

## **ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СОБАК 2 СЕРОТИПА ИЗ ИЗОЛЯТА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

**Климова А.А., Галкина Т.С.**

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»,  
г. Владимир, Российская Федерация

*Использование актуальных штаммов вируса аденовирусной инфекции собак 2 серотипа позволяет разрабатывать и производить качественные биопрепараты. Определение оптимальных параметров культивирования вируса способствует получению качественного сырья для производства вакцин и диагностикумов. В область исследования входило: выделение изолята вируса аденовирусной инфекции собак 2 серотипа, подбор чувствительной культуры клеток. Также было проведено исследование параметров культивирования: возраст монослоя культуры клеток, влияние множественности заражения, времени предварительного контакта, температуры и срока культивирования вируса. Полученные в данной работе результаты могут быть использованы при производстве средств специфической профилактики и диагностики аденовирусной инфекции собак 2 серотипа. **Ключевые слова:** выделение изолята, вирус аденовирусной инфекции собак 2 серотипа, параметры культивирования.*

## **EXTRACTION OF THE VIRUS OF ADENOVIRUS INFECTION OF DOGS 2 SEROTYPES FROM ISOLATE AND DETERMINATION OF THE PARAMETERS OF ITS CULTIVATION**

**Klimova A.A., Galkina T.S.**

**Federal state-financed institution**

**«Federal center for animal health» (fgbi «arriah») vladimir, russia**

*The use of current strains of the virus of adenovirus infection of dogs 2 serotype allows the development and production of quality biopreparations. The determination of optimal parameters for the cultivation of the virus contributes to the production of quality raw materials for the production of vaccines and diagnostics. The research included: isolate the virus of adenovirus infection of dogs 2 serotype, selection of optimal cell culture. The parameters of virus isolate cultivation were also studied: the age of the cell culture monolayer, the influence of multiple infection, the time of preliminary contact, the temperature and the period of virus cultivation. The results obtained in this paper can be used in the production of means of specific prophylaxis and diagnosis of adenovirus infection of dogs 2*

*serotype. Key words: isolate extraction, virus of adenovirus dog infection 2 serotype, cultivation parameters.*

**Введение.** Аденовирус собак 2 серотипа (вирус инфекционного ларинготрахеита собак, canine adenovirus 2 serotype, canine mastadenovirus 2 serotype, CAV-2) относится к сфере Varidnaviria, царству Bamfordvirae, типу Preplasmiviricota, классу Tectiliviricetes, отряду Rowavirales, семейству Adenoviridae, роду Mastadenovirus, виду Canine mastadenovirus A, серотипу 2. Внесён в реестр Международного комитета по систематике вирусов в 1976 году [1].

На настоящий момент известно два серотипа аденовирусной инфекции собак. Аденовирусная инфекция собак 1 серотипа (Canine adenovirus 1, CAV-1, инфекционный гепатит), характеризующаяся генерализованным влиянием на организм животного и поражающая большинство основных органов и вызывающая, помимо прочих клинических признаков, гепатит. CAV-2 характеризуется локальным действием и вызывает преимущественно поражение органов респираторного тракта, реже желудочно-кишечного тракта [2, 3].

CAV-2 является ослабленным вариантом CAV-1. Коинфекция с другими вирусами повышает патогенность аденовирусов [4]. Заболевание было зарегистрировано у собак, енотов, лошадей, крупного рогатого скота, кошек и волков. Субклинически присутствует в популяции диких плотоядных [5, 6].

Получение актуальных на данный временной промежуток и для конкретной территории изолятов вирусов, использование впоследствии их в производстве вакцин способствует качественной профилактике данной болезни.

**Материалы и методы исследований.** Пробы для выделения отобраны из ротоглотки у собак с подозрением на заболевание CAV-2.

Для подтверждения наличия антигена CAV-2 в материале и проведения дифференциальной диагностики использовалась коммерческая тест-система ПЦР «АДЕНОВИР».

Согласно паспортам на культуры клеток, были использованы следующие питательные среды: ПСП с добавлением 5% сыворотки КРС и антибиотиков (стрептомицин 100 мкг/см<sup>3</sup> и пенициллин 100 ЕД/см<sup>3</sup>) в качестве ростовой среды и ПСП с добавлением антибиотиков в качестве поддерживающей, а также питательная среда ПСС с добавлением глутамина (0,584 г/л), 10% сыворотки КРС, антибиотиков в качестве ростовой среды и ПСС с добавлением антибиотиков в качестве поддерживающей среды.

В настоящей работе были использованы следующие культуры клеток: перевиваемые линии культур клеток MDCK, линия NBL 2 и NBL 9 (почка собаки Майдин-Дерби), Vero (почка африканской зелёной мартышки), первично-трипсинизированные почка щенка (ПЩ), селезёнка щенка (СЩ), почка котёнка (ПК), селезёнка котёнка (СК). В качестве способа культивирования был выбран монослойный (адгезионный).

При проведении пассажей использовались пластиковые культуральные флаконы с рабочей поверхностью площадью  $25 \text{ см}^2$  (Т25), по 3 флакона для каждого пассажа каждой пробы и культуры клеток.

**Результаты исследований.** Первый пассаж был проведён в первично-трипсинизированной культуре клеток почки щенка.

Далее пассажи проводили в первично-трипсинизированной культуре клеток почки щенка в течение 2, 3, 4, 5, 6 и 7 суток при температуре  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , после каждого пассажа материал замораживали при температуре минус  $50 \pm 5^\circ\text{C}$ .

Была определена оптимальная продолжительность культивирования – 120 часов ( $4,08 \pm 0,29 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ).

Уровень титра инфекционной активности был выше в перевиваемой культуре клеток MDCK линии NBL 2 и NBL 9, а также в первично-трипсинизированной культуре клеток почки щенка. В культурах клеток Vero, почки котёнка и селезёнки котенка, а также селезёнки щенка накапливался недостаточно. Субкультивирование первично-трипсинизированных культур невозможно вследствие их низкой технологичности.

При сравнении линий NBL2 и NBL9 были отмечены отличия в культуральных свойствах самих линий: оптимальное по срокам (24-48 часов) формирование монослоя линии NBL2. В росте монослоя линии NBL9 была отмечена тенденция к формированию кластеров. Титр инфекционной активности вируса при культивировании в линии NBL2 был незначительно выше.

С целью изучения влияния множественности заражения на накопление титра инфекционной активности СAV-2 в культуре клеток MDCK, линия NBL2 применяли следующие дозы инфицирования: 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ . Инкубацию прекращали при поражении 80% монослоя.

При дозе заражения 0,1  $\text{ТЦД}_{50}/\text{клетку}$  цитопатическое действие наблюдалось через 12 часов после внесения суспензии вируса в культуру клеток. Однако титр инфекционной активности вируса составил  $3,08 \pm 0,38 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  и был ниже, чем при дозе заражения 0,01  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$  ( $4,33 \pm 0,29 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ), что связано с быстрым разрушением монослоя и дегенерацией клеток. Множественность заражения 0,001  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$  и 0,0001  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$  индуцировала снижение титра инфекционной активности до  $2,17 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  и  $1,75 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  соответственно; цитопатическое действие в культуре клеток наблюдалось через 96 часов.

Следовательно, для проведения дальнейших исследований целесообразно использовать дозу заражения 0,01  $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ .

Оптимальное время предварительного контакта составило 60 мин ( $4,33 \pm 0,29 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ). Время адсорбции 30 и 90 минут провоцировало снижение титра инфекционной активности и уровень его составил  $4,08 \pm 0,38 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  и  $4,08 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  соответственно. При внесении суспензии изолята вируса в культуру клеток без адсорбции титр инфекционной активности составил  $2,16 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

Также в число контролируемых показателей был включен срок формирования монослоя культуры клеток MDCK, линии NBL2. Для этого использовался монослой через 24, 48, 72, 96 часов после внесения клеток MDCK в культуральный флакон, а также суспензия культуры клеток. Исходя из полученных данных, оптимальным сроком формирования монослоя культуры клеток для заражения является 48 часов.

При температуре  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  активность вируса была ниже и максимальный титр инфекционной активности составил  $2,83 \pm 0,29 \text{ lg TЦД}_{50}$  после 144 часов культивирования. При температуре культивирования  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  уровень титра инфекционной активности достиг  $4,33 \pm 0,14 \text{ lg TЦД}_{50}$  после 72 часов культивирования. Рост титра инфекционной активности изолята отмечали до 3 дней (72 часа), далее наблюдалось его постепенное снижение.

**Заключение.** В настоящей работе были подобраны оптимальные параметры для культивирования SAV-2.

Была изучена возможность репродукции SAV-2 в культурах клеток. В результате исследований отобрана культура клеток, позволяющая получить вирусосодержащий материал с высоким титром: MDCK линии NBL2 ( $4,33 \pm 0,29 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$ ). Установлено, что наилучшими условиями для культивирования SAV-2 являются: монослой культуры клеток, сформированный в течение 48 часов, множественность заражения 0,01 TЦД<sub>50</sub>/клетку, время адсорбции 60 мин, температура в термостате  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Оптимальный срок для культивирования SAV-2 составил 120 часов.

Полученные в данной работе результаты исследований могут быть использованы при разработке и производстве диагностических тест-систем, вакцинных препаратов для профилактики SAV-2.

### **Литература.**

1. [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202102418](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202102418) (дата обращения: 31.01.2023 г.).
2. Н.Н. Савина, А.А. Екимов, В.П. Грузин и др. Оценка методов инактивирования аденовируса птиц при производстве гриппозных вакцин. (2021). DOI: 10.47183/mes.2021.032.
3. Алипер Т. И., Непоклонов Е. А., Мухин А. Н. и др. Диагностика и профилактика инфекционных болезней собак и кошек: руководство для практикующих ветеринарных врачей. Под ред. Т. И. Алипера. М.: ЗооВетКнига; 2017. 300 с.
4. Yanzhu Zhu, Jinfeng Xu, Shizhen Lian и др. Difference Analysis Between Canine Adenovirus Types 1 And 2. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 11 March 2022 *Sec. Microbes and Innate Immunity*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.854876>.
5. Дэй М.Дж., Кэри С., Клеркс С., Кон Б., Марсилио Ф., Тири Е., Фрейбургер Л., Шульц Б., Уокер Дж. Этиология комплекса инфекционных респираторных заболеваний собак и распространенность его патогенов в Европе. *J Comp Pathol.* 2020 Apr;176:86-108. doi: 10.1016/j.jcpa.2020.02.005. Epub 2020 17 марта. PMID: 32359641; PMCID: PMC7103302.