

## GENOTIPI DI *PESTIVIRUS* RNA IDENTIFICATI IN VACCINI VIRALI ANTI INFLUENZA AD USO UMANO

M. Giangaspero<sup>1</sup>, G. Vacirca<sup>1</sup>, R. Harasawa<sup>2</sup>, M. Buttner<sup>3</sup>, A. Panuccio<sup>4</sup>, C. De Giuli Morghen<sup>5</sup>, A. Zanetti<sup>6</sup>, A. Belloli<sup>1</sup> & A. Verhulst<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Milano - Italia

<sup>2</sup> Centro Animale per la Ricerca Biomedica, Facoltà di Medicina, Università di Tokyo - Giappone

<sup>3</sup> Istituto di Immunologia, Centro di Ricerche Federale per le Malattie Virali degli Animali, Tübingen - Germania

<sup>4</sup> Centro Multizonale di Igiene e Prevenzione, Milano - Italia

<sup>5</sup> Istituto di Farmacologia, Facoltà di Medicina, Università degli Studi, Milano - Italia

<sup>6</sup> Istituto di Virologia, Facoltà di Medicina, Università degli Studi, Milano - Italia

<sup>7</sup> Istituto di Medicina Tropicale Prince Léopold, Anversa - Belgio

### RIASSUNTO

*Vaccini ad uso umano, polivalenti contro virus dell'influenza, prodotti in Europa e USA, sono stati testati con RT-nested PCR per la messa in evidenza di Pestivirus contaminanti. Tre campioni (33,3%), su 9 testati, sono risultati positivi per RNA di Pestivirus. La sequenza della regione genomica non tradotta 5' dell'RNA dei Pestivirus contaminanti è stata analizzata sulla base di omologia della sequenza nucleotidica primaria e della struttura secondaria caratteristica dei genotipi. Due sequenze hanno mostrato la loro appartenenza alla specie Pestivirus tipo 1 (diarrea virale bovina), genotipi BVDV-1b e BVDV-1e. I risultati ottenuti nel presente studio confermano precedenti osservazioni, suggerendo la necessità di potenziare le misure per la prevenzione di contaminazioni nei prodotti biologici ad uso umano.*

### PAROLE CHIAVE

Contaminazione - Genotipi - *Pestivirus* - Vaccini.

### Introduzione

I virus della Diarrea Virale Bovina 1 (BVDV-1), Diarrea Virale Bovina 2 (BVDV-2), Border disease (BDV) e Peste suina classica (PSCV) sono specie stabilite del genere *Pestivirus* della famiglia *Flaviviridae*, con la specie proposta «Giraffa» (33), patogeni degli ungulati domestici e selvatici, a distribuzione cosmopolita, responsabili di vari tipi di manifestazioni cliniche.

Ceppi non citopatici (NCP) di BVDV-1 e BVDV-2 sono stati frequentemente indicati come responsabili di contaminazione di prodotti biologici, colture cellulari, incluso cellule primarie e linee cellulari, anche di origine umana (2, 5, 16, 17, 28), siero fetale bovino (1, 3, 26) e vaccini ad uso veterinario (10, 22, 23, 32, 36).

Durante uno studio sperimentale in Giappone, RNA di *Pestivirus* è stato trovato anche in quat-

tro vaccini virali vivi ad uso umano (20). I vaccini erano stati prodotti da diverse ditte farmaceutiche, regolarmente autorizzati e commercializzati: due monovalenti contro parotite e rosolia e due polivalenti contro morbillo, parotite e rosolia. L'analisi comparativa della sequenza nucleotidica della 5'-UTR aveva identificato RNA di BVDV quale contaminante. Allo stesso modo, interferone ad uso umano è stato trovato contaminato da RNA di BVDV (19). Uno studio realizzato da Vilcek *et al.* (35) ha riportato risultati negativi su 30 vaccini virali umani da ditte europee valutati con PCR per la presenza di RNA di *Pestivirus*. Gli Autori avevano concluso che l'evenienza di contaminazione di vaccini virali umani non rappresentava un fenomeno diffuso.

Ulteriori indagini sono state intraprese su vaccini virali vivi ad

### GENOTYPES OF *PESTIVIRUS* RNA DETECTED IN ANTI INFLUENZA VIRUS VACCINES FOR HUMAN USE

#### Summary

Nine polyvalent human influenza virus vaccines were tested by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the presence of pestivirus RNA. Samples were selected from manufacturers in Europe and the United States of America (USA).

Three samples of the nine vaccines tested (33.3%) gave positive results for pestivirus RNA. The 5'-untranslated genomic region sequence of the contaminant pestivirus RNA was analysed based on primary nucleotide sequence homology and on secondary sequence structures characteristic to genotypes. Two sequences belonged to *Pestivirus* type-1 (bovine viral diarrhoea virus [BVDV]) species, genotypes BVDV-1b and BVDV-1e. These findings confirm previous reports, suggesting an

uso umano selezionati da produttori Europei, Nord Americani e Giapponesi (14). Ventinove monovalenti contro morbillo, parotite, rosolia o polio, otto polivalenti contro morbillo, parotite e rosolia e uno polivalente batterico contro *Streptococcus pneumoniae*, sono stati testati con transcriptasi inversa – nested PCR. Il 13% dei campioni testati (5 su 38) sono risultati positivi per RNA di *Pestivirus*. Tre vaccini (uno anti-rosolia e due anti-morbillo) erano Europei e due (uno anti-parotite e uno anti-rosolia) provenivano dal Giappone. La 5'-UTR dell'RNA dei *Pestivirus* contaminanti è stata amplificata e sequenziata. Le analisi basate sull'omologia della sequenza nucleotidica primaria e sulla struttura secondaria hanno rivelato che le sequenze isolate appartenevano al *Pestivirus* di tipo 1 (diarrea virale bovina). L'RNA di *Pestivirus* identificato dai campioni vaccinali Giapponesi anti-rosolia e anti-parotite appartenevano rispettivamente ai genotipi BVDV-1c e BVDV-1a. Non è stato possibile geotipare la sequenza identificata da un campione di vaccino anti-morbillo a causa della mancanza di una parte della 5'UTR. L'analisi di 2 sequenze identificate da campioni

di vaccini Europei anti-morbillo e anti-rosolia ha evidenziato la loro appartenenza a un nuovo genotipo di *Pestivirus* BVDV-1d.

Data l'importanza della sicurezza dei prodotti biologici ad uso umano, lo studio attuale è stato intrapreso allo scopo di fornire ulteriori conferme dei precedenti risultati e al fine di valutare la contaminazione da RNA di *Pestivirus* in vaccini virali inattivati anti-influenzali ad uso umano.

## Materiali e Metodi

### Campioni di vaccini

I tests sono stati effettuati su nove campioni di vaccini virali inattivati polivalenti anti-influenza ad uso umano, da tre lotti prodotti da due diverse ditte (qui menzionate come A e B) da Europa e Stati Uniti (Tabella 1). In tre prove sono stati usati come controlli positivi i ceppi di referenza BVDV Oregon (C24V) e NADL. In tutte le altre prove i controlli positivi sono stati evitati al fine di ridurre i rischi di contaminazione del sistema di analisi. I campioni sono stati conservati a -70°C fino ad esecuzione dei tests. Cinque Istituzioni di vasta esperienza in Belgio, Germania, Italia e Giappone e Centri di referenza Nazionale per l'identificazione dei *Pestivirus*, hanno eseguito le analisi virologiche.

improvement in preventive measures against contamination of biological products for human use.

## Keywords

Bovine viral diarrhoea - Contamination - Genotype - *Pestivirus* - Vaccine.

## Introduction

Bovine viral diarrhoea virus-1 (BVDV-1), BVDV-2, Border disease virus (BDV), classical swine fever virus (CSFV) (hog cholera virus) are established species of the *Pestivirus* genus, Flaviviridae family, with a tentative 'giraffe' species (33). They are cosmopolitan pathogens in cloven-hoofed ungulates, present a wide range of clinical manifestations and have a significant impact on production.

Non-cytopathic (NCP) strains of BVDV-1 and BVDV-2 have been reported frequently as contaminants of biological products, cell cultures (including primary cell cultures and cell lines), even of human origin (3, 5, 16, 17, 28), bovine foetal serum (1, 2, 26) and vaccines for veterinary use (10, 22, 23, 32, 36).

During an experimental study conducted in Japan, pestivirus RNA was also detected in four live human virus vaccines (20). The four vaccines were produced by different pharmaceutical companies which were correctly authorised and marketed (two monovalent vaccines against mumps and rubella (German measles) and two polyvalent vaccines against measles, mumps and rubella). A comparative analysis of the nucleotide sequence at the 5'-untranslated region (UTR) revealed BVDV RNA as the contaminant. Similarly, interferon for human use was found contaminated by BVDV RNA (19). A study conducted by Vilcek *et al.* (35) reported negative results in 30 human virus vaccines from European producers screened by polymerase chain reaction (PCR) for the detection of pestivirus RNA. The authors concluded that contamination of human virus vaccines is not widespread. Further investigation was undertaken on live virus vaccines for human use selected from European, North American and Japanese

**Tabella 1:** Vaccini virali inattivati anti-influenza ad uso umano, prodotti su embrione di pollo, testati per *Pestivirus* RNA con nested PCR. 1) numero del campione; 2) lotto di produzione; 3) produttore; 4) origine.

**Table 1:** Inactivated human influenza virus vaccines produced in chicken embryos and tested for pestivirus RNA by nested PCR. 1: sample No. 2: Production batch 3: Manufacturer 4: Origin.

1	2	3	4
1	1	A	Svizzera/Switzerland
2	1	A	Svizzera/Switzerland
3	2	A	Svizzera/Switzerland
4	2	A	Svizzera/Switzerland
5	2	A	Svizzera/Switzerland
6	2	A	Svizzera/Switzerland
7	2	A	Svizzera/Switzerland
8	3	B	Stati Uniti d'America/United States of America
9	3	B	Stati Uniti d'America/United States of America

**Tabella 2:** Primers usati per i test di nested PCR. Forward (F), Reverse (R).  
**Table 2:** Primers used for nested PCR tests.

Primers Primers	Sequenze nucleotidiche Nucleotide sequences	Posizione equivalente nel ceppo NADL Equivalent positions in NADL strain
F	5'-CATGCCCTAGTAGGACTAGC-3'	107-127
R	5'-TCAACTCCATGTGCCATGTAC-3'	373-395
F2	5'-AGGGTAGTCGTCAGTGGTTCG-3'	185-205
R2	5'-CTCTGCAGCACCTATCA-3'	326-343
F	5'-ATGCCC(A/T)(C/T)AGTAGGACTAGC-3'	108-127
R	5'-ACTCCATGTGCCATGTACAG-3'	373-392
F2	5'-AGTCGTCAGT(A/G)GTTTCGAC-3'	190-207
R2	5'-CTCTGCAGCACCTATCA-3'	326-343

### Estrazione dell'RNA

L'RNA virale è stato estratto da ogni campione con il metodo isotiocianato di guanidina-fenolo-cloroformio in singola fase (6) con il kit di estrazione RNAzol B (Biotecx Laboratories Inc., USA) (a) o TRIZOL (Gibco BRL, USA) (b).

(a): 200 µl di ogni campione sono stati mescolati e agitati vigorosamente con 800 µl di RNAzol B, una soluzione contenente isotiocianato di guanidina-fenolo in una provetta Eppendorf di 1,5 ml per 30". Dopo l'aggiunta di 100 µl di cloroformio, la provetta è stata posta sotto agitazione per 30", ottenendo una soluzione lattescente. La provetta è stata raffreddata in ghiaccio per 5' e centrifugata a 12.000 gpm per 10'. La fase acquosa (ca. 600 µl di fluido supernatante) è stata trasferita in un'altra provetta Eppendorf. Un µl di 20 mg/ml di glicogeno di mitilo (Boehringer Mannheim GmbH, Germania) e 600 µl di isopropanolo sono stati aggiunti e la provetta è stata raffreddata in ghiaccio per 30'. Il precipitato di RNA è stato raccolto per centrifugazione a 12.000 gpm per 10'. Il pellet è stato lavato tre volte con 600 µl di etanolo al 75% in acqua trattata con dietil pirocarbonato (DEPC) allo 0,1%. Il pellet è stato asciugato all'aria a +37°C per 10', disciolto in 20 µl di acqua distillata trattata con DEPC allo 0,1%, e quindi riscaldata a +60°C per 10'.

(b): ogni campione è stato mescolato a 1 ml di TRIZOL e incubato a temperatura ambiente per 5'. Sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio e la provetta è stata agitata vigorosamente e incubata a temperatura ambiente per 3'. La soluzione è stata centrifugata a 12.000 gpm a +4°C per 15'. La fase acquosa è stata raccolta e 500 µl di isopropanolo sono stati aggiunti e la provetta è stata centrifugata a 12.000 gpm a +4°C per 10'. Il pellet è stato lavato tre volte con 1 ml di etanolo al 75% e ulteriormente centrifugato a 12.000 gpm a +4°C per 15'. Il pellet è stato asciugato all'aria a +37°C per 5', disciolto in 10 µl di acqua distillata trattata con DEPC allo 0,1%. La soluzione di RNA (16 µl) è stata sottoposta alla reazione di trascrizione inversa (RT).

### Oligonucleotidi

Le sequenze dei primer oligonucleotidici per la 5'-UTR usate per i test di RT-PCR hanno corrisposto alle sequenze genomiche di alta omologia tra quelle descritte da Collett *et al.* (7), De Moerlooze *et al.* (8), Deng and Brock (9), Meyers *et al.* (24) e Roehle *et al.* (29).

Queste sequenze di primer non sono state identificate fino ad ora in nessun'altra sequenza virale pubblicata (Tabella 2). I primers sono stati prodotti su ordinazione e disciolti in acqua sterile trattata con DEPC.

manufacturers (14). Twenty-nine monovalent vaccines against measles, mumps, rubella or polio, eight polyvalent against measles-mumps-rubella and one bacterial polyvalent vaccine against *Streptococcus pneumoniae* were tested by reverse transcriptase (RT)-PCR. Of the samples tested, 13% (5 out of 38), gave positive results for pestivirus RNA. Three vaccines (one rubella and two measles) were from Europe and two (mumps and rubella) from Japan. The 5'-UTR genomic region of the contaminant pestivirus RNA was amplified and sequenced. Analyses based on primary nucleotide sequence homology and on secondary sequence structures revealed that the sequences of the isolates belonged to *Pestivirus* type-1 (BVDV). Pestivirus RNA detected from the Japanese rubella and mumps vaccine samples belonged to BVDV genotypes 1c and 1a, respectively. A sequence, detected from one measles sample, could not be genotyped due to the lack of part of the 5'-UTR. Analysis of two sequences detected in measles and rubella vaccine samples from Europe showed they belonged to a new genotype of *Pestivirus* BVDV-1d. Given the importance of the safety of biological products for human use, the current study was undertaken with the aim of providing further confirmation of previous reports to evaluate pestivirus RNA contamination in inactivated human influenza virus vaccines.

### Material and Methods

#### Samples

Tests were performed on nine polyvalent human influenza inactivated virus vaccine samples in three batches and produced by two different manufacturers (referred to as Batches A and B) from Europe and the USA (Table 1). In three assays, BVDV reference strains Oregon (C24V) and NADL were used as positive controls. In all other assays, positive controls were avoided to reduce the risk of contamination. Samples were stored at -70°C until examination. Tests were conducted in Belgium, Germany, Italy and Japan by five experienced institutions and national reference centres for pestivirus detection.

**Tabella 3:** Risultati di test nested PCR per pestivirus RNA in vaccini virali anti-influenza ad uso umano; ND: non determinato.

**Table 3:** Results of nested PCR tests for adventitious pestivirus RNA in human influenza virus vaccines. ND: not determined.

N°	1° PCR 1 <sup>st</sup> PCR	2° PCR 2 <sup>nd</sup> PCR	Genotipo Genotype	Nome/Numero d'accesso Name/Accession number
1	Negativo Negative	Positivo Positive	1e	Massimo4/AB008840
2	Negativo Negative	Positivo Positive	1b	Influenza2/AB010146
3	Negativo Negative	Positivo Positive		
4	Negativo Negative	Positivo Positive		
5	Positivo Positive	ND	ND	
6	Negativo Negative	Negativo Negative		
7	Negativo Negative	Negativo Negative		
8	Negativo Negative	Negativo Negative		

### Sintesi di DNA complementare

La soluzione per la reazione di RT è stata costituita da 8 µl di tampone 5x per la prima catena (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 4 µl di 0,1 M ditiotritolo (DTT), 0,25 µl (25 U) di transcriptasi inversa del virus della Leucemia murina (Gibco BRL, USA), 8 µl di deossinucleotidi trifosfato (dNTPs) a una concentrazione finale di 0,2 mM ognuno (Gibco-BRL, USA), 0,2 µl (110 U/µl) di inibitore di ribonucleasi, 0,25 µl (40 pM/µl) di primer R e acqua trattata con DEPC ad un volume finale di 32 µl. Appena prima dell'incubazione, sono stati aggiunti 8 µl di soluzione di RNA a 32 µl di soluzione RT; in seguito, è stata aggiunta una goccia di olio minerale M-3516 (Sigma Chemicals Co., USA). La sintesi della prima catena di DNA complementare (DNAC) è stata realizzata in bagnomaria a +37°C per 90'.

### PCR

L'amplificazione della 5'-UTR è stata realizzata secondo il metodo descritto da Harasawa *et al.* (17). Sei µl di soluzione di DNAC sono stati aggiunti a 5 µl di tampone 10x (100 mM Tris-HCl, pH

8,9, 800 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mg/ml siero albumina bovina, 1% sodio colato, 1% Triton X-100), 1 µl (1,25 U) di DNA polimerasi *Thermus thermophilus* (Tth), 3 µl di tampone Tth (10 mM Tris HCl, pH 7,5, 300 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM disodio etilenediaminotetracetato (EDTA), 50% glicerolo), dNTPs ad una concentrazione finale di 0,2 mM ognuno, 0,25 µl di primers F e R (40 pM/µl ognuno) e acqua ad un volume finale di 50 µl. Dopo aver ricoperto la miscela di reazione con olio minerale, il protocollo di reazione è stato eseguito in un termociclatore: 30 cicli con denaturazione a +94°C per 30", annealing a +55°C per 100" ed estensione a +72°C per 100", 35 volte con denaturazione a +94°C per 30", annealing a +52°C per 30" e estensione a +72°C per 1', o 35 volte con denaturazione a +94°C per 1', annealing a +57°C per 1', ed estensione a +72°C per 1'. È stato amplificato un prodotto di circa 285 paia di basi dal DNAC. Un µl del prodotto della prima fase di PCR è stato usato per realizzare la seconda amplificazione di PCR con i primers F2 e R2 con la stessa procedura. Le prove sono

### RNA extraction

Viral RNA was extracted from each sample by the single-step guanidinium isothiocyanate-phenol-chloroform method (6) with the RNAzol B extraction kit (Biotecx Laboratories Inc., USA) (see a) below) or Trizol (Gibco BRL, USA) (see b) below), as follows:

a) 200 µl of each sample were mixed vigorously with 800 µl of RNAzol B, a solution containing guanidinium isothiocyanate-phenol in a 1.5 ml Eppendorf tube for 30 sec. One hundred µl of chloroform were added and the tube was vigorously shaken by hand for 30 sec, until the solution became milky. The tube was chilled in ice for 5 min and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. The aqueous phase (approximately 600 µl of supernatant fluid) was transferred into a fresh Eppendorf tube. One µl of 20 mg/ml mussel glycogen (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) and 600 µl of isopropanol were added and the tube was chilled in ice for 30 min. The RNA precipitate was collected by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min. The pellet was washed three times with 600 µl of 75% ethanol in water treated with 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC). The pellet was air-dried at +37°C for 10 min, dissolved in 20 µl distilled water treated with 0.1% DEPC, and then heated at +60°C for 10 min

b) each sample pellet was mixed with 1 ml of Trizol and incubated at room temperature for 5 min. Two hundred µl of chloroform were added and the tube was vigorously shaken and incubated at room temperature for 3 min. The solution was centrifuged at 12,000 rpm at +4°C for 15 min. The aqueous phase was collected and 500 µl of isopropanol were added and the tube was centrifuged at 12,000 rpm at +4°C for 10 min. The pellet was washed three times with 1 ml of 75% ethanol and centrifuged again at 12,000 rpm at +4°C for 15 min. The pellet was air-dried at +37°C for 5 min, dissolved in 10 µl of distilled water treated with 0.1% DEPC. Finally, RT was applied to the RNA solution (16 µl).



state eseguite anche con il metodo descritto da Vilcek *et al.* (34).

#### **Elettroforesi su gel di agarosio**

Dieci  $\mu\text{l}$  di prodotto di PCR sono stati mescolati a 2  $\mu\text{l}$  di soluzione dye 6x costituita da 0,25% xilene cianolo, 0,25% blu di bromofenolo e 40% di saccarosio in acqua. Per stimare la dimensione dei prodotti di PCR sono stati usati markers di peso molecolare (MPM) da un plasmide pHY digerito *HindIII*- e *HaeIII*- contenenti nove frammenti da 80 a 4.870 paia di basi o MPM XIV (Boehringer Mannheim, Germania). Un microlitro di MPM è stato aggiunto a 2  $\mu\text{l}$  di xilene cianolo-soluzione dye blu di bromofenolo e 9  $\mu\text{l}$  di tampone TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA disodico). I 12  $\mu\text{l}$  di ogni campione ottenuto sono stati posti nei pozzetti del gel. Gel di agarosio per elettroendosmosi all'1% di SeaKem (FMC Bioproducts, USA), preparati con tampone TAE (40mM Tris-HCl, pH8, 5 mM acetato di sodio, 1mM EDTA disodico), sono stati usati per effettuare l'elettroforesi, in immersione in tampone TAE, a 50 V costanti per 45'. I gel sono stati colorati in soluzione di etidio bromuro (0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) per 15', al buio, e scolorati 5' in acqua distillata.

#### **Sequenziamento nucleotidico dei prodotti di PCR**

L'elettroforesi dei gel di agarosio è stata realizzata con 10  $\mu\text{l}$  di prodotto di PCR con l'aggiunta di 2  $\mu\text{l}$  di soluzione dye 6x. Per stimare la dimensione dei prodotti di PCR sono stati usati marker di peso molecolare contenenti 8 frammenti da 65 a 2.364 paia di basi (Takara Shuzo, Japan) o MWM XIV (Boehringer Mannheim, Germania). Un microlitro di MPM è stato aggiunto a 2  $\mu\text{l}$  di xilene cianolo-soluzione dye blu di bromofenolo e 9  $\mu\text{l}$  di tampone TE. I 12  $\mu\text{l}$  di soluzione di ogni cam-

pione sono stati posti nei pozzetti del gel. Per effettuare l'elettroforesi orizzontale, in immersione in tampone TAE, a 100 V costanti per 25' è stato usato un gel di agarosio per elettroendosmosi bassa al 2% NuSieve 3:1 (FMC Bioproducts, USA). I gel sono stati colorati con soluzione di etidio bromuro (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) per 10' e scolorati 3 volte con acqua distillata. I gel sono stati osservati usando un UV transilluminator (Ultra Lum, USA) a 300 nanometri. Le porzioni di gel contenenti bande positive sono state prelevate e il DNA estratto con il kit Genetic II (BIO 100 Inc., USA). Tre volumi di soluzione NAI sono stati aggiunti e i gel sono stati liquefatti con un'incubazione a +45°C per 5'. La sospensione glass-milk è stata aggiunta e incubata per 5'. Dopo centrifugazione per 5", il fluido supernatante è stato scartato e il pellet è stato lavato tre volte con acqua fresca e diluito in 10  $\mu\text{l}$  di acqua distillata. Un microlitro (equivalente a 3,2 pM) di primers R o F sono stati addizionati a 30-90 ng (valutati mediante spettrofotometro) di DNA purificato; sono stati aggiunti 8  $\mu\text{l}$  di pre-mix (Perkin-Elmer Corp., USA) consistente in 4  $\mu\text{l}$  di tampone di sequenziamento 5x, 1  $\mu\text{l}$  di dNTP mix, 0,5  $\mu\text{l}$  di dye-deossi terminatori e 1  $\mu\text{l}$  di polimerasi *Taq*, e acqua distillata fino ad un volume finale di 20  $\mu\text{l}$ . La soluzione di reazione con ognuno dei primer è stata agitata per 1-2", addizionata di una goccia di olio minerale e posta in un termociclatore ABI 9600 (Perkin-Elmer Corp., USA), con inizio a +95°C per 10", poi per 25 cicli a +96°C per 10", +50°C per 5" e +60°C per 4'. I prodotti amplificati (20  $\mu\text{l}$ ) sono stati purificati su colonne reidratate Centri-Sep (Princeton Separations Inc., USA) con centrifugazione per 2' a 3.000

#### **Oligonucleotides**

Oligonucleotide primer sequences of the 5'-UTR used for RT-PCR were based on genomic sequences of high homology among those described by Collett *et al.* (7), De Moerloose *et al.* (8), Deng and Brock (9), Meyers *et al.* (24) and Roehe *et al.* (29). These primer sequences have not been found in any other viral sequences published to date (Table 2). Primers were custom-made, and dissolved in sterile DEPC-treated water.

#### **cDNA synthesis**

The RT reaction solution was composed of 8  $\mu\text{l}$  of 5x first strand buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 4  $\mu\text{l}$  of 0.1 M dithiothreitol (DTT), 0.25  $\mu\text{l}$  (25 U) of Moloney murine leukaemia virus RT (Gibco BRL, USA), 8  $\mu\text{l}$  deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to a final concentration of 0.2 mM each (Gibco-BRL), 0.2  $\mu\text{l}$  (110 U/ $\mu\text{l}$ ) ribonuclease inhibitor, 0.25  $\mu\text{l}$  (40 pM/ $\mu\text{l}$ ) primer R and DEPC-treated water to a final volume of 32  $\mu\text{l}$ . Just before the incubation, 8  $\mu\text{l}$  of the RNA solution were added to 32  $\mu\text{l}$  of RT solution and one drop of M-3516 mineral oil (Sigma Chemicals Co., USA) was added to the reaction mixture. The first strand synthesis of cDNA was performed in a water bath at +37°C for 90 min.

#### **Polymerase chain reaction**

The amplification of the 5'-UTR was performed according to the method described by Harasawa *et al.* (17). Six microlitres of cDNA solution were added to 5  $\mu\text{l}$  of 10x buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.9, 800 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mg/ml bovine serum albumin, 1% sodium cholate, 1% Triton X-100), 1  $\mu\text{l}$  (1.25 U) *Thermus thermophilus* (Tth) DNA polymerase, 3  $\mu\text{l}$  Tth buffer (10 mM Tris HCl, pH 7.5, 300 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM disodium ethylenediaminetetraacetate(EDTA), 50% glycerol), dNTPs to a final concentration of 0.2 mM each, 0.25  $\mu\text{l}$  of F and R primers (40 pM/ $\mu\text{l}$  each) and water to a final volume of 50  $\mu\text{l}$ . After the mixture was overlaid with mineral oil, the reaction cycle was performed in a thermal cycler, 30 times with denaturation at +94°C for 30 sec, annealing at +55°C for 100 sec and extension at +72°C for

gpm in una centrifuga VEC-100 *vacuum evaporator*, asciugati per 15', denaturati a +95°C per 2', raffreddati in ghiaccio per 10' e trasferiti una provetta per campioni ABI. Il sequenziamento dei nucleotidi di ogni prodotto di PCR è stato realizzato in un analizzatore genetico ABI Prism 310 (Perkin-Elmer Corp., USA).

#### **Comparazione delle strutture primarie e secondarie della 5'-UTR**

Le strutture primarie nella 5'-UTR dei ceppi di *Pestivirus* identificati nei campioni di vaccini sono state comparate a 22 sequenze pubblicate di *Pestivirus* dal Nord America, Europa e Giappone, incluso ceppi di referenza internazionale. Le sequenze nucleotidiche dei ceppi BVDV NADL (7), Oregon, NY-1, Singer, CD87, 890 (27), SD-1 (9), Osloss (8), N°12, CPAE, EBTr, CPA, HH, MOLT-4, WiDr (15, 16, 17), Europa (13), SE5572 e SE5726 (37), dei ceppi BDV Ch1Es (16) e BD31 (31), e dei ceppi PSCV Alfort (24) e Brescia (25) sono stati usati per comparazione costruendo un allineamento e un dendrogramma. Le sequenze di *Pestivirus* M96687, D50826, D50819, D50815, D50825, D50820, L20929, D50822, L32879, U86599, U03912, U86600, L32882, U63479, L32885, L32884, L20921, L20927, L20928, L32881, L32880, L32883, L20918, L20922, L20919, D26051, D26612, D26049, L20930, Z79769, D50814, D50818, M31182, L32877, L20933, L20925, M96751, U94915, AB000898, Z79770, Z79778, Z79766, L32886, L32887, D50812, D50813, D50817, D26052, D31803, D26614, D26048, D31807, D50816, U17150, U75979, U17144, U17142, M31768, J04358, L42426, X96550, L42435, L42413,

L42437, per un totale di 64 sequenze, sono state usate per ottenere valori di omologia di sequenza. Le sequenze nucleotidiche dei prodotti di PCR delle 5'-UTR di RNA di *Pestivirus* sono state allineate con Clustal V (21). Un albero filogenetico dipendente dalle strutture primarie della 5'-UTR tra RNA di *Pestivirus* conosciuti è stato costruito con il metodo UPGMA di Sneath e Sokal (30). Le strutture secondarie sono state costruite secondo l'algoritmo di Zuker e Steigler (39). Le energie di ripiegamento delle strutture secondarie sono state calcolate con il metodo di Freier *et al.* (11). La genotipizzazione è stata eseguita secondo il metodo descritto da Harasawa e Giangaspero (18). Le rilevanti variazioni a livello delle caratteristiche tre zone variabili, V1, V2 e V3, sequenze palindromiche conservate stelo-anello, della 5'-UTR, sono state considerate per l'analisi filogenetica.

#### **Risultati**

Tre campioni, su nove testati (33,3%), sono risultati positivi per *Pestivirus* o RNA di *Pestivirus*. I campioni positivi erano vaccini anti-influenzali (campioni 1, 3 e 5) prodotti in Europa (Tabella 3). I gel di agarosio colorati con etidio bromuro hanno mostrato una singola banda specifica di prodotto di PCR.

Le analisi basate sull'omologia della sequenza nucleotidica primaria e sulla struttura secondaria della 5'-UTR di due ceppi di *Pestivirus* contaminanti ha mostrato che gli isolati appartenevano al genere *Pestivirus* tipo 1 (BVDV).

La comparazione delle sequenze nucleotidiche della 5'-UTR di 2 *Pestivirus* contaminanti con quelle di altre 22 sequenze di *Pestivirus* pubblicate è stata effet-

100 sec, 35 times with denaturation at +94°C for 30 sec, annealing at +52°C for 30 sec and extension at +72°C for 1 min, or 35 times with denaturation at +94°C for 1 min, annealing at +57°C for 1 min and extension at +72°C for 1 min. This amplified a product of about 285 base pairs (bp) from the cDNA. One  $\mu$ l of the first step PCR product was used to perform the second step PCR with F2 and R2 primers using a similar procedure. Tests were also performed using the method described by Vilcek *et al.* (1994).

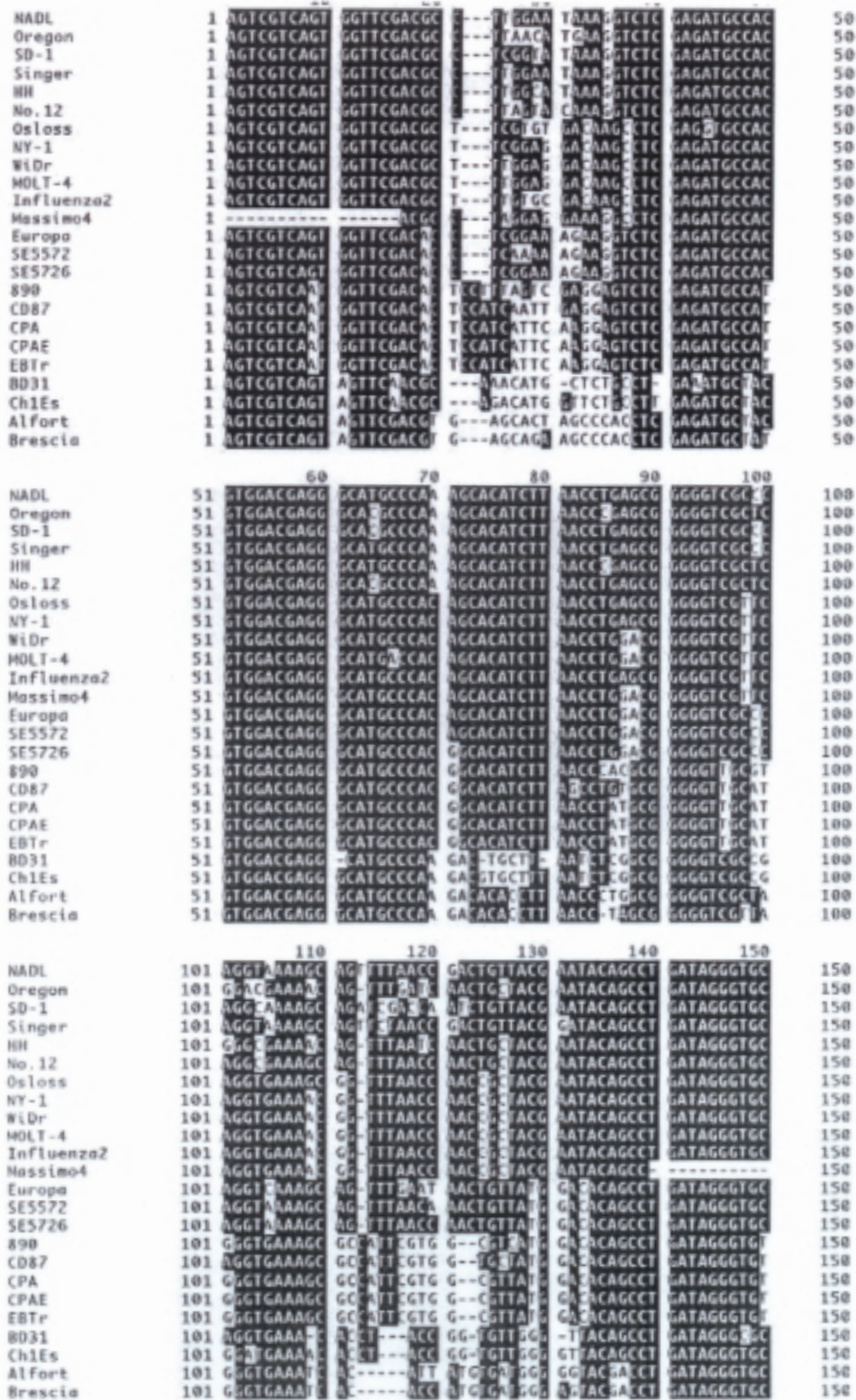
#### **Agarose gel electrophoresis**

Ten microlitres of PCR products were mixed with 2  $\mu$ l of 6x dye solution consisting of 0.25% xylene cyanol, 0.25% bromophenol blue and 40% sucrose in water. Molecular weight markers (MWM) from a HindIII- and HaeIII- digested plasmid pHY containing nine fragments from 80 to 4,870 bp or MWM XIV (Boehringer Mannheim, Germany) were used to estimate the size of PCR products. One microlitre of MWM was added to 2  $\mu$ l xylene cyanol-bromophenol blue dye solution and 9  $\mu$ l TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM disodium EDTA). A total of 12  $\mu$ l from each sample was placed into the wells of containing gel. One percent SeaKem medium electroendosmosis agarose gels (FMC Bioproducts, USA), prepared with TAE buffer (40 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM sodium acetate, 1 mM disodium EDTA), were used to run horizontal electrophoresis, submerged in TAE buffer at 50 V constantly for 45 min. The gels were stained in ethidium bromide solution (0.4  $\mu$ g/ml) for 15 min in the dark and destained for 5 min in distilled water.

#### **Nucleotide sequencing of PCR products**

Agarose gel electrophoresis was performed with 10  $\mu$ l PCR products mixed with 2  $\mu$ l of 6x dye solution. MWM containing 8 fragments from 65 to 2,364 bp (Takara Shuzo, Japan) or MWM XIV (Boehringer Mannheim, Germany) were used to estimate the size of PCR products. One microlitre of MWM was added to 2  $\mu$ l xylene cyanol-bromophenol blue dye solution and 9  $\mu$ l TE buffer. A total of 12  $\mu$ l from each sample solution was





**Figura 1:** Allineamento della sequenza nucleotidica dei prodotti di PCR dalle 5'-UTR per comparazione delle sequenze dei ceppi contaminanti dei vaccini virali con 22 sequenze pubblicate di Pestivirus. Le sequenze nucleotidiche di ceppi di BVDV, BDV e PSCV sono state usate come referenze. Nucleotidi identici in due su tre sequenze sono indicati in caratteri bianchi. I numeri di sequenze nucleotidiche sono dati per un allineamento di consenso. Trattini rappresentano spazi introdotti tra nucleotidi adiacenti per un allineamento massimo.

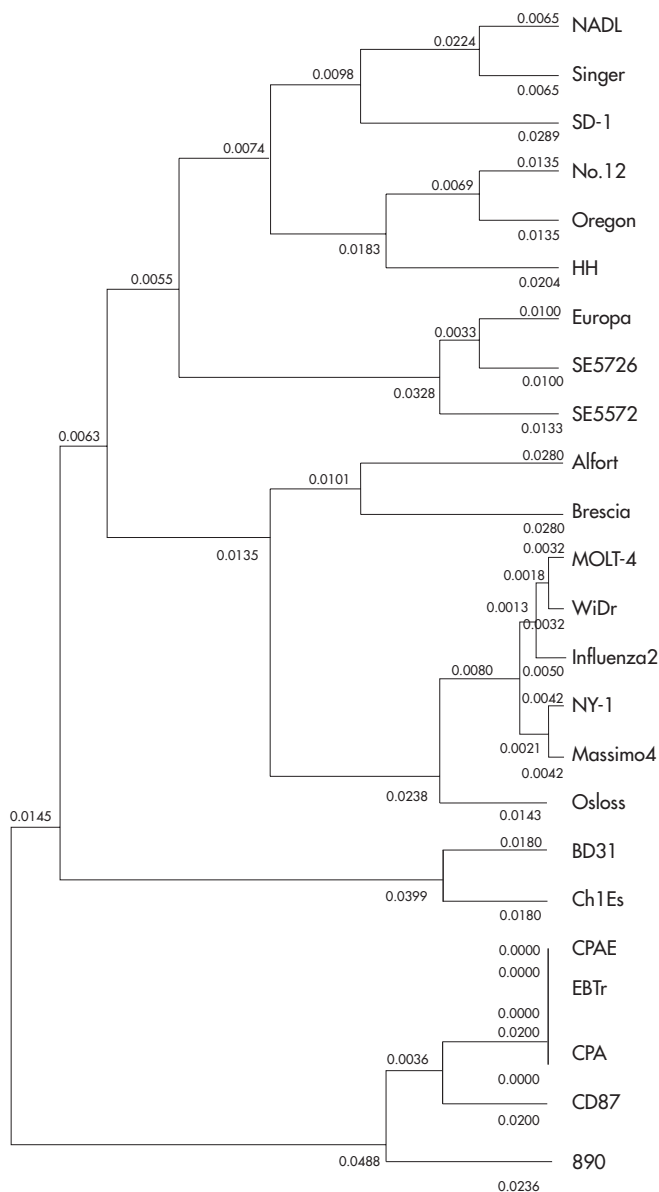
**Figure 1:** Nucleotide sequence alignment of the PCR products from the 5'-UTR for sequence comparison of the virus vaccine contaminant strains with twenty-two published pestivirus sequences. Nucleotide sequences of BVDV, BDV and CSFV strains are used for reference. Nucleotides that are identical in two of three sequences are presented in white characters. The nucleotide sequence numbers are given from a consensus alignment. Dashes represent spacers between adjacent nucleotides introduced for maximum alignment.

tuata con il programma di allineamento Clustal V, usando il software DNASIS (Figura 1). Un albero filogenetico basato sulla comparazione della sequenza nucleotidica primaria è stato ottenuto con il programma UPGMA, compreso nel software DNASIS (Figura 2).

La comparazione del ceppo isolato dal campione 1 con 64 sequenze di ceppi di *Pestivirus* ha mostrato un'omologia nella sequenza nucleotidica con i ceppi del genoti-

po 1b del 90-96% e dell'82-88%, 84-85% e 69-71% con gli altri genotipi di BVDV 1a, 1c e BVDV-2, rispettivamente. L'omologia della sequenza nucleotidica tra il secondo ceppo isolato dal campione 2 e i genotipi di *Pestivirus* BVDV 1a, 1b, 1c e BVDV-2 sono stati di 81-87%, 92-96%, 79-81% e 70-72%, rispettivamente.

La variazione della sequenza tra le 5'-UTR dei ceppi dei *Pestivirus* identificati, principalmente



**Figura 2:** Albero filogenetico basato sulla comparazione della sequenza 5'-UTR di differenti ceppi di *Pestivirus*, ottenuto con UPGMA. I numeri indicati per i rami rilevanti sono riferiti a valori di bootstrap di 1.000 repliche. La scala delle linee indica sostituzioni di 10 nucleotidi per 100 nucleotidi.

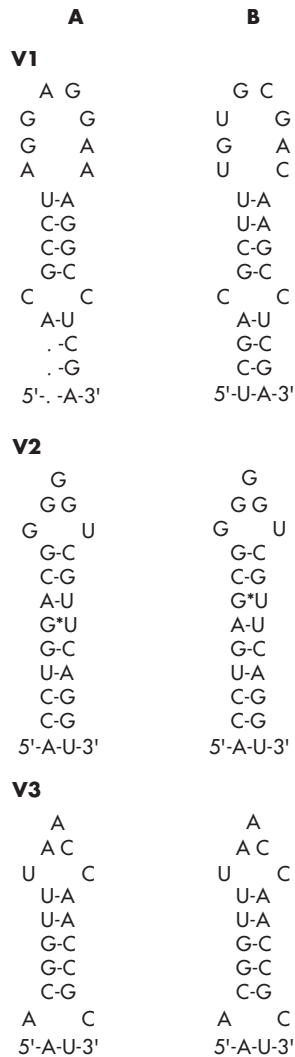
**Figure 2:** Phylogenetic tree based on 5'-UTR sequence comparison from different pestivirus strains, obtained by UPGMA. Numbers at the relevant branches refer to bootstrap values of 1,000 replications. The scale bar indicates 10-nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

placed into the wells containing gel. Two percent NuSieve 3:1 low electroendosmosis agarose gel (FMC Bioproducts, USA) in TAE buffer was used to run horizontal electrophoresis, submerged in TAE buffer, at 100 V constantly for 25 min. The gel was stained with ethidium bromide solution (2 µg/ml) for 10 min and destained 3 times with distilled water. The gel was observed using a 300 nm UV transilluminator (Ultra Lum, USA). The portions of the gel that contained positive bands were excised and DNA was extracted using the Genetic II kit (BIO 100 Inc., USA). Three volumes of NAI solution were added and the gel was liquefied at +45°C incubation for 5 min. Glass-milk suspension was added and incubated for 5 min. After centrifugation for 5 sec, the supernatant fluid was discarded and the pellet was washed three times with fresh wash and eluted in 10 µl distilled water. One microlitre (equivalent to 3.2 pM) of primers R or F were mixed with 30 ng-90 ng (determined by spectrophotometry) purified DNA, 8 µl pre-mix (Perkin-Elmer Corporation, USA) consisting of 4 µl of 5x sequencing buffer, 1 µl dNTP mix, 0.5 µl dye-deoxy terminators and 1 µl Taq polymerase, and distilled water was added to 20 µl of the total volume. The mixture with each primer was vortexed for 1-2 sec, with a drop of mineral oil added and then placed in an ABI 9600 thermal cycler (Perkin-Elmer Corporation, USA), with commencing at +95°C for 10 sec, followed by 25 cycles of +96°C for 10 sec, +50°C for 5 sec and +60°C for 4 min. The amplified product (20 µl) was purified on Centri-Sep re-hydrated columns (Princeton Separations Inc., USA) with centrifugation for 2 min at 3,000 rpm in a VEC-100 vacuum evaporator centrifuge, dried for 15 min, denatured at +95°C for 2 min, chilled on ice for 10 min and transferred to an ABI sampling tube. Nucleotide sequencing of each PCR product was performed in an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Corporation, USA).

### **Comparison of primary and secondary structures of 5'-UTR**

Primary structures in the 5'-UTR of the pestivirus strains detected in





**Figura 3:** Strutture palindromiche (V1, V2 e V3) nella regione genomica 5'-UTR dei ceppi di *Pestivirus* isolati da vaccini virali contro l'influenza (campione 1 colonna A, campione 2 colonna B). Il legame di basi Watson-Crick è mostrato da un tratto (-) e il legame G:U tollerato nella struttura secondaria è indicato da un asterisco (\*).

**Figure 3:** Palindromic structures (V1, V2 and V3) in the 5'-UTR genomic region of the pestivirus strains isolated from influenza virus vaccines. (Sample 1: lane A, Sample 2: lane B). - : Watson-Crick base pairing. \* : G:U pairing tolerated in secondary structures.

limitata a tre regioni specifiche, le zone variabili V1, V2 e V3, tipiche strutture palindromiche, a forma di stelo-anello, sono state identificate attraverso ricerca manuale di strutture potenzialmente elicoidali, cercando sostituzioni di un legame di basi Watson-Crick per un altro. Sono stati identificati elementi comuni caratteristici dei *Pestivirus* a livello di V1 e V2. Le strutture stabili palindromiche stelo-anello hanno mostrato energie libere sostanzialmente negative: -12,92 Kcal/mol nella struttura V1, -13,80 Kcal/mol in V2 e -7,10 Kcal/mol in V3 per il campione 1; -9,32

Kcal/mol in V1, -13,80 Kcal/mol in V2 e -7,10 Kcal/mol in V3 per il campione 2.

Le rilevanti variazioni nucleotidiche sono state comparate con membri rappresentativi di altri genotipi di *Pestivirus*. I legami di basi nucleotidiche componenti gli steli delle strutture palindromiche a livello delle 3 zone variabili, V1, V2 e V3, della regione genomica 5'-UTR dei 2 ceppi di *Pestivirus* hanno mostrato divergenza dai genotipi dei *Pestivirus* precedentemente descritti (campione 1) e chiare similitudini con i ceppi del genotipo 1b (campione 2),

vaccine samples were compared with twenty-two published pestivirus sequences from North America, Europe and Japan, including international reference strains. The nucleotide sequences of BVDV NADL strains (7), Oregon, NY-1, Singer, CD87, 890 (27), SD-1 (9), Osloss (8), No. 12, CPAE, EBTr, CPA, HH, MOLT-4, WiDr (15, 16, 17), Europa (13), SE5572 and SE5726 (37), of BDV strains Ch1Es (16) and BD31 (31), and of HCV strains Alfort (24) and Brescia (25) were used for comparison by constructing an alignment and dendrogram. Pestivirus sequences M96687, D50826, D50819, D50815, D50825, D50820, L20929, D50822, L32879, U86599, U03912, U86600, L32882, U63479, L32885, L32884, L20921, L20927, L20928, L32881, L32880, L32883, L20918, L20922, L20919, D26051, D26612, D26049, L20930, Z79769, D50814, D50818, M31182, L32877, L20933, L20925, M96751, U94915, AB000898, Z79770, Z79778, Z79766, L32886, L32887, D50812, D50813, D50817, D26052, D31803, D26614, D26048, D31807, D50816, U17150, U75979, U17144, U17142, M31768, J04358, L42426, X96550, L42435, L42413, L42437, for a total of 64 sequences, were used to obtain overall sequence homology values. Nucleotide sequences of PCR products from the 5'-UTR of pestivirus RNA were aligned by the Clustal V (21). A phylogenetic tree according to the primary structures of the 5'-UTR among the known pestivirus RNA was constructed by the unweighed pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) by Sneath and Sokal (30). Secondary structures were predicted according to the algorithm of Zuker and Steigler (39). Folding energies of the secondary structures were calculated by the method described by Freier *et al.* (11). Genotyping was performed according to the method of Harasawa and Giangaspero (18). Relevant variations in the characteristic three variable loci, V1, V2 and V3, conserved stem-loop palindromic sequences at the 5'-UTR and were used for the phylogenetic analysis.

rispettivamente (Figura 3).

Le sequenze nella 5'-UTR del ceppo Massimo4 hanno mostrato caratteristiche paia di basi. La zona V1 in posizione 8 aveva mostrato un legame di basi C-G, in V2, in posizione 7 un legame di basi A-U e in V3, in posizione 4 un legame di basi G-C.

Il legame di basi A-U in V2 era condiviso con il genotipo BVDV-1b, dal quale la divergenza era identificabile al livello della V1. Per cui, tale combinazione di sostituzioni nucleotidiche palindromiche è apparsa essere specifica, mostrando PNS comuni con altri genotipi, ma distinta da essi, indicando l'appartenenza a un nuovo genotipo BVDV-1e. Le sequenze nucleotidiche della 5'-UTR genomica dei ceppi di *Pestivirus* presentati per la prima volta in questo studio sono state depositate nelle banche dati di sequenze nucleotidiche DDBJ, EMBL e GenBank sotto i numeri di accesso AB008840 (Massimo4) e AB010146 (Influenza2).

## Discussione

I risultati ottenuti nel corso di questo studio preliminare hanno evidenziato la contaminazione da *Pestivirus* o da RNA di *Pestivirus* in vaccini virali anti-influenzali ad uso umano prodotti in Europa.

Le analisi basate sull'omologia della sequenza nucleotidica primaria e sulla struttura secondaria delle sequenze palindromiche nella 5'-UTR hanno rivelato che l'RNA testato con RT-PCR apparteneva al *Pestivirus* di tipo 1 (BVDV). I risultati ottenuti dalla valutazione della divergenza della sequenza a livello della struttura secondaria nelle 3 zone variabili, strutture palindromiche, nella 5'-UTR erano comparabili a quelli ottenuti attraverso l'allineamento delle sequenze nucleotidiche e l'albero filogenetico ottenuto dalla comparazione delle sequenze nucleotidi-

che nella 5'-UTR tra RNA di *Pestivirus* noti.

I tests di PCR effettuati sui campioni di vaccino appartenente allo stesso lotto, campioni 1 e 2, hanno mostrato risultati corrispondenti. I due campioni hanno mostrato una diversa intensità della banda specifica nel gel elettroforetico. Il campione 1 ha mostrato una banda positiva intensa e il campione 2 ha dato una banda debole. Questo potrebbe essere il risultato di una degenerazione dell'RNA nel campione 2, testato più tardi, oltre la data di validità. Inoltre, le loro sequenze nucleotidiche ottenute in 2 diversi laboratori usando una polimerasi Taq ad alta definizione di lettura, in doppio controllo, entrambe identificate come BVDV-1, hanno mostrato alcune differenze al livello del palindromo V1 (5 nucleotidi della loop e un paio di basi nello stelo in posizione 8) e del palindromo V2 (2 nucleotidi nello stelo, in posizione 6 e 7; questi due cambi di nucleotidi erano indicati come possibili secondo il metodo PNS) (Figura 3). Queste particolari sequenze palindromiche sono state sospettate di essere siti strategici nella 5'-UTR dei *Pestivirus* con funzioni regolatorie necessarie per l'espressione dei geni virali e la replicazione del RNA (15). Questo aspetto potrebbe essere l'espressione di una contaminazione combinata da parte di 2 differenti RNA di *Pestivirus*, appartenenti alla stessa specie BVDV-1, a causa di eterogeneità di fattori determinanti la contaminazione, o della mutazione dello stesso ceppo (i vaccini erano stati selezionati dallo stesso lotto).

Le paia di basi caratteristiche erano comuni a entrambi i genotipi BVDV-1a e BVDV-1b. In V1, C-G in posizione 14 era comune a BVDV-1a; in V2, A-U in posizio-

## Results

Three of the nine tested samples (33.3%) gave positive results for pestivirus or pestivirus RNA. The positive specimens were vaccines against influenza (Samples 1, 2 and 5) from Europe (Table 3). Ethidium bromide-stained agarose gels showed a single specific band of PCR product. Analyses based on primary nucleotide sequence homology and on secondary sequence structure of the 5'-UTR of the contaminant pestivirus strains, revealed that the isolates belonged to type 1 of the *Pestivirus* genus (BVDV).

Comparison of the 5'-UTR nucleotide sequences from the two pestivirus contaminants with those from twenty-two published pestivirus sequences was performed by the Clustal V alignment program using DNASIS software (Fig. 1). A phylogenetic tree based on primary nucleotide sequence comparison was obtained by the UPGMA program (DNASIS software) (Fig. 2).

Comparison of the strain isolated from Sample 1 with 64 pestivirus strain sequences showed an overall nucleotide sequence homology with genotype 1b strains of 90%-96%, and of 82%-88%, 84%-85% and 69%-71% with the other BVDV genotypes 1a, 1c and BVDV-2, respectively. The overall nucleotide sequence homology between the second strain isolated from Sample 2 and the BVDV pestivirus genotypes 1a, 1b, 1c and BVDV-2 were 81%-87%, 92%-96%, 79%-81% and 70%-72%, respectively.

ne 7 era comune a BVDV-1b e in V3, G-C era comune a BVDV-1b. Rimane ancora non chiarita l'origine evolutiva. La media dei valori di divergenza di paia di basi era leggermente più bassa con il genotipo BVDV-1b, 4, 7 invece di 5, 1 per il genotipo BVDV-1a. In termini di cambi evolutivi, le mutazioni stabili avvenute hanno generato caratteristiche paia di basi, ibride tra quelle dei genotipi BVDV-1a e BVDV-1b o potrebbero rappresentare un terzo gruppo tra BVDV-1a e BVDV-1b, rappresentando prototipi della specie. Simili caratteristiche nucleotidiche, osservate nella sequenza del campione 1, sono state osservate anche nel ceppo CRFK, contaminante di prodotti biologici, isolato in Giappone, e nel ceppo CP1885, isolato dal bovino in Belgio, classificati come genotipo BVDV-1e (Giangaspero e Harasawa, dati non pubblicati).

I ceppi di *Pestivirus* contaminanti, identificati durante i precedenti studi sulla contaminazione di vaccini virali ad uso umano, sono stati allocati nei genotipi della specie BVDV-1, BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1c e BVDV-1d. Due ceppi, Rubella e MMR-T, appartenevano al genotipo BVDV-2d della specie BVDV-2.

In tre esperimenti è stato usato un controllo positivo, i ceppi di riferimento Oregon C24V e NADL. Questo ha sollevato la necessità di aumentare l'accuratezza del test per evitare ogni rischio di contaminazione. In un test realizzato con il ceppo di riferimento Oregon C24V (genotipo BVDV-1a), la sequenza di un ceppo isolato è risultata appartenente al genotipo 1b, escludendo ogni dubbio di contaminazione nel sistema diagnostico. Il test con il ceppo NADL non ha mostrato alcun campione positivo. Comunque, in future analisi, sarà più semplice usare un con-

trollo positivo interno che contenga siti di legame per i primers ma che produca prodotti più larghi per discriminare chiaramente da specifiche amplificazioni di *Pestivirus*. I risultati ottenuti con PCR sono stati interpretati con particolare attenzione, confermati da nested-PCR e sequenziamento, tenendo conto delle reazioni non specifiche osservate con RT-PCR per l'identificazione di RNA di *Pestivirus* in due lotti di vaccini vivi polivalenti anti-poliiovirus ad uso umano (38). I campioni di entrambi i lotti avevano mostrato una banda di approssimativamente 450 paia di basi invece delle attese 300 paia di basi del ceppo *Pestivirus* di riferimento usato come controllo positivo. Il sequenziamento confermava l'aspecificità del risultato, rivelando un'omologia con una regione del gene VP1 del *Poliiovirus* di tipo 1.

La percentuale di campioni positivi riportata da Harasawa e Tomyama (20), 4 positivi su 5 testati (80%), non era rappresentativa dato il ridotto numero dei campioni valutati. In un secondo esperimento su interferone ad uso umano, la percentuale era più bassa, 30,4% su 46 campioni testati (19). Ulteriori indagini su vaccini virali vivi ad uso umano selezionati da produttori Europei, Nord Americani e Giapponesi (14) hanno mostrato il 13% di reazioni positive, su 38 campioni testati. La positività rilevata nello studio attuale è stata del 33,3%, ma relativa a un limitato numero di campioni. I risultati negativi recentemente riportati da Vilcek *et al.* (35) su vaccini virali umani Europei non hanno permesso ulteriori conclusioni. Solo attraverso un più ampio monitoraggio sarà possibile ottenere una chiara valutazione del problema.

Un aspetto di interesse è l'identificazione della fonte della conta-

Sequence variation within the 5'-UTR of the identified pestivirus strains, mainly limited to three specific regions, the variable loci V1, V2 and V3, typical palindromic stem-loop shaped structures were found by manual search through potential helical structures, looking for substitutions of one Watson-Crick base pair for another. Pestivirus characteristic consensus motifs at V1 and V2 levels were identified. The stable stem-loop palindromic structures showed substantial negative free energies, namely: -12.92 Kcal/mol in structure V1, -13.80 Kcal/mol in V2 and -7.10 Kcal/mol V3 for Sample 1; -9.32 Kcal/mol V1, -13.80 Kcal/mol V2 and -7.10 Kcal/mol V3 for Sample 2. Relevant variations of nucleotides were compared with representative members of other pestivirus genotypes. Nucleotide base pairs composing the palindromic stem structures, at the level of the three variable loci, V1, V2 and V3 of the 5'-UTR genomic region of the two pestivirus strains, showed divergence from the previously described genotypes of pestivirus (Sample 1) and clear similarities with genotype 1b strains (Sample 2), respectively (Fig. 3).

The sequences in the 5'-UTR of the strain Massimo 4 showed characteristic base pairings. The V1 locus in position 8 showed a C-G base pair, in V2 in position 7, a base pairing A-U, and in V3 in position 4, a base pair G-C. The A-U base pair in V2 was shared with genotype BVDV-1b, from which



minazione virale. Durante i precedenti controlli sperimentali intrapresi in Giappone (20) e Europa (14), il siero fetale bovino è stato usato come supplemento dei terreni per le colture cellulari usate per la produzione dei vaccini ad uso umano, i quali erano contaminati da *Pestivirus* o RNA di *Pestivirus*, e questa è stata la fonte più probabile di contaminazione. Nei vaccini prodotti su embrioni di pollo, la fonte di contaminazione è sconosciuta. Nella procedura di produzione non sono stati usati siero fetale bovino o albumina bovina. Recentemente, nel 2002, una contaminazione di prodotti biologici da *Rinovirus* causata da un tecnico durante la preparazione di terreni di coltura è stata riportata in Belgio (Dobbelaer, Istituto Scientifico di Salute Pubblica, Bruxelles, Euroconferenza «Viruses and new emerging agents in biologicals: a safety approach» Istituto Pasteur, 14 -15 marzo 2002, Parigi, Francia). Il virus si è replicato in substrato di cellule fibroblastiche primarie e linea cellulare umana MRCS. Nel presente caso, una simile evenienza non può essere esclusa. Precedenti studi sull'isolamento di *Pestivirus* da leucociti umani hanno permesso l'identificazione di due soggetti viremici, clinicamente sani (12). Dalla sospensione linfocitaria di una donna di 30 anni di età, l'isolamento è stato ripetuto 3 volte durante 31 giorni. Il tempo di viremia era lungo se comparato con quello osservato negli animali, ad eccezione dei soggetti immunotolleranti che mostrano una viremia per tutta la vita.

Nonostante gli alti standards di produzione e controllo applicati in Giappone e Europa, sorge il problema sulla sicurezza degli attuali metodi di produzione dei prodotti biologici. L'inattivazione termica associata a trattamento

con *-proprilattone* è stata proposta per inattivare il BVDV (4). Bolin *et al.* (1) hanno riportato la contaminazione da BVDV in prodotti biologici commercializzati trattati con tale metodo. Inoltre, le procedure standard (tests di immunofluorescenza indiretta e sieroneutralizzazione), se applicate senza una precedente concentrazione di alti volumi, specialmente in caso di bassi titoli virali, potrebbero mostrarsi inefficaci. Bolin *et al.* (2) ha riportato che l'identificazione di RNA di BVDV con PCR da cellule di scimmia sperimentalmente infettate era inefficace se non applicato un passaggio sequenziale su cellule di turbinato bovino.

Nel presente studio non sono stati effettuati isolamenti su coltura cellulare, pertanto l'identificazione di RNA di *Pestivirus* in vaccini virali ad uso umano non indica necessariamente la presenza di virioni infettivi, ma l'evenienza di infezioni iatrogene è stata più volte riportata in animali in relazione a vaccini ad uso veterinario contaminati da *Pestivirus* infettivi (10, 22, 23, 32, 36).

In conclusione, questi risultati preliminari confermano le precedenti osservazioni e indicano l'evenienza di contaminazioni da *Pestivirus* in prodotti biologici ad uso umano, in evidente contrasto con le generali regole di sicurezza per i prodotti farmaceutici ad uso umano, le quali escludono chiaramente ogni tipo di contaminazione.

### Bibliografia/References

1. Bolin S.R., P.J. Matthews & J.F. Ridpath (1991). - Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **3**, 199-203.
2. Bolin S.R., J.F. Ridpath, J. Black, M. Macy & R. Roblin (1994). - Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods*, **48**, 211-221.

the divergence was identifiable at V1 level. Therefore, this combination of the palindromic nucleotide substitutions appeared to be specific, showing common PNS with other genotypes, but distinct from them, indicating they belonged to a novel genotype BVDV-1e. The nucleotide sequence of the genomic 5'-UTR of the pestivirus strains, presented first in this study, have been deposited in the DDBJ, EMBL and GenBank nucleotide sequence databases under accession numbers AB008840 (Massimo 4) and AB010146 (influenza 2).

### Discussion

The results obtained during this preliminary study provided evidence of the occurrence of pestivirus or pestivirus RNA contamination in human influenza virus vaccines from Europe.

Analyses based on primary nucleotide sequence homology and on secondary palindromic sequence structure in the 5'-UTR revealed that the RT-PCR tested RNA belonged to *Pestivirus* type-1 (BVDV). The results obtained by evaluating the sequence divergence at the secondary structure level, at the 3 variable loci, palindromic structures, in the 5'-UTR were comparable to those obtained from the nucleotide sequence alignment and the phylogenetic tree obtained from comparison of the nucleotide sequences in the 5'-UTR among known pestivirus RNA. PCR tests performed on the vaccine samples that belonged to the same batch of Samples 1 and 2 showed corresponding results. The two samples showed a

- 3 **Bolin S.R. & J.F. Ridpath** (1998). - Prevalence of bovine viral diarrhoea Virus genotypes and antibody those viral genotypes in fetal bovine Serum. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 135-139.
4. **Brock K.V., D.A. Brian, B.T. Rouse & L.N.D. Potgieter** (1988). - Molecular cloning of a pneumopathic strain of bovine viral diarrhoea virus and its diagnostic application. *Can. J. Vet. Res.*, **52**, 451.
5. **Büttner M., A. Oehmig, F. Weiland, H.J. Rziha & E. Pfaff** (1997). - Detection of virus or virus specific nucleic acid in foodstuff or bioproducts-hazards and risk assessment. *Arch. Virol.*, **13**, 57-66.
6. **Chomczynsky P. & N. Sacchi** (1987). - Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annal. Biochem.*, **162**, 156-159.
7. **Collett M.S., R. Larson, C. Gold, D. Strick, D.K. Anderson & A.F. Purchio** (1988). - Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, **165**, 191-199.
8. **De Moerlooze L., C. Lecomte, S. Brown-Shimmer, D. Schmetz, C. Guiot, D. Vandenberghe, D. Allaer, M. Rossius, G. Chappuis, D. Dina, A. Renard & J.A. Martial** (1993). - Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *J. Gen. Virol.*, **74**, 1433-1438.
9. **Deng R. & K.V. Brock** (1992). - Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus genome, non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology*, **191**, 867-879.
10. **Falcone E., M. Conti & M. Tollis** (2000). - Bovine Viral Diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine*, **18**, 387-388.
11. **Freier S.M., R. Kierzek & J.A. Jaeger** (1986). - Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **83**, 9373-9377.
12. **Giangaspero M., G. Vacirca, M. Büttner, G. Wolf, E. Vanopdenbosch & G. Muyldermans** (1993). - Serological and antigenic findings indicating pestivirus in man. *Arch. Virol. (Suppl.)*, **7**, 53-62.
13. **Giangaspero M., R. Harasawa & A. Verhulst** (1997). - Genotypic characteristics of the 5'-untranslated region of a pestivirus strain isolated from human leucocytes. *Microbiol. Immunol.*, **40**, 829-834.
14. **Giangaspero M., G. Vacirca, R. Harasawa, M. Büttner, A. Panuccio, C. De Giuli Morghen, A. Zanetti, A. Belloli & A. Verhulst** (2001). - Genotypes of *Pestivirus RNA* detected in live virus vaccines for human use. *J. Vet. Med. Sci.*, **63** (7), 723-733.
15. **Harasawa R.** (1996). - Phylogenetic analysis of pestivirus based on the 5'-untranslated region. *Acta Virol.*, **40**, 49-54.
16. **Harasawa R. & H. Mizusawa** (1995). - Demonstration and genotyping of *Pestivirus* RNA from mammalian cell lines. *Microbiol. Immunol.*, **39**, 979-985.
17. **Harasawa R., K. Hikiji, H. Tanabe, Y. Takada & H. Mizusawa** (1993). - Detection of adventitious *Pestivirus* in cell cultures by polymerase chain reaction using nested-pair primers. *Tissue Cult. Res. Commun.*, **12**, 215-220.
18. **Harasawa R. & M. Giangaspero** (1998). - A novel method for *Pestivirus* genotyping based on palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. *J. Virol. Methods*, **70**: 225-230.
19. **Harasawa R. & T. Sasaki** (1995). - Sequence analysis of the 5'-untranslated region of *Pestivirus* RNA demonstrated in interferons for human use. *Biologicals*, **23**, 263-269.
20. **Harasawa R. & T. Tomiyama** (1994). - Evidence of *Pestivirus* RNA in human virus vaccines. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1604-1605.
21. **Higgins D.G., A.J. Bleasby & R. Fouchs** (1992). Clustal V: Improved software for multiple alignment. *Comp. Appl. Biol. Sci.*, **8**, 189-191.
22. **Kreeft H.A.J.G., I. Greser-Wilke, V. Moennig & M.C. Horzinek** (1990). - Attempts to characterize bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle after immunization with a contaminated vaccine. *Deut. Tierarztl. Woch.*, **97**, 63-65.
23. **Loken T., H. Krogsrud & I. Bjerkas** (1991). - Outbreaks of border disease in goats induced by a *Pestivirus*-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J. Comp. Pathol.*, **104**, 195-209.
24. **Meyers G., T. Rügenapf & H.J. Thiel** (1989). - Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*, **171**, 555-567.
25. **Moormann R.J.M., P.A.M. Warmerdam, B. Van Der Meer, W.M.M. Schaaper, G. Wenswoort & M.M. Hulst** (1990). - Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology*, **177**, 812-815.
26. **Nuttal P.A., P.D. Luther & E.J. Stott** (1977). - Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures. *Nature*, **266**, 835-837.
27. **Pellerin C., J. Van Den Hurk, J. Lecomte & P. Tijssen** (1994). - Identification of a new group of Bovine Viral Diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* (203), 260-268.
28. **Potts B.J., M. Sawyer, I.C. Shekarchi, T. Wismer & D. Huddleston** (1995). - Different intensity of the specific band in the electrophoretic gel. Sample 1 showed an intense positive band and Sample 2 revealed a weak band. This may be the result of a degeneration of the RNA (Sample 2 was tested later and the vaccine had expired).

Furthermore, the nucleotide sequences obtained from two laboratories using a high proof-reading Taq polymerase in double testing (both identified as BVDV-1), showed some differences at the palindrome V1 level (5 nucleotides in the loop and base pairings in stem position 8) and the palindrome V2 level (2 nucleotides in stem positions 6 and 7; these two nucleotide changes were expected according to the PNS method) (Fig. 3). These particular palindromic loci were suspected to be strategic sites in the 5'-UTR of the pestivirus with regulatory motifs necessary for viral gene expression and RNA replication (15). This aspect might have expressed combined contamination by two different pestivirus RNAs, belonging to the same BVDV-1 species, due to heterogeneity of source factors of contamination, or a mutation of the same strain (the vaccines were selected from the same batch).

Nevertheless, the characteristic base pairs shared both genotypes BVDV-1a and BVDV-1b. In V1, C-G in position 14 was shared with BVDV-1a; in V2, A-U in position 7 was shared with BVDV-1b and in V3, G-C in position 4 was shared

(1989). - Peroxidase-labeled primary antibody method for detection of *Pestivirus* contamination in cell cultures. *J. Virol. Methods*, **26**, 119-124.

29. **Roche P.M., M.J. Woodward & S. Edwards** (1992). - Characterization of p20 gene sequences from a border disease-like *Pestivirus* isolated from pigs. *Vet. Microbiol.*, **33**, 231-238.

30. **Sneath P.H.A. & R.R. Sokal** (1973). - Numerical Taxonomy. WH Freeman, San Francisco.

31. **Sullivan D.G., G. Chagan & R.K. Akkina** (1997). - Genetic characterization of ruminant pestiviruses: Sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep. *Virus Res.* **47**, 19-29.

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

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

34. **Vilcek S., A.J. Herring, J.A. Herring, P.F. Nettleton, J.P. Lowings & D.J. Paton** (1994). - *Pestiviruses* isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.*, **136**, 309-323.

35. **Vilcek S., D.J. Paton, P. Minor & M. Bentley** (1999). - No confirmation of *Pestivirus* RNA in human virus vaccines. *J. Clin. Microb.*, **37**, 1653.

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

37. **Wolfmeyer A., G. Wolf, M. Beer, W. Strube, N. Schmeer, H. Hehnen & O.R. Kaaden** (1997). - Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch. Virol.*, **142**, 2049-2057.

38. **Zanotto C., M. Giangaspero, M. Büttner, A. Braun, C. De Giuli Morghen, V. Elli, A. Panuccio & A. Radaelli** (2002). - Evaluation of *Poliovirus* vaccines for *Pestivirus* contamination: Non-specific amplification of *Poliovirus* sequences by pan-*Pestivirus* primers. *Journal of Virological Methods*, **102**, 167-172.

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

with BVDV-1b. The evolutionary origin still remains unclear. The mean base pairs divergence value was slightly lower with genotype BVDV-1b (4.7 instead of 5.1) for genotype BVDV-1a. In terms of evolutionary changes, the stable mutations generated characteristic hybrid base pairs between BVDV-1a and BVDV-1b genotypes or could represent a third cluster with BVDV-1a and BVDV-1b, representing prototypes in the species. Similar nucleotide characteristics observed in the sequence of Sample 1 were also reported in strain CRFK, adventitious contaminants from biological products, isolated in Japan and strain CP1885 was recorded in a cattle isolate from Belgium, determined as genotype BVDV-1e (A. Giangaspero and R. Harasawa, unpublished findings).

The adventitious pestivirus strains, identified during the previous studies on human virus vaccine contamination, were allocated in genotypes of BVDV-1 species BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1c and BVDV-1d. Two strains (rubella and MMR-T), belonged to the BVDV-2 species genotype BVDV-2d. In three experiments, the authors used a positive control, the BVDV reference strains Oregon C24V and NADL. The accuracy of the test was enhanced to avoid any risk of contamination. A positive sample was detected

in a test performed with the Oregon C24V strain (BVDV genotype 1a). The sequence of the isolate was from genotype 1b. This clearly excluded any doubt of contamination in the diagnostic system. The test with the NADL stain did not reveal positive samples. However, in further analyses, it will be easier to use an internal positive control which contains the primer binding sites but will yield a larger product to clearly discriminate from pestivirus-specific amplifications. Maximum caution was applied when interpreting the results obtained by PCR; these were confirmed by nested PCR and sequencing, taking into account non-specific reactions observed with RT-PCR for the detection of pestivirus RNA in two batches of polyvalent human live vaccines against poliovirus (38). Samples from both batches showed a band of approximately 450 bp instead of the expected 300 bp for the reference pestivirus strains used as positive controls. Sequencing confirmed the non-specificity of the result and revealed homology with a region in the VP1 gene of *Poliovirus* type-1. The percentage of positive samples reported by Harasawa and Tomyama (20) (4 positive of 5 tested) (80%), cannot be considered representative because of the low number of samples tested. In the second experiment on human



interferons, the percentage was lower (30.4% of 46 samples tested) (19). Further investigation on live human virus vaccines selected from European, North American and Japanese manufacturers (14) showed 13% of positive reactions, out of 38 samples tested. The positive level revealed in the current study was 33.3%, but related to a limited number of samples. The negative results recently reported by Vilcek *et al.* (35) on European human virus vaccines did not lead to further conclusion. Only through wider screening will it be possible to obtain a clear evaluation of the extent of the problem.

A topic of interest is the identification of sources of viral contaminants. During experimental controls undertaken in Japan (20) and Europe (14), bovine foetal serum was used as a medium supplement for cell cultures used in the production of human vaccines which were contaminated by pestivirus or pestivirus RNA and it was the most probable source of contamination. However, the source of contamination of vaccines produced in chicken embryo is unknown. In this case, bovine foetal serum or bovine albumin were not involved. Recently (in 2002),

contamination of biological products by rhinovirus was reported in Belgium; this was traced to the preparation of the media by a technician (Dobbelaer, Scientific Institute of Public Health, Brussels, Euroconference «Viruses and new emerging agents in biologicals: a safety approach», held at the Pasteur Institute in Paris from 14 to 15 March 2002). The virus replicated in primary fibroblast cell substrate, human cell line MRCS. Such an occurrence could not be excluded as in the present case, given that previous investigations on pestivirus isolation from human buffy coats revealed viraemia in two clinically healthy people (12). From the buffy coat cells of a 30-year-old woman, isolation was repeated three times for 31 days. The period of viraemia was long when compared to that in animals, with the exception of immunotolerant subjects with life-long viraemia.

Notwithstanding the high production and control standards applied in Japan and Europe, the problem of safety of the production methods of biological product is raised. Thermic inactivation associated with *b-propiolactone* treatment was proposed to inactivate BVDV (4). Bolin *et al.* (1)

reported BVDV contamination in biological products treated using the above method. Furthermore, standard procedures (e.g. indirect immunofluorescence and serum neutralisation tests), when applied without prior concentration of high volumes, especially when low virus titres are involved, might be inefficient. Bolin *et al.* (1994) reported that BVDV RNA detection by PCR from experimentally infected monkey cells was unsuccessful unless sequential passages on turbinate bovine cells were made.

In the present study, isolation assays were not performed on cell culture. Therefore, the detection of pestivirus RNA in human virus vaccines does not necessarily indicate the presence of infectious virions, but the occurrence of iatrogenic infection in animals has been reported in relation to vaccines for veterinary use contaminated by infectious pestivirus (10, 22, 23, 32, 36).

In conclusion, these preliminary results confirm previous observations and demonstrate that the occurrence of pestivirus contamination in biological products for human use contrasts significantly with the general safety rules for pharmaceutical products for human use, which clearly exclude any kind of contamination.