африканской мартышки (Vero) эффективно поддерживала репликацию вируса (26).

Из-за контаминации клеточных культур нецитопатогенными пестивирусами выводы о вирулентности и других процессах, связанных со взаимодействием с организмом-хозяином на клеточном и молекулярном уровнях, могут быть ошибочными. Инфицирование нецитопатогенными штаммами BVDV становится причиной недостоверных результатов исследований *in vitro*, недопустимо при использовании культур клеток в коммерческих целях, а также представляет серьезный риск при вирусологических и диагностических процедурах, производстве вакцин (27). По данным D.A. Stringfellow с соавт. (58), 5 из 39 клеточных линий, использовавшихся в лаборатории, были инфицированы BVDV, а источником оказалась FBS.

В нашей стране Л.В. Урываев и соавт. (59) впервые обнаружили контаминацию вирусом вирусной диареи 127 клеточных линий и отливок, используемых в медицинских вирусологических исследованиях, 37 образцов применяемых для культивирования клеток коммерческих эмбриональных сывороток от отечественных и зарубежных фирм. При иммуноферментном анализе (ИФА) сывороток крови ветеринарных работников из животноводческих хозяйств России антитела к BVDV-1 обнаружили в 42 пробах. В другом исследовании эти же авторы выявили вирус в 25 % образцов клеток и в 75 % фетальных сывороток. Впервые было показано, что вирус может размножаться и персистировать во многих линиях клеток человека, обезьяны, свиньи, овцы, кролика, хомячка, собаки, кошки и других видов животных в относительно высоких титрах (60).

С.В. Вангели с соавт. (61) изучили несколько перевиваемых линий культур клеток, применяемых для получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота, и установили в них смешанную хроническую инфекцию вирусами лейкоза и вирусной диареи, что, по мнению авторов, также связано с контаминированной фетальной сывороткой. Использование таких культур для производства антигенов gr51 и p24 требует тщательного исследования контрольных положительных сывороток, входящих в диагностические наборы.

С.В. Алексеенкова с соавт. (62) установили контаминацию культур клеток бычьего и свиного происхождения вирусом диареи крупного рогатого скота. Источником вируса, вероятно, послужила сыворотка КРС.

При исследовании 117 клеточных серий и 35 проб эмбриональной сыворотки на контаминацию возбудителем вирусной диареи крупного рогатого скота агент был обнаружен в 25 % образцов культур клеток и в 45 % образцов сыворотки. Авторы отмечают, что в России большое количество серий фетальной сыворотки телят контаминировано этим патогеном. Клеточные культуры, применяемые при производстве живых противовирусных вакцин, не должны использоваться более 20 пассажей, а каждый пассаж следует проверять на наличие вирусов-контаминантов (63).

А.Г. Глотов с соавт. (64) исследовали 9 линий перевиваемых культур клеток различного происхождения: MDBK, CRFK, RK13, ТЕВ, L929, MF (Mouse Fibroblasts), КСТ, ВНК21, Vero. Во всех присутствовал геном BVDV-1a. Дополнительными исследованиями в перевиваемых линиях культур клеток Taurus и FLK обнаружили BVDV-1b, а в культуре клеток FK-81 — BVDV-2. L.G. Holinka-Patterson с соавт. (65) сообщали об обнаружении генома BVDV-1a в перевиваемой линии культуры клеток LFBK- $\alpha\gamma\beta_6$ , используемой для культивирования вируса ящура КРС.

В качестве метода деконтаминации материалов (фетальная сыворотка, трипсин, пепсин и др.), используемых для выращивания культур клеток, применяют, в частности, принцип высокотемпературной кратковременной технологии (high temperature short-time technology, HTST). Считается, что риск вирусного заражения можно снизить, инактивируя или устраняя вирусы из среды для культивирования клеток и питательных растворов. Для этого также предложены методы нанофльтрации, ультрафиолетового облучения и технологии с применением гамма-излучения (66, 67).

**Вакцины.** Многие продукты биотехнологии (вакцины, рекомбинантные белки, экспрессированные белки, диагностические препараты) разработаны с использованием различных культур клеток, в которые добавлялась эмбриональная сыворотка КРС. Следовательно, эти продукты потенциально подвержены заражению пестивирусами и могут в определенных ситуациях представлять опасность для животных и даже человека. При производстве вакцин вирус-контаминант может препятствовать размножению вакцинного штамма вируса в инфицированной культуре клеток, снижая его титр, что требует повышения заражающей дозы, а также реплицироваться вместе с ним в высоких титрах. Последствия контаминации вакцин могут быть различными (26, 27, 52).

**Ветеринарные вакцины.** Результат контаминации зависит от вида вакцин (живые или убитые), титра контаминирующего вируса, вирулентности и степени его инактивации при производстве. Практическими последствиями загрязнения вакцины BVDV могут быть инфекция (клиническая или субклиническая) реципиента или серологическая реакция на контаминант.

Пестивирусы обладают выраженными иммуносупрессивными свойствами и синергически взаимодействуют с другими патогенами (68),

что может привести к возникновению новых инфекций в стаде. Кроме того, вакцинация стельных серонегативных телок живыми вакцинами, контаминированными Нцп штаммами, приводит к рождению персистентно инфицированных телят, к порокам развития, абортам (2, 69) и возникновению болезни слизистых оболочек у телят (70), что повышает риск распространения вируса по всему стаду.

С. J. Brusckhe с соавт. (71) обнаружили вирус диареи в 7 из 82 партий маркерной вакцины против инфекционного ринотрахеита, которые были на голландском рынке в феврале 1999 году. Шесть партий препарата содержали BVDV-1 и одна — BVDV-2. Использование этой партии вакцины привело к вспышке болезни у привитого поголовья. Н. W. Barkema с соавт. (72) описали вспышку вирусной диареи, вызванную введением животным другой серии вакцины против инфекционного ринотрахеита, контаминированной Нцп BVDV-2. Заболеваемость привитых животных была высокой на 11 из 12 ферм, а на пяти фермах заболело более 70 % животных. Больных животных выбраковали. Всего в Голландии и Италии зарегистрировали три вспышки вирусной диареи после использования контаминированной вакцины. Эти серии препарата были изъяты с рынка.

Е. Falcone с соавт. (73) экспериментально воспроизвели у серонегативных телят 3-месячного возраста тяжелые признаки вирусной диареи нецитопатогенным BVDV-2, выделенным из живой вакцины против инфекционного ринотрахеита. Полученные данные свидетельствуют об инфекционном характере контаминанта и его способности вызывать вспышки заболевания при вакцинации восприимчивых животных.

В нескольких статьях сообщалось о проблемах контаминации других вакцин ветеринарного назначения. Так, с помощью ОТ-ПЦР было обнаружено присутствие BVDV 1a, 1b, 1c и 1d в живых вирусных вакцинах против болезни Акабана, болезни Ибараки, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, парвовирусной инфекции свиней, трансмиссивного гастроэнтерита. Источником вируса служила эмбриональная сыворотка (74). Вирулентный пестивирус, ставший причиной вспышек вирусной диареи у привитых животных, присутствовал в вакцинах против классической чумы свиней, респираторно-синцитиальной инфекции, инфекционного ринотрахеита, коронавирусной инфекции крупного рогатого скота в некоторых странах Европы (27). N. Gómez-Romero с соавт. (75) тестировали методом ОТ-ПЦР шесть партий живой вакцины против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита, а также живой вакцины против бешенства от разных мексиканских производителей, восемь партий культур клеток MDCK, MDBK и ВНК- 21, а также 10 партий FBS, подвергшихся гамма-облучению (всего 24 образца). Пятнадцать образцов из 24 содержали BVDV 1a, 1b и 2a.

В партии коммерческой вакцины против чумы мелких жвачных животных, применявшейся в некоторых административных районах Республики Таджикистан, обнаружили BVDV-3 (76). Установлена роль BVDV-3а итало-бразильской группы в возникновении респираторных болезней телят, абортов, системных инфекций и энтеритов у телят и взрослых животных в нескольких хозяйствах Сибири. Источником инфекции была контаминированная живая вакцина (9).

*Вакцины для человека.* Из-за пластичности пестивирусов вопрос об их зооантропонозном потенциале остается открытым. Факты контаминации вакцинных препаратов для медицины приводятся в литературе с конца 1990-х—начала 2000-х годов. Так, М. Giangaspero с соавт. (77) исследовали 29 моновакцин против кори, эпидемического паротита, краснухи, полиомиелита, восемь поливалентных препаратов, содержащих антигены кори,

паротита и краснухи (в Европе было произведено 24 препарата, в США — 10, в Японии — 4). В результате 5 вакцин (13,1 %) содержали РНК пестивируса крупного рогатого скота. Три из них (две вакцины против кори и одна против краснухи) поступили из Европы и две (против эпидемического паротита и краснухи) были японского производства. Анализ нуклеотидных последовательностей подтвердил присутствие в вакцинах РНК BVDV, причем в одной вакцине против кори выявили BVDV 1b, а в образцах японских вакцин против паротита и краснухи — соответственно BVDV 1a и 1c. В двух европейских вакцинах против кори и краснухи присутствовал BVDV-1d. Геном вируса обнаруживали также в вакцине против гриппа человека (78). R. Nagasawa с соавт. (79) проверяли живые вирусные вакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи. Геном BVDV-1 обнаружили в двух комбинированных вакцинах против кори-паротита-краснухи и в двух моновалентных вакцинах против паротита и краснухи, а также против японского энцефалита.

Последствия контаминации культур клеток, в которых происходит размножение вакцинных штаммов, зависят от их вида. S.A. Audet с соавт. (80) анализировали 38 партий вирусных вакцин и пять партий интерферона-альфа, произведенных в США. Все препараты дали отрицательный результат в ОТ-ПЦР, за исключением вирусвакцины, полученной в культуре клеток почек кролика. С целью определения перmissивности для репликации пестивирусов КРС клеточные линии, используемые для производства этих вакцин, экспериментально инфицировали штаммом NADL BVDV. Клетки MRC-5 и WI-38 человека не поддерживали репликацию вируса. Признаки пестивирусной инфекции обнаружили в клетках Vero, CHO, CEF и других. Эти данные свидетельствуют о том, что вирусные вакцины, полученные в культурах клеток человека, имеют низкий риск контаминации пестивирусами, а в клеточных линиях других видов животных — высокий.

E. Studer с соавт. (81) тестировали 36 партий живых вирусных вакцин для человека на контаминацию вирусом вирусной диареи и выявили РНК BVDV-1a в 33 % партий вакцины против эпидемического паротита одного производителя. Авторы сделали вывод о том, что вирус попадает в диплоидную культуру клеток человека MRC-5, используемую для накопления вакцинного штамма, из контаминированной фетальной сыворотки, но не может реплицироваться. Все попытки обнаружить вирусный антиген в этой культуре клеток или заразить ее BVDV не увенчались успехом. Таким образом, контаминация BVDV фетальных сывороток, используемых в производстве вакцин в культуре клеток MRC-5, не представляет непосредственной опасности для здоровья человека. Кроме того, дополнительное гамма-облучение сыворотки разрушает частицы вируса, что предотвращает его попадание в вакцины.

M. Laassri с соавт. (82) при помощи ОТ-ПЦР, иммунофлуоресценции и секвенирования исследовали семь партий трехвалентной вакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи, одну партию моновакцины против кори, 17 партий FBS от разных поставщиков, четыре партии лошадиной сыворотки, две партии бычьего трипсина и пять партий свиного трипсина. Все партии FBS и одна партия трипсина бычьего происхождения содержали геном BVDV-1, а вакцины и другие образцы — нет. Эти данные подтвердили мнение о том, что нуклеиновая кислота BVDV может присутствовать в исходных материалах, полученных от КРС, но не в готовых вакцинных продуктах.

В настоящее время до конца неизвестно о способности пестивирусов крупного рогатого скота вызывать заболевание людей. В литературе

описаны случаи выявления вируснейтрализующих антител к BVDV-1 в пробах сыворотки крови людей, контактировавших с инфицированным скотом (59, 60). Антитела к BVDV были обнаружены в 40 % сывороток, взятых у близнецов с шизофренией (83). В другом исследовании антиген BVDV выявили в 23,6 % образцов фекалий от детей с гастроэнтеритом (84).

Анализ образцов ткани головного мозга плодов с микроцефалией во время вспышки болезни Зика в Бразилии в 2015 году позволил предположить наличие пептидов из полипротеина BVDV-подобного вируса (85). На этом основании была высказана гипотеза, что вирус Зика может действовать вместе с BVDV, вызывая микроцефалию плода у человека (86). Однако доказательств того, что BVDV играет роль в указанной патологии, до сих пор недостаточно (87).

В России подобные работы не проводились, что обуславливает актуальность проблемы и ее научное значение, а также необходимость выполнения таких исследований.

Сперма быков-производителей. Одним из основных источников распространения возбудителей многих вирусных болезней служит сперма быков-производителей, однако при вирусной диарее этот путь не считается значимым. Сперма представляет опасность, когда она получена от серонегативных персистентно инфицированных (ПИ) быков, выделяющих вирус в течение всей жизни с секретами и экскретами организма; транзитно инфицированных быков, выделяющих вирус в течение 2-3 нед до появления специфических антител; серопозитивных быков с тестикулярной инфекцией, выделяющих вирус продолжительное время (88-91).

А.В. Нефедченко с соавт. (92) выявили присутствие вируса первого вида в 0,4 % серий от 4,1 % быков на племпредприятии, полученных от ПИ быка. Оплодотворяющая способность инфицированной спермы снижена, а последствиями осеменения серонегативных особей становятся снижение оплодотворяемости, ранняя эмбриональная смертность, аборт и рождение ПИ телят (88).

Эмбрионы. В настоящее время пересадка эмбрионов, наряду с искусственным осеменением, широко применяется в молочном животноводстве. Эмбрионы могут быть контаминированы BVDV, если инфицированные ооциты или фолликулярную жидкость получают от персистентно инфицированного или транзитно инфицированного КРС. Эмбрионы, полученные от ПИ доноров и пересаженные серопозитивным реципиентам, не всегда передают вирус потомству (88).

Первичным источником инфицирования донорских клеток при производстве эмбрионов также может быть фетальная сыворотка. Риск передачи вируса через зараженные ооциты со скотобойни относительно низкий, и его можно свести к минимуму посредством удаления клеток кумюса и соответствующих процедур отмывки ооцитов (93).

В связи с изложенным, риск передачи BVDV посредством эмбрионов считается незначительным в случае BVDV, кроме того, обработка эмбрионов трипсином и перенос их серонегативным реципиентам снижает риск инфицирования (94).

Суммируя, отметим, что при разработке биологических препаратов (вакцин и других) для ветеринарного и особенно медицинского применения необходимо строго придерживаться требований Всемирной организации здоровья животных (95), российской и европейской фармакопеи (96-97). Одним из возможных путей решения проблемы, наряду с контролем материалов, может быть применение в биотехнологиях производства вакцинных препаратов бессывороточных сред для культивирования клеток и исключение

использования материалов животного происхождения (98) с соответствующим контролем.

Итак, контаминация культур клеток млекопитающих пестивирусами крупного рогатого скота представляет серьезную угрозу и может привести к ложным результатам диагностических исследований, заражению вирусами биологических препаратов, полученных из инфицированных культур клеток, и, наконец, к инфицированию реципиентов. Только тщательный рутинный контроль и выбраковка животных, используемых для получения фетальной сыворотки или органов для культур клеток, всех полученных на их основе серий сыворотки, культур клеток и биопрепаратов, может предотвратить потенциально опасную контаминацию пестивирусами. При этом необходимо учитывать пластичность вирусов и появление новых видов и субтипов. В условиях глобализации, стремительного развития клеточных биотехнологий, современных направлений ветеринарии и медицины ежегодно повышается спрос на фетальную сыворотку крови (FBS) крупного рогатого скота. Проблема контаминации FBS не теряет актуальности из-за повышенного спроса, наличия недобросовестных производителей и продавцов, несоответствия маркировки товара заявленной и отсутствия унифицированных методик контроля. В связи с расширением рынка фетальной сыворотки факт существования 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 такого препарата в нашей стране создает возможность появления на рынке товара сомнительного качества от различных производителей.

*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,  
homeovet@narod.ru, k-olga-83@mail.ru*

*Поступила в редакцию  
21 апреля 2023 года*

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2024, V. 59, № 2, pp. 179-193*

## **BOVINE PESTIVIRUSES AS CONTAMINANTS OF BIOLOGICAL PREPARATIONS** (review)

*A.G. Glotov, T.I. Glotova✉, S.V. Koteneva, A.V. Nefedchenko, O.V. Semenova*

*Siberian Federal Scientific Center of Agro-BioTechnologies RAS, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, r.p. Krasnoobsk, PO box 463, Novosibirskii Region, Novosibirsk Province, 630501 Russia, e-mail glotov\_vet@mail.ru, t-glotova@mail.ru (✉ corresponding author), koteneva-sv@mail.ru, homeovet@narod.ru, k-olga-83@mail.ru*

**ORCID:**

*Glotov A.G. orcid.org/0000-0002-2006-0196*

*Nefedchenko A.V. orcid.org/0000-0002-4181-4268*

*Glotova T.I. orcid.org/0000-0003-3538-8749*

*Semenova O.V. orcid.org/0000-0002-1165-5243*

*Koteneva S.V. orcid.org/0000-0003-2649-7505*

The authors declare no conflict of interests

**Acknowledgements:**

Supported financially by the Russian Science Foundation, grant No. 23-26-00006 "Genetic variability and diversity of cattle pestiviruses, the main risks of introducing new genetic variants into the territory of the Russian Federation"

*Final revision received April 21, 2023*

doi: 10.15389/agrobiology.2024.2.179eng

*Accepted May 25, 2023*

### **Abstract**

Bovine pestiviruses are causative agents of bovine viral diarrhea-mucosal disease, a widespread and economically significant infection (J.F. Ridpath, 2010; C.A. Evans et al., 2019). These

viruses include the prototype species *Pestivirus A* (bovine viral diarrhoea virus type 1; BVDV-1), *Pestivirus B* (bovine viral diarrhoea virus type 2; BVDV-2) and *Pestivirus H* (Hobi-like pestivirus, HoBiPeV; bovine viral diarrhoea virus type 3; BVDV-3) (P. Simmonds et al., 2017; ICTV, 2019). All agents are represented by cytopathogenic (CP) and non-cytopathogenic (NCP) biotypes. The NCP biotype, unlike CP, does not cause visible morphological destruction of cell cultures and represents more 90 % of virus population (P.H. Walz et al., 2020). The number of known subtypes of BVDV-1 is 22 (a to v), BVDV-2 4 (a-d) and BVDV-3 4 (a-d) (N. Su et al., 2023). In Russia, circulation of 12 subtypes of BVDV-1, three subtypes of BVDV-2 and one subtype of BVDV-3 has been established (A.G. Glotov et al., 2022). One of the ways of spreading pathogens in cattle populations may be biological products produced using contaminated fetal sera (L.V. Uryvaev et al., 2012; A.G. Glotov et al., 2018), cell cultures and trypsin (O. Lung et al., 2021), namely veterinary vaccines and interferons. Agents can be distributed through embryos and sires' semen (J.A. Gard et al., 2007; K. Gregg et al., 2010). Contaminated medical vaccines (M. Giangaspero et al., 2004), as well as biotechnological materials (L. Djemal et al., 2021), and stem cells (S. Viau et al., 2019) can pose a significant problem. Contamination of vaccines occurs during their production with NCP strains of all types of pestiviruses which are randomly introduced into cell cultures from untested fetal serum (B. Makoschey et al., 2003; P.P. Pastoret, 2010). Existing decontamination methods cannot always ensure complete inactivation of agents (W.P. Paim et al., 2021). An additional challenge is the increasing number of virus species and subtypes (C. Luzzago et al., 2021). Contamination of mammalian cell cultures can lead to false diagnostic test results, contamination of biological products and their transfer to recipients. Antibodies to bovine pestiviruses were found in 40 % of serum samples from twins with schizophrenia (M. Giangaspero, 2013), and their antigens were found in 23.6 % of fecal samples from children with gastroenteritis (R. Yolken et al., 1989). Only careful routine monitoring and culling animals used to obtain fetal serum or organs for cell cultures, all batches of serum, cell cultures and biological products based on these components, can prevent potentially dangerous contamination with pestiviruses. It is necessary to take into account the plasticity of viruses and the emergence of new species and subtypes.

Keywords: pestiviruses, cattle, contamination, fetal serum, cell cultures, vaccines, biological products, sperm, embryos.

## REFERENCES

1. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Family: Flaviviridae. Genus: Pestivirus*. Available: <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridaeport/flaviviridaeport/flaviviridae/pestivirus>. No date.
2. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: diagnosis, management, and control*. S.M. Goyal, J.F. Ridpath (eds.). Blackwell Publishing Ltd., 2005 (doi: 10.1002/9780470344453).
3. Verkhovskaya A.E., Sergeev V.A., Aliper T.I., Ivanov E.V. *Veterinariya*, 2009, 8: 3-7 (in Russ.).
4. Evans C.A., Pinior B., Larska M., Graham D., Schweizer M., Guidarini C., Decaro N., Ridpath J., Gates M.C. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(2): 640-652 (doi: 10.1111/tbed.13068).
5. 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).
6. Simmonds P., Becher P., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., Muerhoff S., Pletnev A., Rico-Hesse R., Smith D.B., Stapleton J.T., ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. *Journal of General Virology*, 2017, 98(1): 2-3 (doi: 10.1099/jgv.0.000672).
7. Su N., Wang Q., Liu H.-Y., Li L.-M., Tian T., Yin J.-Y., Zheng W., Ma Q.-X., Wang T.-T., Li T., Yang T.-L., Li J.-M., Diao N.-C., Shi K., Du R. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus in cattle between 2010 and 2021: a global systematic review and meta-analysis. *Front. Vet. Sci.*, 2023, 9: 1086180 (doi: 10.3389/fvets.2022.1086180).
8. Walz P.H., Chamorro M.F., Falkenberg M.S., Passler T., van der Meer F.R., Woolums A. Bovine viral diarrhoea virus: an updated American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2020, 34(5): 1690-1706 (doi: 10.1111/jvim.15816).
9. Glotov A.G., Glotova T.I., Nefedchenko A.V., Koteneva S.V. *Voprosy virusologii*, 2022, 67(1): 18-26 (doi: 10.36233/0507-4088-96) (in Russ.).
10. Moennig V., Becher P. Control of bovine viral diarrhoea. *Pathogens*, 2018, 7(1): 29-41 (doi: 10.3390/pathogens7010029).
11. Glotov A.G., Glotova T.I. Atypical bovine pestiviruses (review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2015, 50(4): 399-408 (doi: 10.15389/agrobiol.2015.4.399eng).
12. Bauermann F.V., Ridpath J.F. Hobi-like viruses — the typical 'atypical bovine pestivirus'. *Animal Health Research Reviews*, 2015, 16(1): 64-69 (doi: 10.1017/S146625231500002X).
13. Pinior B., Firth C.L., Richter V., Lebl K., Trauffer M., Dzieciol M., Hutter S.E., Burgstaller J., Obritzhauser W., Winter P., Käsbohrer A. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Preventive*

- Veterinary Medicine*, 2017, 137(Pt. A): 77-92 (doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.12.014).
14. Grooms D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2004, 20(1): 5-19 (doi: 10.1016/j.cvfa.2003.11.006).
  15. O'Rourke K. BVDV: 40 years of effort and the disease still has a firm hold. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2002, 220(12): 1770-1773.
  16. Decaro N. HoBi-like pestivirus and reproductive disorders. *Front. Vet. Sci.*, 2020, 7: 622447 (doi: 10.3389/fvets.2020.622447).
  17. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhea virus. In: *Encyclopedia of virology*. B.W.J. Mahy, M.H.V. Regenmortel (eds.). Elsevier, Oxford (UK), 2008: 374-380 (doi: 10.1016/B978-012374410-4.00354-X).
  18. Georges H.M., Knapck K.J., Bielefeldt-Ohmann H., Van Campen H., Hansen T.R. Attenuated lymphocyte activation leads to the development of immunotolerance in bovine fetuses persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Biology of Reproduction*, 2020, 103(3): 560-571 (doi: 10.1093/biolre/iaaa088).
  19. Georges H.M., Van Campen H., Bielefeldt-Ohmann H., Hansen T.R. Epigenomic and proteomic changes in fetal spleens persistently infected with bovine viral diarrhea virus: repercussions for the developing immune system, bone, brain, and heart. *Viruses*, 2022, 14(3): 506 (doi: 10.3390/v14030506).
  20. Chi S., Chen S., Jia W., He Y., Ren L., Wang X. Non-structural proteins of bovine viral diarrhea virus. *Virus Genes*, 2022, 58(6): 491-500 (doi: 10.1007/s11262-022-01914-8).
  21. Lindberg A.L.E. Bovine viral diarrhea virus infections and its control. A review. *Veterinary Quarterly*, 2003, 25(1): 1-16 (doi: 10.1080/01652176.2003.9695140).
  22. Bielefeldt-Ohmann H. Special issue: bovine viral diarrhea virus and related pestiviruses. *Viruses*, 2020, 12(10): 1181 (doi: 10.3390/v12101181).
  23. Glotov A.G., Glotova T.I., Koteneva S.V. Pestiviruses, which contaminate imported fetal bovine serum, may be a cause of the global spreading of viral diarrhea in cattle — a mini review. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, 53(2): 248-257 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.2.248eng).
  24. Koteneva S.V., Maksyutov R.A., Glotova T.I., Glotov A.G. Identification of the bovine atypical pestivirus in biological samples. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, 52(6): 1259-1264 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1259eng).
  25. Zhang P., Cao L., Ma Y.Y., Su B. Zhang C.Y., Li Y.P. Metagenomic analysis reveals presence of different animal viruses in commercial fetal bovine serum and trypsin. *Zool Res.*, 2022, 43(5): 756-766 (doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2022.093).
  26. Makoschey B., van Gelder P.T.J.A., 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).
  27. Pastoret P.P. Human and animal vaccine contaminations. *Biologicals*, 2010, 38(3): 332-334 (doi: 10.1016/j.biologicals.2010.02.015).
  28. EMA. *Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products*. 2013. Available: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-use-bovine-serum-manufacture-human-biological-medicinal-products-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-use-bovine-serum-manufacture-human-biological-medicinal-products-revision-1_en.pdf). No date.
  29. Gstraunthaler 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).
  30. Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *Altex*, 2003, 20(4): 275-281.
  31. Flatschart R.B., Caldas L.A., de Oliveira Almeida D., dos Santos N.C., da Cunha Boldrini L., 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*. L.V. Berhardt (ed.). Nova Science Publishers, New York, 2016, 95: 75-95.
  32. Caballero S., Diez J.M., Belda F.J., Otegui M., Herring S., Roth N.J., Lee D., Gajardo R., Jorquera J.I. Robustness of nanofiltration for increasing the viral safety margin of biological products. *Biologicals*, 2014, 42(2): 79-85 (doi: 10.1016/j.biologicals.2013.10.003).
  33. Van der Valk J., Bieback K., Buta C., Cochrane B., Dirks W.G., Fu J., Hickman J.J., Hohensee C., Kolar R., Liebsch M., Pistollato F., Schulz M., Thieme D., Weber T., Wiest J., Winkler S., Gstraunthaler G. Fetal bovine serum (FBS): past—present—future. *ALTEX — Alternatives to Animal Experimentation*, 2018, 35(1): 99-118 (doi: 10.14573/altex.1705101).
  34. Kwon S.Y., Kim I.S., Bae J.E., Kang J.W., Cho Y.J., Cho N.S., Lee S.W. Pathogen inactivation efficacy of Mirasol PRT System and Intercept Blood System for non-leucoreduced platelet-rich plasma-derived platelets suspended in plasma. *Vox Sang.*, 2014, 107(3): 254-260 (doi: 10.1111/vox.12158).
  35. Sadeghi M., Kapusinszky B., Yugo D.M., Phan T.G., Deng X., Kanevsky I., Opriessnig T., Woolums A.R., Hurley D.J., Meng X.J., Delwart E. Virome of US bovine calf serum. *Biologicals*, 2017, 46: 64-67 (doi: 10.1016/j.biologicals.2016.12.009).
  36. Zabal O., Kobrak A.L., Lager I.A., Schudel A.A., Weber E.L. Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhea virus. *Rev. Argent. Microbiol.* 2000, 32(1): 27-32.
  37. Paim W.P., Maggioli M.F., Falkenberg S.M., Ramachandran A., Weber M.N., Canal C.W.,

- Bauermann F.V. Virome characterization in commercial bovine serum batches — a potentially needed testing strategy for biological products. *Viruses*, 2021, 3(12): 2425 (doi: 10.3390/v13122425).
38. Pecora A., Pérez López J., Jordán M.J., Franco L.N., Politzki R., Ruiz V., Alvarez I. Analysis of irradiated Argentinean fetal bovine serum for adventitious agents. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2020, 32: 892-897 (doi: 10.1177/1040638720951556).
  39. La Polla R., Goumaidi A., Daniau M., Legras-Lachuer C., De Saint-Vis B. NGS method by library enrichment for rapid pestivirus purity testing in biologics. *Vaccine*, 2023, 41(3): 855-861 (doi: 10.1016/j.vaccine.2022.12.040).
  40. Carrondo M.J., Alves P.M., Carinhas N., Glassey J., Hesse F., Merten O.W., Micheletti M., Noll T., Oliveira R., Reichl U., Staby A., Teixeira A.P., Weichert H., Mandenius C.F. How can measurement, monitoring, modeling and control advance cell culture in industrial biotechnology? *Biotechnology Journal*, 2012, 7(12): 1522-1529 (doi: 10.1002/biot.201200226).
  41. 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).
  42. 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).
  43. 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. *Veterinary Microbiology*, 2013, 166 (1-2): 242-245 (doi: 10.1016/j.vetmic.2013.04.032).
  44. Giammaroli 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).
  45. Luzzago C., Decaro N. Epidemiology of bovine pestiviruses circulating in Italy. *Front. Vet. Sci.*, 2021, 8: 669942 (doi: 10.3389/fvets.2021.669942).
  46. 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 fetal bovine serum lots. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2014, 26(1): 10-17 (doi: 10.1177/1040638713518208).
  47. Kozasa T., Aoki H., Nakajima N., Fukusho A., Ishimaru M., Nakamura S. Methods to select suitable fetal bovine serum for use in quality control assays for the detection of adventitious viruses from biological products. *Biologicals*, 2011, 39(4): 242-248 (doi: 10.1016/j.biologicals.2011.06.001).
  48. Koteneva S.V., Nefedchenko A.V., Glotova T.I., Glotov A.G. Genetic polymorphism of the bovine viral diarrhoea viruses in big dairy farms in Siberia. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, 53(6): 1238-1246 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.6.1238eng).
  49. Nims R.W., Gauvin G., Plavsic M. Gamma irradiation of animal sera for inactivation of viruses and molluscites — a review. *Biologicals*, 2011, 39(6): 370-377 (doi: 10.1016/j.biologicals.2011.05.003).
  50. Merten O.W. Virus contaminations of cell cultures — a biotechnological view. *Cytotechnology*, 2002, 39(2): 91-116 (doi: 10.1023/A:1022969101804).
  51. Uysal O., Sevimli T., Sevimli M., Gunes S., Eker Sariboyac A., Barh D., Azevedo V. Chapter 17 — Cell and tissue culture: the base of biotechnology. In: *Omics technologies and bio-engineering*. Academic Press, 2018: 391-429 (doi: 10.1016/B978-0-12-804659-3.00017-8).
  52. Lee D.Y., Lee S.Y., Yun S.H., Jeong J.W., Kim J.H., Kim H.W., Choi J.S., Kim G.-D., Joo S.T., Choi I., Hur S.J. Review of the current research on fetal bovine serum and the development of cultured meat. *Food Sci. Anim. Resour.*, 2022, 42(5): 775-799 (doi: 10.5851/kosfa.2022.e46).
  53. Lung O., Candlish R., Nebroski M., Kruckiewicz P., Buchanan C., Moniwa M. High-throughput sequencing for species authentication and contamination detection of 63 cell lines. *Sci. Rep.*, 2021, 11(1): 21657 (doi: 10.1038/s41598-021-00779-5).
  54. Barone P.W., Wiebe M.E., Leung J.C., Hussein I.T.M., Keumurian F.J., Bouressa J., Brussel A., Chen D., Chong M., Dehghani H., Gerentes L., Gilbert J., Gold D., Kiss R., Kreil T.R., Labatut R., Li Y., Mьllberg J., Mallet L., Menzel C., Moody M., Monpoeho S., Murphy M., Plavsic M., Roth N.J., Roush D., Ruffing M., Schicho R., Snyder R., Stark D., Zhang C., Wolfrum J., Sinskey A.J., Springs S.L. Viral contamination in biologic manufacture and implications for emerging therapies. *Nat. Biotechnol.*, 2020, 38(5): 563-572 (doi: 10.1038/s41587-020-0507-2).
  55. Viau S., Eap S., Chabrand L., Lagrange A., Delorme B. Viral inactivation of human platelet lysate by gamma irradiation preserves its optimal efficiency in the expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, 2019, 59(3): 1069-1079 (doi: 10.1111/trf.15205).
  56. Bolin S.R., Ridpath J.F., Black J., Macy M., Roblin R. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virological Methods*, 1994, 48(2-3): 211-221 (doi: 10.1016/0166-0934(94)90120-1).
  57. Dezengrini R., Weiblen R., Flores E.F. Selection and characterization of canine, swine and rabbit cell lines resistant to bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virological Methods*, 2006, 137(1): 51-57 (doi: 10.1016/j.jviromet.2006.05.032).
  58. Stringfellow D.A., Riddell K.P., Givens M.D., Galik P.K., Sullivan E., Dykstra C.C., Robl J.,

- Kasinathan P. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cell lines used for somatic cell cloning. *Theriogenology*, 2005, 63(4): 1004-1013 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.05.021).
59. Uryvaev L.V., Ionova K.S., Dedova A.V., Dedova L.V., Selivanova T.K., Parasyuk N.A., Mezentseva M.V., Kostina L.V., Gushchina E.A., Podchernyaeva R.Ya., Grebennikova T.V. *Voprosy virusologii*, 2012, 5(57): 15-21 (in Russ.).
  60. Uryvaev L.V., Dedova A.V., Dedova L.V., Ionova K.S., Parasyuk N.A., Selivanova T.K., Bun'kova N.I., Gushchina E.A., Grebennikova T.V., Podchernyaeva R.Ya. *Byulleten' eksperimental'noy biologii meditsiny*, 2012, 153(1): 88-93 (in Russ.).
  61. Vangeli S.V., Nadtochey G.A., Gal'nbeq T.V. *Infektsionnye bolezni*, 2016, 14(S1): 57 (in Russ.).
  62. Alekseenkova C.V., Yurov G.K., Gal'nbeq T.V., Kalita I.A., Yurov K.P. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Sel'skokhozyaystvennyye zhivotnyye*, 2013, 1: 15-18 (in Russ.).
  63. Chernykh O.Yu., Mishchenko A.V., Mishchenko V.A., Krivonos R.A., Drobin Yu.D., Lysenko A.A. *Veterinariya Kubani*, 2019, 3: 3-60 (doi: 10.33861/2071-8020-2019-3-3-6) (in Russ.).
  64. Glotov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Maksyutov R.A., Zaberezhnyy A.D. *Voprosy virusologii*, 2018, 63(4): 185-191 (doi: 10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191) (in Russ.).
  65. Holinka-Patterson L.G., Fish I.H., Bertram M.R., Hartwig E.J., Smoliga G.R., Stenfeldt C., Rodriguez L.L., Artz J. Genome of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) contaminating a continuous LFBK- $\alpha$ v $\beta$ 6 cell line. *Microbiology Resource Announcements*, 2022, 11(2): e0116721 (doi: 10.1128/mra.01167-21).
  66. Djemal L., Fournier C., von Hagen J., Kolmar H., Deparis V. Review: High temperature short time treatment of cell culture media and feed solutions to mitigate adventitious viral contamination in the biopharmaceutical industry. *Biotechnol. Progress*, 2021, 37(3): e3117 (doi: 10.1002/btpr.3117).
  67. Gray A.R., Wood B.A., Henry E., King D.P., Mioulet V. Elimination of non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus from the LFBK- $\alpha$ v $\beta$ 6 cell line. *Front Vet Sci.*, 2021, 8: 715120 (doi: 10.3389/fvets.2021.715120).
  68. *Aktual'nye infektsionnye bolezni krupnogo rogatogo skota. Rukovodstvo*. M., 2021.
  69. Oguejiofor C.F., Thomas C., Cheng Z., Wathes D.C. Mechanisms linking bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection with infertility in cattle. *Animal Health Research Reviews*, 2019, 20(1): 72-85 (doi: 10.1017/S1466252319000057).
  70. Liebler-Tenorio E.M., Ridpath J.E., Neill J.D. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2004, 16(5): 388-396 (doi: 10.1177/104063870401600504).
  71. Brusckhe C.J., Paal H.A., Weerdmeester K. Detection of bovine virus diarrhoea virus in a live bovine herpes virus 1 marker vaccine. *Tijdschr Diergeneesk.*, 2001, 126: 189-190.
  72. Barkema H.W., Bartels C.J., van Wuijckhuise L., Hesselink J.W., Holzhauser M., Weber M.F., Franken P., Kock P.A., Brusckhe C.J., Zimmer G.M. Outbreak of bovine virus diarrhoea on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhoea virus type 2. *Tijdschr Diergeneesk.*, 2001, 126(6): 158-165.
  73. Falcone E., Cordioli P., Tarantino M., Muscillo M., Sala G., La Rosa G., Archetti I.L., Marianelli C., Lombardi G., Tollis M. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV-2) isolated from a contaminated vaccine. *Veterinary Research Communications*, 2003, 27(7): 577-589 (doi: 10.1023/a:1026064603630).
  74. Harasawa R. Adventitious pestivirus RNA in live virus vaccines against bovine and swine diseases. *Vaccine*, 1995, 13(1): 100-103 (doi: 10.1016/0264-410x(95)80018-9).
  75. Gómez-Romero N., Velázquez-Salinas L., Ridpath J.F., Verdugo-Rodríguez A., Basurto-Alcántara F.J. Detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus found contaminating commercial veterinary vaccines, cell lines, and fetal bovine serum lots originating in Mexico. *Arch Virol.*, 2021, 166(7): 1999-2003 (doi: 10.1007/s00705-021-05089-9).
  76. Yurov K.P., Anoyatbekova A.M., Alekseenkova S.V. *Veterinariya*, 2016, 10: 8-10 (in Russ.).
  77. Giangaspero M., Vacirca G., Harasawa R., Buttner M., Panuccio A., De Giuli Morghen C., Zanetti A., Belloli A., Verhulst A. Genotypes of pestivirus RNA detected in live virus vaccines for human use. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2001, 63(7): 723-733 (doi: 10.1292/jvms.63.723).
  78. Giangaspero M., Vacirca G., Harasawa R., Buttner M., Panuccio A., De Giuli Morghen C., Zanetti A., Belloli A., Verhulst A. Genotypes of Pestivirus RNA detected in anti-influenza virus vaccines for human use. *Vet. Ital.*, 2004, 40(1): 7-21.
  79. Harasawa R., Tomiyama T. Evidence of pestivirus RNA in human virus vaccines. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32(6): 1604-1605 (doi: 10.1128/jcm.32.6.1604-1605.1994).
  80. Audet S.A., Crim R.L., Beeler J. Evaluation of vaccines, interferons and cell substrates for pestivirus contamination. *Biologicals*, 2000, 28(1): 41-46 (doi: 10.1006/biol.1999.0240).
  81. Studer E., Bertoni G., Candrian U. Detection and characterization of pestivirus contaminations in human live viral vaccines. *Biologicals*, 2002, 30(4): 289-296 (doi: 10.1006/biol.2002.0343).
  82. Laassri M., Mee E.T., Connaughton S.M., Manukyan H., Gruber M., Rodriguez-Hernandez C., Minor P.D., Schepelmann S., Chumakov K., Wood D.J. Detection of bovine viral diarrhoea virus

- nucleic acid, but not infectious virus, in bovine serum used for human vaccine manufacture. *Biologicals*, 2018, 55: 63-70 (doi: 10.1016/j.biologicals.2018.06.002).
83. Giangaspero M. Pestivirus species potential adventitious contaminants of biological products. *Trop. Med. Surg*, 2013, 1(6): 1000153 (doi: 10.4172/2329-9088.1000153).
  84. Yolken R., Leister F., Almeida-Hill J., Dubovi E., Reid R., Santosham M. Infantile gastroenteritis associated with excretion of pestivirus antigens. *Lancet*, 1989, 333(8637): 517-520 (doi: 10.1016/s0140-6736(89)90066-4).
  85. Nogueira F.C.S., Velasquez E., Melo A.S.O., Domont G.B., Sawa A. Zika virus may not be alone: proteomics associates a bovine-like viral diarrhea virus to microcephaly. *bioRxiv*, 2016: 062596 (doi: 10.1101/062596).
  86. Colucci C. Brazil to investigate if other factors act with Zika to cause congenital defects. *BMJ*, 2016, 354: i4439 (doi: 10.1136/bmj.i4439).
  87. Giangaspero M., Okabayashi T. Serological survey on bovine viral diarrhea virus in man and evaluation of relation with Zika virus-associated microcephaly. *Open Veterinary Journal*, 2023, 13(4): 400-406 (doi: 10.5455/OVJ.2023.v13.i4.1).
  88. Gard J.A., Givens M.D., Stringfellow D.A. Bovine viral diarrhea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology*, 2007, 68(3): 434-442 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.04.003).
  89. Givens M.D., Riddell K.P., Edmondson M.A., Walz P.H., Gard J.A., Zhang Y., Galik P.K., Brodersen B.W., Carson R.L., Stringfellow D.A. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*, 2009, 139(1-2): 42-51 (doi: 10.1016/j.vetmic.2009.04.029).
  90. Galuppo A.G., Junior N.B., Arruda N.S., Corbellini A.O., Chiappetta C.M., Pavro D.L., D'Angelo M., Canal C.W., Rodrigues J.L. Evaluation of the effectiveness of semen processing techniques to remove bovine viral diarrhea virus from experimentally contaminated semen samples. *Journal of Virological Methods*, 2013, 187(2): 443-448 (doi: 10.1016/j.jviromet.2012.11.029).
  91. Read A.J., Gestier S., Parrish K., Finlaison D.S., Gu X., O'Connor T.W., Kirkland P.D. Prolonged detection of bovine viral diarrhoea virus infection in the semen of bulls. *Viruses*, 2020, 12(6): 674 (doi: 10.3390/v12060674).
  92. Nefedchenko A.V., Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov A.G. *Veterinariya*, 2022, 9: 18-23 (doi: 10.30896/0042-4846.2022.25.9.18-23) (in Russ.).
  93. Gregg K., Gosch G., Guerra T., Chen S.H., Xiang T., Broek D., Bruner B., Polejaeva I. Large scale in vivo risk assessment of bovine viral diarrhea virus (BVDV) transmission through transfer of bovine embryos produced via somatic cell nuclear transfer (SCNT). *Theriogenology*, 2010, 74(7): 1264-1270 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.05.032).
  94. Stringfellow D.A., Riddell K.P., Galik P.K., Damiani P., Bishop M.D., Wright J.C. Quality controls for bovine viral diarrhea virus-free IVF embryos. *Theriogenology*, 2000, 53(3): 827-839 (doi: 10.1016/S0093-691X(99)00277-0).
  95. *WOAH Terrestrial Manual 2023. Chapter 1.1.9. Tests for sterility and freedom from contamination of biological materials intended for veterinary use*. Paris, 2023: 1-15.
  96. *OFS.1.7.2.0006.15. Ispytanie virusnykh vaksyn na prisutstvie postoronnikh agentov. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii* [OFS.1.7.2.0006.15. Testing viral vaccines for the presence of foreign agents. State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV izd. v 4 volumes; 2018: 2773-2782 (in Russ.).
  97. *European pharmacopoeia. 10th ed.* Council of Europe, Strasbourg, 2019.
  98. Pilgrim C.R., McCahill K.A., Rops J.G., Dufour J.M., Russell K.A., Koch T.G. A review of fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stromal cells and potential alternatives for veterinary medicine. *Front. Vet. Sci*, 2022, 9: 859025 (doi: 10.3389/fvets.2022.859025).