

# КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ВИРУСА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ШТАММА «АБ 1908»

В. В. Кирпиченко<sup>1</sup>, С. В. Кононова<sup>2</sup>, А. В. Кононов<sup>3</sup>, О. П. Бьядовская<sup>4</sup>, Б. Л. Манин<sup>5</sup>, А. В. Спрыгин<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: kirpichenko@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-2494-3826

<sup>2</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: kononova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3932-2416

<sup>3</sup> Начальник отдела, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: kononov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5523-3261

<sup>4</sup> Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-8326-7151

<sup>5</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: manin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5263-1491

<sup>6</sup> Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sprygin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-5982-3675

## РЕЗЮМЕ

Респираторные заболевания крупного рогатого скота являются одними из наиболее распространенных патологий, а также важным фактором, обуславливающим экономический ущерб, связанный с финансовыми потерями и затратами на лечение и диагностику заболеваний. Одну из ведущих позиций в развитии респираторной патологии занимает респираторно-синцициальная инфекция крупного рогатого скота. Анализ результатов серологических исследований, проведенных в референтной лаборатории болезней КРС ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017–2018 гг., показал, что серопревалентность животных к респираторно-синцициальной инфекции в молочных хозяйствах составила 60%. При этом было отмечено, что наиболее восприимчивыми животными к данной инфекции являются телята в возрасте до одного года. Эффективность мер борьбы с респираторно-синцициальной инфекцией крупного рогатого скота зависит от своевременной постановки диагноза, для этого необходимы надежные и точные средства диагностики, в том числе оптимальные методы выделения вируса из патологического материала. Для успешного выделения вируса из клинических образцов необходимо точно соблюдать оптимальные параметры культивирования данного возбудителя. В статье представлены данные по изучению

культуральных свойств вируса респираторно-синцициальной инфекции крупного рогатого скота штамма «АБ 1908». В результате проведенных исследований было установлено, что перевиваемая культура клеток слизистой носовых перегородок крупного рогатого скота (ВТ), перевиваемая линия клеток трахеи эмбриона коровы (ФВТ) и перевиваемая линия клеток почки телят (РВТ) являются чувствительными системами для культивирования данного возбудителя и могут быть использованы для получения вирусной суспензии с целью дальнейших научных исследований. Титр вируса в культуре клеток ВТ был на уровне  $4,33 \pm 0,16 - 4,66 \pm 0,12 \text{ лг ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , в культуре клеток РВТ –  $4,33 \pm 0,33 - 4,7 \pm 0,36 \text{ лг ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  и в культуре клеток ФВТ –  $4,13 \pm 0,20 - 4,78 \pm 0,17 \text{ лг ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . Также в ходе проделанной работы были определены оптимальные параметры культивирования возбудителя в данных чувствительных культурах клеток: возраст культуры для инфицирования вирусом – 1–2 сут, множественность заражения – 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл.

**Ключевые слова:** респираторно-синцициальный вирус крупного рогатого скота, штамм «АБ 1908», культура клеток, культивирование, титр вируса, инфекционная активность.

UDC 619:578.231.31:636.22/28:57.082.26

# CULTURAL PROPERTIES OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS STRAIN AB1908

V. V. Kirpichenko<sup>1</sup>, S. V. Kononova<sup>2</sup>, A. V. Kononov<sup>3</sup>, O. P. Byadovskaya<sup>4</sup>, B. L. Manin<sup>5</sup>, A. V. Sprygin<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: kirpichenko@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-2494-3826

<sup>2</sup> Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: kononova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3932-2416

<sup>3</sup> Head of Department, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: kononov@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5523-3261

<sup>4</sup> Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-8326-7151

<sup>5</sup> Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: manin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-5263-1491

<sup>6</sup> Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: sprygin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0001-5982-3675

## SUMMARY

Cattle respiratory diseases are some of the most spread pathologies that can cause economic damage, resulting from financial losses and costs of treatment and diagnostics. One of the major factors contributing to respiratory pathology development is bovine respiratory syncytial infection. The analysis of serological testing, performed by the FGBI "ARRIAH" Reference Laboratory for Cattle Diseases in 2017–2018, showed that respiratory syncytial virus seroprevalence in animals of dairy farms is 60%. Herewith, it was noted that the most susceptible animals to this infection are calves under one year of age. The effectiveness of bovine respiratory syncytial infection control measures depends on timely diagnosis; that is why reliable and accurate diagnostic tools are needed, including optimal techniques of virus isolation from pathological material. For successful virus isolation from clinical samples, it is necessary to adhere strictly to optimal parameters of this agent cultivation. This paper pre-

sents data on study of bovine respiratory syncytial virus strain AB 1908 cultural properties. The tests performed showed that a continuous bovine turbinate (BT) cell line, continuous bovine fetal trachea (FBT) cell line and continuous bovine calf kidney (RBT) cell line are sensitive for cultivation of this agent and can be used to prepare viral suspension, needed for further research. Virus titre in BT cell culture was  $4.33 \pm 0.16 - 4.66 \pm 0.12 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$ , in RBT cell culture –  $4.33 \pm 0.33 - 4.7 \pm 0.36 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$  and in FBT cell culture –  $4.13 \pm 0.20 - 4.78 \pm 0.17 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$ . The following virus cultivation optimal parameters were also determined during this study: the age of the culture for virus inoculation should be 1–2 days and multiplicity of inoculation should be 0.1 TCID<sub>50</sub>/cell.

**Key words:** bovine respiratory syncytial virus, AB 1908 strain, cell culture, cultivation, virus titre, infectivity.

## ВВЕДЕНИЕ

Значимую часть экономического ущерба, связанного со снижением скорости развития и роста больных животных, затратами на лечение, а также диагностическими и профилактическими мероприятиями, составляют респираторные заболевания крупного рогатого скота (КРС) [4]. Одну из ведущих позиций в развитии респираторной патологии занимает респираторно-синцициальная вирусная инфекция крупного рогатого скота.

Респираторно-синцициальная инфекция крупного рогатого скота (РСИ КРС) – это контагиозное респираторное заболевание, которое наносит огромный ущерб животноводству по всему миру, в том числе и в России. РСИ КРС характеризуется катаральной бронхопневмонией, отеком легкого, слизистыми выделениями из носа, угнетением общего состояния животного и отсутствием аппетита. Наиболее восприимчивыми являются телята первого года жизни [1, 6, 7]. Согласно данным, опубликованным на официальном сайте Россельхознадзора, серопревалентность животных к РСИ КРС составила 78,9% от общего числа исследованных проб. В период с 2017 по 2018 г. циркуляцию вируса РСИ КРС отмечали в молочных хозяйствах, не практикующих вакцинацию. По результатам исследований, проведенных в референтной лаборатории болезней КРС ФГБУ «ВНИИЗЖ», количество выявленных положительных проб в этих хозяйствах составило 60%. На основании вышеизложенного можно заключить, что изучение биологических свойств вируса РСИ КРС, а также разработка средств диагностики и профилактики данного заболевания являются актуальной задачей.

Эффективность мер борьбы с РСИ КРС зависит от точности и быстроты диагностики. Диагноз ставят на основании эпизоотических данных, клинических признаков, патологоанатомического вскрытия и подтверждают лабораторными исследованиями. При постановке диагноза необходимо исключить такие заболевания, как инфекционный ринотрахеит (ИРТ), вирусную диарею (ВД КРС), парагрипп-3 (ПГ-3), рота- и коронавирусные инфекции КРС [6, 7]. Для диагностики РСИ КРС используют иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и выделение вируса в культуре клеток.

До настоящего времени в России основным способом диагностики РСИ КРС является выделение вируса из проб биологического материала в культуре клеток с последующей идентификацией его в реакции нейтрализации. По данным отечественных авторов, чувствительными к вирусу РСИ КРС считаются такие культуры клеток, как диплоидные культуры клеток легкого (Л<sub>5</sub>Э) и почки эмбриона (П<sub>5</sub>Э) коровы, перевиваемые линии почки эмбриона овцы (FLK), почки теленка (Т-1, ПТ) и первично трипсинизированная культура клеток легкого эмбриона коровы (ЛЭК) [3, 5]. Выделение вируса РСИ КРС затруднено ввиду его чрезвычайной лабильности и возможно только на ранней стадии инфекции; вероятность выделения снижается с появлением признаков заболевания. Из-за сложности выделения и культивирования также затруднено получение достаточного количества вирусного материала с высокой инфекционной активностью.

В связи с этим актуальным является изучение культуральных свойств возбудителя с целью выбора наиболее технологичных приемов конструирования средств диагностики и профилактики данного заболевания.

Целью настоящей работы явилось изучение культуральных свойств вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» и степени его накопления в различных системах культивирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали штамм «АБ 1908», адаптированный к перевиваемой культуре клеток слизистой носовых перегородок КРС (ВТ, АТСС, США).

Для проведения исследований были выбраны: перевиваемая линия клеток слизистой носовых перегородок эмбриона КРС (FBN), перевиваемая культура клеток слизистой носовых перегородок КРС (ВТ), перевиваемая культура клеток почки макаки-резуса (МА-104), перевиваемая линия клеток почки теленка (RBT) [2], перевиваемая линия клеток трахеи эмбриона коровы (FBT), первично трипсинизированная культура клеток почки барана (ПБ). Чувствительность культуры клеток к вирусу РСИ КРС определяли методом последовательных пассажей. С этой целью монослойную культуру клеток без признаков дегенерации, после отмывки раствором Хенкса, заражали вирусом РСИ КРС с предварительной адсорбцией на клетках. После 60-минутного контакта вируса с клетками заливали поддерживающую среду ПСП с 10%-м содержанием сыворотки крови КРС и культивировали при температуре  $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ . Инфицированную культуру ежедневно просматривали под микроскопом на наличие характерных морфологических изменений клеток.

Инфекционную активность вируса РСИ КРС определяли в культуре клеток ВТ методом микротитрования стандартным способом. Заключительный учет результатов титрования вируса проводили через 6–7 сут инкубирования при условии сохранения целостности монослоя клеток в контрольных лунках.

Расчет инфекционной активности проводили по методу Рида и Менча и выражали в  $\text{lg TCD}_{50}/\text{см}^3$ . Геном вируса РСИ КРС выявляли с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), используя коммерческий набор «Рибо-Сорб», (AmpliSens, Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения культуральных свойств вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» было проведено 5 последовательных пассажей в различных культурах клеток. Результаты исследований приведены в таблице 1.

Из представленных в таблице 1 данных видно, что уровень накопления вируса РСИ КРС штамм «АБ 1908» в различных клеточных системах был неодинаков.

Культивирование вируса в культурах клеток ПБ и FBN привело к постепенному снижению его активности, при проведении 2–3 пассажей титр вируса находился в пределах от  $2,68 \pm 0,13$  до  $1,13 \pm 0,08 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$ . Время культивирования составляло 7 сут.

При культивировании вируса в культуре клеток МА-104 наблюдали минимальное накопление вируса только на уровне 1-го пассажа ( $1,05 \pm 0,30 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$ ). Далее вирус не регистрировали.

Высокое накопление вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» было отмечено в культурах клеток ВТ, RBT и FBT уже с 1-го пассажа. Титр вируса в данных системах был в пределах  $4,33 \pm 0,16$  –  $4,66 \pm 0,12$ ,  $4,33 \pm 0,33$  –  $4,7 \pm 0,36$ ,  $4,13 \pm 0,20$  –  $4,78 \pm 0,17 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$  соответственно.

В ходе исследований было отмечено, что цитопатическое действие (ЦПД) вируса РСИ КРС в культурах

**Таблица 1**  
Репродукция вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» в культурах клеток ( $n = 3$ )

Культура клеток	Номер пассажа	Время культивирования, сут	Титр инфекционной активности, $\lg$ ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>2</sup>	Наличие генома вируса в ОТ-ПЦР
BT	1	10	$4,33 \pm 0,16$	+
	2	7	$4,63 \pm 0,13$	+
	3	5–6	$4,66 \pm 0,12$	+
	4	5	$4,66 \pm 0,12$	+
	5	5	$4,50 \pm 0,25$	+
RBT	1	10	$4,33 \pm 0,33$	+
	2	7	$4,36 \pm 0,11$	+
	3	5–6	$4,66 \pm 0,33$	+
	4	5	$4,70 \pm 0,36$	+
	5	6	$4,66 \pm 0,33$	+
FBT	1	10	$4,25 \pm 0,10$	+
	2	7	$4,33 \pm 0,80$	+
	3	5–6	$4,78 \pm 0,05$	+
	4	5	$4,13 \pm 0,20$	+
	5	6	$4,78 \pm 0,17$	+
ПБ	1	7	$2,68 \pm 0,13$	+
	2	7	$2,05 \pm 0,14$	+
	3	7	$1,67 \pm 0,10$	+
	4	7	н/о	+
	5	7	н/о	–
FBN	1	7	$1,26 \pm 0,03$	+
	2	7	$1,13 \pm 0,08$	+
	3	7	н/о	–
МА-104	1	7	$1,05 \pm 0,30$	+
	2	7	н/о	–

н/о – не обнаружено.

клеток было различным (рис. 1–6). Так, в культуре BT к 5-му пассажу через 2–3 сут культивирования наблюдали округление клеток, к 4–5-м сут – слияние клеточных мембран, а к 5–6-м сут – образование синцитиев, фрагментацию, разрыв монослоя и отделение клеток от стекла (рис. 1–2).

В культурах клеток FBT и RBT наблюдали схожую картину ЦПД вируса: образование нечетких симпластов и конгломератов (рис. 3–6). В данных клеточных линиях к 5-му пассажу на 2–3 сут культивирования отмечали деформацию отдельных клеток, к 3–5-м сут – образование выраженных локализованных очагов поражения

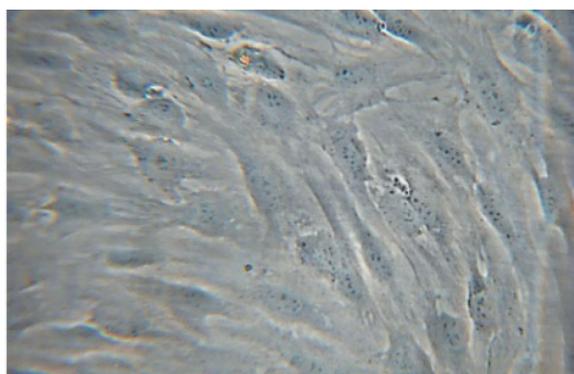


Рис. 1. Монослой незараженной культуры клеток BT на 6-е сут (увеличение  $\times 400$ )

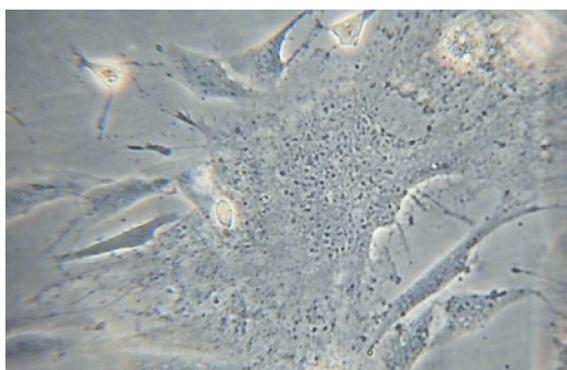


Рис. 2. Клетки монослоя BT после инфицирования вирусом РСИ КРС через 6 сут (увеличение  $\times 400$ )

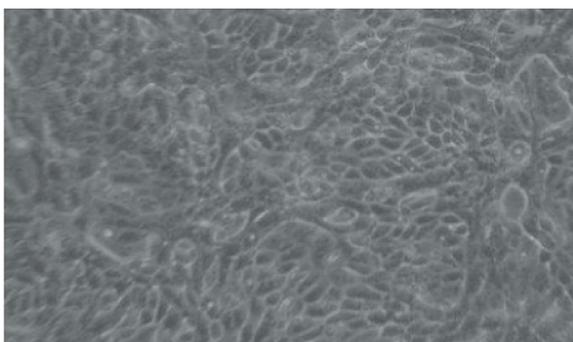


Рис. 3. Монослой незараженной культуры клеток RBT на 6-е сут (увеличение  $\times 400$ )

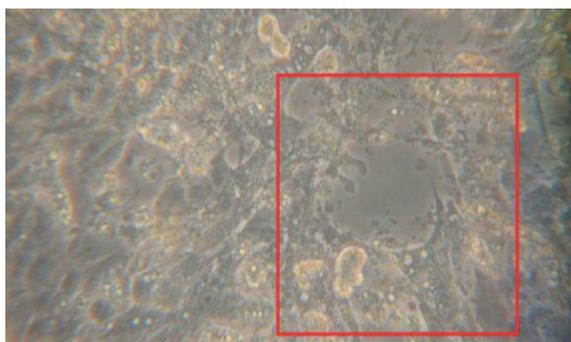


Рис. 4. Клетки моноосля RBT после инфицирования вирусом РСИ КРС через 6 сут (увеличение  $\times 400$ )

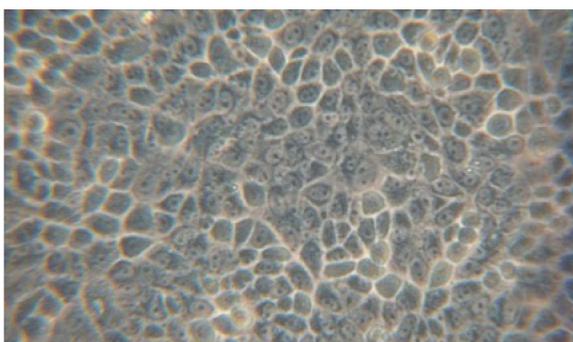


Рис. 5. Монослой незараженной культуры клеток FBT на 6-е сут (увеличение  $\times 400$ )

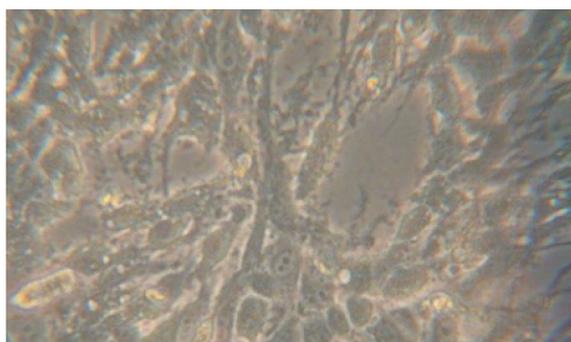


Рис. 6. Клетки моноосля FBT после инфицирования вирусом РСИ КРС через 6 сут (увеличение  $\times 400$ )

клеток, к 6–7-м сут – образование симпластов и конгломератов.

Нужно отметить, что из всех испытанных культур клеток наиболее подходящими для репродукции вируса РСИ КРС оказались клеточные системы BT, FBT и RBT гомологичного происхождения. Культуры клеток BT и FBT произошли из тканей дыхательной системы и являются явно перmissive. Клеточная линия RBT, полученная из почки КРС, также оказалась чувствительной к изучаемому вирусу.

Следующим этапом работы являлось определение посевной концентрации клеток BT, FBT и RBT, которая наиболее подходит для максимальной репродукции вируса (табл. 2). Для этого использовали посевную концентрацию клеток в диапазоне от 100 до 400 тыс./см<sup>3</sup>. Культуры клеток выращивали в течение 1 сут при  $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ , множественность заражения составила 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Активность вируса учитывали по лизису клеток в суспензии исследуемой культуры, а также методом титрования в культуре клеток BT. Результаты представлены в таблице 2.

Как видно из данных, представленных в таблице 2, максимальное накопление вируса в культуре клеток BT отмечали при посевной концентрации 100–200 тыс./см<sup>3</sup>. Титр вируса в данной культуре составлял  $4,25 \pm 0,44 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . Наибольшая активность вируса в культурах клеток RBT и FBT была при посевной концентрации 200–300 тыс./см<sup>3</sup> –  $3,78 \pm 0,13$  –  $4,25 \pm 0,25$  и  $3,62 \pm 0,13$  –  $4,54 \pm 0,24 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  соответственно.

Таким образом, оптимальной посевной концентрацией для клеток BT является 100 тыс./см<sup>3</sup>, для RBT и FBT – 200–300 тыс./см<sup>3</sup>.

На следующем этапе работы изучали влияние возраста культуры на инфекционную активность вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908». С этой целью были выбраны культуры клеток с наибольшим уровнем накопления вируса (BT, RBT, FBT). Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, в сформировавшемся к 1–2-м сут моноосле культуры клеток BT, RBT и FBT вирус РСИ КРС штамма «АБ 1908» репродуцировался в титрах  $4,75 \pm 0,06$ ;  $4,50 \pm 0,25$  и  $4,63 \pm 0,05 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$

Таблица 2

Влияние посевной концентрации клеток BT, FBT и RBT на репродукцию вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» ( $n = 3$ )

Посевная концентрация клеток, тыс./см <sup>3</sup>	Время культивирования, сут	Титр вируса, $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$		
		BT	FBT	RBT
100	6	$4,25 \pm 0,44$	$3,33 \pm 0,23$	$3,33 \pm 0,33$
200	5	$4,25 \pm 0,25$	$3,62 \pm 0,13$	$3,78 \pm 0,13$
300	5	$3,78 \pm 0,33$	$4,54 \pm 0,24$	$4,25 \pm 0,25$
400	6	$2,70 \pm 0,10$	$3,33 \pm 0,30$	$3,16 \pm 0,16$

Таблица 3

Влияние возраста культуры клеток на инфекционную активность вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» ( $n = 3$ )

Возраст культуры, сут	Время культивирования, сут	Титр вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$		
		BT	RBT	FBT
1	6	$4,75 \pm 0,06$	$4,25 \pm 0,11$	$4,50 \pm 0,17$
2	7	$4,25 \pm 0,11$	$4,50 \pm 0,25$	$4,63 \pm 0,05$
3	10	$4,00 \pm 0,25$	$4,00 \pm 0,22$	$3,83 \pm 0,15$
4	10	$3,33 \pm 0,33$	$3,21 \pm 0,11$	$3,23 \pm 0,11$

Таблица 4

Определение влияния множественности заражения на активность вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» ( $n = 3$ )

Доза заражения, $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$	Время культивирования, сут	Титр вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$		
		BT	RBT	FBT
0,001	7–10	$3,63 \pm 0,20$	$3,33 \pm 0,30$	$3,16 \pm 0,16$
0,01	6–8	$4,16 \pm 0,16$	$4,00 \pm 0,25$	$4,00 \pm 0,19$
0,1	5–6	$4,33 \pm 0,10$	$4,54 \pm 0,10$	$4,33 \pm 0,33$

соответственно. А при инокуляции вируса в 3–4-суточные культуры репродукция вируса снижалась и составила в среднем  $3,66 \pm 0,29$  (BT);  $3,60 \pm 0,16$  (RBT) и  $3,53 \pm 0,13 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  (FBT). Снижение инфекционной активности вируса может быть связано со снижением процессов обмена веществ клеток с внешней средой, которые протекают активнее на начальной стадии роста монослоя. Таким образом, наиболее оптимальным возрастом культур клеток BT, RBT и FBT для инокуляции вируса является 1–2 сут.

При исследовании культуральных свойств вируса важным является определение множественности заражения. Исходя из этого, следующим этапом работы стало определение влияния множественности заражения на цитопатическую активность вируса в культурах клеток BT, RBT и FBT. Для этого использовали дозы заражения 0,001; 0,01 и 0,1  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ . Инкубацию вируса прекращали при 90%-м разрушении клеток и отслоении их от стекла. Цитопатическую активность проверяли методом микротитрования в культуре клеток BT. Результаты представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы 4, цитопатическая активность вируса при множественности заражения 0,1  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$  составила  $4,33 \pm 0,10 \text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$  в культуре клеток BT,  $4,54 \pm 0,10 \text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$  в культуре клеток RBT,  $4,33 \pm 0,33 \text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$  в культуре клеток FBT. При более низких дозах заражения (0,01 и 0,001  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ ) инфекционная активность вируса уменьшалась и составила  $3,16 \pm 0,16$ – $4,16 \pm 0,16 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , а время проявления ЦПД увеличивалось от 6 до 10 сут.

Таким образом, оптимальная доза заражения культур клеток вирусом равна 0,1  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ . Заражение культур клеток малой концентрацией вируса (0,001 и 0,01  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ ) замедляет процесс репродукции вируса и снижает его цитопатическую активность.

На следующем этапе работы изучали влияние времени культивирования на репродукцию вируса РСИ

КРС, используя для этого суточные культуры клеток BT, FBT и RBT. Вирус культивировали в течение 1–6 сут. Интенсивность размножения вируса учитывали по ЦПД на клетки, его активность определяли методом титрования в культуре клеток BT.

Установлено, что наиболее высокий выход вируса в культурах клеток BT, FBT и RBT происходит при его репродукции в течение 4–6 сут, о чем свидетельствуют данные, представленные в таблице 5. При этом максимальный уровень накопления вируса составил от  $3,33 \pm 0,23$  до  $4,75 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . При культивировании вируса в течение 1–3 сут титр вируса был в диапазоне от  $2,00 \pm 0,16$  до  $2,70 \pm 0,10 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

Для получения опытных образцов культурального вируса РСИ КРС было проведено три последовательных пассажа по оптимизированной схеме культивирования: клеточная система – BT, FBT или RBT, возраст культуры – 1 сут.; посевная концентрация – 100 тыс. кл./ $\text{см}^3$  для BT, 200–300 тыс. кл./ $\text{см}^3$  для FBT и RBT; множественность заражения – 0,1  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ ; время сбора вирусного материала – 6 сут.

На 1-м пассаже ЦПД вируса в культуре BT проявлялось в виде округления клеток к 3–4-м сут культивирования, слияние клеточных мембран с образованием симпластов происходило к 4–6-м сут, возникновение конгломератов и синцитиев – к 6–7-м сут. В культурах клеток FBT и RBT к 6-м сут отмечалось разрыхление монослоя и частичное отслоение клеток в суспензию. При этом титр инфекционной активности составил  $3,78 \pm 0,33$ ;  $3,33 \pm 0,13$  и  $3,63 \pm 0,33 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  для культур клеток BT, FBT и RBT соответственно. На 2-м пассаже картина ЦПД вируса практически не изменилась. Однако к 3-му пассажу происходило образование конгломератов и синцитиев к 4–6-м сут во всех исследуемых клеточных системах. Результаты представлены в таблице 6.

Таким образом, представленные культуры клеток являются чувствительными биологическими

**Таблица 5**  
Влияние времени культивирования на репродукцию вируса РСИ КРС ( $n = 3$ )

Время культивирования, сут	Возраст культуры, сут	Титр вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$		
		BT	FBT	RBT
1	1	$2,23 \pm 0,10$	$2,00 \pm 0,16$	$2,16 \pm 0,16$
2		$2,54 \pm 0,08$	$2,23 \pm 0,10$	$2,22 \pm 0,11$
3		$2,70 \pm 0,10$	$2,33 \pm 0,33$	$2,54 \pm 0,24$
4		$3,78 \pm 0,33$	$3,33 \pm 0,23$	$3,33 \pm 0,33$
5		$4,25 \pm 0,44$	$3,62 \pm 0,13$	$3,78 \pm 0,13$
6		$4,75 \pm 0,25$	$4,54 \pm 0,24$	$4,25 \pm 0,25$

**Таблица 6**  
Инфекционная активность вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» на различных пассажах ( $n = 3$ )

Номер пассажа	Культура клеток	Время проявления ЦПД, сут	Инфекционная активность, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$
1	BT	4	$3,78 \pm 0,33$
	FBT	5	$3,33 \pm 0,13$
	RBT	5	$3,63 \pm 0,33$
2	BT	4	$4,0 \pm 0,25$
	FBT	5	$3,63 \pm 0,12$
	RBT	5	$3,75 \pm 0,25$
3	BT	4	$4,75 \pm 0,06$
	FBT	6	$4,67 \pm 0,17$
	RBT	6	$4,65 \pm 0,25$

системами для вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908», титр вируса в культуре клеток BT был на уровне  $3,78 \pm 0,33 - 4,75 \pm 0,06 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ , в культуре клеток RBT –  $3,63 \pm 0,33 - 4,65 \pm 0,25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$  и в культуре клеток FBT –  $3,33 \pm 0,13 - 4,67 \pm 0,17 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ .

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении культуральных свойств вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» установлено, что чувствительными биологическими системами для его репродукции являются культуры клеток BT, RBT и FBT гомологичного происхождения. Культуры клеток МА-104, ПБ и FBN оказались непригодными для репродукции вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908». Вирус в культуре клеток BT накапливался в пределах  $4,33 \pm 0,16 - 4,66 \pm 0,12 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ , в культуре клеток RBT –  $4,33 \pm 0,33 - 4,7 \pm 0,36 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$  и культуре клеток FBT –  $4,13 \pm 0,20 - 4,78 \pm 0,17 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ . Оптимальными условиями культивирования вируса РСИ КРС штамма «АБ 1908» в изучаемых клеточных линиях являлось: посевная концентрация  $100 \text{ тыс.}/\text{cm}^3$  – для BT,  $200-300 \text{ тыс.}/\text{cm}^3$  – для FBT и RBT; время выращивания культур клеток – 1–2 сут, множественность заражения –  $0,1 \text{ TCID}_{50}/\text{кл}$ , время сбора вирусного материала – 6–7-е сут культивирования.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Журавлева Е. А. Нозоареал респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота // Ветеринария. – 2018. – № 12. – С. 3–8; DOI: 10.30896/0042-4846.2018.21.12.03-08.
- Пат. 2488631 Российская Федерация, МПК<sup>7</sup> А61К39/12. Линия клеток почки теленка *Bos taurus* RBT (Rene Bos Taurus) для репродукции вирусных животных / Б. Л. Манин, Н. В. Коропова, Е. Г. Кузнецова [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – № 2012126700/10; заявл. 26.06.2012; опубл. 27.07.2013.
- Сергеев В. А. Репродукция и выращивание вирусов животных. – М.: Колос, 1976. – 303 с.
- Строганова И. Я. Особенности эпизоотической ситуации по вирусным респираторным болезням крупного рогатого скота в Восточной Сибири // Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 1. – С. 125–128.
- Строганова И. Я., Войтова К. В. Методы обнаружения и идентификации респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота в культуре клеток // Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 3. – С. 128–133.
- Pathogens, patterns of pneumonia, and epidemiologic risk factors associated with respiratory disease in recently weaned cattle in Ireland / G. M. Murray, S. J. More, D. Sammin [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 2017. – Vol. 29 (1). – P. 20–34; DOI: 10.1177/1040638716674757.
- Valarcher J.-F., Taylor G. Bovine respiratory syncytial virus infection // Vet. Res. – 2007. – Vol. 38 (2). – P. 153–180; DOI: 10.1051/vetres:2006053.

### REFERENCES

- Zhuravleva Ye. A. Nosoarea of bovine respiratory syncytial infection [Nozoareal respiratorno-sincitjal'noj infekcii krupnogo rogatogo skota]. *Veterinariya*. 2018; 12: 3–8; DOI: 10.30896/0042-4846.2018.21.12.03-08 (in Russian).
- Pat. 2488631 Russian Federation, MPK<sup>7</sup> A61K39/12. *Bos taurus* calf kidney cells RBT (Rene Bos Taurus) for animal virus reproduction [Linija kletok pochki telenka *Bos taurus* RBT (Rene Bos Taurus) dlya reprodukcii virusov zhivotnyh]. B. L. Manin, N. V. Koropova, Ye. G. Kuznetsova [et al.]; FGBI "ARRIAH". No. 2012126700/10; appl. on 26.06.2012; publ. on 27.07.2013 (in Russian).
- Sergeyev V. A. Reproduction and cultivation of animal viruses [Reprodukcija i vyrashchivanie virusov zhivotnyh]. M.: Kolos, 1976 (in Russian).
- Stroganova I. Ya. Epizootic situation peculiarities on the cattle virus respiratory diseases in the Eastern Siberia [Osobennosti epizooticheskoj situacii po virusnym respiratornym boleznjam krupnogo rogatogo skota v vostochnoj Sibiri]. *Bulletin of KrasGAU*. 2011; 1: 125–128 (in Russian).
- Stroganova I. Ya., Voitova K. V. The techniques for revealing and identification of the respiratory and syncytial virus of cattle in cell culture [Metody obnaruzheniya i identifikacii respiratorno-sincitjal'nogo virusa krupnogo rogatogo skota v kul'ture kletok]. *Bulletin of KrasGAU*. 2011; 3: 128–133 (in Russian).
- Pathogens, patterns of pneumonia, and epidemiologic risk factors associated with respiratory disease in recently weaned cattle in Ireland. G. M. Murray, S. J. More, D. Sammin [et al.]. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2017; 29 (1): 20–34; DOI: 10.1177/1040638716674757.
- Valarcher J.-F., Taylor G. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* 2007; 38 (2): 153–180; DOI: 10.1051/vetres:2006053.

Поступила 22.08.19  
Принята в печать 09.12.19