

KEWASPADAAN DALAM PENGGUNAAN FETAL *BOVINE SERUM* KOMERSIAL YANG TERKONTAMINASI *BOVINE VIRAL DIARRHEA* SEBAGAI SUPLEMEN MEDIA KULTUR SEL PADA PENGUJIAN ISOLASI PESTIVIRUS

Sri Handayani Irianingsih^{1*}, Desi Puspita Sari¹, Muhammad Afdhal Darul², Zaza Famia¹

¹Medik Veteriner di Balai Besar Veteriner Wates

²Paramedik Veteriner di Balai Besar Veteriner Wates

*corresponding author: yanibiotech@gmail.com

Abstrak

Ketersediaan *fetal bovine serum* (FBS) komersial sebagai suplemen media kultur sel di Indonesia saat ini masih bergantung pada importasi. Persyaratan bebas virus *Bovine Viral Diarrhea* (BVD) untuk pengujian isolasi virus BVD dan *Classical Swine Fever* (CSF) yang tergolong dalam Pestivirus harus dipenuhi sesuai dengan protokol pengujian. Evaluasi terhadap FBS komersial ini bertujuan untuk memberikan penilaian kesesuaian FBS sebagai suplemen media kultur sel berdasarkan adanya antibodi dan kontaminasi antigen dan/atau virus BVD. Sebanyak 9 *batch* FBS yang berasal dari 2 penyedia telah diuji ELISA antibodi dan antigen BVD, *realtime* RT-PCR virus BVD, dan multiplex nested PCR genotyping BVD, sedangkan 2 *batch* FBS diuji terhadap pertumbuhan virus BVD menggunakan kultur sel *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK). Hasil pengujian menunjukkan 9 *batch* FBS negatif antibodi BVD, 4 *batch* FBS positif antigen BVD, 9 *batch* FBS terkontaminasi virus BVD, dan 8 *batch* FBS diidentifikasi genotipe BVDV-1. Kultur sel MDBK yang dilakukan pertumbuhan sel hingga 3 kali pasase menggunakan 2 *batch* FBS sebagai suplemen media kultur sel menunjukkan positif virus BVD biotipe *noncytopathic*. Berdasarkan hasil pengujian disimpulkan bahwa sediaan FBS komersial telah terkontaminasi virus BVD dan terindikasi sebagai virus aktif, sehingga perlu lebih waspada dan selektif dalam menentukan FBS sebagai suplemen media kultur sel pada pengujian diagnostik, isolasi virus, dan analisis sekuensing virus BVD dan CSF yang termasuk dalam Genus Pestivirus.

Kata kunci: *fetal bovine serum*, Pestivirus, kultur sel, *realtime*RT-PCR

PENDAHULUAN

Virus BVD tergolong dalam anggota prototipe genus Pestivirus, family Flaviviridae dan bersifat patogen pada hewan (Callens *et al.*, 2016). Pestivirus memiliki genom RNA untai tunggal, positif *sense*, panjang sekitar 12.3 kb dan 4 spesies yaitu virus bovine viral diarrhea (BVD-1), virus BVD-2, virus *border disease* (BDV), dan virus *classical swine fever* (CSFV) (Becher *et al.*, 2003; Walz *et al.*, 2010; Callens *et al.*, 2016); it has undergone surges and lulls in importance. Epizootics of disease caused by BVDV are described. Although naming of the virus and illness implies gastrointestinal disease in cattle, BVDV is a pathogen that affects multiple organ systems in many animal species. Infection, disease, or both have been described in cattle, sheep, goats, pigs, bison, alpacas, llamas, and white-tailed deer, among others. In 2007, the Office of International Epizootics added bovine viral diarrhea to its list of reportable diseases, but the listing is as a reportable disease of cattle rather than as a reportable disease of multiple species. Although initial descriptions of disease caused by BVDV were of digestive disease, respiratory disease and reproductive losses because of BVDV are the most important economically. BVDV uses multiple strategies to ensure survival and successful propagation in mammalian hosts, and this includes suppression

of the host's immune system, transmission by various direct and indirect routes, and, perhaps most importantly, induction of persistently infected (PI). Virus BVD diklasifikasikan menjadi 2 genotipe yang secara antigenik berbeda berdasarkan susunan nukleotida pada 5' UTR (Kameyama *et al.*, 2006). Genotipe virus BVD-1 dan BVD-2 masing-masing mempunyai subgenotipe yang bervariasi virulensinya dan dua biotipe yang berbeda, *cytopathic* (cp) dan *non-cytopathic* (ncp), berdasarkan efek pada pertumbuhan kultur sel (Ammari *et al.*, 2010) causing important economic losses. Pathogenesis of the disease caused by BVDV is complex, as each BVDV strain has two biotypes: non-cytopathic (ncp).

Kualitas sangat penting untuk diagnosis yang tepat dan keamanan biologis dalam program pengendalian penyakit (Polak *et al.*, 2008). Adanya infeksi pada induk bunting hingga menembus *barrier* plasenta dan menginfeksi fetus menyebabkan FBS terkontaminasi secara vertikal (Nagayama *et al.*, 2015). Banyak kultur sel dilaporkan telah terkontaminasi BVDV karena menggunakan FBS yang berasal dari fetus terinfeksi persisten atau hasil pengumpulan FBS dari fetus yang tidak terinfeksi dengan terinfeksi (Bolin *et al.*, 1991). Kontaminasi virus BVD pada FBS merupakan masalah besar karena menghambat diagnosis dan banyak ditemukan pada sediaan FBS komersial. Pengujian untuk mengetahui ada/tidaknya kontaminan virus *Bovine Viral Diarrhea* (BVD) aktif metode kultur sel (Makoschey *et al.*, 2003).

Diagnosa penyakit BVD dan CSF harus memperhatikan *fetal bovine sera* (FBS) yang digunakan dalam media pertumbuhan kultur sel, karena sebagian besar sera tersebut terkontaminasi oleh virus BVD (Mahlum *et al.*, 2002). Berdasarkan kajian sekuen genom utuh virus BVD yang terisolasi dari kultur sel *High-Passage RK-13 American Tissue Culture Collection* (ATCC) teridentifikasi *noncytopathic* BVDV-1b (Nam *et al.*, 2015) sedangkan *fetal bovine serum* (FBS) komersial di China teridentifikasi *cytopathic* BVDV-2 (Liu *et al.*, 2012). Tujuan dilakukan evaluasi terhadap FBS komersial ini adalah untuk memberikan penilaian kesesuaian FBS sebagai suplemen media kultur sel berdasarkan keberadaan antibodi dan/atau kontaminasi antigen virus BVD. Hal ini sebagai bentuk kewaspadaan dan sangat bermanfaat bagi kepentingan diagnostik.

MATERI DAN METODA

Materi

Bahan utama yang digunakan pada kajian ini adalah sampel FBS komersial sebanyak sembilan *batch* yang berasal dari dua penyedia. Sediaan FBS ini biasanya digunakan sebagai suplemen media kultur sel untuk memperbanyak sel dan keperluan diagnostik.

Metoda

Pemeriksaan adanya antibodi dalam FBS komersial menggunakan uji ELISA antibodi p80 BVD sedangkan kontaminasi virus BVD menggunakan

antigen capture ELISA (ACE), *real time reverse transcriptase-polymerase chain reactions* (RT-PCR), dan *multiplex* nPCR virus BVD. Pemeriksaan pertumbuhan virus BVD dilakukan terhadap FBS terpilih berdasarkan keberadaan antigen, genotipe, dan nilai Ct menggunakan kultur sel *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK). Identifikasi biotipe virus BVD menggunakan teknik imunostikomia dengan pewarnaan streptavidin-biotin imunoperoxidase.

Uji ELISA Antibodi p80 BVD

Pengujian ELISA antibodi BVD menggunakan kit IDVet ID *Screen*® BVD p80 (NS2-3) *Antibody Competition*.

Uji ELISA Antigen Erns BVD

Pengujian *antigen capture* ELISA (ACE) menggunakan antibodi monoklonal anti Erns sebagai protein yang dilapiskan untuk mendeteksi antigen BVD.

Realtime RT-PCR

Reagen untuk reaksi *realtime* RT-PCR menggunakan kit komersial VetMAX™ Gold BVDV PI Detection kit (*Applied Biosystems*®).

Multiplex nested PCR

Tahap *multiplex genotyping* untuk menentukan genotipe virus BVD-1 menghasilkan pita berukuran 360 bp sedangkan untuk BVD-2 berukuran 604 bp (Gilbert *et al.*, 1999). Sekuen primer yang digunakan pada *multiplex nested* RT-PCR virus BVD ditunjukkan pada Tabel 1. Reagen untuk reaksi RT-PCR eksternal menggunakan *AffinityScript One-Step RT-PCR Kit*. Reagen untuk PCR tahap kedua (*nested*), *multiplex genotyping* menggunakan *HotStar Taq Mastermix Kit*, Qiagen®.

Tabel 1. Sekuen primer *genotyping* pada *multiplex nested* RT-PCR virus BVD.

Primer	Sekuen (5' – 3')	Posisi pada gen NS5B	Ukuran produk PCR
Ekst_fwd	AAGATCCACCCTTATGA(A/G)GC	10385-10404	1.100 bp
Ekst_rev	AAGAAGCCATCATC(A/C)CCACA	11528-11547	
Int_fwd1	TGGAGATCTTTCACACAATAGC	10758-10779	360 bp (BVDV-1)
Int_fwd2	GGGAACCTAAGAACTAAATC	10514-10533	604 bp (BVDV-2)
Int_rev	GCTGTTTCACCCAGTT(A/G)TA CAT	11096-11117	

Keterangan: Ekst = eksternal; Int = internal; fwd = *forward*; rev = *reverse* (Gilbert *et al.*, 1999)

Isolasi Virus BVD pada sel MDBK

Sampel serum sapi yang positif antigen BVD dengan uji ACE kemudian dilakukan isolasi virus menggunakan biakan sel MDBK (OIE, 2015). *Microplate* 96 *welol flat bottom* disiapkan untuk menumbuhkan sel MDBK selapis dengan jumlah 150.000 sel/ml dalam media MEM yang telah ditambahkan *bovine*

serum 10%, antibiotika Penicillin-Streptomycin (100 IU/ml-100 µg/ml) dan Gentamycin (50 µg/ml), Fungizone (2,5 µg/ml), dan Hepes Buffer (0,01 M). Sel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C agar tumbuh selapis pada setiap sumuran. Pertumbuhan sel apabila sudah mencapai 80% konfluen, maka cairan media diambil dan sel dicuci dua kali dengan larutan PBS yang telah ditambah dengan antibiotika.

Identifikasi menggunakan teknik Imunositokimia

Sampel yang telah diinokulasikan hingga pasase keempat/kelima sesuai dengan metoda OIE (2018) diidentifikasi menggunakan metoda imunositokimia pewarnaan streptavidin-biotin immunoperoxidase dengan kit *StarTrek HRP Detection System*®. Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi monoklonal anti gp53 IgG1 virus BVD (VMRD, USA) dengan pengenceran 1:100 dengan 1% serum *goat* normal. Analisis data dilakukan secara deskriptif melalui pembacaan *slide* menggunakan mikroskop *inverted*. Sel terinfeksi akan terlihat berwarna kecoklatan yang menunjukkan adanya ikatan antigen virus BVD dan antibodi di sitoplasma.

HASIL

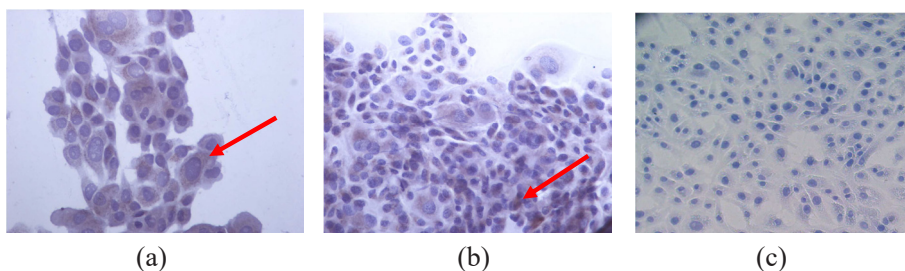
Sebanyak 9 *batch* sampel FBS komersial yang berasal dua penyedia diuji terhadap keberadaan antibodi, antigen dan/atau virus BVD. Pemeriksaan tersebut meliputi ELISA antibodi p80, *antigen capture* ELISA (ACE), *real time* RT-PCR, dan *multiplex* nPCR. Pengujian ELISA antibodi p80 (NS2-3) menggunakan kit komersial terhadap 9 sampel FBS memberikan hasil negatif antibodi p80 BVDV (100%). Sebanyak 4 dari 9 sampel FBS (44%) menunjukkan positif antigen Erns. Pengujian *real time* RT-PCR sembilan sampel FBS menunjukkan hasil positif BVD (100%). Berdasarkan genotyping *multiplex* nPCR 8 dari 9 sampel FBS menunjukkan BVDV-1 (89%). Hasil pengujian selengkapnya dapat dilihat seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengujian sampel FBS komersial terhadap keberadaan antibodi dan antigen/virus

No.	Kode Sampel	ELISA Ab BVD	ELISA Ag BVD	Uji Real Time RT-PCR BVD (Ct value)	PCR Nested Genotyping BVD
1	FBS (A1)	Negatif	Negatif	Positif (27,02)	Positif BVDV-1
2	FBS (A2)	Negatif	Negatif	Positif (32,35)	Positif BVDV-1
3	FBS (A3)	Negatif	Negatif	Positif (25,77)	Positif BVDV-1
4	FBS (A4)	Negatif	Negatif	Positif (25,44)	Positif BVDV-1
5	FBS (A5)	Negatif	Positif	Positif (22,77)	Positif BVDV-1
6	FBS (B1)	Negatif	Negatif	Positif (29,04)	Negatif
7	FBS (A6)	Negatif	Positif	Positif (25,55)	Positif BVDV-1

No.	Kode Sampel	ELISA Ab BVD	ELISA Ag BVD	Uji Real Time RT-PCR BVD (Ct value)	PCR Nested Genotyping BVD
8	FBS (A6)	Negatif	Positif	Positif (27,42)	Positif BVDV-1
9	FBS (A7)	Negatif	Positif	Positif (26,04)	Positif BVDV-1

Pengujian pertumbuhan virus BVD dilakukan terhadap FBS terpilih yaitu sampel FBS kode A5 dan A6 berdasarkan keberadaan antigen, genotipe, dan nilai Ct ($\leq 25,6$) dengan menggunakan kultur sel MDBK. Pertumbuhan kultur sel MDBK menggunakan suplemen FBS (A5) dari p129 hingga p132 sedangkan FBS (A6) dari p138 hingga p141. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa FBS (A5) dan (A6) terkontaminasi virus BVD aktif berdasarkan uji pewarnaan streptavidin-biotin immunoperoxidase. Hasil uji yang positif ditandai secara spesifik dengan terlihatnya warna kecoklatan di bagian sitoplasma dari sel MDBK yang terinfeksi BVDV. Gambaran kultur sel MDBK yang terinfeksi virus BVD asal FBS, kontrol positif virus ncpBVD dan kontrol sel MDBK, ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kultur sel MDBK p132 *in vitro* FBS yang terkontaminasi virus ncpBVD (a) kultur sel MDBK p132 *in vitro* yang terinfeksi virus ncpBVD sebagai kontrol positif (b) dan kultur sel MDBK *in vitro* non infeksi sebagai kontrol sel (c). Pada sitoplasma sel MDBK terlihat berwarna coklat (BVDV / IPMA, 1000X).

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pengujian semua produk materi biologik dari sapi, yaitu 9 *batch* FBS, terkontaminasi antigen/virus BVD dan 8 FBS teridentifikasi genotipe BVDV-1. Adanya antigen virus BVD dapat menyebabkan hasil positif dari sampel negatif saat pengujian RT-PCR dan analisis sekuensing. Dua *batch* FBS menunjukkan keberadaan virus ncpBVD secara aktif. Menurut Polak *et al.* (2008) dan OIE (2018) uji identifikasi virus BVD sebagai kontaminan materi biologik dapat menggunakan ELISA, *multiplex* nPCR, *real time* RT-PCR dan isolasi virus serta imunositokimia. Biotipe virus ncpBVD biasanya yang mengkontaminasi FBS dan mengakibatkan sel MDBK terinfeksi sehingga mengganggu diagnosa penyakit (Bolin dan Ridpath, 1998; Polak *et al.*, 2008).

Suplemen serum spesies sapi yang sesuai untuk pertumbuhan Sel MDBK khususnya FCS/FBS, namun prevalensi kontaminasi virus BVD pada FCS komersial mencapai 49% (93/190) (Bolin *et al.*, 1991). Penggunaan sera dari spesies yang berbeda disarankan sebagai alternatif, seperti serum kuda untuk pengujian isolasi virus menggunakan kultur sel agar terhindar dari kontaminasi virus BVD, walaupun pertumbuhan sel menjadi lebih lambat dan tidak untuk jangka waktu lama (Abe *et al.*, 2016; OIE, 2015) we genetically analyzed bovine viral diarrhoea viruses (BVDVs).

Tingkat kejadian BVDV pada sapi sangat tinggi di negara seperti Australia, New Zealand (Reichel *et al.*, 2018), United States, Eropa, China dan Turkey (Yesilbag *et al.*, 2017). Kontaminasi virus BVD dilaporkan pada *cell lines* yang berasal dari spesies sapi, domba, kambing, rusa, bison, kelinci termasuk RK-13 (CCL-37; American Type Culture Collection/ATCC) yang diakibatkan oleh FBS terkontaminasi virus BVD dalam media kultur sel (Nam *et al.*, 2015).

Menurut (Liu *et al.*, 2012) 284 nucleotides (nt FBS yang diinokulasikan ke sel MDBK dan melewati pasase hingga 10 kali mengakibatkan perubahan biotipe *cytopathic* sel MDBK. Virus BVD yang berasal dari FBS telah dikarakterisasi lebih lanjut dengan melakukan sekuensing genom utuh (Liu *et al.*, 2012) 284 nucleotides (nt dan parsial (Zhang *et al.*, 2014) and 20 batches of bovine serum were positive by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR. Waktu yang diperlukan FBS untuk menginfeksi sel bervariasi tergantung dari konsentrasi virus yang aktif. Langkah pemeriksaan ini harus dilakukan secara rutin sebelum melaksanakan pengujian diagnostik, isolasi virus dan analisis sekuensing.

Uji identifikasi menggunakan teknik imunositokimia, streptavidin-biotin immunoperoxidase dilakukan terhadap kultur sel MDBK p132. Antibodi monoklonal BVDV tipe 1 dan 2 (E2 gp53 IgG1, VMRD®) yang digunakan sebagai antibodi primer mengikat antigen spesifik dari kultur sel MDBK. Pengujian ini mampu menunjukkan kultur sel yang terinfeksi oleh virus BVD dan distribusi antigen dalam sel (Bedeckovic *et al.*, 2011). Adanya antigen virus BVD ditunjukkan dengan bentukan agregat berwarna kecoklatan pada sitoplasma sel MDBK. Teknik streptavidin-biotin immunoperoxidase ini mempunyai kelebihan dalam menskrining kultur sel secara cepat, dapat dipercaya, dan efektif (Castro *et al.*, 1997).

Identifikasi genotipe BVDV menggunakan teknik *multiplex* nPCR menunjukkan genotipe BVDV-1 dengan ukuran produk PCR sebesar 360bp (Gilbert *et al.*, 1999). Sel MDBK p132 menunjukkan telah terkontaminasi oleh BVDV-1 yang dibawa oleh FBS. Sel ini berasal dari p129 yang sebelumnya menunjukkan hasil negatif BVD. Prevalensi BVDV-1 (88,2%) mempunyai nilai lebih tinggi dibandingkan BVDV-2 (11,8%) (Yesilbag *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil tersebut, maka sel MDBK p133 dan semua FBS tidak dapat digunakan untuk keperluan diagnostik, pengujian isolasi virus serta analisis sekuensing BVD dan CSF yang termasuk dalam genus Pestivirus.

Pengujian FBS terhadap antibodi BVD dan virus BVD wajib dilakukan untuk keperluan diagnostik. Deteksi materi genetik virus BVD saja tidak cukup, karena tidak selalu memiliki relevansi biologis sehingga perlu menggunakan metoda kultur sel (Makoschey *et al.*, 2003). Adanya perlakuan iradiasi dengan dosis minimal 25 kiloGrays (2,5 Mrad) dapat menonaktifkan virus BVD dalam FBS yang terkontaminasi namun parsial gen masih terdeteksi dengan *real-time* RT-PCR (OIE, 2018). Penggunaan serum kuda juga dapat dilakukan namun bersifat sementara karena penggunaan yang terus-menerus akan menghambat pertumbuhan sel (OIE, 2018). Pemilihan FBS komersial sangat penting diperhatikan untuk mendapatkan FBS yang bebas dari antibodi dan virus BVD (Nagayama *et al.*, 2015).

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil pengujian disimpulkan bahwa sediaan FBS komersial di laboratorium telah terkontaminasi virus BVD dan terindikasi sebagai virus aktif, sehingga perlu lebih waspada dan selektif dalam menentukan FBS sebagai suplemen media kultur sel pada pengujian diagnostik, isolasi virus, dan analisis sekuensing virus BVD dan CSF yang termasuk dalam Genus Pestivirus.

KETERBATASAN ATAU LIMITASI

Jumlah penyedia yang memasok ketersediaan FBS komersial beserta *batch* yang berbeda belum dievaluasi seluruhnya terhadap kontaminasi virus BVD, terutama keberadaan secara aktif menggunakan kultur sel.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe, Y., Tamura, T., Torii, S., Wakamori, S., Nagai, M., Mitsunashi, K., Mine, J., Fujimoto, Y., Nagashima, N., Yoshino, F., Sugita, Y., Nomura, T., Okamatsu, M., Kida, H., and Sakoda, Y. 2016. Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(1): 61–70.
- Ammari, M., McCarthy, F. M., Nanduri, B., and Pinchuk, L. M. 2010. Analysis of Bovine Viral Diarrhea Viruses-infected monocytes: identification of cytopathic and non-cytopathic biotype differences. *BMC Bioinformatics*, 11(Suppl 6): S9
- Becher, P., Ramirez, R. A., Orlich, M., Rosales, S. C., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirmer, H., and Thiel, H.J. 2003. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: Implications for classification. *Virology*, 311(2003): 96–104
- Bedeković, T., Lemo, N., Lojkić, I., Beck, A., Lojkić, M., and Madić, J. 2011. Implementation of immunohistochemistry on frozen ear notch tissue samples in diagnosis of bovine viral diarrhea virus in persistently infected cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(65): 1-4

- Bolin, S. R., Matthews, P. J., and Ridpath, J. F. 1991. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhea virus and antibodies against bovine viral diarrhea virus.. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 3(1991): 199-203.
- Bolin, S. R., and Ridpath, J. F. 1998. "Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus Genotypes and Antibody against Those Viral Genotypes in Fetal Bovine Serum." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(2): 135–39.
- Callens, N., Brugger, B., Bonnafous, P., Drobecq, H., Gerl, M. J., Krey, T., Roman-Sosa, G., Rumenapf, T., Lambert, O., Dubuisson, J., and Rouille, Y. 2016. Morphology and Molecular Composition of Purified Bovine Viral Diarrhea Virus Envelope. *PLoS Pathogens*, 12(3): e1005476
- Castro, M. D., Stoffregen, W. C., Brigman, G. P., and Hillard, K. A. 1997. A method to detect bovine viral diarrhea virus contamination in cell cultures using immunoperoxidase staining. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9(1997): 427–431.
- Fang, C-Y., Wu C-C., Fang C-L., Chen, W-Y., and Chen, C-L. 2017. Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. *PLoS ONE*, 12(6): e0178960.
- Gilbert, S., Burton, K. M., Prins, S. E., and Deregt, D. 1999. Typing of Bovine Viral Diarrhea Viruses Directly from Blood of Persistently Infected Cattle by Multiplex PCR Typing of Bovine Viral Diarrhea Viruses Directly from Blood of Persistently Infected Cattle by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6): 2020–2023
- Houe, H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *The Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 11(3): 521–547.
- Kameyama, K., Sakoda, Y., Tamai, K., Nagai, M., Akashi, H., and Kida, H. 2006a. Genetic recombination at different points in the Npro-coding region of bovine viral diarrhea viruses and the potentials to change their antigenicities and pathogenicities. *Virus Research*, 116(2006): 78–84.
- Liu, H., Li, Y., Gao, M., Wen, K., Jia, Y., Liu, X., Zhang, W., Ma, B., and Wang, J. 2012. Complete Genome Sequence of a Bovine Viral Diarrhea Virus 2 from Commercial Fetal Bovine Serum. *Journal of Virology*, 86(18): 10233.
- Mahlum, C. E., Haugerud, S., Shivers, J. L., Rossow, K. D., Goyal, S. M., Collins, J. E., and Faaberg, K. S. 2002. Detection of bovine viral diarrhea virus by TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14(2): 120–125.
- Makoschey, B., Gelder, P.T.J.A.v., Keijzers, V., Goovaerts, D. Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. *Biologicals* 31 (2003): 203–208.
- Nagayama, K., Oguma, K., and Sentsui, H. 2015. Survey on Vertical Infection of Bovine Viral Diarrhea Virus from Fetal Bovine Sera in the Field. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(11): 1531–1534

- Nam, B., Zheng, Y., Zhang, J., Shuck, K.M., Timoney, P.J, and Balasuriya, U.B.R. 2015. Complete Genome Sequence of Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus 1 Contaminating a High-Passage RK-13 Cell Line. *Genome Announcements*, 3(5): e01115-15.
- OIE, 2018, Bovine Viral Diarrhoea in OIE *Terrestrial Manual*, pp.:1-22.
- Polak, M.P., Rola J., and Żmudziński, J.F. 2008. Contamination of Foetal Bovine Serum with Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV). *Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy*, 52(2008): 501-505.
- Reichel, M. P., Lanyon, S. R., and Hill, F. I. 2018. Perspectives on Current Challenges and Opportunities for Bovine Viral Diarrhoea Virus Eradication in Australia and New Zealand. *Pathogens*, 7(14): 1-10.
- Walz, P., Grooms, D. L., Passler, T., Ridpath, J. F., Tremblay, R., Step, D., Callan, R.J., and Givens, M.D. 2010. Control of bovine viral diarrhea virus in ruminants. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(3), 476–486.
- Wiyono, A., Ronohardjo, P., Graydon, R., dan Daniels, P. 1989. Diare ganas sapi: Kejadian penyakit pada sapi bali bibit asal sulawesi. *Penyakit Hewan*, XXI (38): 77–83.
- Yesilbag, K., Alpay, G., and Becher, P. 2017. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses*, 9(128): v9060128.
- Zhang, S., Tan, B., Guo, L., Wang, F., Zhu, H., Wen, Y., and Cheng, S. 2014b. Genetic Diversity of Bovine Viral Diarrhea Viruses in Commercial Bovine Serum Batches of Chinese Origin. *Infection, Genetics and Evolution* 27(Aug 2014): 230–233.