



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-4-352-359>
УДК 619:578.826.2:636.7:57.082.26



Выделение аденовируса собак 2-го серотипа и определение параметров культивирования

А. А. Климова

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), мкр. Юревец, г. Владимир, 600901, Россия

РЕЗЮМЕ

Аденовирусная инфекция собак, вызванная аденовирусом 2-го серотипа, является преимущественно респираторным заболеванием, которое классически проявляется поражением органов дыхательной системы. Заболеваемость собак инфекционным ларинготрахеитом наиболее часто регистрируется в центральной части Российской Федерации и имеет тенденцию к росту. В связи с этим сохраняется актуальность профилактической иммунизации против данного заболевания. В первую очередь для формирования длительного и напряженного иммунитета у животных при изготовлении вакцины необходимо использовать штаммы вируса, распространенные на конкретной территории и актуальные на данный отрезок времени. Целью данного исследования являлось выделение возбудителя аденовируса собак 2-го типа из биологического материала от животных с признаками аденовирусной инфекции, обладающего устойчивостью на протяжении пяти и более пассажей, а также определение параметров его культивирования. В результате эксперимента было выделено пять изолятов вируса, один из которых обладал оптимальными свойствами для использования при производстве вакцинных препаратов. При проведении сравнительного анализа чувствительности к выделенному вирусу перевиваемых культур клеток Vero, MDCK линий NBL-2 и NBL-9, а также первично трипсинизированных культур клеток (почка щенка, селезенка щенка, почка котенка, селезенка котенка) было установлено, что наиболее чувствительной является клеточная культура MDCK линии NBL-2. Следующим этапом было определение параметров культивирования вируса в данной культуре клеток. В результате установлены оптимальные условия, при которых происходит накопление вируса в максимальных титрах: возраст монослоя культуры клеток для заражения – 48 ч, множественность заражения – 0,01 ТЦД₅₀/кл, время предварительного контакта – 60 мин, температура – (37,0 ± 0,5) °C, срок культивирования – 120 ч.

Ключевые слова: аденовирус собак 2-го серотипа, выделение изолята, аденовирусная инфекция, инфекционная активность вируса, параметры культивирования

Благодарности: Автор выражает благодарность Т. С. Галкиной, канд. вет. наук, заведующему лабораторией профилактики болезней мелких домашних животных, за научную консультацию и редактуру, а также сотрудникам сектора культуры клеток научно-производственной службы ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Для цитирования: Климова А. А. Выделение аденовируса собак 2-го серотипа и определение параметров культивирования. *Ветеринария сегодня*. 2024; 13 (4): 352–359. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-4-352-359>

Конфликт интересов: Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Климова Анастасия Антоновна, ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных ФГБУ «ВНИИЗЖ», мкр. Юревец, г. Владимир, 600901, Россия, klimova_aa@arriah.ru

Canine adenovirus serotype 2 isolation and determination of its cultivation parameters

Anastasia A. Klimova

Federal Centre for Animal Health, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia

ABSTRACT

Adenovirus infection in dogs caused by canine adenovirus serotype 2 predominantly results in respiratory disease typically manifested by respiratory tract lesions. Infectious laryngotracheitis is the most often recorded in dogs in the central part of the Russian Federation and its incidence tends to increase. Therefore, preventive immunization against this disease remains important. Primarily, the virus strains currently important and circulating in the particular territory shall be used for vaccine production to induce long-term and strong immunity in animals. The study was aimed at isolation of canine adenovirus type 2 remaining stable during five or more passages from the biological samples collected from animals with adenovirus infection signs as well as at determination of its cultivation parameters. As a result, five virus isolates were recovered, one of the recovered virus isolates had optimal properties for its use for vaccine production. Comparative analysis of continuous Vero, MDCK (NBL-2 and NBL-9 line) cell cultures as well as primarily trypsinized cell cultures (baby dog kidney, baby dog spleen, baby cat kidney, baby cat spleen) for their susceptibility to the recovered virus showed that MDCK (NBL-2 line) was the most susceptible. The virus cultivation parameters in this cell culture was determined at the next step. The following optimal conditions under which the virus accumulated to the maximum titres were determined: cell culture monolayer age for inoculation – 48 hours, multiplicity of infection – 0.01 TCID₅₀/cell, preliminary holding time – 60 min, temperature – (37.0 ± 0.5) °C, cultivation period – 120 hours.

Keywords: canine adenovirus serotype 2, recovery of isolate, adenovirus infection, virus infectivity, cultivation parameters

Acknowledgements: The author expresses her gratitude to T. S. Galkina, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of the Laboratory for Pet Disease Prevention for scientific advice and paper editing as well as to staff-members of the Cell Culture Sector of the Scientific and Production Service of the Federal Centre for Animal Health.

For citation: Klimova A. A. Canine adenovirus serotype 2 isolation and determination of its cultivation parameters. *Veterinary Science Today*. 2024; 13 (4): 352–359. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-4-352-359>

Conflict of interests: The author declares no conflict of interests.

For correspondence: Anastasia A. Klimova, Veterinarian, Laboratory for Pets Disease Prevention, Federal Centre for Animal Health, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia, klimova_aa@arriah.ru

ВВЕДЕНИЕ

Аденовирусная инфекция собак (инфекционный ларинготрахеит), вызванная аденовирусом 2-го серотипа (CAV-2), является преимущественно респираторным заболеванием, классическим проявлением которого является поражение органов дыхательной системы [1, 2, 3]. Возбудитель инфекции широко распространен в центральной части Российской Федерации из-за плотной популяции собак и регулярного проведения мероприятий, для которых характерно скученное содержание животных. Несмотря на регулярную профилактическую вакцинацию животных, заболеваемость инфекционным ларинготрахеитом имеет тенденцию к росту.

Аденовирус собак 2-го серотипа относится к сфере *Varidnaviria*, царству *Bamfordvirae*, типу *Preplasmiviricota*, классу *Tectiliviricetes*, отряду *Rowavirales*, семейству *Adenoviridae*, роду *Mastadenovirus*, виду *Mastadenovirus canidae*. Внесен в реестр Международного комитета по систематике вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) в 1976 г. [4]. Был впервые выделен в Канаде в 1961 г. [5].

В настоящий момент известно два серотипа возбудителя аденовирусной инфекции собак: 1-й серотип (*Canine adenovirus 1*, CAV-1) характеризуется генерализованным влиянием на организм животного, поражает большинство основных органов и вызывает инфекционный гепатит; вирус 2-го серотипа (*Canine adenovirus 2*, CAV-2), как и многие представители рода *Mastadenovirus*, характеризуется локальным действием и вызывает преимущественно поражение органов респираторного тракта, реже – желудочно-кишечного тракта [2, 6, 7, 8, 9].

Аденовирус собак 1-го серотипа (CAV-1) более вирулентен по сравнению с CAV-2. Возбудитель 2-го серотипа является безоболочечным ДНК-вирусом, ослабленным вариантом CAV-1, с которым имеет общность нуклеотидной последовательности около 75% [10]. Ко-инфекция с другими вирусами повышает патогенность аденовирусов [11].

Аденовирус собак 2-го серотипа был зарегистрирован у собак, енотов, лошадей, крупного рогатого скота, кошек и волков. Субклинически присутствует в популяции диких плотоядных [11, 12, 13, 14].

Необходимо отметить, что симптомокомплекс, называемый «инфекционный ларинготрахеит собак» (или «вольерный кашель»), вызывают многие микроорганизмы, к числу которых, помимо аденовируса 2-го серотипа, относятся такие возбудители, как вирус

чумы плотоядных, герпесвирус собак, вирус парагриппа собак, вирус гриппа собак, респираторный коронавирус собак, пневмовирус собак, а также следующие бактерии: *Mycoplasma cynos*, *Bordetella bronchiseptica* и подвид *Streptococcus equi* [3, 15, 16, 17, 18]. Бокавирус и гепацивирус собак в редких случаях вызывают симптомы заболевания респираторного тракта и не рассматриваются при дифференциации [19].

В отношении культивирования CAV-2 представлены различные сведения. Известно, что аденовирусы наилучшим образом размножаются в клетках тех видов животных, которые являются их природными хозяевами [6]. К вирусу наиболее чувствительны культуры клеток почки собаки и не чувствительны другие виды клеточных культур собачьего происхождения. Не чувствительны также к вирусу первичные или перевиваемые культуры клеток других млекопитающих, таких как люди, овцы, обезьяны. В мировой практике как оптимальная система культивирования CAV-2 зарекомендовала себя перевиваемая культура клеток почки собаки Мадина – Дарби (Madin – Darby Canine Kidney, MDCK) [11, 20, 21, 22]. Согласно другим исследованиям, CAV-2 возможно культивировать в том числе в культуре клеток Vero (перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартишки) [7].

Целью данного исследования являлось выделение аденовируса собак 2-го серотипа, обладающего устойчивостью на протяжении пяти и более пассажей, а также определение параметров его культивирования.

Подбор культур клеток для размножения вируса CAV-2 осуществляли на основании имеющихся в наличии клеточных линий путем серийных пассажей из числа основных, используемых для культивирования вирусов собак и рекомендованных для культивирования аденовирусов.

Общепринято для выделения вируса использовать первичную линию клеток естественно восприимчивых животных, которые, как правило, являются более чувствительными для заражения. В связи с этим для проведения первого пассажа была выбрана первично трипсинизированная культура клеток почки щенка. Также данная культура клеток приоритетна для выделения вируса из патологического материала вследствие высокой потенции эмбриональных клеток к росту.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы биоматериала (смазвы из носовой и ротовой полости) были получены от собак с подозрением на аденовирусную инфекцию, которые поступали

в ветеринарные клиники и приюты Владимирской, Вологодской и Нижегородской областей в период с 2019 по 2022 г.

Диагностика. Для подтверждения наличия CAV-2 в материале и проведения дифференциальной диагностики методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовалась коммерческая тест-система «АДЕНОВИР» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

В процессе пассирования вируса CAV-2 для определения наличия антигена вируса применялась иммунохроматографическая тест-система Asan Easy Test CAV2 (Asan Pharmaceutical Co., Ltd., Корея) согласно инструкции производителя.

Культуры клеток. Для исследования были отобраны: перевиваемые культуры клеток MDCK (линии NBL-2 и NBL-9) и Vero, первично трипсинизированные клеточные культуры почки щенка, селезенки щенка, почки котенка, селезенки котенка. Исходная концентрация клеток в клеточной суспензии для MDCK линий NBL-2 и NBL-9 составила 400 тыс/см³, для культур клеток Vero – 200–250 тыс/см³, для первично трипсинизированных культур клеток – 300–400 тыс/см³. Критерием выбора культуры клеток для заражения являлся полностью сформированный монослой без признаков дегенерации клеток. Для данных культур клеток был применен стационарный способ культивирования при температуре (37,0 ± 0,5) °C.

При проведении пассажей использовались пластиковые культуральные флаконы с рабочей площадью поверхности 25 см² (T25).

Питательные среды. Согласно паспортам на культуры клеток были использованы следующие питательные среды: в качестве ростовой среды для культуры клеток MDCK – ПСП (питательная среда полусинтетическая) с добавлением 5% сыворотки крупного рогатого скота, антибиотиков (стрептомицин 100 мг/см³ и пенициллин 100 ЕД/см³) и в качестве поддерживающей среды – ПСП без сыворотки; в качестве ростовой среды для перевиваемой культуры клеток Vero и первично трипсинизированных культур – ПСС (питательная среда синтетическая) с добавлением глутамина (0,584 г/л), 10% сыворотки крупного рогатого скота, антибиотиков (стрептомицин 100 мг/см³ и пенициллин 100 ЕД/см³) и в качестве поддерживающей среды – ПСС с добавлением антибиотиков без сыворотки.

Подготовка материала для внесения в культуру клеток. Вирусосодержащую суспензию отфильтровали при помощи мембранного фильтра Millipore, MCE, 20 мкм (Merck Millipore, США), центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Далее отбирали надосадочную жидкость, добавляли антибиотики (стрептомицин 100 мг/см³ и пенициллин 100 ЕД/см³) и после экспозиции в течение 1 ч при температуре 2–8 °C использовали для заражения культуры клеток.

Выделение вируса производили на первично трипсинизированной культуре клеток почки щенка.

Заражение культуры клеток. Для каждого пассажа аденовируса собак 2-го серотипа использовали три культуральных флакона T25. Перед инокуляцией вируса на клеточный монослой ростовую питательную среду сливали, монослой трехкратно отмывали раствором Хенкса и вводили вирусосодержащую суспензию; множественность заражения составила 0,01 ТЦД₅₀/кл. Культуральные флаконы помещали в термостат с со-

блюдением температурного режима (37,0 ± 0,5) °C на 1 ч. По прошествии 1 ч вносили поддерживающую питательную среду, помещали культуральные флаконы в термостат при температуре (37,0 ± 0,5) °C и просматривали под инвертированным микроскопом каждые 12 ч на наличие характерных морфологических изменений клеток: при поражении монослоя более 80% флаконы подвергали замораживанию при температуре минус (45 ± 5) °C до следующего пассажа.

Также было изучено влияние следующих факторов на уровень титра инфекционной активности вируса:

- время культивирования;
- температура культивирования;
- возраст монослоя культуры клеток;
- множественность заражения;
- время предварительного контакта.

Титрование вируса проводилось по общепринятой методике [23, 24] в трех повторностях для каждого образца. Использовались 96-луночные плоскодонные микропланшеты Costar® (Corning, США). После внесения компонентов реакции планшеты культивировали 5 сут (120 ч) при температуре (37 ± 0,5) °C, концентрации CO₂ 5% и просматривали ежедневно под инвертированным микроскопом. Титр вируса оценивали по количеству лунок с цитопатогенным действием. Расчет титра проводили по методу Кербера и выражали в lg ТЦД₅₀/см³.

Анализ результатов. Результаты, полученные в ходе исследований, обрабатывали в программе для работы с электронными таблицами Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Патологический материал, отобранный для выделения вируса, предварительно был исследован методом ПЦР для выявления наличия вирусного генома CAV-2. Пробы, положительные в ПЦР, были использованы в дальнейшей работе. Для выделения аденовируса собак 2-го серотипа была использована первично трипсинизированная культура клеток почки щенка. Данные о титрах инфекционной активности после первого пассажа представлены в таблице 1.

Установлено, что все изоляты, наличие генома CAV-2 в которых было подтверждено методом ПЦР, обладали инфекционной активностью в различной степени и их использование в работе было целесообразным.

С целью оценки репродуктивной способности и стабильности вируса были проведены пять последовательных пассажей в первично трипсинизированной

Таблица 1
Инфекционная активность CAV-2 в первично трипсинизированной культуре клеток почки щенка при вирусывыделении на уровне первого пассажа

Table 1
CAV-2 infectivity in primary trypsinized baby dog kidney cell culture when the virus was isolated at the first passage

Номер изолята	Титр инфекционной активности, lg ТЦД ₅₀ /см ³
1	1,83 ± 0,14
2	1,67 ± 0,29
3	1,92 ± 0,38
4	2,42 ± 0,29
5	3,33 ± 0,29

культуре клеток почки щенка. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Исходя из полученных данных, для дальнейшего культивирования был отобран вирусосодержащий материал изолята № 5 (в дальнейшем получивший название «Юнити»), так как он обладал стабильностью в течение пяти пассажей, характерное цитопатическое действие (ЦПД) вируса проявлялось на уровне каждого пассажа; титр инфекционной активности находился в пределах от $(3,33 \pm 0,29)$ до $(4,33 \pm 0,29)$ $\text{lg TCID}_{50}/\text{см}^3$. Вирусосодержащие материалы изолятов № 1, 2, 3, 4, титр которых был ниже $3,0 \text{ lg TCID}_{50}/\text{см}^3$, в дальнейшем исследовании не использовали. На следующих этапах при изучении культуральных свойств вируса был использован материал изолята № 5 третьего пассажа с максимальным для данного изолята титром.

На уровне первого пассажа проявление ЦПД аденовируса собак 2-го серотипа отмечали через 24 ч после внесения вирусосодержащей суспензии в культуру клеток. Поражение монослоя на площади 80% наблюдали через 72 ч. На уровне второго и дальнейших пассажей морфологические изменения клеток отмечали через 24–48 ч, поражение монослоя на площади 80% регистрировали через 72–120 ч.

Для изучения чувствительности различных культур клеток к CAV-2 было проведено пять последовательных пассажей. В чувствительных культурах клеток ЦПД вируса проявлялось однотипно и наблюдалось с первого пассажа. Титр инфекционной активности CAV-2 определяли путем микротитрования в культуре клеток MDCK. При отсутствии цитопатического действия наличие антигена в культуральной жидкости устанавливали при помощи иммунохроматографической тест-системы. При получении отрицательного результата на протяжении двух пассажей дальнейшие исследования на культуре клеток не проводились. Титр инфекционной активности вируса в отобранных культурах клеток представлен в таблицах 2 (для культуры клеток почки щенка) и 3 (для других клеточных культур).

Установили, что в перевиваемой культуре клеток Vero, первично трипсинизированных клеточных культурах почки котенка и селезенки котенка аденовирус собак 2-го серотипа не накапливается, видимых морфологических изменений клеток выявлено не было;

Таблица 2
Последовательное культивирование CAV-2 в первично трипсинизированной культуре клеток почки щенка

Table 2
Serial CAV-2 cultivation in primary trypsinized baby dog kidney cell culture

Номер пассажа вируса	Титр инфекционной активности, $\text{lg TCID}_{50}/\text{см}^3$				
	изолят № 1	изолят № 2	изолят № 3	изолят № 4	изолят № 5
1	$1,83 \pm 0,14$	$1,67 \pm 0,29$	$1,92 \pm 0,38$	$2,42 \pm 0,29$	$3,33 \pm 0,29$
2	$0,83 \pm 0,58$	$1,67 \pm 0,29$	$2,25 \pm 0,25$	$2,50 \pm 0,43$	$4,17 \pm 0,14$
3	–	$1,17 \pm 0,14$	$2,50 \pm 0,25$	$2,17 \pm 0,14$	$4,33 \pm 0,29$
4	–	–	$2,58 \pm 0,14$	$1,75 \pm 0,25$	$4,08 \pm 0,14$
5	–	–	$2,33 \pm 0,29$	–	$3,92 \pm 0,14$

«–» – исследование не проводилось (not tested).

Таблица 3
Чувствительность различных перевиваемых и первично трипсинизированных культур клеток к изоляту «Юнити» CAV-2

Table 3
Susceptibility of different continuous and primary trypsinized cell cultures to CAV-2 Yunity isolate

Культура клеток	Титр инфекционной активности, $\text{lg TCID}_{50}/\text{см}^3$				
	1-й пассаж	2-й пассаж	3-й пассаж	4-й пассаж	5-й пассаж
Перевиваемые культуры клеток					
MDCK NBL-2	$4,33 \pm 0,29$	$4,00 \pm 0,25$	$4,08 \pm 0,14$	$4,17 \pm 0,14$	$4,25 \pm 0,25$
MDCK NBL-9	$4,00 \pm 0,25$	$3,92 \pm 0,38$	$3,83 \pm 0,29$	$4,00 \pm 0,00$	$3,83 \pm 0,14$
Vero	$< 1,0^*$	$< 1,0$	–	–	–
Первично трипсинизированные культуры клеток					
СЩ	$2,42 \pm 0,14$	$2,17 \pm 0,29$	$1,50 \pm 0,25$	$1,17 \pm 0,29$	$0,92 \pm 0,14$
ПК	$< 1,0$	$< 1,0$	–	–	–
СК	$< 1,0$	$< 1,0$	–	–	–

* данные микротитрования (microtitration results); «–» – не исследовали (not tested); СЩ – селезенка щенка (baby dog kidney); ПК – почка котенка (baby cat kidney); СК – селезенка котенка (baby cat spleen).

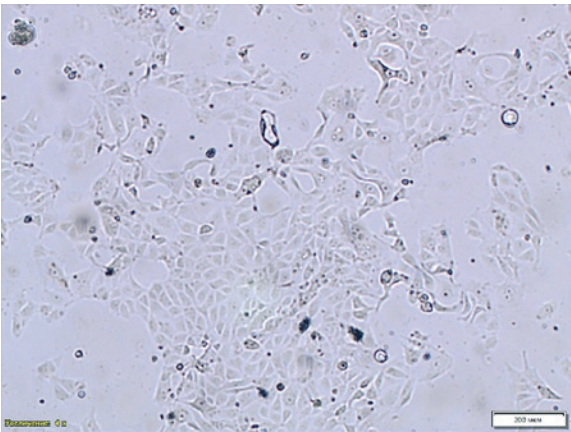


Рис. 1. Формирование монослоя через 24 ч, культура клеток MDCK линии NBL-9 (увеличение 200х)

Fig. 1. Monolayer formation – age: 24 hours, MDCK cell culture NBL-9 line (200× magnification)

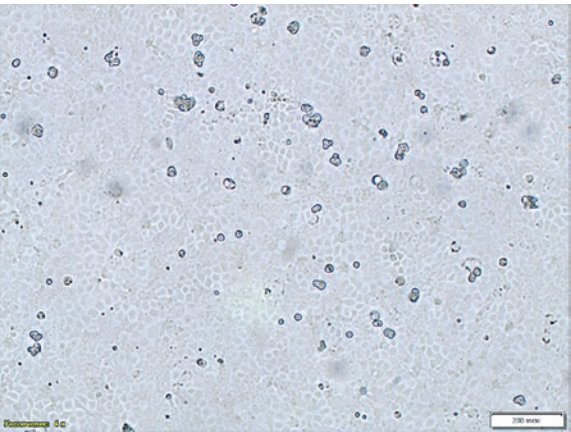


Рис. 2. Формирование монослоя через 24 ч, культура клеток MDCK линии NBL-2 (увеличение 200х)

Fig. 2. Monolayer formation – age: 24 hours, MDCK cell culture NBL-2 line (200× magnification)

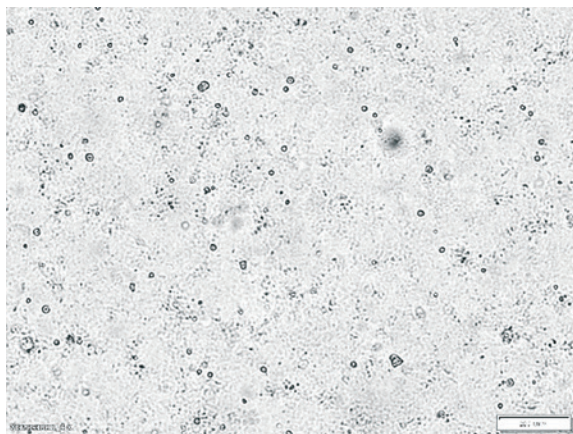


Рис. 3. Интактная перевиваемая культура клеток MDCK линии NBL-2 (увеличение 200х)

Fig. 3. Intact continuous MDCK cell culture NBL-2 line (200x magnification)

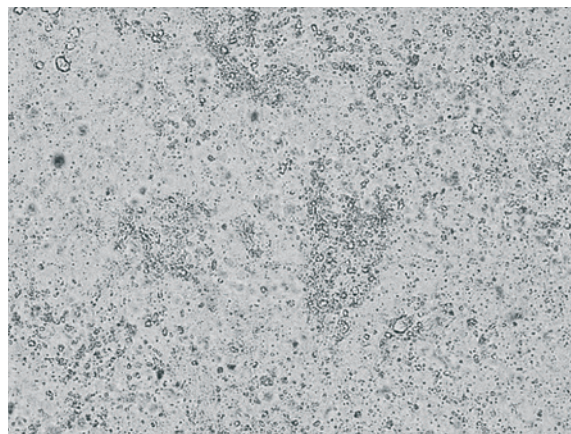


Рис. 4. Проявление ЦПД CAV-2 через 96 ч после инфицирования перевиваемой культуры клеток MDCK линии NBL-2 (увеличение 200х)

Fig. 4. CAV-2 CPE manifestation 96 hours after infection of continuous MDCK cell culture NBL-2 line (200x magnification)

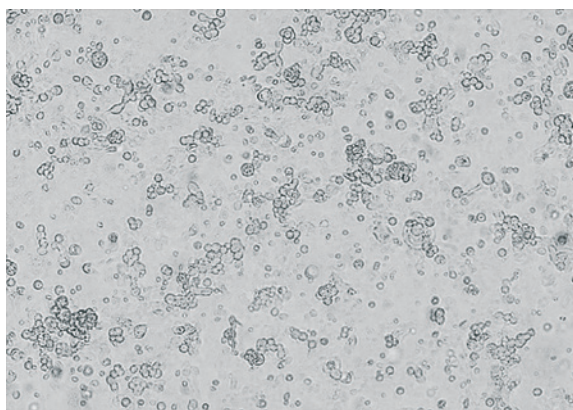


Рис. 5. Проявление ЦПД CAV-2 через 120 ч после инфицирования перевиваемой культуры клеток MDCK линии NBL-2 (увеличение 400х)

Fig. 5. CAV-2 CPE manifestation 120 hours after infection of continuous MDCK cell culture NBL-2 line (400x magnification)

иммунохроматографическая тест-система показала отсутствие антигена возбудителя аденовирусной инфекции собак в культуральной жидкости начиная со второго пассажа. При микротитровании титр вируса не был определен. Культивирование вируса в первично трипсинизированной клеточной культуре селезенки щенка приводило к постепенному снижению инфекционной активности вируса. Учитывая полученные результаты, использование указанных культур клеток для культивирования нецелесообразно.

Инфекционная активность вируса в первично трипсинизированной культуре клеток почки щенка составила $(4,33 \pm 0,29) \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ на уровне третьего пассажа; титр вируса в перевиваемой культуре клеток MDCK был равен $(4,25 \pm 0,25) \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ на уровне пятого пассажа.

В результате исследований, представленных в таблицах 2 и 3, были выявлены следующие наиболее чувствительные культуры клеток: перевиваемая культура клеток MDCK линий NBL-2 (так называемая родительская) [22] и NBL-9, а также первично трипсинизированная клеточная культура почки щенка. Однако использование первично трипсинизированной культуры для последующего культивирования вируса с целью из-

готовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики нерационально, так как она является сезонной из-за использования доноров ткани. Субкультивирование первично трипсинизированных культур невозможно вследствие их низкой технологичности.

При формировании монослоя MDCK линии NBL-9 было отмечено неравномерное размещение клеток на поверхности флакона, что потенциально может отрицательно влиять на накопление вируса и способствовать ошибочной оценке наличия ЦПД при микроскопии (рис. 1). Титр инфекционной активности при культивировании в MDCK линии NBL-2 был незначительно выше. Таким образом, для дальнейшего подбора условий культивирования вируса была отобрана перевиваемая культура клеток MDCK линии NBL-2 (рис. 2).

Интактная культура клеток MDCK линии NBL-2 представлена на рисунке 3. Проявление ЦПД вируса через 96 и 120 ч отражено на рисунках 4 и 5 (увеличение 200х и 400х), где отчетливо просматриваются отдельные округлившиеся рефракtilные клетки, которые постепенно отслаиваются от стекла. В начале процесса морфологические изменения клеток имели очаговый характер, далее наблюдалась деструкция монослоя, приводящая к отделению клеток от поверхности культурального флакона. По мере размножения вируса число клеток, подвергшихся дегенерации, увеличивалось и в монослое образовывались пустоты. По краям сохранившихся участков монослоя концентрировались пораженные клетки, образуя большие конгломераты, напоминающие грозди винограда.

Для проведения дальнейших исследований необходимо было определить время культивирования, за которое накапливался CAV-2 в максимальных титрах. Результаты исследования представлены в таблице 4.

Установлено, что максимальное накопление вируса происходило на 5-е сутки культивирования $(4,08 \pm 0,29 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3)$. При культивировании вируса в течение 48, 72 и 96 ч уровень репродукции вируса был в диапазоне от $(1,25 \pm 0,25)$ до $(3,08 \pm 0,29) \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Титр инфекционной активности снижался до значений $(3,42 \pm 0,14)$ и $(3,08 \pm 0,14) \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ при культивиро-

Таблица 4
Накопление CAV-2 в зависимости от времени культивирования в перевиваемой культуре клеток MDCK линии NBL-2

Table 4
CAV-2 accumulation depending on the time of cultivation in continuous MDCK NBL-2 line cell culture

Время культивирования, ч	Титр инфекционной активности, Ig ТЦД ₅₀ /см ³
48	1,25 ± 0,25
72	2,92 ± 0,38
96	3,08 ± 0,29
120	4,08 ± 0,29
144	3,42 ± 0,14
168	3,08 ± 0,14

вании в течение 144 и 168 ч соответственно. Снижение инфекционной активности вируса, вероятно, связано с замедлением процессов обмена веществ клеток с внешней средой при длительном культивировании.

Также предварительно было исследовано влияние температурного режима (39,0 ± 0,5) °C на жизнеспособность культуры клеток MDCK. При данной температуре были отмечены морфологические изменения в культуре клеток через 12 ч. Через 24 ч монослой отторгался от поверхности. Вследствие этого данный диапазон температур не применяли для культивирования вируса.

Из результатов, представленных в таблице 5, можно сделать вывод, что при температуре (35,0 ± 0,5) °C активность CAV-2 была ниже и максимальный титр вируса составил (2,83 ± 0,29) Ig ТЦД₅₀/см³ после 144 ч культивирования. При температуре культивирования (37,0 ± 0,5) °C в культуре клеток MDCK линии NBL-2 активность вируса была максимальной (4,33 ± 0,14 Ig ТЦД₅₀/см³) через 120 ч культивирования. Далее наблюдалось постепенное снижение титра инфекционной активности CAV-2.

На следующем этапе определяли оптимальный для заражения вирусом возраст клеточного монослоя. Для этого использовали монослой через 24, 48, 72, 96 ч после внесения клеток MDCK в культуральный флакон, а также культуру клеток, внесенную в культуральный флакон непосредственно перед инокуляцией вирусосодержащего материала. Результаты учитывали через 120 ч (5 сут) инкубации в термостате при температуре (37,0 ± 0,5) °C.

Исходя из полученных данных (табл. 6), оптимальным сроком формирования монослоя культуры клеток для заражения является 48 ч, титр вируса составил (4,08 ± 0,38) Ig ТЦД₅₀/см³. При инокуляции CAV-2 в суспензию клеток до формирования монослоя титр вируса был равен (2,42 ± 0,14) Ig ТЦД₅₀/см³. Монослой при этом формировался медленнее, чем у интактной культуры клеток, и в большей степени проявлялась тенденция к формированию кластеров клеток. При культивировании в течение 72 и 96 ч, вероятно, снижались процессы обмена веществ клеток и репродукции вируса. Титр инфекционной активности при этом составил (3,83 ± 0,14) и (3,08 ± 0,29) Ig ТЦД₅₀/см³ соответственно.

С целью изучения влияния множественности заражения на уровень накопления CAV-2 в культуре клеток MDCK линии NBL-2 применяли следующие дозы инфицирования: 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 ТЦД₅₀/кл. Инкубацию

прекращали при разрушении 80% площади монослоя клеток и отделении их от поверхности. Полученные результаты приведены в таблице 7.

При дозе заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл ЦПД наблюдалось уже через 48 ч после внесения суспензии вируса в культуру клеток. Однако титр CAV-2 составил (3,08 ± 0,38) Ig ТЦД₅₀/см³ и был ниже, чем при дозе заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл (4,33 ± 0,29 Ig ТЦД₅₀/см³), что связано с быстрым разрушением монослоя и, как следствие, отсутствием возможности накопления вируса в максимальной концентрации. При множественности заражения 0,001 и 0,0001 ТЦД₅₀/кл титр инфекционной активности вируса был низким и находился на уровне

Таблица 5
Титр инфекционной активности CAV-2 в зависимости от температуры культивирования в перевиваемой культуре клеток MDCK линии NBL-2

Table 5
CAV-2 infectivity titre depending on temperature of cultivation in continuous MDCK NBL-2 line cell culture

Продолжительность культивирования	Титр инфекционной активности, Ig ТЦД ₅₀ /см ³	
	(35,0 ± 0,5) °C	(37,0 ± 0,5) °C
1 сут (24 ч)	0	0
2 сут (48 ч)	0,92 ± 0,14	1,17 ± 0,14
3 сут (72 ч)	2,67 ± 0,14	3,33 ± 0,14
4 сут (96 ч)	2,75 ± 0,25	3,58 ± 0,14
5 сут (120 ч)	2,83 ± 0,14	4,33 ± 0,29
6 сут (144 ч)	2,83 ± 0,29	3,58 ± 0,29
7 сут (168 ч)	1,75 ± 0	2,17 ± 0,14

Таблица 6
Корреляция возраста монослоя культуры клеток MDCK линии NBL-2 с титром инфекционной активности CAV-2

Table 6
Correlation of MDCK NBL-2 line cell culture monolayer age with CAV-2 infectivity titre

Срок формирования монослоя, ч	Титр инфекционной активности, Ig ТЦД ₅₀ /см ³
0	2,42 ± 0,14
24	3,17 ± 0,14
48	4,08 ± 0,38
72	3,83 ± 0,14
96	3,08 ± 0,29

Таблица 7
Титр инфекционной активности CAV-2 в зависимости от заражающей дозы в культуре клеток MDCK линии NBL-2

Table 7
CAV-2 infectivity titre depending on infectious dose in MDCK NBL-2 line cell culture

MOI, ТЦД ₅₀ /кл	Время культивирования, ч	Титр инфекционной активности, Ig ТЦД ₅₀ /см ³
0,1	48	3,08 ± 0,38
0,01	72	4,33 ± 0,29
0,001	96	2,17 ± 0,14
0,0001	96	1,75 ± 0,25

MOI – множественность заражения (multiplicity of infection).

($2,17 \pm 0,14$) и ($1,75 \pm 0,25$) Ig ТЦД₅₀/см³ соответственно; ЦПД в культуре клеток наблюдалось через 96 ч.

Фактор продолжительности предварительного контакта (адсорбции) вируса с монослоем культуры клеток MDCK также представляет интерес в связи с его влиянием на накопление вируса.

Установлено, что при культивировании без адсорбции титр инфекционной активности CAV-2 составил ($2,16 \pm 0,14$) Ig ТЦД₅₀/см³. Предварительный контакт вируса с монослоем улучшает репродукцию CAV-2, что характеризуется повышением его инфекционного титра. Оптимальным для максимального накопления вируса временем был предварительный контакт в течение 60 мин: титр инфекционной активности составил ($4,33 \pm 0,29$) Ig ТЦД₅₀/см³. При времени предварительной адсорбции 30 и 90 мин титр инфекционной активности находился на уровне ($4,08 \pm 0,38$) и ($4,08 \pm 0,14$) Ig ТЦД₅₀/см³ соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы был выделен аденовирус собак 2-го типа, обладающий стабильностью на протяжении пяти пассажей и высоким титром инфекционной активности.

Были изучены параметры культивирования изолята CAV-2 в перевиваемых и первично трипсинизированных культурах клеток. В результате исследований отобрана наиболее чувствительная клеточная культура MDCK линии NBL-2, позволяющая получить вирусосодержащий материал с высоким титром ($4,33 \pm 0,29$ Ig ТЦД₅₀/см³). Установлено, что условиями, способствующими накоплению CAV-2 в максимальных титрах, являются: использование для заражения монослоя культуры клеток, сформированного в течение 48 ч; множественность заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл; время предварительной адсорбции 60 мин; культивирование при температуре ($37,0 \pm 0,5$) °C в течение 120 ч.

Полученные результаты исследований могут быть использованы при разработке диагностических тест-систем, вакцинных препаратов для профилактики аденовирусной инфекции собак, вызванной вирусом 2-го серотипа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савина Н. Н., Екимов А. А., Трухин В. П., Евтушенко А. Э., Жиренкина Е. Н., Синегубова Е. О., Слита А. В. Оценка методов инаktivирования аденовируса птиц при производстве гриппозных вакцин. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2021; (3): 84–89. <https://doi.org/10.47183/mes.2021.032>
2. Chander V., Sharma G. K., Bhatt M., Nandi S., Mahajan S., Singh M., et al. Isolation and genetic characterization of canine adenovirus type 2 from a domestic dog showing neurological symptoms. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021; 52 (4): 2521–2528. <https://doi.org/10.1007%2Fs42770-021-00540-0>
3. Ford R. B., Vaden S. L. Canine infectious tracheobronchitis. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Ed. by C. E. Greene. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1998; 33–38.
4. ICTV. Taxon Details. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxon_id=202302418&taxon_name=Mastadenovirus%20canidae
5. Ditchfield J., Macpherson L. W., Zbitnew A. Association of canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("Kennel Cough"): A preliminary report. *Canadian Veterinary Journal*. 1962; 3 (8): 238–247. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17421510>
6. Баррет Т., Берд П., Клерк Дж., Гулд Э., Халл Р., Инглис С. и др. Вирусология. Методы. Под ред. Б. Мейхи. М.: Мир; 1988. 344 с.
7. Диагностика и профилактика инфекционных болезней собак и кошек: руководство для практикующих ветеринарных врачей. Под ред. Т. И. Алипера. М.: ЗооВетКнига; 2017. 304 с.
8. Macartney L., Cavanagh H. M. A., Spibey N. Isolation of canine adenovirus-2 from the faeces of dogs with enteric disease and its unambiguous

typing by restriction endonuclease mapping. *Research in Veterinary Science*. 1988; 44 (1): 9–14. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(88\)90004-5](https://doi.org/10.1016/0034-5288(88)90004-5)

9. Ramidi A., Ganji V. K., Buddala B., Yella N. R., Manthani G. P., Putty K. E3 gene-based genetic characterization of canine adenovirus-2 isolated from cases of canine gastroenteritis in India revealed a novel group of the virus. *Intervirology*. 2020; 62 (5–6): 216–221. <https://doi.org/10.1159/000507329>

10. Buonavoglia C., Martella V. Canine respiratory viruses. *Veterinary Research*. 2007; 38 (2): 355–373. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006058>

11. Zhu Y., Xu J., Lian S., Zhang R., Hou J., Wang M., Yan X. Difference analysis between canine adenovirus types 1 and 2. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022; 12:854876. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.854876>

12. Day M. J., Carey S., Clercx C., Kohn B., Marsillo F., Thiry E., et al. Aetiology of canine infectious respiratory disease complex and prevalence of its pathogens in Europe. *Journal of Comparative Pathology*. 2020; 176: 86–108. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.02.005>

13. Dowgier G., Lahoreau J., Lanave G., Losurdo M., Varello K., Lucenete M. S., et al. Sequential circulation of canine adenoviruses 1 and 2 in captive wild carnivores, France. *Veterinary Microbiology*. 2018; 221: 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.025>

14. Timurkan M. O., Aydin H., Alkan F. Detection and molecular characterization of canine adenovirus type 2 (CAV-2) in dogs with respiratory tract symptoms in shelters in Turkey. *Veterinarski Arhiv*. 2018; 88 (4): 467–479. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0052>

15. Koptopoulos G., Cornwell H. J. C. Canine adenoviruses: a review. *Veterinary Bulletin*. 1981; 51 (3): 135–142. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/19812282132>

16. Vieson M. D., Piñeyro P., LeRoith T. A review of the pathology and treatment of canine respiratory infections. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2012; 3: 25–39. <https://doi.org/10.2147/vmr.s25021>

17. O'Neill D., Jackson C., Guy J., Church D., McGreevy P., Thomson P., Brodbelt D. Epidemiology of canine upper respiratory disorders in brachycephalic and non-brachycephalic breeds attending veterinary practices in England. *BSAVA Congress Proceedings (9–12 April, 2015)*. Birmingham: British Small Animal Veterinary Association; 2015; 481–482. <https://doi.org/10.22233/9781910443521.65.4>

18. Balboni A., Mollace C., Giunti M., Dondi F., Prosperi S., Battilani M. Investigation of the presence of canine adenovirus (CAV) in owned dogs in Northern Italy. *Research in Veterinary Science*. 2014; 97 (3): 631–636. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.10.010>

19. Priestnall S. L., Mitchell J. A., Walker C. A., Erles K., Brownlie J. New and emerging pathogens in canine infectious respiratory disease. *Veterinary Pathology*. 2014; 51 (2): 492–504. <https://doi.org/10.1177/0300985813511130>

20. Gaush C. R., Hard W. L., Smith T. F. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1966; 122 (3): 931–935. <https://doi.org/10.3181/00379727-122-31293>

21. American Type Culture Collection. <https://www.atcc.org>

22. Valentich J. D. Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting tubule. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1981; 372 (1): 384–405. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1981.tb15490.x>

23. Климова А. А., Комарова А. А., Киселев А. М., Галкина Т. С. Методические рекомендации по титрованию вируса аденовируса собак микрометодом: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 14.06.2022 № 35–22. Владимир; 2022. 11 с.

24. Глинская Е. В., Тучина Е. С., Петров С. В. Вирусология. Методические материалы: учебно-методическое пособие. Саратов; 2013. 84 с.

REFERENCES

1. Savina N. N., Ekimov A. A., Trukhin V. P., Evtushenko A. E., Zhirenkina E. N., Sinigubova E. O., Slita A. V. Evaluation of avian adenovirus inactivation methods used in the production of influenza vaccines. *Extreme Medicine*. 2021; (3): 78–83. <https://doi.org/10.47183/mes.2021.032>
2. Chander V., Sharma G. K., Bhatt M., Nandi S., Mahajan S., Singh M., et al. Isolation and genetic characterization of canine adenovirus type 2 from a domestic dog showing neurological symptoms. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021; 52 (4): 2521–2528. <https://doi.org/10.1007%2Fs42770-021-00540-0>
3. Ford R. B., Vaden S. L. Canine infectious tracheobronchitis. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Ed. by C. E. Greene. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1998; 33–38.
4. ICTV. Taxon Details. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxon_id=202302418&taxon_name=Mastadenovirus%20canidae
5. Ditchfield J., Macpherson L. W., Zbitnew A. Association of canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("Kennel Cough"): A preliminary report. *Canadian Veterinary Journal*. 1962; 3 (8): 238–247. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17421510>

6. Barrett T., Beard P., Clegg J. C. S., Gould E. A., Hull R., Inglis S. C. et al. *Virology: A Practical Approach*. Ed. by B. W. J. Mahy. Oxford, Washington: IRL Press Ltd.; 1985. 264 p.
7. Diagnosis and prevention of infectious dog and cat diseases: guidelines for veterinary practitioners. Ed. by T. I. Aliper. Moscow: ZooVetKniga; 2017. 304 p. (in Russ.)
8. Macartney L., Cavanagh H. M. A., Spibey N. Isolation of canine adenovirus-2 from the faeces of dogs with enteric disease and its unambiguous typing by restriction endonuclease mapping. *Research in Veterinary Science*. 1988; 44 (1): 9–14. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(88\)90004-5](https://doi.org/10.1016/0034-5288(88)90004-5)
9. Ramidi A., Ganji V. K., Buddala B., Yella N. R., Manthani G. P., Putty K. E3 gene-based genetic characterization of canine adenovirus-2 isolated from cases of canine gastroenteritis in India revealed a novel group of the virus. *Intervirology*. 2020; 62 (5–6): 216–221. <https://doi.org/10.1159/000507329>
10. Buonavoglia C., Martella V. Canine respiratory viruses. *Veterinary Research*. 2007; 38 (2): 355–373. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006058>
11. Zhu Y., Xu J., Lian S., Zhang R., Hou J., Wang M., Yan X. Difference analysis between canine adenovirus types 1 and 2. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022; 12:854876. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.854876>
12. Day M. J., Carey S., Clercx C., Kohn B., Marsillo F., Thiry E., et al. Aetiology of canine infectious respiratory disease complex and prevalence of its pathogens in Europe. *Journal of Comparative Pathology*. 2020; 176: 86–108. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.02.005>
13. Dowgier G., Lahoreau J., Lanave G., Losurdo M., Varello K., Lucen-te M. S., et al. Sequential circulation of canine adenoviruses 1 and 2 in captive wild carnivores, France. *Veterinary Microbiology*. 2018; 221: 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.025>
14. Timurkan M. O., Aydin H., Alkan F. Detection and molecular characterization of canine adenovirus type 2 (CAV-2) in dogs with respiratory tract symptoms in shelters in Turkey. *Veterinarski Arhiv*. 2018; 88 (4): 467–479. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0052>
15. Koptopoulos G., Cornwell H. J. C. Canine adenoviruses: a review. *Veterinary Bulletin*. 1981; 51 (3): 135–142. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/19812282132>
16. Vieson M. D., Piñeyro P., LeRoith T. A review of the pathology and treatment of canine respiratory infections. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2012; 3: 25–39. <https://doi.org/10.2147/vmmr.s25021>
17. O'Neill D., Jackson C., Guy J., Church D., McGreevy P., Thomson P., Brodbelt D. Epidemiology of canine upper respiratory disorders in brachycephalic and non-brachycephalic breeds attending veterinary practices in England. *BSAVA Congress Proceedings (9–12 April, 2015)*. Birmingham: British Small Animal Veterinary Association; 2015; 481–482. <https://doi.org/10.22233/9781910443521.65.4>
18. Balboni A., Mollace C., Giunti M., Dondi F., Prosperi S., Battilani M. Investigation of the presence of canine adenovirus (CAV) in owned dogs in Northern Italy. *Research in Veterinary Science*. 2014; 97 (3): 631–636. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.10.010>
19. Priestnall S. L., Mitchell J. A., Walker C. A., Erles K., Brownlie J. New and emerging pathogens in canine infectious respiratory disease. *Veterinary Pathology*. 2014; 51 (2): 492–504. <https://doi.org/10.1177/0300985813511130>
20. Gausch C. R., Hard W. L., Smith T. F. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1966; 122 (3): 931–935. <https://doi.org/10.3181/00379727-122-31293>
21. American Type Culture Collection. <https://www.atcc.org>
22. Valentich J. D. Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting tubule. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1981; 372 (1): 384–405. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1981.tb15490.x>
23. Klimova A. A., Komarova A. A., Kiselev A. M., Galkina T. S. Methodical guidelines for canine adenovirus microtitration approved by the Federal Centre for Animal Health 14.06.2022 No. 35–22. Vladimir; 2022. 11 p. (in Russ.)
24. Glinskaya E. V., Tuchina E. S., Petrov S. V. *Virology. Methodical materials: study guide*. Saratov; 2013. 84 p. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 25.06.2024

Поступила после рецензирования / Revised 14.10.2024

Принята к публикации / Accepted 25.10.2024

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ / INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Климова Анастасия Антоновна, ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия;
<https://orcid.org/0009-0005-0023-7117>, klimova_aa@arriah.ru

Anastasia A. Klimova, Veterinarian, Laboratory for Pets Disease Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia;
<https://orcid.org/0009-0005-0023-7117>, klimova_aa@arriah.ru

Вклад автора: Климова А. А. – развитие ключевой цели и задач; проведение экспериментов, анализ и интерпретация полученных данных; подготовка, создание рисунков и таблиц; создание опубликованной работы; принятие ответственности за все аспекты работы, целостность всех частей статьи и за ее окончательный вариант.

Contribution: Klimova A. A. – evolution of overarching research goals and aims, performing the experiments, obtained data analysis and interpretation; preparation and creation of figures and tables; paper drafting; taking responsibility for all aspects of the work, the integrity of all parts of the article and for its final version.