

УДК: 619:578.831.31:615.371
DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.4.97

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕСПИРАТОРНО- СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ ТЕЛЯТ

Тарасова Е.Ю.^{1*} – канд. биол. наук, зав. лабораторией ветеринарной санитарии, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-9056-5798); Хаммадов Н.И.^{1,2} – канд. биол. наук, зав. лабораторией молекулярно-генетического анализа, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5669-1486); Ефимова М.А.^{1,2} – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-8786-1310); Кашеваров Г.С.¹ – канд. биол. наук, зав. лабораторией морфологических исследований, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-4520-7596); Каримуллина И.Г.¹ – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-6771-3457); Калимуллин Ф.Х.¹ – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-2468-3163); Быкова П.В.¹ – мл. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-3636-0633)

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

² ФГБОУ ВО Казанский ГАУ Институт "Казанская академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана"

* evgenechka1885@gmail.com

Ключевые слова: перевиваемые линии культур клеток, респираторно-синцициальный вирус, вакцина, телята, инфекционный титр, репликация, количественная полимеразная цепная реакция

Keywords: continuous cell culture lines, respiratory syncytial virus, vaccine, calves, infectious titer, replication, quantitative polymerase chain reaction

Поступила: 15.07.2025

Принята к публикации: 05.12.2025

Опубликована онлайн: 26.12.2025



РЕФЕРАТ

Целью работы являлось изучение особенностей культивирования и определения инфекционной активности штамма респираторно-синцициального вируса «РБ23» для дальнейшего создания живой аттенуированной импортозамещающей вакцины против ИРТ, ПГ-3 и РСВ для назальной иммунизации новорожденных телят. Качество репликации на клеточных линиях проводили путем оценки инфекционных титров по прямому цитопатическому действию вируса на клетки млекопитающих, а также использовали метод окрашенных фокусов. Методом количественной ПЦР определена степень репликации РСВ на культуре клеток ЛЭК в зависимости от сроков культивирования. Показано, что клетки ЛЭК и Т-1 являются перmissive для РСВ. При этом чувствительность клеток ЛЭК превышала чувствительность клеток Т-1 на 1,96, 1,88 и 7,69 % соответственно, в трех последовательных пассажах. Смена среды МЕМ с добавлением глутамин при культивировании РСВ на 4 сутки способствовала усилению репликативной активности на 8,6 % по сравнению с флаконами, в кото-

рых смена среды не проводилась. Отмечено также, что оптимальным сроком культивирования РСВ является срок семь суток, дальнейшее культивирование приводит к деградации внеклеточных вирусных частиц, что снижает концентрацию вирионов на 26,5-40,0 %. Нарботана биомасса РСВ «РБ23» для дальнейшего создания живой аттенуированной импортзамещающей вакцины против ИРТ, ПГ-3 и РСВ для назальной иммунизации новорожденных телят с инфекционным титром РСВ – $4,75 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, титром по ФОЕ – $1,5 \times 10^6$ ФОЕ/см³ и количеством вирионов в вирусосодержащей суспензии не ниже $4,5 \pm 0,20$ млн. копий/мл.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Массовые респираторные заболевания новорожденных телят с симптомами конъюнктивита, поражения верхних и нижних дыхательных путей представляют наиболее серьезную проблему для скотоводства многих сельхозпредприятий Российской Федерации [1-3]. К основным вирусным патогенам относят вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (ИРТ), вирус парагриппа крупного рогатого скота-3 (ПГ-3) и респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота (РСВ) [4, 5].

Респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота является повсеместно распространенным и важным респираторным патогеном крупного рогатого скота, который может вызывать тяжелое заболевание у животных всех возрастов, но в первую очередь поражает молодых телят во время повторяющихся сезонных вспышек. Клинически заболевание характеризуется лихорадкой, кашлем и тахипноэ, часто быстро прогрессирующими до одышки. РСВ считается одним из предрасполагающих факторов, приводящих к вторичному заражению и эпизоотиям пастереллеза крупного рогатого скота [2, 3, 6].

Вспышки респираторных заболеваний часто затрагивают телят в возрасте всего нескольких недель. Поэтому важно, чтобы вакцинация быстро индуцировала защиту от заболевания. Большинство телят в возрасте до 3 месяцев имеют циркулирующие материнские антитела, приобретенные через молоко. Эти антитела не обеспечивают должной защиты от заболеваний, но могут влиять на эффективность системной вакцинации. При этом именно интраназальная вакцинация является методом, с помощью которого может

быть быстро вызван иммунитет (обходя возможное влияние материнских антител). Установлено, что телята в возрасте от 3 до 8 дней способны формировать иммунный ответ слизистой оболочки, даже при наличии материнских антител.

Разработка живой аттенуированной импортзамещающей вакцины против ИРТ, ПГ-3 и РСВ для назальной иммунизации новорожденных телят имеет потенциальные преимущества по сравнению с традиционной парентеральной вакцинацией, являясь дополнительным инструментом для усиления защиты от респираторных инфекций путем стимуляции иммунного ответа слизистой оболочки. Многочисленные исследования продемонстрировали эффективность интраназальной вакцинации в условиях материнских антител после заражения вирусами респираторных инфекций. Респираторные заболевания крупного рогатого скота являются основной причиной смертности телят. В связи с этим важность ранней защиты новорожденных телят не вызывает сомнений [7, 8].

Многие исследователи отмечают трудности при культивировании РСВ, связанные с нерегулярным проявлением цитопатического действия (ЦПД), низким инфекционным титром, лабильностью вируса. Было отмечено, что пассирование различных штаммов РСВ крупного рогатого скота (КРС) даже в чувствительных культурах клеток не в каждом пассаже сопровождалось видимым ЦПД, поэтому цитопатическое действие РСВ в культуре клеток носит неперманентный характер, что и осложняет его культивирование. Поэтому при культивировании РСВ КРС в культурах клеток необходимо использовать и другие методы контроля его размножения, определения инфекционной

активности и его идентификации [9-11]. В связи с этим, целью работы являлось изучение особенностей культивирования и определения инфекционной активности штамма РСВ «РБ23» для дальнейшего создания живой аттенуированной импортозамещающей вакцины против ИРТ, ПГ-3 и РСВ для назальной иммунизации новорожденных телят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

При создании вакцинных препаратов большую роль играет выбор эффективных биологических моделей с целью получения высокоактивной биомассы вирусов. Поэтому на первом этапе работы для разработки технологии производства нами была изучена чувствительность различных перевиваемых линий культур клеток к аттенуированному штамму РСВ КРС «РБ23». Для репликации вируса использовались следующие перевиваемые линии культур клеток: ЛЭК (легкого эмбриона коровы), Т-1 (почки телят), МДБК (почки быка), ВНК-21/13 (почки новорожденного золотистого сирийского хомячка).

Наработка биомассы вируса осуществлялась на перевиваемых линиях культур клеток методами стационарного культивирования в стеклянных флаконах (матрасах) вместимостью 200 и 1500 см³ с выходом вирусосодержащей суспензии в объеме 20-30 см³ и 120-150 см³ соответственно.

Заражение штаммом РСВ КРС «РБ23» в дозе 0,1 lg ТЦД₅₀/см³ проводили на 80–90 % конфлюэнтном монослое клеток возрастом 24–48 часов. Перед инокуляцией промывали клетки фосфатно-солевым буфером (рН 7,4±0,1). С целью адсорбции вируса флаконы инкубировали при температуре 37±0,5 °С в течение одного часа, встряхивая каждые 20–30 минут для перераспределения инокулята. Адсорбцию завершали добавлением среды Игла МЕМ (в которую предварительно вносили L-глутамин (ООО «ПанЭко», Россия) из расчета 146 мг на 450 мл среды). Инфицированные культуры клеток инкубировали при температуре 37±0,5 °С,

ежедневно просматривая под микроскопом на наличие характерных морфологических (цитопатических) изменений клеток. Культуры клеток, на которых происходило максимальное накопление вирусов, были использованы для накопления вирусосодержащего материала.

Оценку качества репликации РСВ на клеточных линиях проводили путем определения инфекционных титров согласно общепринятой методике L. Reed и H. Muench [12] по прямому цитопатическому действию вируса на клетки и выражали в lg ТЦД₅₀/см³ (50%-ная тканевая цитопатическая доза), а также использовали метод окрашенных фокусов по Calnek V. et al. [13] при этом титр вируса выражали в фокусобразующих единицах/мл (ФОЕ/мл). Для оценки титра в последовательных разведениях вирусосодержащей суспензии подсчитывали предварительно окрашенные 0,5 %-ным раствором амидового черного на 0,5 % -ной уксусной кислоте фокусы в 8 флаконах, соответствующих одному и тому же разведению вируса без слияния фокусов (при условии, что число фокусов не превышает 100 и не менее 10). Величину титра определяли по следующей формуле:

$$T = \frac{a \times 2}{P}$$

где: T – титр вируса в ФОЕ/см³;

a – среднее количество фокусов во флаконе;

P – показатель степени разведения вирусосодержащего материала.

Также проведено количественное определение степени репликации РСВ на культуре клеток ЛЭК в зависимости от сроков культивирования. Для этого зараженные РСВ флаконы замораживали через 4; 7 и 10 суток после инокуляции. На 4 сутки в половине флаконов проводили смену питательной среды. Далее определяли содержание вируса с помощью ПЦР.

Нуклеотидные последовательности изолятов вируса РСВ определены путем поисковых запросов из базы данных GenBank ресурсов NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). В результате множественного выравнивания нуклеотид-

ных последовательностей изолятов РСВ и дизайна олигонуклеотидов были разработаны праймеры и олигонуклеотидный зонд для амплификации консервативного локуса РСВ («RSV F» атаассггсатсас-тсгтсатсасгс, «RSV R» гтгттгггггггггг-гггггг, «RSV Р» Rох-агтгггггаатгсгаагссагсс-ВНQ2). Олигонуклеотидные праймеры и зонды синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия) [14, 15].

Нуклеиновые кислоты (НК) выделяли из образцов культуры клеток ЛЭК с помощью набора РИБО-преп (AmpliSens, Россия), согласно инструкции производителя.

Для реакции амплификации использовали следующий состав реакционной смеси, из расчета на одну пробу: 3 мкл 5х qPCRmix-HS SYBR; 0.2 мкл MMLV – обратной транскриптазы (ЗАО «Евроген», Россия); 0.5 мкл 10 рМ раствора зонда для ПЦР; 10 рМ раствора прямого и обратного праймеров по 0.5 мкл; 5 мкл нуклеиновых кислот и 6.3 - деионизированной воды. Конечный объем реакционной смеси составил 15 мкл. Амплификация нуклеиновых кислот осуществлялась по следующей программе: (I) обратная транскрипция РНК при температуре 37 °С в течение 5 минут; (II) денатурация ДНК при температуре 95 °С в течение 2 минут; (III) 5 циклов, состоящих из: 15 секунд - при 95 °С, 30 секунд - при 59 °С; (IV) 40 циклов, состоящих из: 10 секунд - при 95

°С, 30 секунд при - 59 °С. Детекция результата ПЦР происходит на каждом из 40 циклов третьей стадии ПЦР, при 59 °С по каналам Rох и Fаm. Для расчета количества НК в образце готовили серию образцов с 10-кратными разведениями разработанного положительного контрольного образца (которые при амплификации считали стандартами). Количество НК вируса в образцах определяли по показателям амплификатора (основанном на сопоставлении Ct анализируемого образца с Ct стандартных образцов).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Нами, также, как и многими исследователями [38-41] отмечены трудности при культивировании РСВ, связанные с нерегулярным и неодинаковым проявлением ЦПД.

Так культивирование РСВ на перевиваемой линии культур клеток ЛЭК могло сопровождаться как ярко выраженной деструкцией монослоя, отторжением клеток и образованием пустот (рис. 1.1, 1.2), так и формированием скоплений клеток (в виде так называемых фокусов), т.е. развитием цитопатологии синцитиального типа (рис. 1.3-1.5), а в случае с культивированием на перевиваемой линии культур клеток Т-1 преимущественно фокусов (выраженных локализованных очагов поражения в виде клеточных конгломератов) и отходящих от них ярко выраженных тяжей (рис. 2.1-2.5).

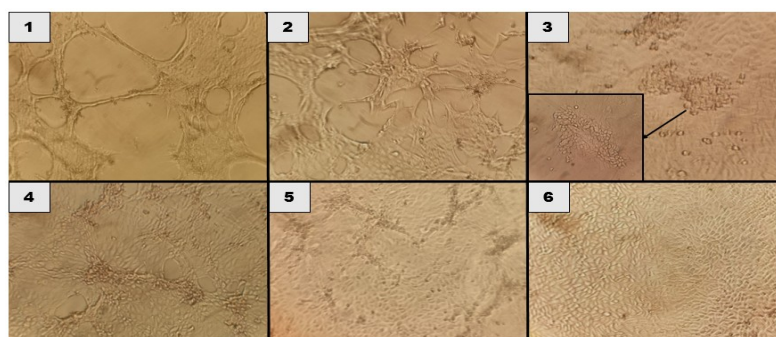


Рисунок 1 – Цитопатическое действие РСВ КРС на культуре клеток ЛЭК через 7 суток после заражения в третьем пассаже: 1-5 – клетки ЛЭК после заражения; 6 – монослой интактной культуры клеток ЛЭК (1-3 - увеличение x400; 4-6 - увеличение x200).

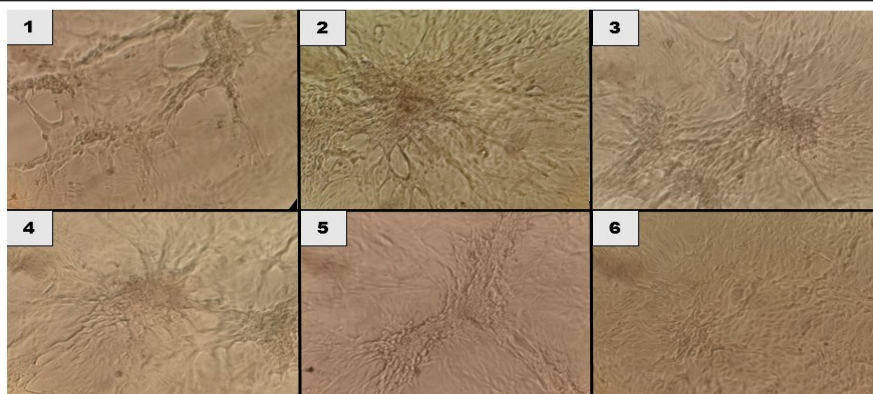


Рисунок 2 – Цитопатическое действие РСВ КРС на культуре клеток Т-1 через 7 суток после заражения в третьем пассаже: 1-5 – клетки Т-1 после заражения; 6 – монослой интактной культуры клеток Т-1 (увеличение $\times 400$).

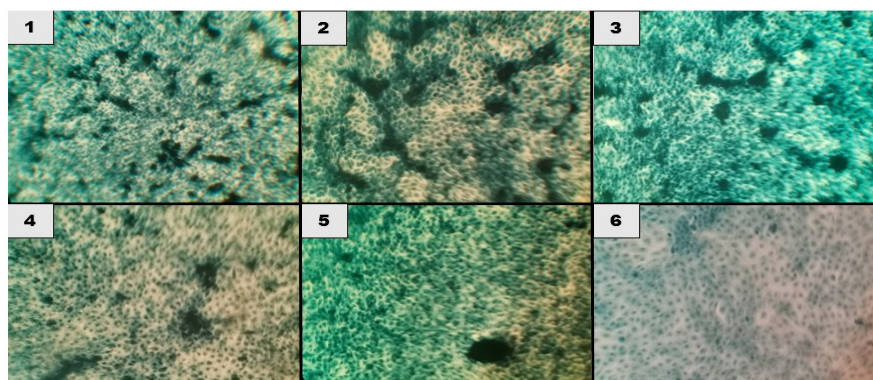


Рисунок 3 – Титрование РСВ КРС (штамм «РБ23») на культуре клеток ЛЭК методом окрашенных фокусов (через 7 суток после заражения, где 1-5 – последовательные разведения вируса, 6 – контроль (увеличение $\times 200$)).

Таблица 1 – Определение титра РСВ на перевиваемой линии культур клеток ЛЭК методом ФОЕ

Степень разведения вирусосодержащего материала	Среднее количество фокусов в опыте	Среднее количество фокусов во флаконах, отвечающих условиям расчета* (а)	Титр вируса, ФОЕ/см ³ (Т)
10^{-1}	241,5 \pm 27,53	–	–
10^{-2}	110,63 \pm 30,95	77	1,5 $\times 10^4$
10^{-3}	70,5 \pm 18,05	71	1,4 $\times 10^5$
10^{-4}	75,38 \pm 15,63	75	1,5 $\times 10^6$
10^{-5}	3,5 \pm 3,85	–	–
10^{-6}	0,13 \pm 0,35	–	–

Примечание: * с учётом значений, отвечающих условиям расчета (от 10 до 100 фокусов во флаконе)

Проведено три последовательных пассажа аттенуированного штамма РСВ КРС «РБ23» на культурах клеток ЛЭК и Т-1 с максимальным проявлением ЦПД на 7 сутки после заражения и инфекционным титром в первом пассаже – $4,08 \pm 0,20 \lg$ ТЦД₅₀/см³ и $4,00 \pm 0,18 \lg$ ТЦД₅₀/см³; во втором пассаже – $4,25 \pm 0,18 \lg$ ТЦД₅₀/см³ и $4,17 \pm 0,20 \lg$ ТЦД₅₀/см³ и третьем пассаже – $4,42 \pm 0,18 \lg$ ТЦД₅₀/см³ и $4,08 \pm 0,10 \lg$ ТЦД₅₀/см³ соответственно. Таким образом, обе клеточные линии являются пермиссивными для РСВ. Однако в связи с тем, что на предыдущем этапе работы наиболее чувствительной к вирусам ИРТ и ПГ-3 оказалась перевиваемая культура клеток ЛЭК, технологически удобно продолжать накопление РСВ именно на этой культуре.

В связи с тем, что пассирование РСВ КРС даже в чувствительных культурах клеток не в каждом пассаже сопровождается видимым ЦПД и носит неперманентный характер, что осложняет его культивирование [38-41], инфекционный титр РСВ определялся нами также по числу фокусообразующих единиц (ФОЕ) (рис. 3).

Результаты определения инфекционного титра РСВ третьего пассажа на пере-

виваемой линии культур клеток ЛЭК методом ФОЕ представлены в таблице 1.

Таким образом, титр РСВ в третьем пассаже составил $1,5 \times 10^6$ ФОЕ/см³.

РСВ слабо реплицировался на перевиваемой линии клеток MDBK и ВНК-21/13. ЦПД, если и проявлялось, то не раньше 8-9 суток во флаконах с разведением вируса 10^{-1} и 10^{-2} . Так инфекционный титр на культуре клеток MDBK составил $0,83 \pm 0,10$, $1,00 \pm 0,18$, $0,92 \pm 0,10 \lg$ ТЦД₅₀/см³, на культуре клеток ВНК-21/13 – $1,08 \pm 0,10$, $1,17 \pm 0,27$, $1,08 \pm 0,20 \lg$ ТЦД₅₀/см³ соответственно в первом, втором и третьем пассажах. Таким образом, перевиваемые линии культур клеток почки быка и новорожденного золотистого сирийского хомячка оказались слабочувствительными к изучаемому вирусу в трех последовательных пассажах.

По результатам амплификации вирусосодержащего материала из флаконов третьего пассажа, замороженных на 4, 7 и 10 сутки после заражения, показано, что концентрация РСВ имела тенденцию к нарастанию при увеличении срока культивирования до 7 суток, при этом смена среды во флаконах на 4 сутки способствовала усилению репликации вируса (рис. 4)

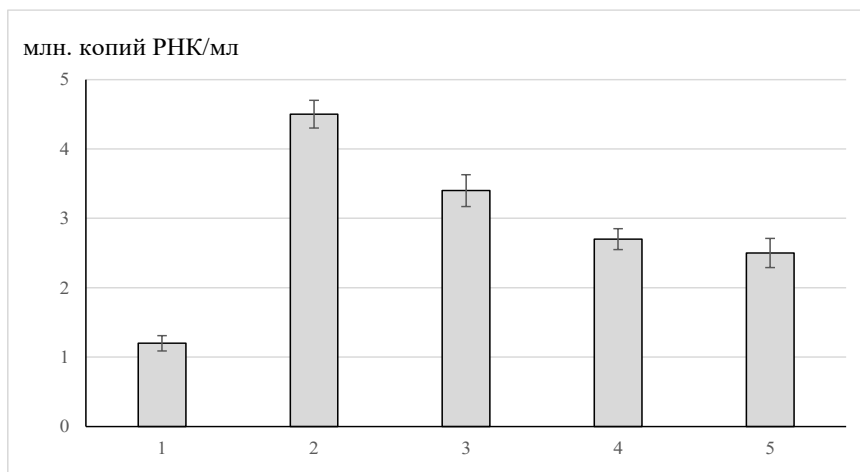


Рисунок 4 – Концентрация РСВ КРС «РБ23» на культуре клеток ЛЭК в зависимости от сроков культивирования (1 – 4 сут; 2 – 7 сут со сменой среды на 4 сут; 3 – 7 сут без смены среды на 4 сут; 4 – 10 сут со сменой среды на 4 сут; 5 – 10 сут без смены среды на 4 сут).

При смене среды на 4 сутки происходило усиление репликативной активности РСВ на 8,6 % относительно флаконов без смены среды к седьмым суткам опыта. Тогда как продолжение культивирования РСВ более 7 суток приводило к снижению концентрации вирионов на 40,0 % во флаконах со сменой и 26,5 % соответственно, без смены среды, что может быть связано с постепенной деградацией внеклеточных вирусных частиц (т.к. РНК плохо сохраняется во внешней среде, эффективность амплификации так же имеет тенденцию к представлению меньших количественных показателей). Инфекционный титр в третьем пассаже на 7 сутки во флаконах со сменой среды на 4 сутки составил $4,75 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, что на 7,5 % выше по сравнению с инфекционным титром РСВ во флаконах без смены среды.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом, наработана биомасса РСВ «РБ23» для дальнейшего создания живой аттенуированной импортзамещающей вакцины против ИРТ, ПГ-3 и РСВ для назальной иммунизации новорожденных телят. Определена чувствительность различных перевиваемых линий культур клеток к штамму «РБ23». Показано, что клетки ЛЭК и Т-1 являются пермиссивными для РСВ. При этом чувствительность клеток ЛЭК превышала чувствительность клеток Т-1 на 1,96, 1,88 и 7,69 % соответственно, в трех последовательных пассажах. Так как на предыдущем этапе работы наиболее чувствительной к вирусам ИРТ и ПГ-3 оказалась перевиваемая культура клеток ЛЭК, технологически удобно продолжать накопление РСВ именно на этой культуре. Смена среды MEM с добавлением глутамина при культивировании РСВ на 4 сутки способствовала усилению репликативной активности на 8,6 % по сравнению с флаконами, в которых смена среды не проводилась. Отмечено также, что оптимальным сроком культивирования РСВ является срок семь суток, дальнейшее культивирование приводит к деградации внеклеточных вирусных частиц, что снижает концентрацию вирио-

нов на 26,5-40,0 %. Инфекционный титр РСВ при отсутствии ярко выраженного ЦПД может определяться также методом подсчета фокусообразующих единиц. Таким образом, наработана биомасса РСВ «РБ23» для дальнейшего создания живой аттенуированной импортзамещающей вакцины против ИРТ, ПГ-3 и РСВ для назальной иммунизации новорожденных телят с инфекционным титром РСВ – $4,75 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, титром по ФОЕ – $1,5 \times 10^6 \text{ ФОЕ}/\text{см}^3$ и количеством вирионов в вирусосодержащей суспензии не ниже $4,5 \pm 0,20$ млн. копий/мл.

IMPROVING THE METHOD OF CULTURING RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS TO CREATE A VACCINE AGAINST RESPIRATORY INFECTIONS IN CALVES

Tarasova E.Yu.¹ – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Veterinary Sanitation Leading Researcher (ORCID 0000-0002-9056-5798); **Khammadov N.I.**^{1,2} – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Genetic Analysis, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5669-1486), **Efimova M.A.**^{1,2} – Doctor of Biological Sciences, Leading researcher (ORCID: 0000-0001-8786-1310); **Kashevarov G.S.**¹ – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Morphological Research, Senior Researcher (ORCID 0000-0002-4520-7596); **Karimullina I.G.**¹ – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0002-6771-3457); **Kalimullin F.Kh.**¹ – Candidate of Biological Sciences, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-2468-3163); **Bykova P.V.** – Junior Researcher (ORCID 0000-0003-3636-0633)

¹ FSBSI «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety»

² FSBEI HE «Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman»

* evgenechka1885@gmail.com

ABSTRACT

The aim of the work was to study the

features of cultivation and determination of the infectious activity of the respiratory syncytial virus strain "RB23" for the further creation of a live attenuated import-substituting vaccine against IRT, PG-3 and RSV for nasal immunization of newborn calves. The quality of replication on cell lines was carried out by assessing infectious titers by the direct cytopathic effect of the virus on mammalian cells, and also using the stained foci method. The degree of RSV replication on the LEC cell culture depending on the cultivation time was determined by the quantitative PCR method. It was shown that LEC and T-1 cells are permissive for RSV. Moreover, the sensitivity of LEC cells exceeded the sensitivity of T-1 cells by 1.96, 1.88 and 7.69%, respectively, in three consecutive passages. Changing the MEM medium with the addition of glutamine during RSV cultivation on the 4th day contributed to an increase in replicative activity by 8.6% compared to flasks in which the medium was not changed. It was also noted that the optimal period for RSV cultivation is seven days, further cultivation leads to the degradation of extracellular viral particles, which reduces the concentration of virions by 26.5-40.0%. The RSV biomass "RB23" has been produced for further development of a live attenuated import-substituting vaccine against IRT, PG-3 and RSV for nasal immunization of newborn calves with an infectious RSV titer of $4.75 \pm 0.18 \lg$ TCID₅₀/cm³, a FFU titer of 1.5×10^6 FFU/cm³ and a virion count in a virus-containing suspension of at least 4.5 ± 0.20 million copies/ml.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Распространение респираторно-синцитиальной вирусной инфекции КРС на территории ряда регионов Российской Федерации / С. А. Андреев, А. В. Кононов, А. А. Нестеров, Е. А. Бухон, К. А. Шалина // Молодые ученые - науке и практике АПК : Материалы Международной научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых, Витебск, 25–26 апреля 2024 года. – Витебск: Витебская государственная академия ветеринарной медицины, 2024. – С. 21–23.
2. Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота: особенности клинического проявления, патогенеза и молекулярной эпизоотологии (обзор) / С.В. Котенева, А.Г. Глотов, Т.И. Глотова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2025. – № 14(2). – С. 133-139. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-2-133-139>.
3. Изучение антигенных свойств ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого на кроликах / И. Р. Акбашев, С. В. Садыкова, Л. М. Яшагина [и др.] // Ветеринарный врач. – 2024. – № 2. – С. 39-42. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_2_39.
4. Bovine respiratory disease during the mid-portion of the feeding period: Observations from vaccination history, viral and bacterial prevalence, and rate of gain in feedlot cattle / М. Е. Theurer, М. D. Johnson, Т. Fox [et al.] // Appl. Anim. Sci. – 2021. – № 37. – P. 59–67. <https://doi.org/10.15232/aas.2020-02090>
5. Культуральные свойства вируса респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота штамма «АБ 1908» / В.В. Кирпиченко, С.В. Кононова, А.В. Кононов [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2019. – № 4. С. 31-36. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2019-4-31-31-36>
6. Коровкин А.С., Горенков Д.В., Волгин А.Р. Профилактика респираторно-синцитиальной вирусной инфекции: современное состояние и перспективы разработки вакцин // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2024. – № 24(3). – С. 255–269. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-255-26>
7. Vaccination of calves at day of birth with attenuated vaccines against bovine respiratory syncytial virus, bovine parainfluenza type 3 virus and respiratory bovine coronavirus / М. Н. van Rooij, М. Schmitz, J. М. Н. Meessen [et al.] // Veterinary Vaccine. – 2023. – Vol. 2 (1). – 100014. <https://doi.org/10.1016/j.vetvac.2023.100014>
8. Comparative effectiveness of intranasal

- and parenteral vaccines for prevention of bovine respiratory disease in feedlot heifers / J. I. Szasz, T. C. Bryant, K. S. Blood [et al.] // *Applied Animal Science*. – 2023. – Vol. 39 (5). – P. 273–281. <https://doi.org/10.15232/aas.2023-02396>
9. Строганова И. Я., Войтова К. В. Методы обнаружения и идентификации респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота в культуре клеток // *Вестник КрасГАУ*. – 2011. – №3. – С. 128-133. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/metody-obnaruzheniya-i-identifikatsii-respiratorno-sintsitialnogo-virusa-kрупnogo-rogatogo-skota-v-kulture-kletok> (дата обращения: 04.08.2025).
10. Chamorro M. F., Palomares R. A. Bovine respiratory disease vaccination against viral pathogens. Modified-live versus inactivated antigen vaccines, intranasal versus parenteral, what is the evidence? // *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* – 2020. – № 36. – P. 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.006>.
11. Modified-live versus inactivated respiratory viral vaccines for revaccinating beef calves at weaning / C.A. McNeff, C.A. Robinson, B.K. Wilson [et al.] // *Applied Animal Science*. – 2023. – № 39 (1). – С. 1-13. <https://doi.org/10.15232/aas.2022-02332>
12. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *American Journal of Epidemiology*. – 1938. – № 27(3). – С. 493-497.
13. Calnek, B.W., Ljarrido E., Okazaki W. In vitro methods for assay of turkey herpes virus / *V Avian Dis.* – 1972. – V.16. – P.52-56. <https://n2t.net/ark:/87292/w9sj33>
14. Дизайн праймеров для индикации патогенных лептоспир методом гнездовой полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / К.В. Усольцев, Р.И. Шангараев, К.С. Хаертынов [и др.] // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. – 2025. – № 2. – С. 95-106. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202502111>
15. Дизайн специфических олигонуклеотидов для выявления контаминации культур клеток возбудителем вирусной диареи и микоплазмами при разработке интраназальной вакцины против респираторных болезней новорожденных телят / Н. И. Хаммадов, М. Е. Горбунова, М. А. Ефимова [и др.] // *Ветеринарный врач*. – 2025. – № 3. – С. 98-104. – https://doi.org/10.33632/1998-698X_2025_3_98.

REFERENCES

1. Spread of bovine respiratory syncytial virus infection in a number of regions of the Russian Federation / S. A. Andreev, A. V. Kononov, A. A. Nesterov, E. A. Bukhon, K. A. Shalina // *Young scientists - for science and practice of the agro-industrial complex: Proceedings of the International scientific and practical conference of postgraduate students and young scientists, Vitebsk, April 25-26, 2024*. - Vitebsk: Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, 2024. - P. 21-23. (In Russ.)
2. Bovine respiratory syncytial infection: features of clinical manifestation, pathogenesis and molecular epizootology (review) / S.V. Koteneva, A.G. Glotov, T.I. Glotova [et al.] // *Veterinary science today*. - 2025. - No. 14 (2). - P. 133-139. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-2-133-139>. (In Russ.)
3. Study of antigenic properties of the associated vaccine against IRT, VD-BS, PG-3 and bovine chlamydia in rabbits / I. R. Akbashev, S. V. Sadykova, L. M. Yashagina [et al.] // *Veterinarian*. - 2024. - No. 2. - P. 39-42. https://doi.org/10.33632/1998-698X_2024_2_39. (In Russ.)
4. Bovine respiratory disease during the mid-portion of the feeding period: Observations from vaccination history, viral and bacterial prevalence, and rate of gain in feedlot cattle / M. E. Theurer, M. D. Johnson, T. Fox [et al.] // *Appl. Anim. Sci.* – 2021. – № 37. – P. 59–67. <https://doi.org/10.15232/aas.2020-02090>
5. Cultural properties of the bovine respiratory syncytial virus strain "AB 1908" / V.V. Kirpichenko, S.V. Kononova, A.V. Kononov [et al.] // *Veterinary Science Today*. - 2019. - No. 4. P. 31-36. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2019-4-31-31-36> (In Russ.)
6. Korovkin A.S., Gorenkov D.V., Volgin A.R. Prevention of respiratory syncytial vi-

- rus infection: current status and prospects for vaccine development // BIOpreparations. Prevention, diagnostics, treatment. - 2024. - No. 24 (3). - P. 255-269. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-255-26> (In Russ.)
7. Vaccination of calves at day of birth with attenuated vaccines against bovine respiratory syncytial virus, bovine parainfluenza type 3 virus and respiratory bovine coronavirus / M. H. van Rooij, M. Schmitz, J. M. H. Meessen [et al.] // *Veterinary Vaccine*. - 2023. - Vol. 2 (1). - 100014. <https://doi.org/10.1016/j.vetvac.2023.100014>
8. Comparative effectiveness of intranasal and parenteral vaccines for prevention of bovine respiratory disease in feedlot heifers / J. I. Szasz, T. C. Bryant, K. S. Blood [et al.] // *Applied Animal Science*. - 2023. - Vol. 39 (5). - P. 273-281. <https://doi.org/10.15232/aas.2023-02396>
9. Stroganova I. Ya., Voitova K. V. Methods for detection and identification of bovine respiratory syncytial virus in cell culture // *Bulletin of KrasSAU*. - 2011. - No. 3. - P. 128-133. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/metody-obnaruzheniya-i-identifikatsii-respiratorno-sintsitialnogo-virusa-krupnogo-rogatogo-skota-v-kulture-kletok> (date of access: 04.08.2025). (In Russ.)
10. Chamorro M. F., Palomares R. A. Bovine respiratory disease vaccination against viral pathogens. Modified-live versus inactivated antigen vaccines, intranasal versus parenteral, what is the evidence? // *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* - 2020. - № 36. - P. 461-472. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.006>.
11. Modified-live versus inactivated respiratory viral vaccines for revaccinating beef calves at weaning / C.A. McNeff, C.A. Robison, B.K. Wilson [et al.] // *Applied Animal Science*. - 2023. - № 39 (1). - C. 1-13. <https://doi.org/10.15232/aas.2022-02332>
12. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *American Journal of Epidemiology*. - 1938. - № 27(3). - C. 493-497.
13. Calnek, B.W., Ljarrido E., Okazaki W. In vitro methods for assay of turkey herpes virus / *V Avian Dis.* - 1972. - V.16. - P.52-56. <https://n2t.net/ark:/87292/w9sj33>
14. Design of primers for the indication of pathogenic leptospira by the nested polymerase chain reaction method in real time / K.V. Usoltsev, R.I. Shangaraev, K.S. Khaertynov [et al.] // *Veterinary science, zootechnics and biotechnology*. - 2025. - No. 2. - P. 95-106. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202502111> (In Russ.)
15. Design of specific oligonucleotides for detection of contamination of cell cultures with the causative agent of viral diarrhea and mycoplasmas in the development of an intranasal vaccine against respiratory diseases of newborn calves / N. I. Khammatov, M. E. Gorbunova, M. A. Efimova [et al.] // *Veterinarian*. - 2025. - No. 3. - P. 98-104. - https://doi.org/10.33632/1998-698X_2025_3_98. (In Russ.)