

# ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 619.578.2

Р.З. Нургазиев, М.Т. Толубаева  
R.Z. Nurgaziyev, M.T. Tolubayeva

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АДЕНОВИРУСОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

### BOVINE ADENOVIRUS CULTIVATION IN A CONTINUOUS CELL CULTURE

**Ключевые слова:** аденовирусная инфекция, крупный рогатый скот, телята, культура клеток, Vero, вирус, ЦПД, изолят, питательная среда, культивирование.

Аденовирусная инфекция телят (англ. – Bovine adenovirae infection) – остропротекающая болезнь, преимущественно телят. Характеризуется поражением органов дыхания, пищеварения и конъюнктивитами. У взрослых животных протекает обычно латентно. Возбудителем аденовирусной инфекции является ДНК-геномный вирус, принадлежащий к семейству Adenoviridae, роду Mastadenovirus. Культура клеток – единственная биологическая система для репродукции аденовирусов крупного рогатого скота (АВ КРС). Проведена серодиагностика по респираторным инфекциям крупного рогатого скота. Приведены результаты иммуноферментного анализа парных сывороток крови на выявление специфических антител к возбудителям аденовирусной инфекции, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции, инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи. Представлены экспериментальные данные чувствительности аденовирусов на перевиваемой культуре клеток Vero. Для культивирования использовали вирусную массу, приготовленную из носовых смывов. Микроскопированием ежедневно исследовали зараженную культуру клеток и контрольную культуру. Дегенеративные изменения в клетках наблюдали на 2-е сут. после заражения. Цитопатическое действие вируса в клеточной культуре характеризовалось появлением округлых клеток и образованием участков, свободных от клеток. Клетки округлялись и собирались в конгломераты. На 7-е сут. образовались «стерильные пятна», а в контрольной культуре клеток изменения не наблюдались. Таким образом, полученные результаты в ходе исследований свидетельствуют о возможности использования перевиваемой культуры клеток Vero. Также с помощью серологических исследований выявлено наличие антител к респираторным вирусам круп-

ного рогатого скота, что подтверждает циркуляцию этих вирусов среди поголовья КРС в животноводческих хозяйствах. Результаты исследований свидетельствуют о циркуляции смешанной инфекции, среди которых преобладают аденовирус и вирус парагриппа-3.

**Key words:** adenoviral infection, cattle, calves, cell culture, Vero, virus, cytopathic effect (CPE), isolate, culture medium, cultivation.

Bovine adenovirus (BAV) infection is an acute disease in calves mostly. The disease affects the respiratory and digestive systems, and causes conjunctivitis. Adult animals usually have a latent form. The causative agent is a DNA genome virus belonging to the Adenoviridae family, the Mastadenovirus genus. Cell culture is the only biological system to reproduce BAV. Serodiagnosis of respiratory infections in cattle was conducted. The results of ELISA paired sera tests to detect specific antibodies to the pathogens of adenovirus infection, parainfluenza-3, respiratory syncytial infection, infectious rhinotracheitis and viral diarrhea are presented. The experimental data of adenovirus sensitivity in the passaged culture of Vero cells are discussed. The virus mass prepared from nasal washings was used for the cultivation. The infected and control cell culture were daily checked with microscope. Degenerative changes in the cells were revealed on the 2nd day after infection. The cytopathic effect of the virus in the cell culture was characterized by the appearance of rounded cells and the formation of the areas free of cells. Plaques formed on the 7th day; there were no changes in the control cell culture. The obtained results prove the possibility of using a continuous culture of Vero cells. The serological tests have revealed the presence of antibodies to the respiratory viruses in cattle; that confirms the circulation of these viruses in the cattle herds on farms. The research results indicate the circulation of mixed infections which are dominated by adenovirus and parainfluenza-3 virus.

**Нургазиев Рысбек Зарылдыкович**, д.в.н., проф., член-корр. НАН КР, ректор, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: rysbekn@mail.ru.

**Толубаева Майрамкул Толубаевна**, соискатель, м.н.с., лаб. вирусологии и биотехнологии, Кыргызский научно-исследовательский ветеринарный институт им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: tolubaeva.m@gmail.com.

**Nurgaziyev Rysbek Zaryldykovich**, Dr. Vet. Sci., Prof., Corresponding Member of Natl. Acad. of Sci. of Kyrgyz Republic, Rector, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: rysbekn@mail.ru.

**Tolubayeva Mayramkul Tolubayevna**, Degree Applicant, Staff Scientist, Kyrgyz Research Institute of Veterinary Medicine named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: tolubaeva.m@gmail.com

### Введение

Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота (аденовирусная пневмония телят, аденовирусный пневмоэнтерит телят) – остро протекающее заболевание молодняка сельскохозяйственных животных с поражением органов дыхания, пищеварения, лимфоидной ткани, конъюнктивитами [1]. Инфицированные телята отстают в росте, плохо наращивают мышечную массу [2].

Вирус относится к семейству Adenoviridae, роду Mastadenovirus. Вирионы вируса представляют собой двадцатигранник кубической симметрии, лишенный суперкапсидной оболочки диаметром 70-90 нм. Каждый вирион состоит из 252 капсомеров, из которых 240 являются гексонами (капсомер в окружении шести капсомеров), 12 – пентонами (капсомер в окружении пяти капсомеров) и длинного отростка с утолщением на вершине. Геном аденовирусов содержит одну линейную молекулу двуспиральной ДНК [3, 4].

Выделение аденовируса у телят проводят в культуре клеток [5]. Для культивирования аденовируса крупного рогатого скота успешно используются различные методы культивирования: как первичные и перевиваемые линии клеток различных животных и человека, так и тканевые культуры. Так, из первичных клеток аденовирусы культивируются на эпителиальных клетках почки теленка, тестикул бычка, овцы, легких эмбрионов коровы, обезьяны, кошки, морской свинки, куриных фибробластах, клетках амниона человека и др., из перевиваемых – на культуре клеток почек теленка – МДБК, ПТ-80, тестикул бычка – ТБ, почки эмбрионов овцы, хомячка, диплоидных клетках фибробластов человека и т.д. Но на культуре клеток злокачественной опухоли человека Hela аденовирусы крупного рогатого скота не размножаются. Это является их отличительным признаком от аденовирусов человека [6].

Длительность культивирования инфицированных клеток 10-12 дн. Размножение аденовирусов в культуре клеток сопровождается медленным развитием ЦПД. В процессе ЦПД аденовирусов в клеточном монослое отмечают округление клеток, повышение их светопреломляемости, образование внутриядерных включений. Затем клетки постепенно

группируются в конгломераты в виде гроздьев винограда. За счет некротизации клеток в монослое образуются «стерильные пятна». ЦПД никогда не приводит к полному разрушению клеток. Окрашивание инфицированного монослоя позволяет выявить в клетках базофильные внутриядерные включения. При отсутствии ЦПД на протяжении 4 дней делают 2-3 слепых пассажа с интервалом 3-4 дн. На третьем пассаже срок наблюдения удлиняют на 10-15 дн. [7].

Увеличение продукции вируса представляет собой большой практический интерес, особенно при массовом производстве вирусных препаратов. Изучению влияния различных факторов на репродукцию вирусов и накопление вирусных антигенов в культуре клеток посвящены многие исследования. Оказалось, что это зависит от ряда условий, оптимизация которых имеет важное технологическое значение. Успех культивирования вирусов прежде всего зависит от удачного выбора клеточного субстрата [8].

**Цель** исследования – провести мониторинг распространения респираторных инфекций, выявить и изучить рост полевых изолятов аденовируса КРС на перевиваемой культуре клеток Vero, время проявления ЦПД и установить титр вируса.

### Материалы и методы

Работа выполнялась в лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева.

Материал для исследований отбирали у телят с клиническими признаками респираторных инфекций. Патологическим материалом служили сыворотка крови и носовые смывы. Собранный материал исследовали с помощью иммуноферментного анализа. Пробы, давшие положительный результат, культивировали на культуре клеток. В качестве системы для культивирования использовали перевиваемую линию культуру клеток Vero – почки зеленой мартышки. Клетки Vero отмывали от сыворотки. Культуру клеток инфицировали вирусом содержащим испытываемым материалом в дозе 200 мкл. Для контакта вируса с клетками вирусосодержащую массу инкубировали в термостате при температуре

37°C. Далее удаляли посевной материал и вносили поддерживающую среду. Зараженную и контрольные культуры инкубировали в термостате при 37°C. Культуры исследовали ежедневно в течение 11 дней.

**Результаты исследований и обсуждение**

С помощью иммуноферментного анализа в патологическом материале были выявлены специфические антитела к возбудителям аденовирусной инфекции, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции, инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи. Исследовали парные сыворотки крови у невакцинированных животных на вышеуказанные инфекции. Результаты исследований показали, что в настоящее время респираторные заболевания крупного рогатого скота имеют широкое распространение. Этиология массовых респираторных болезней телят является многофакторной. Из данных таблицы следует, что респираторные инфекции в некоторых случаях встречаются в ассоциации. Результаты исследований сыворотки крови крупного рогатого скота свидетельствуют о преобладании аденовирусной инфекции и парагриппа-3.

С учетом того, что респираторные болезни среди телят имеют полиэтиологичный характер, при проведении профилактических мероприятий необходимо учесть этот фактор. В нашем случае можно было использовать двухвалентную вакцину, против адено- и парагриппа-3.

Для последующего культивирования вирусосодержащего материала была отобрана проба, давшая положительный результат на аденовирусную инфекцию. Использовали культуру клеток Vero. Перевиваемую культуру клеток Vero выращивали в питательной

среде с добавлением 5% фетальной сыворотки и антибиотика в пластиковых матрасах (75 см<sup>2</sup>). Оценку качества клеток и плотности монослоя определяли микроскопированием.

Суспензию готовили из биоматериала носовых смывов. Культуру исследовали ежедневно. При микроскопировании зараженных культур различные дегенеративные изменения в клетках наблюдали на 2-е сут. после заражения. Цитопатическое действие (ЦПД) вируса в клеточной культуре характеризовалось появлением округлых клеток и образованием участков свободных от клеток.

Уже на вторые сутки наблюдали ЦПД на 30% поверхности посевного материала. Клетки начали округляться и собираться в конгломераты. Образование «стерильных пятен» наблюдали на 7-е сут. и ЦПД 60%.

На 10-е сут. площадь «стерильных пятен» увеличилась, образованные конгломераты были в виде гроздьев винограда.

На 11-е сут. были четко видны конгломераты. Площадь ЦПД составила 80% поверхности культуры. На 11-е сут. зараженную культуру клеток консервировали и в дальнейшем использовали для ПЦР.

Монослой перевиваемых клеток наступал на 5-6-е сут. Перевиваемые линии клеток Vero оказались чувствительными. Цитопатические изменения наблюдались в виде собрания пораженных клеток и конгломератов, напоминающих «гроздь винограда» и последующее отторжение их от стекла. Vero было более чувствительной, вирус размножился характерным изменением клеток. Полевые изоляты с 1 пассажа вызывали характерные для аденовирусов внутриклеточные изменения в культуре клеток. Выделенные изоляты хорошо репродуцировались в клетке Vero, и титр достигал до 4,5 log TCID<sub>50</sub>/мл.

Таблица

*Результаты исследования патологического материала (сыворотка крови) от телят методом иммуноферментного анализа*

№	Идентификационный номер/возраст	Инфекционный ринотрахеит	Вирусная диарея	Вирусная респираторно-синцитиальная инфекция	Парагрипп-3	Аденовирусная инфекция
1	64/8 мес.	-	-	-	-	-
2	62/9 мес.	-	-	+	+	+
3	68/9 мес.	-	-	-	+	+
4	72/5 мес.	-	-	-	-	+
5	70/5 мес.	-	-	-	-	-
6	89/3 мес.	-	-	-	-	+
7	79/4 мес.	-	+	+	+	+
8	1/2 мес.	-	-	-	-	+
9	85/3 мес.	-	-	-	-	+
10	78/3 мес.	-	+	-	+	+
11	87/2 мес.	-	+	+	+	+
12	83/3 мес.	-	-	-	-	+
13	75/4 мес.	-	-	-	-	+
14	7/1 мес.	+	+	+	+	+
	Кол-во полож.	1	4	4	6	12

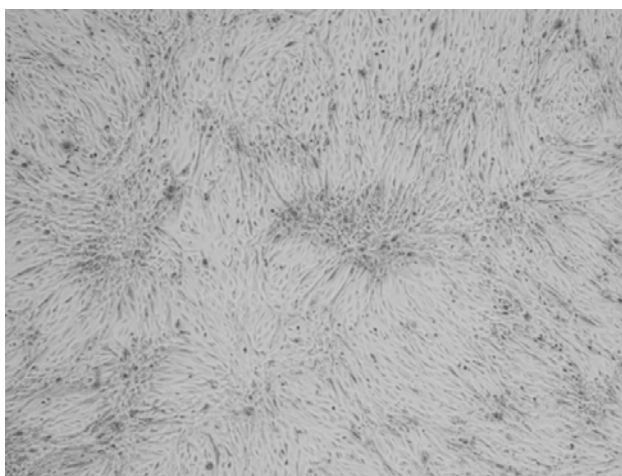


Рис. 1. ЦПД на 2-е сут.

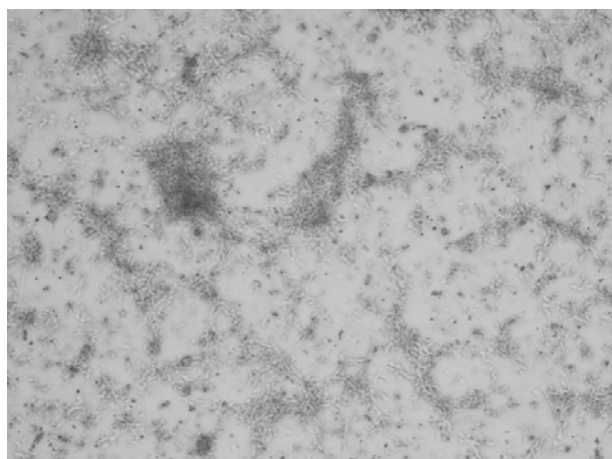


Рис. 4. 11-е сут.

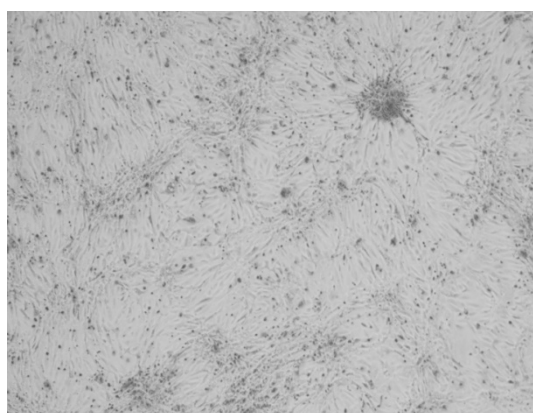


Рис. 2. 7-е сут.

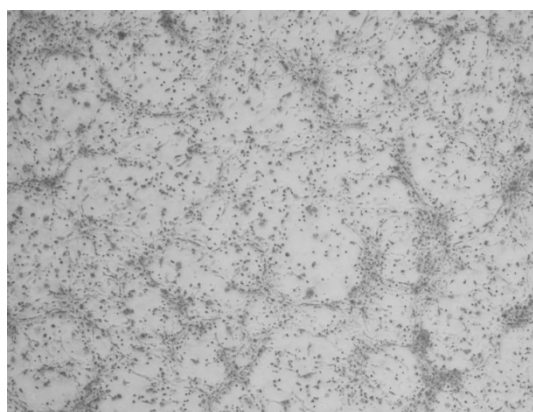


Рис. 3. 10-е сут.

Таким образом, полученные результаты по изучению изменения перевиваемых клеток для выделенных изолятов показали их патогенные свойства в отношении зараженной культуры клеток. Вирус репродуцировался с высоким титром  $4,5 \log_{10}$  ТЦД 50/мл, хорошо накапливался на перевиваемой культуре клеток.

Перевиваемая линия клеток, инфицированная изолятом, в каждом препарате имела клетки с ядрами, заполненными мелкими зелеными гранулами.

Как отмечали ранее, перевиваемая линия клеток Vero оказалась чувствительной. Инфицированные изолятом клетки были на различных стадиях формирования включений: в ядрах мелкие гранулы, в ядрах центроядерное включение, в ядрах несколько крупных включений. Как показали результаты наших исследований, полевые изоляты при пассировании в культуре клеток Vero проявили ЦПД на протяжении нескольких пассажей и обнаружение внутриядерных включений.

Включения, образующиеся при репродукции изолятов, были сходны между собой и не отличались от описаний в литературе. Вначале они были в ядре небольшими и многочисленными группами, а затем увеличивались в размере. В отличие от многих исследователей при репродукции изолятов нами не были выявлены включения других типов аденовирусов.

Таким образом, аденовирусы крупного рогатого скота (выделенные изоляты) не различаются по морфологии включений.

#### Вывод

Результаты исследований с помощью ИФА показали наличие респираторных инфекций, среди которых преобладают аденовирус и вирус парагриппа-3.

Полученные результаты изучения полевых изолятов позволяет нам однозначно делать выводы, что для дальнейшего культивирования и накопления вируса перевиваемая линия клеток Vero является оптимальной. ЦПД проявилось характерным изменением клеток уже на 2-е сут. Титр вируса достигал  $4,5 \log_{10}$  ТЦД 50/мл. В дальнейшем считаем необходимым изучение иммунобиологические свойства выделенных изолятов, таких как гемагглютинирующие терморезистентности, культуральные свойства, для изготовления вакцины против наиболее распространенных респираторных вирусов.



**Библиографический список**

1. Белоусова Р.В., Преображенская Э.А., Третьякова И.В. Ветеринарная вирусология. – КолосС, 2007. – С. 178.
2. Пчельников А.В., Алексеенкова С.В., Диас Хименес К.А., Юров К.П. Некоторые результаты изучения этиологии респираторных болезней телят в хозяйствах Московской области. – Российский ветеринарный журнал 2015. – № 1. – С. 16-18.
3. Нургазиев Р.З. Жаныбарлардын вирустук ыландары. – Бишкек, 2011. – С. 258-260.
4. Zhu Y.M., Yu Z., Cai H., Gao Y.R., Dong X.M., Li Z.L., Shi H.F., Meng Q.F., Lu C., Xue F. Isolation, identification, and complete genome sequence of a bovine adenovirus type 3 from cattle in China // *Virology*. – 2011. – Vol. 8. – P. 557.
5. Дьяконов Л.П., Стегний М.Ю., Поздняков А.А. Животная клетка в культуре. – М., 2009. – С. 526.
6. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьёв Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. – М., 2001.
7. Белявская Л.А. и др. Моделирование смешанной адено-герпетической инфекции клеток MDBK, ее характеристика и особенности антивирусного действия веществ. Молодой ученый. – 2014. – № 17. – С. 117-125.
8. <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/910.html> MedUniver (19.11.2015).

**References**

1. Belousova R.V., Preobrazhenskaya E.A., Tretyakova I.V. Veterinarnaya virusologiya. – KolosS, 2007. – S. 178.
2. Pchel'nikov A.V., Alekseenkova S.V., Dias Khimenes K.A., Yurov K.P. Nekotorye rezultaty izucheniya etiologii respiratornykh boleznei telyat v khozyaistvakh Moskovskoi oblasti // *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal*. – 2015. – № 1. – S. 16-18.
3. Nurgaziev R.Z. Zhanybarlardyn virustuk ylandary. – Bishkek, 2011. – S. 258-260.
4. Zhu Y.M., Yu Z., Cai H., Gao Y.R., Dong X.M., Li Z.L., Shi H.F., Meng Q.F., Lu C., Xue F. Isolation, identification, and complete genome sequence of a bovine adenovirus type 3 from cattle in China // *Virology*. – 2011. – Vol. 8. – P. 557.
5. D'yakonov L.P., Stegnii M. Yu., Pozdnyakov A.A. Zhivotnaya kletka v kul'ture. – M., 2009. – S. 526.
6. Syurin V.N., Samuilenko A.Ya., Solov'ev B.V., Fomina N.V. Virusnye bolezni zhivotnykh. – M., 2001.
7. Belyavskaya L.A. i dr. Modelirovanie smeshannoi adeno-gerpeticheskoi infektsii kletok MDBK, ee kharakteristika i osobennosti antivirushnogo deistviya veshchestv // *Molodoi uchenyi*. – 2014. – № 17. – S. 117-125.
8. <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/910.html> MedUniver (19.11.2015).



УДК 636.294:637

**В.Г. Луницын, А.А. Неприятель, И.С. Белозерских**  
**V.G. Lunitsyn, A.A. Nepriyatel, I.S. Belozerskikh**

**НОВЫЕ КОМПЛЕКСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ КРОВИ МАРАЛА И БИОСУБСТАНЦИЙ ИЗ ПАНТОВ И ВТОРОСТЕПЕННОЙ ПРОДУКЦИИ ОЛЕНЕВОДСТВА**

**NEW COMPLEX PREPARATIONS BASED ON MARAL BLOOD AND BIOLOGICAL SUBSTANCES FROM VELVET ANTLERS AND SECONDARY PRODUCTS OF DEER BREEDING**

**Ключевые слова:** панты, хвостовые железы, половые органы маралов, сухожилия, ферментация, папаин, пепсин, экстракция, ультразвук, биохимический состав.

Представлены результаты разработки технологии производства комплексных препаратов на основе крови марала и биосубстанций из пантов и второстепенной продукции оленеводства. Проведен анализ биохимического состава полученных образцов. В результате анализа биохимического состава и тонизирующего действия полученных препаратов было установлено, что наивысшим тонизирующим эффектом обладает образец с биосубстанцией из половых органов. Образцы с биосубстанциями из сухожилий, хвостов и эмбрионов практически не влияют на физическую вы-

носливость, но при этом значительно усиливают биосинтетические процессы в мышечной ткани. Это позволяет предположить, что тонизирующее действие указанных средств носит долгосрочный характер и не успевает проявиться за короткий промежуток времени. Препарат с биосубстанцией из пантов не оказал влияния на физическую выносливость и биосинтетические процессы, что свидетельствует о его слабом тонизирующем действии. Высокие биохимические показатели препаратов с биосубстанциями из пантов и второстепенной продукции пантового оленеводства, а также наблюдаемый тонизирующий эффект позволяют рекомендовать их к применению, а их большое разнообразие позволит подобрать подходящий продукт индивидуально для каждого потребителя.