

Оптимизация параметров культивирования вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота штамма «Вологда/2019»

В. В. Кирпиченко¹, С. В. Кононова², И. Н. Шумилова³, А. А. Нестеров⁴, М. В. Туркова⁵, Е. А. Бухон⁶,
Д. В. Роменская⁷, А. В. Спрыгин⁸, Б. Л. Манин⁹, О. П. Бьядовская¹⁰

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

¹ ORCID 0000-0002-2494-3826, e-mail: kirpichenko@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-3932-2416, e-mail: kononova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-6132-5771, e-mail: shumilova@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-4288-1964, e-mail: nesterov@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-6598-7593, e-mail: turkova@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-2989-7793, e-mail: buhon@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-2443-1898, e-mail: romenskaya@arriah.ru

⁸ ORCID 0000-0001-5982-3675, e-mail: sprygin@arriah.ru

⁹ ORCID 0000-0002-5263-1491, e-mail: manin@arriah.ru

¹⁰ ORCID 0000-0002-8326-7151, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В настоящее время в изучении респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота есть множество спорных вопросов. В связи с этим актуальным является изучение биологических свойств вируса, оптимизация методов его культивирования и подбор наиболее технологичных приемов конструирования средств диагностики и профилактики данного заболевания. Целью настоящей работы являлись выбор чувствительных клеточных систем и оптимизация параметров культивирования в подобранных культурах клеток. В опытах использовали штамм «Вологда/2019» вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота, выделенный из биологического материала, полученного от теленка с признаками респираторной патологии. Штамм адаптирован к перевиваемой культуре клеток слизистой носовых перегородок крупного рогатого скота (ВТ) и депонирован в Государственную коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Установлено, что перевиваемые линии клеток трахеи эмбриона крупного рогатого скота (FBT) и почки теленка (RBT) являются наиболее чувствительными клеточными системами для репродукции респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота штамма «Вологда/2019», в данных культурах клеток отмечалось максимальное накопление вируса. Цитопатическая активность вируса в культуре клеток FBT на 4–5 сут культивирования составила от $4,78 \pm 0,18$ до $5,50 \pm 0,16$ Ig ТЦД₅₀/см², а в клеточной системе RBT – от $4,00 \pm 0,23$ до $4,75 \pm 0,20$ Ig ТЦД₅₀/см². Определено, что при множественности заражения культур клеток FBT и RBT вирусом в $0,1$ Ig ТЦД₅₀/кл, использовании в составе поддерживающей питательной среды 2% глутамина, а также 2% сыворотки крови лошади либо крупного рогатого скота удается получить вирусный материал с высокой цитопатической активностью.

Ключевые слова: респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота, штамм «Вологда/2019», культивирование, цитопатическая активность, титр вируса.

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Кирпиченко В. В., Кононова С. В., Шумилова И. Н., Нестеров А. А., Туркова М. В., Бухон Е. А., Роменская Д. В., Спрыгин А. В., Манин Б. Л., Бьядовская О. П. Оптимизация параметров культивирования вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота штамма «Вологда/2019». *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 170–178. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-170-178.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Кирпиченко Владимир Владимирович, аспирант, референтная лаборатория болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: kirpichenko@arriah.ru.

UDC 619:578.231.31:636.22/.28:57.082.26

Optimization of cultivation parameters for bovine respiratory syncytial virus strain Vologda/2019

V. V. Kirpichenko¹, S. V. Kononova², I. N. Shumilova³, A. A. Nesterov⁴, M. V. Turkova⁵, Ye. A. Bukhon⁶,
D. V. Romenskaya⁷, A. V. Sprygin⁸, B. L. Manin⁹, O. P. Byadovskaya¹⁰

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ ORCID 0000-0002-2494-3826, e-mail: kirpichenko@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-3932-2416, e-mail: kononova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0001-6132-5771, e-mail: shumilova@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-4288-1964, e-mail: nesterov@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-6598-7593, e-mail: turkova@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0002-2989-7793, e-mail: buhon@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-2443-1898, e-mail: romenskaya@arriah.ru

⁸ ORCID 0000-0001-5982-3675, e-mail: sprygin@arriah.ru

⁹ ORCID 0000-0002-5263-1491, e-mail: manin@arriah.ru

¹⁰ ORCID 0000-0002-8326-7151, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

SUMMARY

There are currently many controversial issues in the study of bovine respiratory syncytial infection. In this regard, it is relevant to study the biological properties of the virus, optimize the methods of its cultivation and select the most technologically advanced methods of designing diagnostic and prevention tools for this disease. The aim of this work was to select sensitive cell systems and to optimize the cultivation parameters in selected cell cultures. The Vologda/2019 strain of the bovine respiratory syncytial infection virus isolated from biological material obtained from a calf with respiratory symptoms was used in the experiment. The strain was adapted to the continuous cell culture derived from bovine turbinate tissue (BT) and deposited in the State collection of microorganism strains at FGBI "ARRIAH". It was established that the continuous cell lines of fetal bovine trachea (FBT) and calf kidney (RBT) are the most sensitive cell systems for the reproduction of the bovine respiratory syncytial virus strain Vologda/2019, the maximum accumulation of the virus was observed in these cell cultures. The cytopathic activity of the virus in the FBT cell culture ranged from 4.78 ± 0.18 to 5.50 ± 0.16 lg TCID₅₀/cm³, and in the RBT cell culture – from 4.00 ± 0.23 to 4.75 ± 0.20 lg TCID₅₀/cm³ at days 4–5 of cultivation. It was determined that in case of multiplicity of inoculation of FBT and RBT cell cultures with the virus at 0.1 lg TCD₅₀/cell and the use of 2% glutamine in the maintenance nutrient medium, as well as 2% horse or cattle blood serum, it is possible to obtain virus material with high cytopathic activity.

Key words: bovine respiratory syncytial virus, Vologda/2019 strain, cultivation, cytopathic activity, virus titer.

Acknowledgements: The experiment was carried out at the expense of the FGBI "ARRIAH" in the framework of the research topic "Animal Welfare".

For citation: Kirpichenko V. V., Kononova S. V., Shumilova I. N., Nesterov A. A., Turkova M. V., Bukhon Ye. A., Romenskaya D. V., Sprygin A. V., Manin B. L., Byadovskaya O. P. Optimization of cultivation parameters for bovine respiratory syncytial virus strain Vologda/2019. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 170–178. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-170-178.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Vladimir V. Kirpichenko, Post-Graduate Student, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: kirpichenko@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение в животноводство промышленных методов, с одной стороны, привело к увеличению продуктивности животных, с другой – способствовало появлению таких серьезных проблем, как возникновение благоприятных условий для массового распространения инфекционных заболеваний. Ведущую позицию среди самых распространенных заболеваний крупного рогатого скота занимают респираторные болезни [1]. Они могут возникать как самостоятельно (парагрипп-3, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, аденовирусы, респираторно-синцитиальная инфекция), так и в различных ассоциациях вирусной и бактериальной этиологии, нанося огромный экономический ущерб животноводству [2–4].

В настоящее время респираторно-синцитиальная инфекция (РСИ) крупного рогатого скота (КРС) зарегистрирована во многих странах мира (Япония, Германия, США, Хорватия, Бельгия), в том числе с 1975 г. и в России [4–6].

Возбудитель РСИ КРС относится к семейству *Pneumoviridae*, роду *Orthopneumovirus*, виду *Bovine orthopneumovirus*. К вирусу восприимчивы КРС всех пород, а также буйволы, туры, яки, бизоны, зебу и т. д. По данным большинства отечественных и зарубежных

авторов, наиболее подвержены заболеванию РСИ КРС телята в возрасте от одного месяца до года. Однако у молодняка до 4-недельного возраста заболевание встречается реже. Возможно, данный факт связан с более ответственным отношением к новорожденным телятам и более тщательным уходом за ними. Имеются данные о возникновении вспышек и среди взрослого КРС, что может быть связано с механическим заносом возбудителя в стадо, где не применялись профилактические меры для предупреждения заноса РСИ КРС. К таким случаям можно отнести закупку инфицированного скота, использование при транспортировке несертифицированных перегонных участков и т. д. Инкубационный период составляет от 2 до 5 сут. Различают три формы течения болезни: субклиническую, острую и сверхострую [7].

Источником инфекции зачастую являются больные или ранее переболевшие животные. Наиболее вероятными способами передачи вируса считается аэрогенный или контактный, через выделение из глаз, носа и слюнистой оболочки трахеи. Ряд авторов показали, что внутриутробная инфекция способствует циркуляции респираторно-синцитиального вируса в стаде. Данных о передаче возбудителя РСИ КРС со спермой нет, эта область пока остается малоизученной [6, 8, 9].

В настоящее время многие вопросы течения инфекции также остаются недостаточно изученными. Известно, что вирус РСИ КРС размножается в клетках органов респираторного тракта, однако имеются данные отечественных авторов об адаптации этого вируса к культурам клеток почек и тестикул КРС [2, 7, 10].

Диагноз на РСИ КРС ставят на основании эпизоотологических и клинических данных, патологоанатомических изменений и лабораторных исследований. Лабораторная диагностика включает обнаружение специфических антител методом иммуноферментного анализа (ИФА) или в реакции нейтрализации, идентификация генома респираторно-синциального вируса в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), выделение вируса из биологического материала от животных культуральными методами [2, 3, 8]. Как правило, материалом для исследования служат сыворотки крови, пробы носовых выделений, трахеальные и бронхиальные экссудаты, кусочки легкого и бронхов [5, 10, 11].

Выделение вируса РСИ КРС в культуре клеток чаще всего затруднено ввиду его лабильности и неустойчивости в условиях внешней среды [7, 8]. Результат выделения вируса в культуре клеток и его дальнейшая идентификация в ПЦР или ИФА во многом зависят от правильного отбора, хранения и транспортировки проб биоматериала от больных животных [10]. Для выделения вируса, согласно данным отечественных и зарубежных авторов, используют первично трипсинизированные культуры клеток эмбриона КРС (ПЭК, ЛЭК и т. д.) [7–9].

При диагностике РСИ КРС наиболее перспективной является ОТ-ПЦР-РВ в сочетании с ретроспективными серологическими методами [9]. Следует отметить, что вирусологические методы являются важным звеном при разработке диагностических систем и средств специфической профилактики заболевания. При производстве качественных тест-систем, наборов, вакцин и специфических сывороток крайне важно получить высокоактивный культуральный вирусный материал [2, 3, 12].

Таким образом, представляется актуальным изучение биологических свойств вируса, оптимизация культивирования и подбор компонентов для создания средств диагностики и профилактики данного заболевания.

Целью настоящей работы являлась оптимизация параметров культивирования вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в подобранных ранее чувствительных клеточных системах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали вирус РСИ КРС штамма «Вологда/2019», выделенный из биологического материала, полученного от теленка с признаками респираторной патологии, и адаптированный к перевиваемой линии культуры клеток слизистой носовых перегородок КРС (ВТ) с титром цитопатической активности $4,0 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В 2019 г. полученный штамм «Вологда/2019» вируса РСИ КРС был депонирован в Государственную коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ».

С целью изучения культуральных свойств вируса РСИ КРС указанного штамма и его адаптации к высоко-технологичным линиям культур клеток использовали

следующие культуральные системы животных клеток: почки теленка (RBT), слизистых носовых перегородок эмбриона КРС (FBN), трахеи эмбриона КРС (FBT), почки макаки-резуса (МА-104), яичников домашней козы (ЯДК-04) [13].

Для культивирования вируса РСИ КРС в перевиваемых клеточных линиях использовали 24-часовой монослой клеток, выращенных в пластиковых матрасах объемом от 25 до 175 см³. Исходная концентрация клеток в клеточной суспензии составляла 100–300 тыс./см³. В культуру клеток инокулировали вирус РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в дозе 0,1 ТЦД₅₀/кл. Время культивирования составляло 6–8 сут (при условии сохранения целостности монослоя).

Чувствительность перевиваемых культур клеток к вирусу РСИ КРС штамма «Вологда/2019» определяли методом последовательных пассажей [12]. С этой целью заражение культуры проводили с предварительной адсорбцией вируса на клетках монослоя без добавления поддерживающей питательной среды.

Инокуляцию вируса проводили после удаления ростовой питательной среды, далее на 1,5 ч оставляли вирус для контакта с клеточным монослоем в СО₂-инкубаторе при температуре 37 °С, а затем добавляли поддерживающую полусинтетическую питательную среду (ПСС) с содержанием в ней по 2% сыворотки крови животных (коровы или лошади) и глутамина. Сбор вирусного сырья проводили при проявлении цитопатического действия (ЦПД) на 70–80% площади клеточного монослоя. Полученный вирус хранили при минус 80 °С. Цитопатическую активность вируса проверяли путем микротитрования вируса [12] в культурах клеток ВТ или FBT. Отличительной особенностью в данном исследовании являлось то, что вирус РСИ КРС штамма «Вологда/2019» инокулировали на уже выращенный 24-часовой клеточный монослой.

Микротитрование вируса РСИ КРС каждого пассажа проводили в стерильных 96-луночных плоскодонных культуральных планшетах в объеме 0,2 см³ на лунку. Для этого предварительно в стерильных пробирках типа Эппендорф готовили разведения вирусосодержащего материала (ВСМ) на среде ПСП (от 10⁻¹ до 10⁻⁸) [12]. Подготовленные разведения вируса, начиная с наивысшего, переносили одноканальным механическим дозатором в лунки культурального планшета с выращенным монослоем культур клеток FBT или ВТ по 0,1 см³ на лунку. Для адсорбции вируса на клетках монослоя планшет помещали в СО₂-инкубатор с содержанием 5% диоксида углерода и температурой 37 °С на 1,5 ч. После контакта вируса и клеточного монослоя добавляли 0,1 см³ питательной среды ПСС с содержанием в ней по 2% сыворотки крови лошади и глутамина. Наблюдение вели с использованием инвертируемого микроскопа Olympus CKX53 (при увеличении от ×40 до ×400) и цветовых фазово-контрастных слайдеров теплого и холодного спектра для увеличения резкости изображения. Учет результатов титрования вируса проводили через 10 сут инкубирования при условии сохранения целостности монослоя клеток в контрольных лунках [12].

Расчет ЦПД проводили по методу Рида и Менча и выражали в Ig ТЦД₅₀/см³ [12].

Определение титра антигена вируса РСИ КРС в инактивированных препаратах проводили с помощью коммерческого набора для выявления антигена

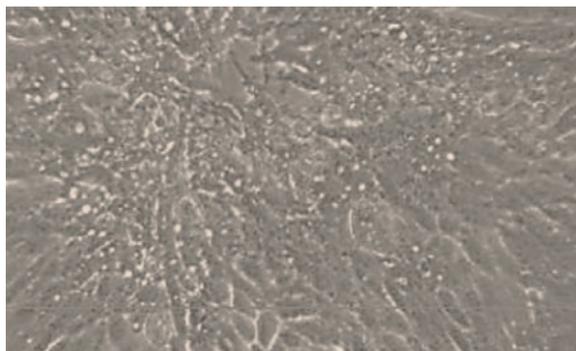


Рис. 1. Культура клеток RBT, инокулированная вирусом РСИ КРС (3-и сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 1. BRSV-inoculated RBT cell culture (day 3, $\times 400$ magnification)

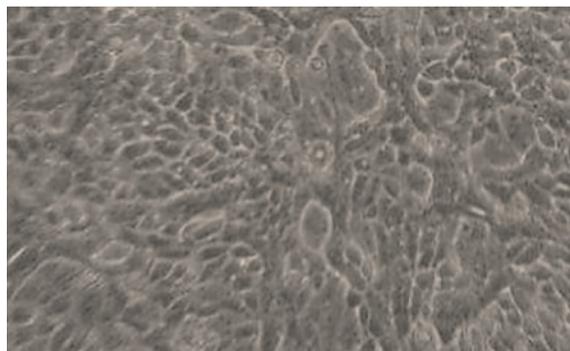


Рис. 2. Культура клеток RBT без инокуляции вируса РСИ КРС (3-и сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 2. Non-BRSV-inoculated RBT cell culture (day 3, $\times 400$ magnification)



Рис. 3. Культура клеток RBT, инокулированная вирусом РСИ КРС (5-е сут, увеличение $\times 200$)

Fig. 3. RBT cell culture inoculated with BRSV (day 5, $\times 200$ magnification)

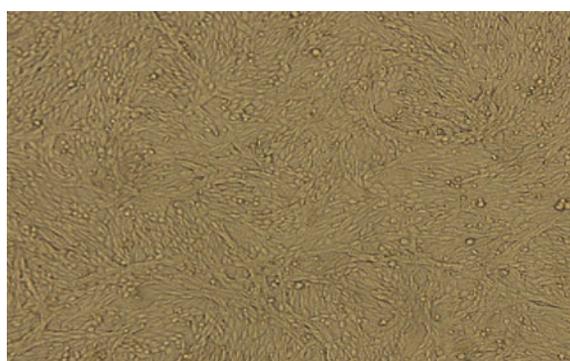


Рис. 4. Культура клеток RBT без инокуляции вируса РСИ КРС (5-е сут, увеличение $\times 200$)

Fig. 4. RBT cell culture not inoculated with BRSV (day 5, $\times 200$ magnification)

РСИ КРС в ИФА (ELISA kit for antigenic diagnosis of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV); Bio-X Diagnostics, Бельгия) согласно инструкции производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения чувствительности различных культур клеток к вирусу РСИ КРС штамма «Вологда/2019» было проведено пять последовательных пассажей в культуральных системах RBT, FBN, FBT, МА-104 и ЯДК-04.

Развитие ЦПД вируса во всех культурах клеток было различным. Через 3-и сут в культуре RBT отмечали локальные поражения отдельных клеток и/или групп клеток (рис. 1, 2).

К 4–5-м сут в культуре клеток RBT формировались локальные очаги ЦПД, вызванные влиянием размножающегося вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019», основной «рисунок» монослоя сглаживался за счет деформации клеток, а в суспензию откреплялось большое количество клеток и их структурных элементов (рис. 3). На рисунке 4 наглядно видна разница между условно чистой и инокулированной культурой, т. е. практически отсутствует отслаивание клеток в суспензию, нет очагов поражения, рисунок монослоя резкий, отчетливо различимы отдельные клетки.

На 7–8-е сут проявление ЦПД вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в культуре клеток RBT достигало 70–80%. Монослой разряжался, клетки разрушались, обра-

зовывались «дыры» (рис. 5). При наблюдении подобной картины вирусосодержащий материал замораживали при минус 80°C и оставляли на хранение. На рисунке 6 представлен контроль без инокуляции вируса.

В культуре клеток FBT к 4-м сут культивирования вируса были видны очаги поражения, состоящие из скопления разрушенных или деформированных клеток (рис. 7). На рисунке 8 представлен контроль без инокуляции вируса.

При проведении дальнейших исследований проявление ЦПД вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» становилось более выраженным. К 3-му пассажу на 7-е сут культивирования в культуре клеток FBT наблюдали 80%-е разрушение монослоя с образованием конгломератов и синцитий (рис. 9). При наблюдении подобной картины ВСМ замораживали при минус 80°C и оставляли на хранение. На рисунке 10 представлен контроль без инокуляции вируса.

В культурах клеток МА-104 и FBN ЦПД вируса не отмечали, определение титра вируса в ИФА позволило подтвердить, что в данных клеточных системах вирус РСИ КРС штамма «Вологда/2019» не репродуцируется (снижение титра в процентном эквиваленте). На уровне 4–5-го пассажей каких-либо изменений в клеточном монослое культур МА-104 и FBN не наблюдали.

В культуре клеток ЯДК-04 ЦПД вируса проявлялось редким округлением клеток и разряжением монослоя.

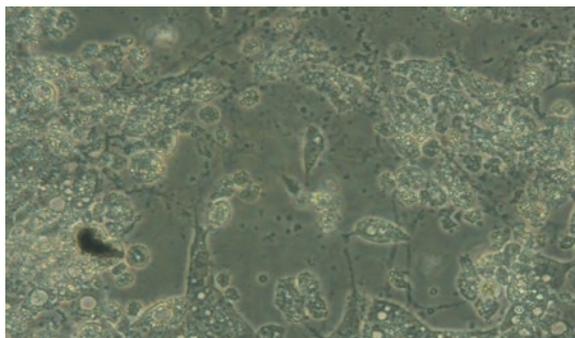


Рис. 5. Культура клеток RBT, инокулированная вирусом РСИ КРС (7-е сут, увеличение $\times 200$)

Fig. 5. BRSV-inoculated RBT cell culture (day 7, $\times 200$ magnification)

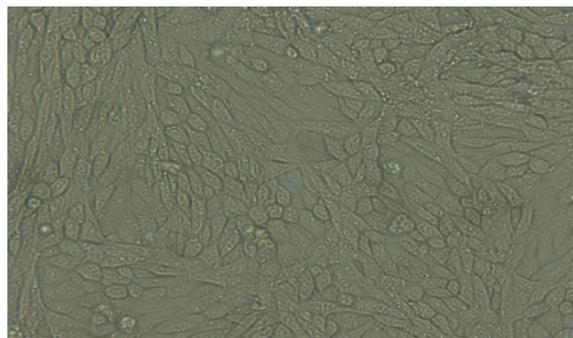


Рис. 6. Культура клеток RBT без инокуляции вируса РСИ КРС (7-е сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 6. Non-BRSV-inoculated RBT cell culture (day 7, $\times 400$ magnification)

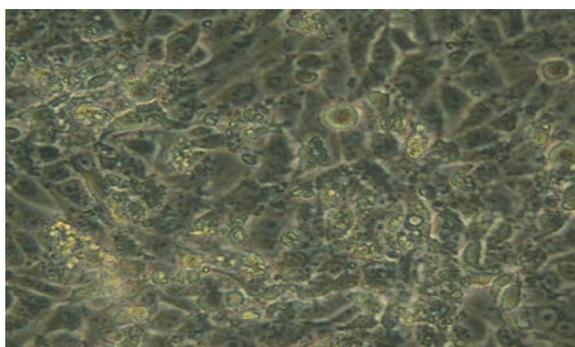


Рис. 7. Культура клеток FBT, инокулированная вирусом РСИ КРС (4-е сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 7. BRSV-inoculated FBT cell culture (day 4, $\times 400$ magnification)

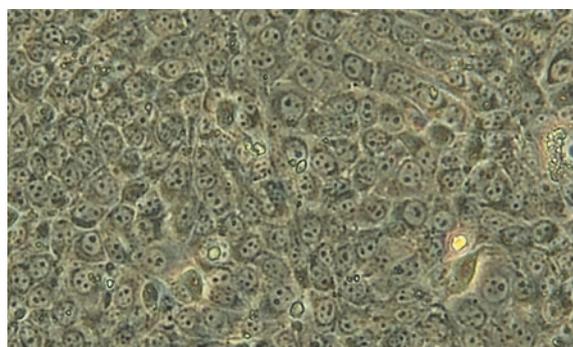


Рис. 8. Культура клеток FBT без инокуляции вируса РСИ КРС (4-е сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 8. Non-BRSV-inoculated FBT cell culture (day 4, $\times 400$ magnification)

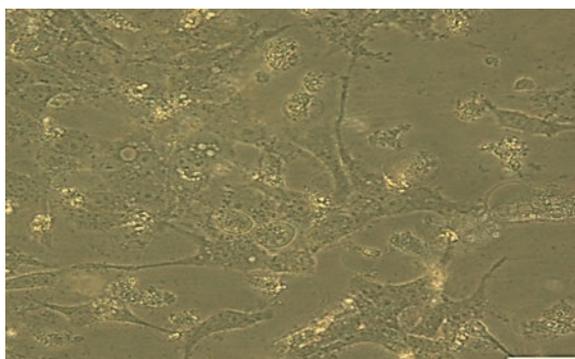


Рис. 9. Культура клеток FBT, инокулированная вирусом РСИ КРС (7-е сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 9. BRSV-inoculated FBT cell culture (day 7, $\times 400$ magnification)

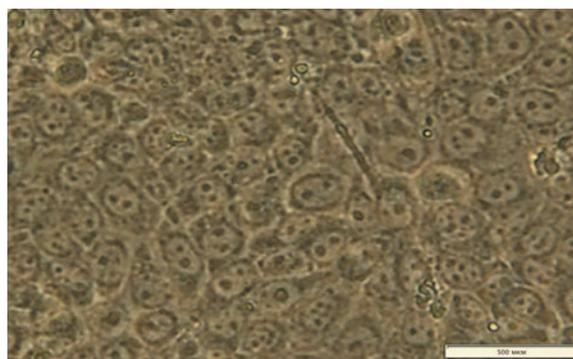


Рис. 10. Культура клеток FBT без инокуляции вируса РСИ КРС (7-е сут, увеличение $\times 400$)

Fig. 10. Non-BRSV-inoculated FBT cell culture (day 7, $\times 400$ magnification)

Методом микротитрования удалось установить, что вирус стабильно размножается в данной клеточной системе, однако прироста вирусной массы, как в культурах клеток RBT и FBT, не происходит. Данный факт свидетельствует о необходимости оптимизации параметров культивирования для достижения лучшего результата.

Определение титра вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в каждом из пассажей проводили методом микротитрования в культуре клеток VT, а подтверж-

дение специфичности полученных препаратов вируса РСИ КРС – методом ИФА (табл. 1).

В ходе исследований было отмечено, что при культивировании вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в культуре клеток FBT характерное ЦПД наблюдали на 4–5-е сут при проведении 3–5 пассажей. Уровень ЦПД вируса к 5-му пассажу постепенно увеличивался до $5,50 \pm 0,16 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В ИФА титр вируса РСИ КРС на 1-м пассаже составил 1:2, а на 5-м пассаже – 1:64. При

культивировании вируса РСИ КРС в культуре клеток RBT наблюдали аналогичную тенденцию: на 4–5-е сут культивирования (5-й пассаж) титр вируса составлял $4,75 \pm 0,20 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а в ИФА увеличился до 1:32.

Инокуляция вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в клеточных системах МА-104 и FBN привела к снижению его активности до $1,50 \pm 0,17 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а на 4–5-м пассаже вирус обнаружен не был. Аналогичное снижение титра вируса было подтверждено и в ИФА.

При культивировании вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в культуре клеток ЯДК-04 отмечали стабильную активность вируса на протяжении всех 5 пассажей ($2,50 \pm 0,17 - 3,33 \pm 0,18 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$). Возможно, при оптимизации параметров культивирования в клеточной системе ЯДК-04 удастся получить более высокую цитопатическую активность вируса. Титр вируса в ИФА для данного вирусного сырья составил 1:2 на 1-м пассаже и 1:4 на последующих, что является стабильным результатом, но недостаточным для наработки качественного вирусосодержащего препарата.

В ходе исследований было установлено, что наиболее приемлемыми клеточными системами для репродукции вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» являются культуры клеток RBT и FBT. Клеточные системы МА-104 и FBN оказались непригодными для наработки вирусной массы и репродукции вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019».

С целью увеличения титра вируса необходимо было подобрать оптимальные дозы для заражения культур клеток. Для этого были отобраны наиболее перспективные клеточные системы RBT и FBT. Для проведения инокуляции вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в подобранные культуры клеток вирусосодержащий материал был разведен до значений от 0,001 до 0,1 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ (рис. 11).

Как видно из рисунка 11, при множественности заражения 0,001 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ цитопатическая активность вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в культурах клеток FBT и RBT составляла 2,50 и 2,75 $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. При множественности инфицирования 0,01 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ цитопатическая активность данного вируса в клеточных системах FBT и RBT составляла 4,00 и 3,25 $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Также при данной дозе заражения отмечали более медленное накопление вируса в культурах клеток RBT и FBT, время культивирования для достижения 80% разрушения монослоя вирусом РСИ КРС составило 9 и 12 сут соответственно. Учитывая устойчивость клеточных систем к старению и отмиранию (18 сут до начала деградации клеток для FBT и 16 сут – для RBT), данный результат можно считать приемлемым. Однако результаты исследования показали, что при увеличении множественности заражения до 0,1 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ 80%-е разрушение монослоя и накопление вируса в культурах клеток RBT и FBT шло быстрее (4-е и 5-е сут соответственно), при этом титр цитопатической активности вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» составил $4,75 \pm 0,16$ и $5,50 \pm 0,80 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Поэтому данная множественностью инфицирования является оптимальной.

С целью оптимизации состава питательной среды ПСС, используемой при инокуляции вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в качестве поддерживаемой, было решено оценить эффект от добавления глутамин, показанный ранее Т. Ю. Кочиш [1], с различной концентрацией исходного тестируемого вещества (табл. 2).

Таблица 1
Титр вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» в различных культурах клеток ($n = 3$)

Table 1
Titers of BRSV strain Vologda/2019 in various cell cultures ($n = 3$)

Культура клеток	Номер пассажа	Время культивирования, сут	Титр вируса, $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	Титр вируса в ИФА, разведение
RBT	1	8–10	$3,00 \pm 0,25$	1:2
	2	8–10	$3,63 \pm 0,07$	1:4
	3	7–10	$3,56 \pm 0,06$	1:4
	4	4–5	$4,00 \pm 0,23$	1:16
	5	4–5	$4,75 \pm 0,20$	1:32
FBT	1	8–10	$3,63 \pm 0,15$	1:2
	2	8–10	$4,00 \pm 0,22$	1:4
	3	7–10	$4,33 \pm 0,23$	1:4
	4	4–5	$4,78 \pm 0,18$	1:32
	5	4–5	$5,50 \pm 0,16$	1:64
МА-104	1	10	$1,83 \pm 0,16$	1:2
	2	10	$1,67 \pm 0,16$	1:2
	3	10	$1,50 \pm 0,17$	1:2
	4	10	н/о	–
	5	10	н/о	–
FBN	1	10	$2,23 \pm 0,23$	1:2
	2	10	$1,67 \pm 0,10$	1:2
	3	10	$1,50 \pm 0,17$	1:2
	4	10	н/о	–
	5	10	н/о	–
ЯДК-04	1	9	$2,50 \pm 0,17$	1:2
	2	10	$3,25 \pm 0,25$	1:4
	3	9	$3,12 \pm 0,18$	1:4
	4	8	$3,16 \pm 0,17$	1:4
	5	9	$3,33 \pm 0,18$	1:4

н/о – не обнаружено (not detected);

«–» – отрицательный результат (negative result).

Согласно данным таблицы 2, обогащение питательной среды глутамином привело к постепенному увеличению цитопатической активности вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019». В культуре клеток RBT при добавлении в питательную среду 0,1 и 0,5% глутамин титр вируса увеличивался от $3,00 \pm 0,25$ до $3,56 \pm 0,06 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, что является относительно низким уровнем активности для данного вируса. В культуре клеток FBT при добавлении среды с содержанием 0,1 и 0,5% глутамин к 3-му пассажу удалось получить вирус с титром цитопатической активности $3,63 \pm 0,15$ и $4,00 \pm 0,12 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Было установлено, что наиболее оптимальной

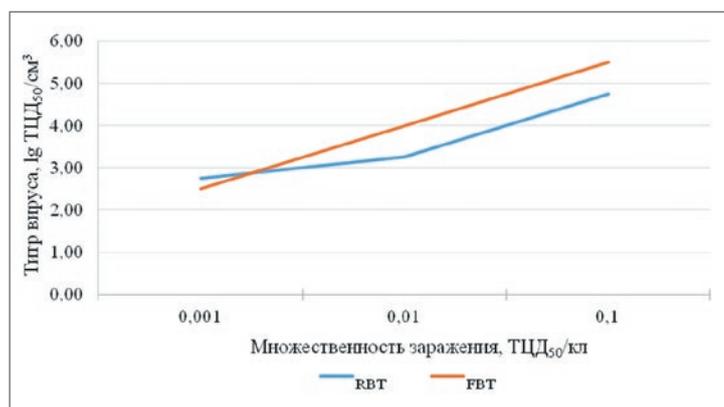


Рис. 11. Влияние множественности заражения на активность вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» ($n = 3$)

Fig. 11. Effects of inoculation multiplicity on the BRSV strain Vologda/2019 activity ($n = 3$)

концентрацией глутамина в питательной среде ПСС является 2%, при которой удалось добиться максимального титра цитопатической активности вируса РСИ КРС к 3-му пассажу: $4,75 \pm 0,20$ lg ТЦД₅₀/см³ (RBT) и $5,50 \pm 0,08$ lg ТЦД₅₀/см³ (FBT). Дальнейшее увеличение концентрации глутамина в питательной среде ПСС привело к снижению цитопатической активности вируса в рассматриваемых клеточных системах. При использовании среды без добавления глутамина в контрольных образцах титр вируса был на уровне от $3,00 \pm 0,25$ до $4,00 \pm 0,17$ lg ТЦД₅₀/см³.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что обогащение питательной среды глутамином в концентрации 2% приводит к увеличению титра цитопатической активности вируса, а также сокращает время его максимального накопления в культурах клеток FBT и RBT.

Следующим этапом исследования было изучение влияния на репродукцию вируса сыворотки крови лошади и КРС в составе питательной среды ПСС.

Как известно, сыворотка крови КРС зачастую контаминирована различными вирусными агентами, в том числе вирусом вирусной диареи КРС, что может повли-

ять на накопление вирусной массы в культуре клеток и снизить цитопатическую активность изучаемого вируса [14]. Применение сыворотки крови лошади позволило бы исключить контаминацию вирусной суспензии данным пестивирусом и тем самым получить вирус с высокой биологической активностью.

При исследовании влияния концентрации испытуемых сывороток крови животных на активность вируса проводили 5 последовательных пассажей в культурах клеток RBT и FBT. Данные представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, при добавлении 0,1 и 0,5% сыворотки крови КРС в питательную среду ПСС уровень цитопатической активности вируса в культуре клеток RBT составил $3,25 \pm 0,25$ и $3,37 \pm 0,20$ lg ТЦД₅₀/см³ соответственно, а в культуре клеток FBT – $2,75 \pm 0,25$ и $3,25 \pm 0,08$ lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. Постепенное увеличение концентрации сыворотки крови КРС в питательной среде от 1 до 2% привело к повышению титра цитопатической активности как в культуре клеток RBT ($4,33 \pm 0,12$ lg ТЦД₅₀/см³), так и в культуре FBT ($4,75 \pm 0,25$ lg ТЦД₅₀/см³). Дальнейшее увеличение концентрации сыворотки крови КРС привело к потере цитопатической активности вируса в обеих культурах, что может быть связано с лабильностью вируса и высокой чувствительностью к компонентам питательной среды.

При изучении влияния концентрации сыворотки крови лошади в питательной среде для культивирования вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» было установлено, что оптимальной дозой является 2%. При введении в среду данного количества сыворотки титр цитопатической активности вируса составил $4,50 \pm 0,23$ lg ТЦД₅₀/см³ в культуре клеток RBT и $5,50 \pm 0,16$ lg ТЦД₅₀/см³ в культуре FBT, что является лучшим результатом в свете полученных данных. Добавление в питательную среду ПСС малой (0,1%) или большой (3%) дозы сыворотки крови лошади приводило к снижению титра цитопатической активности вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019».

Таким образом, можно сделать вывод, что добавление сыворотки крови лошади или КРС благоприятно влияет на репродукцию вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019». Оптимальной концентрацией сыворотки крови КРС или лошади в питательной среде является 2%.

Таблица 2

Активность вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» при обогащении питательной среды глутамином ($n = 3$)

Table 2

BRSV strain Vologda/2019 activity in case of glutamine-enriched nutrient medium ($n = 3$)

Количество глутамина в поддерживающей среде, %	Цитопатическая активность вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³					
	RBT			FBT		
	1-й пассаж	2-й пассаж	3-й пассаж	1-й пассаж	2-й пассаж	3-й пассаж
0,1	$3,00 \pm 0,25$	$3,25 \pm 0,25$	$3,37 \pm 0,20$	$3,12 \pm 0,25$	$3,33 \pm 0,22$	$3,63 \pm 0,15$
0,5	$3,00 \pm 0,25$	$3,37 \pm 0,20$	$3,56 \pm 0,06$	$3,33 \pm 0,22$	$3,63 \pm 0,17$	$4,00 \pm 0,12$
1	$3,56 \pm 0,06$	$3,56 \pm 0,17$	$4,00 \pm 0,23$	$3,63 \pm 0,16$	$4,00 \pm 0,22$	$4,00 \pm 0,25$
2	$4,00 \pm 0,23$	$4,30 \pm 0,23$	$4,75 \pm 0,20$	$4,33 \pm 0,23$	$4,78 \pm 0,18$	$5,50 \pm 0,08$
3	$3,56 \pm 0,17$	$4,00 \pm 0,23$	$3,56 \pm 0,06$	$3,83 \pm 0,20$	$3,83 \pm 0,20$	$3,73 \pm 0,12$
Среда без глутамина	$3,37 \pm 0,20$	$3,00 \pm 0,25$	$3,56 \pm 0,06$	$3,33 \pm 0,27$	$3,63 \pm 0,12$	$4,00 \pm 0,17$

Таблица 3
Влияние концентрации сыворотки крови в питательной среде на активность вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019» (n = 5)

Table 3
Effect of blood sera concentration in the nutrient medium on BRSV strain Vologda/2019 activity (n = 5)

Концентрация сыворотки крови в питательной среде, %	Цитопатическая активность вируса, Ig ТЦД ₅₀ /см ³			
	RBT		FBT	
	сыворотка крови КРС	сыворотка крови лошади	сыворотка крови КРС	сыворотка крови лошади
0,1	3,25 ± 0,25	3,50 ± 0,15	2,75 ± 0,25	3,63 ± 0,15
0,5	3,37 ± 0,20	3,00 ± 0,25	3,25 ± 0,08	4,00 ± 0,12
1	4,30 ± 0,23	4,00 ± 0,23	3,56 ± 0,19	4,00 ± 0,25
2	4,33 ± 0,12	4,50 ± 0,23	4,75 ± 0,25	5,50 ± 0,16
3	4,00 ± 0,23	3,56 ± 0,17	4,00 ± 0,23	3,73 ± 0,12
Среда без сыворотки крови	3,00 ± 0,25	3,37 ± 0,20	3,50 ± 0,33	4,00 ± 0,17

При добавлении указанного количества сыворотки удалось достичь максимальной цитопатической активности данного вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении чувствительности перевиваемых культур клеток к вирусу РСИ КРС штамма «Вологда/2019» установлено, что эффективными системами для получения высокоактивной вирусной суспензии являются культуры RBT и FBT. Указанные линии культур клеток могут быть использованы для получения вирусного материала с целью разработки средств диагностики и специфической профилактики данного заболевания.

Оптимальной дозой заражения культур клеток является 0,1 ТЦД₅₀/кл, при которой титр вируса составил 4,75 ± 0,16 Ig ТЦД₅₀/см³ для RBT и 5,50 ± 0,80 Ig ТЦД₅₀/см³ для FBT.

Обогащение питательной среды глутамином в концентрации 2% приводит к увеличению титра вируса при культивировании в указанных клеточных системах.

Добавление сыворотки крови лошади или КРС благоприятно влияет на цитопатическую активность вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019». Установлено, что оптимальной концентрацией сыворотки крови в питательной среде является 2%. При добавлении данного количества сыворотки удалось достичь максимальной цитопатической активности вируса РСИ КРС штамма «Вологда/2019».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 12, 13 см. REFERENCES)

1. Кочиш Т. Ю. Разработка набора реагентов для определения уровня антител к респираторно-синцитиальному вирусу крупного рогатого скота в иммуноферментном анализе: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Щелково; 2004. 23 с.
2. Баженов К. С. Распространение вирусов парагриппа-3 и респираторно-синцитиальной инфекции среди телят на откорме в осенне-зимний период. *Бюллетень ВИЭВ*. 1983; 50: 6–8.
3. Гуненков В. В., Халенев Г. А., Сюрин В. Н. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция *Животноводство и ветеринария*. 1975; 8: 70–76.
4. Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота: рекомендации. Сост.: А. Г. Глотов, Т. И. Глотова, С. В. Котенева,

А. В. Нефедченко, К. В. Войтова, О. В. Кунгурцева, И. Я. Строганова. Новосибирск: Сибирское отделение Россельхозакадемии; ГНУ ИЭВСидВ; 2010. 26 с. eLIBRARY ID: 19518328.

5. Глотов А. Г., Петрова О. Г., Глотова Т. И., Нефедченко А. В., Татарчук А. Т., Кушнир Н. И. и др. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2002; 3: 17–21. eLIBRARY ID: 22435011.

6. Сюрин В. Н., Самуйленко А. Я., Соловьев Б. В., Фомина Н. В. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП; 1998. 928 с.

7. Строганова И. Я., Войтова К. В. Методы обнаружения и идентификации респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота в культуре клеток. *Вестник КрасГАУ*. 2011; 3: 128–133. eLIBRARY ID: 16445217.

8. Глотов А. Г., Глотова Т. И. Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2009; 11: 18–23. eLIBRARY ID: 12968708.

9. Журавлева Е. А. Нозоареал респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2018; 12: 3–8. DOI: 10.30896/0042-4846.2018.12.03-08.

10. Кононова С. В., Нестеров А. А., Думова В. В., Манин Б. Л., Кононов А. В., Бабин Ю. Ю., Губенко О. Г. Адаптация вируса болезни Шмалленберга к перевиваемым клеточным культурам. *Ветеринария сегодня*. 2015; 2 (13): 17–21. eLIBRARY ID: 24345887.

11. Манин Б. Л., Коропова Н. В., Кузнецова Е. Г., Лабзова М. Н., Хлебопашникова С. В. Линия клеток почки телят *Bos taurus* RBT (Rene *Bos taurus*) для репродукции вирусов животных. Патент № 2488631 Российская Федерация, МПК С12N 5/07 (2010.01), А61К 39/12 (2006.01). ФГБУ «ВНИИЗЖ». № 2012126700/10. Заявл. 26.06.2012. Оpubл. 27.07.2013. Бюл. № 21. Режим доступа: https://patents.s3.yandex.net/RU2488631C1_20130727.pdf.

14. Пономарев А. П., Манин Б. Л., Коган М. М. Культивирование клеточных линий человека и животных с использованием сыворотки крови, очищенной лантаноидами. *Ветеринарная патология*. 2019; 4: 61–70. eLIBRARY ID: 41560805.

REFERENCES

1. Kochish T. Yu. Development of a set of reagents for determining the level of antibodies to bovine respiratory syncytial virus using ELISA [Razrabotka nabora reagentov dlya opredeleniya urovnya antitel k respiratorno-sincital'nomu virusu krupnogo roगतого skota v immunofermentnom analize]: author's abstract ... Candidate of Science (Biology). Shchyolkovo; 2004. 23 p. (in Russian)
2. Bazhenov K. S. Spread of parainfluenza-3 and respiratory syncytial viruses in fattening calves in autumn-winter season [Rasprostraneniye virusov paragrippa-3 i respiratorno-sincital'noj infekcii sredi telyat na otkorme v osenne-zimnij period]. *Bulletin of the All-Russia Institute for Experimental Veterinary Medicine (VIEV)*. 1983; 50: 6–8. (in Russian)
3. Gunenkov V. V., Khalenev G. A., Syurin V. N. Respiratory syncytial virus infection [Respiratorno-sincital'naya virusnaya infekciya]. *Zhivotnovodstvo i Veterinariya*. 1975; 8: 70–76. (in Russian)
4. Bovine respiratory syncytial infection [Respiratorno-sincital'naya infekciya krupnogo roगतого skota]: recommendations. Compiled by:

A. G. Glotov, T. I. Glotova, S. V. Koteneva, A. V. Nefedchenko, K. V. Voytova, O. V. Kungurtseva, I. Ya. Stroganova. Novosibirsk: Siberian Branch of the Russian Agricultural Academy; Institute of Experimental Veterinary Medicine for Siberia and Far East; 2010. 26 p. eLIBRARY ID: 19518328. (in Russian)

5. Glotov A. G., Petrova O. G., Glotova T. I., Nefedchenko A. V., Tatarchuk A. T., Kushnir N. I., et al. Spread of bovine viral respiratory diseases [Rasprostraneniye virusnykh respiratornykh boleznej krupnogo rogatogo skota]. *Veterinariya*. 2002; 3: 17–21. eLIBRARY ID: 22435011. (in Russian)

6. Syurin V. N., Samuylenko A. Ya., Solovyov B. V., Fomina N. V. Animal viral diseases [Virusnye bolezni zhivotnykh]. M.: All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry; 1998. 928 p. (in Russian)

7. Stroganova I. Ya., Voitova K. V. The techniques for revealing and identification of the respiratory and syncytial virus of cattle in cell culture. *Bulletin of KSAU*. 2011; 3: 128–133. eLIBRARY ID: 16445217. (in Russian)

8. Glotov A. G., Glotova T. I. Respiratory syncytial virus (BRSV). *Veterinariya*. 2009; 11: 18–23. eLIBRARY ID: 12968708. (in Russian)

9. Zhuravleva E. A. Nososemia of bovine respiratory syncytial virus infection. *Veterinariya*. 2018; 12: 3–8. DOI: 10.30896/0042-4846.2018.12.12.03-08. (in Russian)

10. Kononova S. V., Nesterov A. A., Dumova V. V., Manin B. L., Kononov A. V., Babin Yu. Yu., Gubenko O. G. Adaptation of Schmallenberg virus to continuous cell cultures. *Veterinary Science Today*. 2015; 2 (13): 17–21. eLIBRARY ID: 24345887. (in Russian)

11. Manin B. L., Koropova N. V., Kuznetsova Ye. G., Labzova M. N., Khlebopashnikova S. V. Bovine calf kidney cell line *Bos taurus* RBT (Rene *Bos taurus*) for animal virus reproduction [Liniya kletok pochki telenki *Bos taurus* RBT (Rene *Bos taurus*) dlya reprodukcii virusov zhivotnykh]. Patent No. 2488631 Russian Federation, IPC C12N 5/07 (2010.01), A61K 39/12 (2006.01). FGBI "ARRIAH". No. 2012126700/10. Submitted on 26.06.2012. Published on 27.07.2013. Bulletin No. 21. Available at: https://patents.s3.yandex.net/RU2488631C1_20130727.pdf. (in Russian)

12. Murray G. M., More S. J., Sammin D., Casey M. J., McElroy M. C., O'Neill R. G., et al. Pathogens, patterns of pneumonia, and epidemiologic risk factors associated with respiratory disease in recently weaned cattle in Ireland. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2017; 29 (1): 20–34. DOI: 10.1177/1040638716674757.

13. Valarcher J.-F., Taylor G. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* 2007; 38 (2): 153–180. DOI: 10.1051/vetres:2006053.

14. Ponomarev A. P., Manin B. L., Kogan M. M. Cultivation of human and animal cell lines using blood serum purified by lanthanoids. *Veterinarnaya patologiya*. 2019; 4: 61–70. eLIBRARY ID: 41560805. (in Russian)

Поступила 15.06.2020

Принята в печать 22.07.2020

Received on 15.06.2020

Approved for publication on 22.07.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кирпиченко Владимир Владимирович, аспирант, референтная лаборатория болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Кононова Светлана Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шумилова Ирина Николаевна, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Нестеров Александр Александрович, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Туркова Мария Владимировна, ведущий ветеринарный врач референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Бухон Елена Александровна, ведущий биолог референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Роменская Диана Витальевна, кандидат ветеринарных наук, заведующий сектором отдела образования и научно-методической работы ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Спрыгин Александр Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Манин Борис Леонидович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора культуры клеток отдела инноваций ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Бядовская Ольга Петровна, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Vladimir V. Kirpichenko, Post-Graduate Student, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Svetlana V. Kononova, Candidate of Sciences (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Irina N. Shumilova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexander A. Nesterov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Maria V. Turkova, Leading Veterinarian, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Yelena A. Bukhon, Leading Biologist, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Diana V. Romenskaya, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Sector, Department for Education and Science Methodology, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexander V. Sprygin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Boris L. Manin, Candidate of Sciences (Biology), Leading Researcher, Sector for Cell Culture, Innovation Department, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Olga P. Byadovskaya, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.