

<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.4.896-905>

УДК 578.823.1:57.085.23

Культуральные свойства и генетическая характеристика штамма Gil-Gil вируса блютанга

© 2025. О. Г. Лаптева ✉, А. В. Луницин, А. А. Чадаева, О. С. Поволяева, А. Ю. Кольцов, С. Г. Юрков

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», пос. Вольгинский, Владимирская область, Российская Федерация

Распространение блютанга в странах северо-западной части Европы в 2023–2024 годах, вызванного высоко-вирулентным вирусом, относящимся к 3-му серотипу, актуализировало изучение биологических свойств штамма Gil-Gil вируса блютанга, депонированного более 50 лет назад в коллекции патогенов Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии. Цель исследований – поиск наиболее перmissive клеточных систем для репродукции штамма Gil-Gil вируса блютанга 3-го серотипа, генетическая характеристика штамма и его серотипирование. Установлено, что вирус вызывает цитопатическое действие в клетках трёх сублиний перевиваемых культур ВНК-21/13, в перевиваемых линиях клеток ПСГК-60 и ПС. Перспективными клеточными системами для биотехнологии вакцинных препаратов определены монослойно-суспензионная культура клеток ВНК-21/13 и перевиваемая линия клеток ПСГК-60. В этих субстратах штамм Gil-Gil вируса блютанга накапливался до 7,25–7,50 lg ТЦД₅₀/см³. В реакции нейтрализации с референс-сывороткой подтверждена принадлежность штамма Gil-Gil к вирусу блютанга 3-го серотипа, а по результатам молекулярно-генетических исследований штамм отнесён к группе вирусов блютанга 3-го серотипа западного топотипа. Полученные результаты исследований рассматриваются как основополагающие для создания в короткий промежуток времени вакцинного препарата из охарактеризованного штамма вируса блютанга в случае заноса данного заболевания на территорию РФ.

Ключевые слова: культура клеток, культивирование, секвенирование, инфекционная активность, цитопатическое действие

Благодарности: работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Государственного задания ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (тема № FGNM-2024-0003).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Лаптева О. Г., Луницин А. В., Чадаева А. А., Поволяева О. С., Кольцов А. Ю., Юрков С. Г. Культуральные свойства и генетическая характеристика штамма Gil-Gil вируса блютанга. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2025;26(4):896–905. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.4.896-905>

Поступила: 23.12.2024

Принята к публикации: 07.07.2025

Опубликована онлайн: 29.08.2025

Cultural properties and genetic characteristics of the Gil-Gil strain of the bluetongue virus

© 2025. Oksana G. Lapteva ✉, Andrey V. Lunitsin, Anna A. Chadaeva, Olga S. Povolyaeva, Andrey Y. Koltsov, Sergey G. Yurkov

Federal Research Center for Virology and Microbiology, Volginsky settlement, Vladimir region, Russian Federation

The spread of bluetongue in the countries of north-western part of Europe in 2023–2024, caused by a highly virulent virus of serotype 3, has updated the study of the biological properties of the Gil-Gil strain of the bluetongue virus, deposited more than 50 years ago in the pathogen collection of the Federal Research Center for Virology and Microbiology. The aim of the research was to find the most permissive cell systems for the reproduction of the Gil-Gil strain of bluetongue virus of serotype 3, to characterize the strain genetically and to serotype it. The virus was found to cause cytopathic effect (CPE) in cells of three sublines of VNK-21/13 (newborn Syrian hamster kidney) transplanted cultures, in PSGC-60 (Siberian ibex kidney) and PS (saiga kidney) transplanted cell lines. The monolayer suspension culture of VNK-21/13 cells and the PSGC-60 transplanted cell line were identified as promising cell systems for the biotechnology of vaccine preparations. In these substrates, the Gil-Gil strain of bluetongue virus accumulated up to 7.25–7.50 lg TCD₅₀/cm³. The neutralization test with reference serum confirmed that the Gil-Gil strain belonged to bluetongue virus of serotype 3, and according to the results of molecular genetic studies, the strain was included in the group of bluetongue viruses of serotype 3 of the western topotype. The obtained results are considered to be fundamental for the development of a vaccine preparation from the characterized strain of the bluetongue virus in a short period of time in case of introduction of this disease into the territory of the Russian Federation.

Keywords: cell culture, culturing, sequencing, infectious activity, cytopathic effect

Acknowledgements: the research was carried out under the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment of the Federal Research Center for Virology and Microbiology (topic No. FGNM-2024-0003).

The authors thank the reviewers for their contribution to the expert assessment of this work.

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

For citation: Lapteva O. G., Lunitsin A. V., Chadaeva A. A., Povolyaeva O. S., Koltsov A. Y., Yurkov S. G. Cultural properties and genetic characteristics of the Gil-Gil strain of the bluetongue virus. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka* = Agricultural Science Euro-North-East. 2025;26(4):896–905. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.4.896-905>

Received: 23.12.2024

Accepted for publication: 07.07.2025

Published online: 29.08.2025

Вирус блютанга (BTV), относящийся к роду *Orbivirus* семейства *Reoviridae*, вызывает распространённое по всему миру заболевание домашних и диких жвачных животных, передается в основном трансмиссивным путём [1]. По результатам молекулярно-генетических и серологических исследований в настоящее время выделяют 36 различных серотипов BTV [2].

В эндемичных по вирусу блютанга странах ежегодно отмечается циркуляция новых для региона изолятов, включая реассортанты, вызывающие заболевание с клиническими проявлениями различной тяжести – от бессимптомного носительства до высоких уровней летальности восприимчивых животных [3].

Вирусологическими и молекулярно-генетическими методами исследований ранее была установлена циркуляция вируса блютанга 3-го серотипа (BTV-3) в Тунисе в 2018–2020 гг. [4], позднее обнаружили этот же серотип в южной провинции Сардинии [5] и на западе Сицилии [6], а затем и совместная циркуляция этого же серотипа с серотипами 1 и 9 в северных районах Израиля [7].

Осенью 2023 года в Европе возникли вспышки заболевания, вызванные вирусом блютанга 3-го серотипа. Первоначально инфекция охватила большую часть Нидерландов [8, 9]. Заболевание характеризовалось яркой клини-

ческой картиной у овец [9, 10, 11]. При распространении нового высоковирулентного BTV-3 уровень смертности среди овец достигал 75 %. Далее вспышки этой инфекции стали регистрировать на территории других стран – Германии [12], Бельгии, Великобритании [9, 10, 13].

Геномная последовательность выделенного изолята, кодирующая экспрессию вирусного белка 2 (VP2) BTV-3/NET2023, имела наибольшую гомологию со штаммами из Европы, что указывает на западный топотип, а полногеномное секвенирование показало, что BTV-3/NET2023, вызвавший вспышку BTV-3 в Нидерландах, значительно отличался от известных штаммов BTV-3. Всемирная Ветеринарная Информационная Система WAHIS (World Animal Health Information System) сообщает о вспышках блютанга среди восприимчивых животных в Дании¹ [8], Франции² [8, 9, 10], Англии [9, 10], Швеции³, Норвегии⁴, Швейцарии⁵, Австрии⁶, Португалии⁷ [14], Греции⁸. Ветеринарное управление Люксембурга информирует о 98 новых очагах блютанга, где инфицировано почти 900 животных⁹. В сентябре 2024 года зарегистрирована вспышка блютанга в Чехии, где на протяжении 15 лет данную инфекцию не регистрировали¹⁰ [15].

¹EVENT 5804. WAHIS: World Animal Health Information System. [Электронный ресурс]. URL: <https://wahis.woah.org/#/in-event/5804/dashboard> (дата обращения: 11.12.2024).

²Fièvre catarrhale ovine (FCO): situation en France, mesures de gestion et stratégie vaccinale. WAHIS: World Animal Health Information System. [Электронный ресурс]. URL: <https://agriculture.gouv.fr/la-situation-de-la-fievre-catarrhale-ovine-fco-en-france> (дата обращения 11.12.2024).

³EVENT 5871. WAHIS: World Animal Health Information System. [Электронный ресурс]. URL: <https://wahis.woah.org/#/in-event/5871/dashboard> (дата обращения: 11.12.2024).

⁴EVENT 5856. WAHIS: World Animal Health Information System. [Электронный ресурс]. URL: <https://wahis.woah.org/#/in-event/5856/dashboard> (дата обращения: 11.12.2024).

⁵EVENT 5840. WAHIS: World Animal Health Information System. [Электронный ресурс]. URL: <https://wahis.woah.org/#/in-event/5840/dashboard> (дата обращения: 11.12.2024).

⁶EVENT 5869. WAHIS: World Animal Health Information System. [Электронный ресурс]. URL: <https://wahis.woah.org/#/in-event/5869/dashboard> (дата обращения: 11.12.2024).

⁷WAHIS: World Animal Health Information System. [Электронный ресурс]. URL: https://assets.publishing.service.gov.uk/media/67693d924e2d5e9c0bde9d0f/BTV_Europe_12.1.pdf (дата обращения: 11.12.2024).

⁸Там же.

⁹WAHIS: World Animal Health Information System: [Электронный ресурс]. URL: <https://today.rtl.lu/news/luxembourg/a/2232636.html> (дата обращения: 3.12.2024).

¹⁰Минсельхоз Чешской Республики подтвердил первый за 15 лет случай заражения блютангом. Ветеринария и жизнь: информационный портал и газета. [Электронный ресурс]. URL: <https://vetandlife.ru/epizootic-situation/minselhoz-cheshskoj-respubliki-podtverdil-pervyj-za-15-let-sluchaj-zarazheniya-bljutangom/> (дата обращения: 3.12.2024).

В связи с распространением вируса блютанга в 2023 и 2024 годах в Европе возникла необходимость в оценке биологических свойств штаммов, относящихся по паспортным данным к 3-му серотипу вируса блютанга, но депонированных в различные временные периоды (более 50 лет назад) в «Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в т. ч. зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных» (реестровый номер ЦКП – 441429, <http://ckp-rf.ru/ckp/441429/>).

Цель исследований – поиск перmissive клеточных систем к штамму Gil-Gil вируса блютанга, которые в дальнейшем могли бы быть применены для разработки технологии изготовления вакцины, а также молекулярно-генетическая характеристика штамма и его серотипирование.

Научная новизна – получены данные по биологическим свойствам штамма Gil-Gil вируса блютанга 3-го серотипа и определены наиболее перmissive перевиваемые линии клеток для его репродукции.

Материал и методы. *Культуры клеток:* перевиваемые линии клеток почки сайги (ПС), почки сибирского горного козерога (ПСГК-60), три сублинии перевиваемых клеток почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/13), перевиваемые клетки почки африканской зеленой мартышки (Vero) получали из коллекции клеточных культур ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ФИЦВиМ)¹¹.

Вирусы: в экспериментах использовали вирус блютанга штамма Gil-Gil, выделенный от больных овец в Кении, поступивший в 1966 году из научной ветеринарной лаборатории в Конго (Браззавиль) и референс штамм BTV-3, предоставленный The Pirbright Institute (Великобритания) в 2009 году. Используемые штаммы вируса получали из «Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в т. ч. зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных» (реестровый номер ЦКП – 441429, <http://ckp-rf.ru/ckp/441429/>).

Питательные среды и растворы: среда Игла-MEM на солевом растворе Эрла, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), фетальная сыворотка крови крупного рогатого скота (KPC) FBS (Fetal Blood Serum (БиолоТ, Россия),

0,25%-ный раствор трипсина, 0,02%-ный раствор версена, раствор антибиотика – гентамицин.

Оборудование и расходные материалы: холодильник низкотемпературный и CO₂-инкубатор фирмы Sanio (Япония); холодильник бытовой; микроскоп инвертированный OPTONID 03; бокс микробиологический «Ламинар-С»-1,2 фирмы LAMSYSTEMS; термостаты отечественные электрические; микропипетки 1- и 8-канальные с наконечниками объемом от 50 до 300 мкл («Ленпипет», Россия); флаконы пластиковые культуральные T25, T75, T175 и планшеты культуральные, 24- и 96-луночные (Corning Incorporated, США).

Восстановление и поддержание культур клеток. Восстановление культуры клеток ПС, Vero, ПСГК-60, ВНК-21/13 (три сублинии) после хранения в жидком азоте проводили по общепринятой методике. После размораживания ампул с культурами вносили 5-кратный объем питательной среды и отбирали пробы для подсчета концентрации клеток и определения их жизнеспособности по тесту витального окрашивания трипановым синим. Затем содержимое флаконов центрифугировали при 1000 об/мин в течение 15 мин. Раствор над осадком удаляли, а осадок ресуспендировали в ростовой среде (Игла-MEM с 10%-ной FBS) в таком объеме, чтобы концентрация клеток составила 150–200 тыс. кл/см³ для ПС, Vero, ПСГК-60, ВНК-21/13, затем суспензии вносили в культуральные флаконы. Через сутки инкубирования клеток проводили смену ростовой среды. Перевиваемые линии клеток ПС, Vero, ПСГК-60, ВНК-21/13 культивировали при температуре 37±0,5 °С.

Культуры пассировали методом последовательных пересевов, используя диспергирующие растворы с выбранным для каждой культуры соотношением компонентов.

Культивирование вируса. В культуральные флаконы полезной площадью 25 см² с конфлюэнтным монослоем клеток после удаления среды вносили вирусный материал в дозе 0,01–0,001 ТЦД₅₀/кл (50%-ная тканевая цитопатическая доза). Адсорбцию вируса проводили при температуре 37±0,5 °С в течение 1 часа. Затем во флаконы как с интактной, так и инфицированной культурой вносили поддерживающую среду DMEM с 2%-ной фетальной сывороткой КРС. Длительность культивирования зависела от характера поражения монослоя.

¹¹Юрков С. Г., Зуев В. В., Сидоров С. И., Кушнир С. Д., Смыслова Н. Ю., Неверовская Н. С. и др. Каталог коллекции клеточных культур ВНИИВВиМ. Покров: ВНИИВВиМ РАСХН, 2000. 78 с.
DOI: <https://elibrary.ru/item.asp?id=21632428> EDN: SFJYIP

Определение инфекционной активности вирусного материала. Инфекционную активность вируса исследовали в клеточной культуре Vero, выращенной в 24-луночных планшетах. Посевная концентрация клеток составила 100 тыс. кл/см³. Готовили десятикратные разведения вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) с 10⁻¹ по 10⁻⁷, и разведения 10⁻³ по 10⁻⁷ вносили по 1,0 см³ в лунки с культурой клеток. Для каждого разведения использовали по 4 лунки. Планшеты инкубировали при температуре 37±0,5 °С в атмосфере с повышенным содержанием (до 5 %) СО₂ и относительной влажности 95 %. Результаты титрования учитывали в течение 7 дней по развитию цитопатического эффекта. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в ТЦД₅₀/см³.

Типирование вируса блютанга штамма Gil-Gil в реакции нейтрализации. Серотип штамма определяли в реакции нейтрализации по общепринятой методике. В лунки 96-луночной панели вносили среду Игла-МЕМ без сыворотки в объеме 100 мкл. Затем, в первые 4 ряда вносили референс сыворотку к вирусу блютанга 3-го серотипа в разведении 1:40, далее в 4 ряда – отрицательную сыворотку овец, не содержащую антитела к вирусу блютанга. Отдельно готовили разведение вируса блютанга штамма Gil-Gil, так чтобы в инокуляте содержалось по 100 инфекционных единиц, и вносили по 100 мкл в каждую лунку с сыворотками. Смесь сыворотки с вирусом инкубировали при температуре 4 °С в течение суток. Затем смесь переносили в 96-и луночную панель с однослойным монослоем клеток Vero. Параллельно вносили вирус в качестве контроля, который использовали для смеси с сывороткой и также проводили титрование этой дозы вируса. Учет результатов проводили на 2-3 сутки при проявлении цитопатического действия (ЦПД) вируса в клетках с отрицательной сывороткой крови.

Секвенирование вируса. Нуклеотидное секвенирование проводили с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров [16]. Выделение специфических продуктов амплификации из агарозного геля осуществляли коммерческим набором для выделения нуклеиновых кислот DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific, США) с последующей реамплификацией фрагментов с помощью компонентов «Big Dye v.3.1. Terminator» (Applied Biosystems, США). Реакцию с 2'-, 3'-дидезок-

синуклеозидтрифосфатами проводили с прямым и обратным праймерами при следующих температурных режимах: 95 °С – 10 сек, 50 °С – 20 сек, 60 °С – 4 мин (25 циклов). Секвенирование проводили в автоматическом анализаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, США).

Для просмотра и анализа последовательностей ДНК использовали компьютерные программы Sequencing Analysis и Sequence Scanner («Applied Biosystems», США).

Филогенетическое древо строили методом Maximum Likelihood, расчет эволюционных дистанций осуществляли по алгоритму Tamura-Nei, достоверность распределения последовательностей по группам проверяли путем бутстрэп-анализа со 1000-кратным повторением.

Результаты и их обсуждение. В соответствии с рекомендациями Всемирной организации охраны здоровья животных (ВОАН) по болезни блютанга [17] для репродукции вируса использовали культуры клеток ВНК-21/13 и Vero, а также дополнительно ПСГК-60 и ПС, отобранные на основании данных, полученных при разработке технологии изготовления поливалентной вакцины против блютанга [18].

Штамм Gil-Gil вируса блютанга по паспортным данным при выделении из патматериала культивировали в первичной культуре клеток почки ягнёнка (ПЯ), поэтому была проведена его адаптация к выращиванию в перевиваемых линиях клеток. В качестве контрольного штамма при культивировании и оценке вирусрепродуцирующих свойств клеток использовали референс-штамм BTV-3.

Характер и время проявления видимого поражения клеток вирусом были различны. В 2-х сублиниях клеток ВНК-21/13 (монослойной и монослойно-суспензионной) развитие ЦПД происходило за 2 суток культивирования (рис. 1 а, б, в).

Развитие ЦПД вируса выражалось в округлении клеток, их хаотичном скоплении по всему инфицированному монослою с последующим его разрежением вследствие дегенерации и отслоения клеток.

В сублинии клеток ВНК-21/13 («Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов» (ВГНКИ)) поражение монослоя было единичное и слабо выраженное (рис. 2).

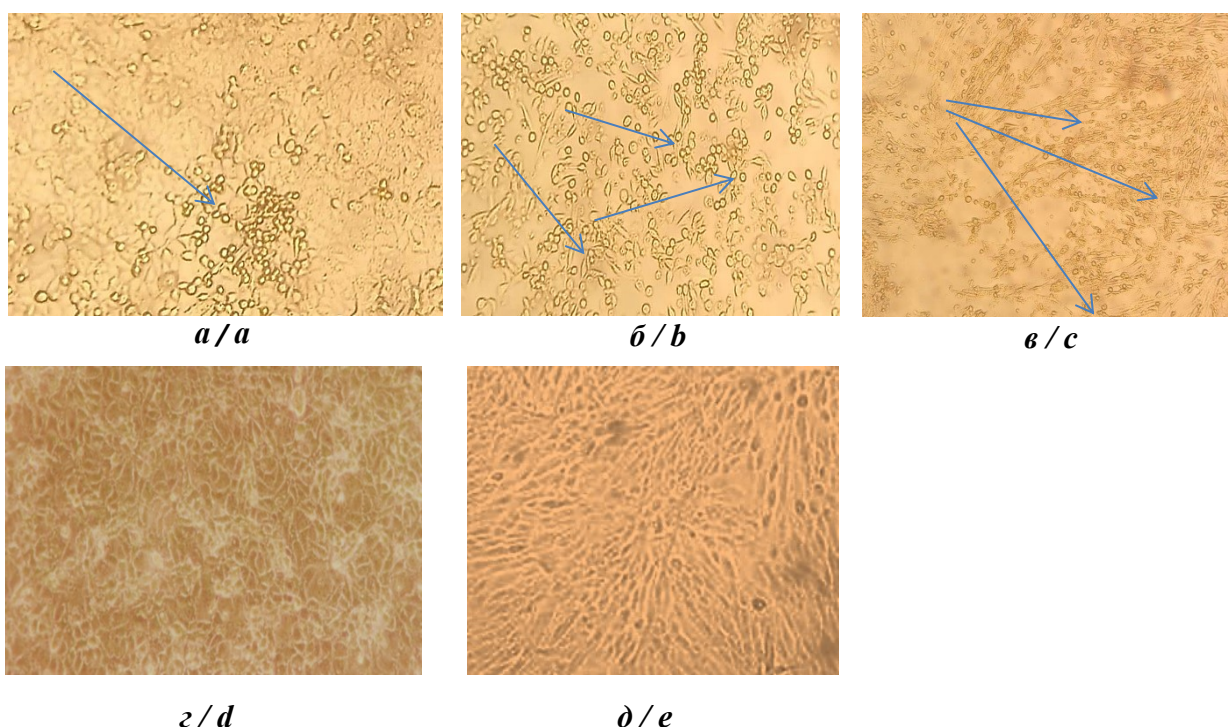


Рис. 1. Картина поражения культуры клеток: *а* и *б* – характер развития ЦПД вируса блютанга в монослойно-суспензионной культуре клеток ВНК-21/13 (1 и 2 сутки); *в* – развитие ЦПД вируса блютанга в монослойной культуре клеток ВНК-21/13; *г* – контрольная культура клеток ВНК-21/13 (монослойно-суспензионная); *д* – контрольная культура клеток ВНК-21/13 (монослойная) Ув.×100 /

Fig. 1. Picture of cell culture damage: *a* and *b* – pattern of bluetongue virus CPE development in monolayer suspension culture of VNK-21/13 cells (1 and 2 days); *c* – development of bluetongue virus CPE in monolayer cell culture of VNK-21/13 cells; *d* – control cell culture VNK-21/13 (monolayer suspension), *e* – Control cell culture VNK-21/13 (monolayer). Magnification×100

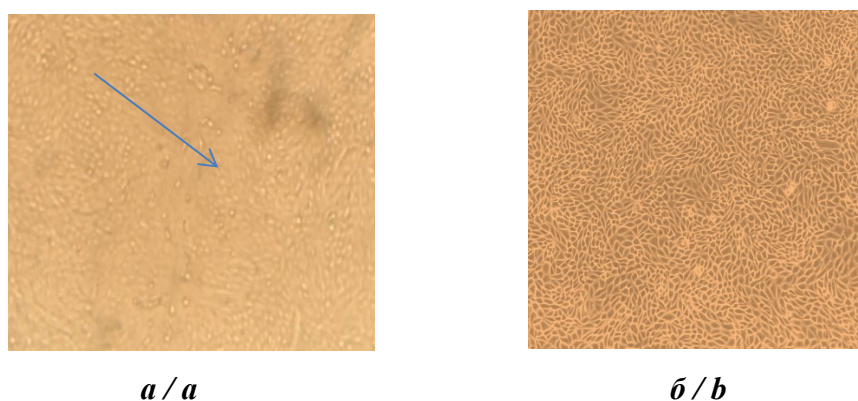


Рис. 2. Картина поражения культуры клеток: *а* – Единичное поражение клеток культуры ВНК-21/13(ВГНКИ) вирусом блютанга; *б* – Контрольная культура клеток ВНК-21/13 (ВГНКИ); Ув.×100 /

Fig. 2. Picture of cell culture damage: *a* – Single infection of culture VNK-21/13(VGNKI) cells by bluetongue virus; *b* – Control cell culture VNK-21/13(VGNKI); Magnification×100

Различный характер проявления ЦПД вируса блютанга штамма Gil-Gil в трёх сублиниях культуры клеток ВНК-21/13 указывает на значительную гетерогенность их популяционного состава по клеткам-мишеням к данному вирусу, несмотря на то, что сублинии принадлежали к одному виду культуры клеток, в данном случае к ВНК-21/13. Сходные данные были

ранее получены при культивировании вируса бешенства в различных сублиниях клеток ВНК-21/13 [19].

В культуре клеток ПСГК-60 репродукция вируса в течение 2-х суток сопровождалась образованием тяжей из округлых клеток, разрывением клеточного пласта и деструкцией клеточного монослоя (рис. 3, *а*).

Идентичное поражение наблюдали и при инфицировании этой же культуры референс-штаммом вируса блютанга 3-го серотипа (рис. 3, б).

В культуре клеток ПС вирус блютанга штамма Gil-Gil на 4 сутки культивирования вызывал поражение монослоя, характеризовавшееся скоплением обособленных клеток, их округлением и разрушением клеточного пласта (рис. 4).

Основываясь на рекомендации ВОАН, для получения сопоставимых данных оценки вирусорепродуцирующих свойств различных клеточных культур определение инфекционной активности вирусных материалов проводили только в культуре клеток Vero (табл.). Характер поражения культуры клеток почки африканской зелёной мартышки вирусом блютанга двух штаммов был идентичен (рис. 5).

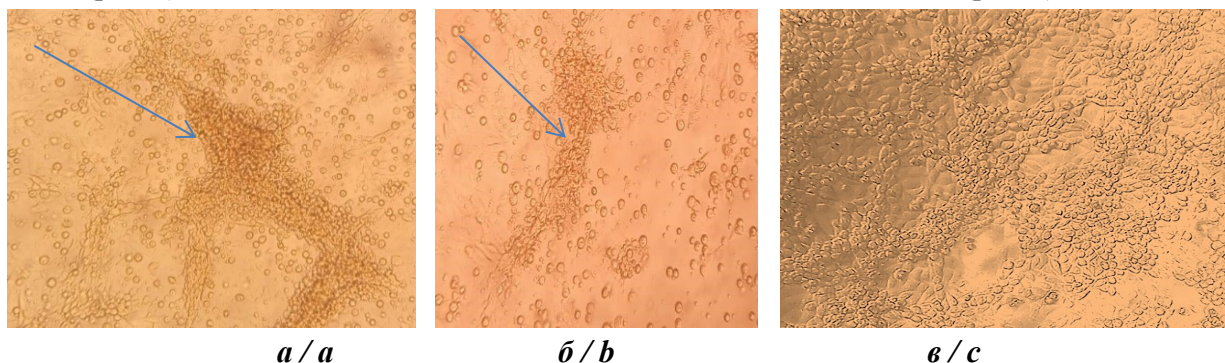


Рис. 3. Картина поражения культуры клеток: а – Характер развития ЦПД вируса блютанга в культуре клеток ПСГК-60, штамм Gil-Gil; б – референс-штамм BTV-3; в – Контрольная культура клеток ПСГК Ув.×100 /

Fig. 3. Picture of cell culture damage: a – Pattern of bluetongue virus CPE development in PSGC-60 cell culture, Gil-Gil strain; b – reference strain BTV-3; c – Control cell culture PSGC-60; Magnification×100

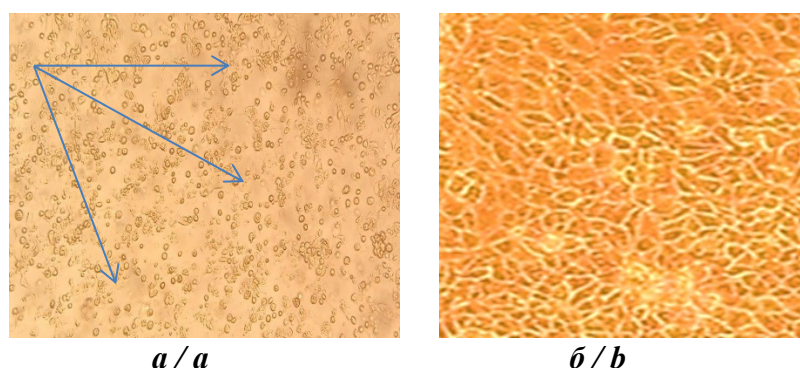


Рис. 4. Картина поражения культуры клеток: а – характер развития ЦПД вируса блютанга штамм Gil-Gil в культуре клеток почки сайги; б – контрольная культура клеток почки сайги Ув.×100 /

Fig. 4. Picture of cell culture damage: a – developmental pattern of CPE of bluetongue virus strain Gil-Gil in saiga kidney cell culture; b – control saiga kidney cell culture; Magnification×100

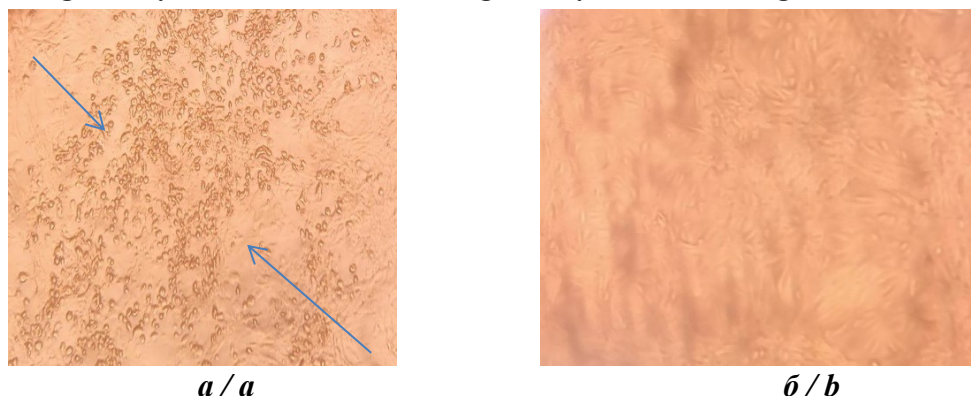


Рис. 5. Картина поражения культуры клеток: а – Характер развития ЦПД вируса блютанга 3 серотипа в культуре клеток Vero; б – Контрольная культура клеток Vero Ув.×100 /

Fig. 5. Picture of cell culture damage: a – The character of development of CPE of bluetongue virus serotype 3 in Vero cell culture; b – Control cell culture Vero; Magnification×100

Таблица – Инфекционная активность вируса блютанга штамма Gil-Gil и референс штамма BTV-3, полученного в различных перевиваемых линиях клеток (n = 5) /

Table – Infectious activity of bluetongue virus strain Gil-Gil and reference strain BTV-3 produced in different transplanted cell lines (n = 5)

Штамм вируса блютанга / Strain of bluetongue virus	Титр вируса ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) в культуре клеток Vero, полученных в перевиваемых клетках / Virus titer ($\lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$) in Vero cell culture obtained in transfecting cells			
	ВНК-21/13 (монослойно-суспензионная) / VNK-21/13 (monolayer suspension)	ВНК-21/13 (монослойная) / VNK-21/13 (monolayer)	ПСГК-60 / PSGC-60	ПС / PS (saiga kidney cell)
Gil-Gil	7,50±0,15	5,50±0,12	7,25±0,22	6,50±0,16
BTV-3	7,50±0,17	6,00±0,13	6,7±0,14	5,75±0,10

Примечания: перевиваемые линии клеток: ВНК-21/13 – почки новорожденного сирийского хомячка; ПСГК-60 – почки сибирского горного козерога; ПС – почки сайги; Vero – почки африканской зеленой мартышки /

Notes: transferable cell lines: transplanted kidney cell lines – VNK-21/13 of the newborn Syrian hamster, PSGC-60 – transplanted kidney cell lines of the Siberian ibex, PS – transplanted kidney cell lines of the saiga, Vero – transplanted kidney cells of the African green monkey

Представленные в таблице результаты показали, что наибольшей перmissивностью к исследуемым штаммам вируса обладали монослойно-суспензионная линия клеток ВНК-21/13 и культура клеток ПСГК-60. Ранее исследователями было показано, что данные культуры клеток перmissивны к вирусу блютанга 4, 9, 12, 16-го серотипов, где вирус накапливался от 5,75 до 6,50 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ [20]. В нашей работе накопление штамма Gil-Gil вируса блютанга в монослойно-суспензионной линии ВНК-21/13 и культуре клеток ПСГК-60 было значительно выше – 7,25–7,50 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Учитывая результаты вирусрепродуцирующей активности клеточных культур и их биотехнологические характеристики (способность росту в суспензии) для дальнейшей работы, как перспективные для крупномасштабного культивирования вируса блютанга штамма Gil-Gil, определены монослойно-суспензионные линии клеток ВНК-21/13 и ПСГК-60.

При типировании штамма Gil-Gil в реакции нейтрализации с использованием референс-сыворотки к 3-му серотипу вируса блютанга установлено, что данная референс-сыворотка нейтрализовала штамм Gil-Gil вируса блютанга в титре 1:40 при дозе вируса 100 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$. Таким образом, в реакции нейтрализации с референс-сывороткой подтверждена принадлежность штамма Gil-Gil вируса блютанга к 3-му серотипу.

Установлено, что аминокислотная последовательность белка VP2 коррелирует с резуль-

татами определения серотиповой принадлежности вируса блютанга [21]. Нуклеотидная последовательность 2-го сегмента генома вируса блютанга позволяет не только предопределить серотип вируса, но и определить другие его характеристики, например, топотип или нуклеотип.

С целью определения серотипа штамма Gil-Gil и подтверждения принадлежности BTV-3 к 3-му серотипу вируса блютанга было проведено секвенирование и филогенетический анализ последовательности 2-го сегмента генома вируса.

В результате сравнительного анализа с последовательностями 2-го сегмента штаммов/изолятов вируса блютанга, представленных в базе данных GenBank, было установлено, что штаммы Gil-Gil и BTV-3 относятся к 3-му серотипу и западному топотипу вируса блютанга (рис. 6).

Сравнительный анализ гомологии установленной последовательности штамма BTV-3 и опубликованных в базе данных GenBank продемонстрировали 100%-ную гомологию нуклеотидной последовательности штамма BTV-3 с последовательностью 2-го сегмента штамма RSArtrr/3 вируса блютанга 3-го серотипа (KP821039.1), гомология с последовательностями других серотипов не превышала 95 %.

Нуклеотидные последовательности штамма Gil-Gil имели 97,86 % степень гомологии с наиболее близкородственным штаммом RSArtrr/3, в то время как степень их гомологии с последовательностями других серотипов не превышала 95,0 %.

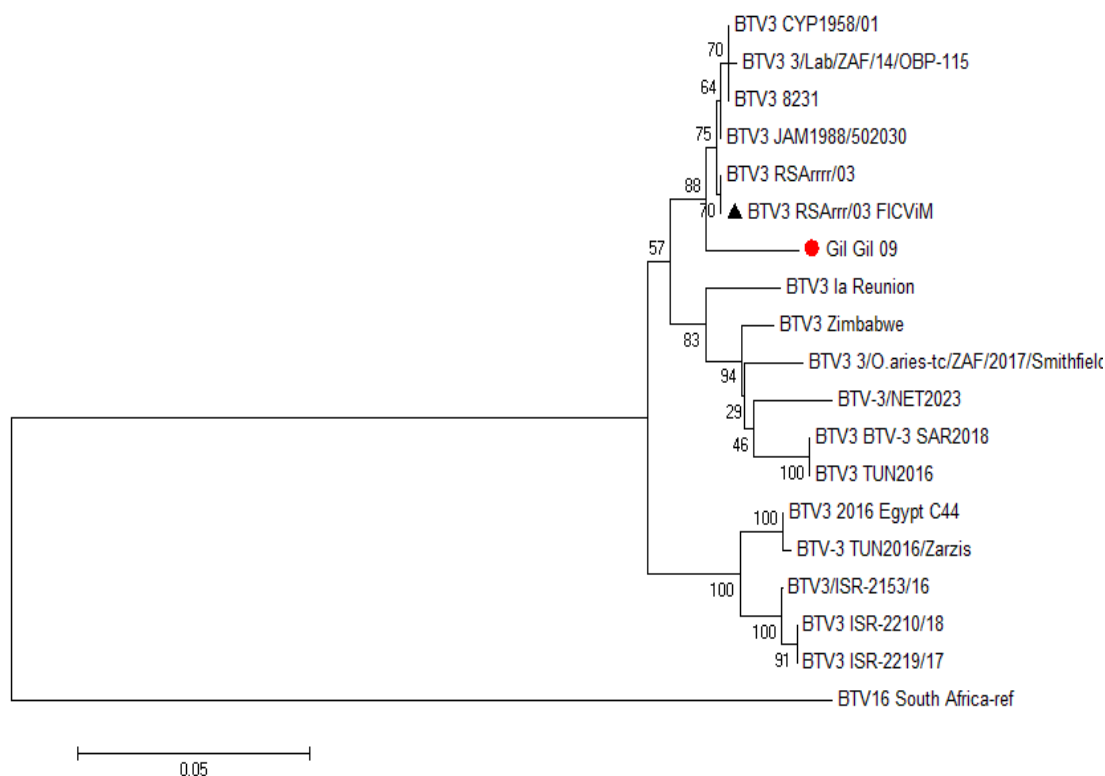


Рис. 6. Дендрограмма, построенная по методу Maximum Likelihood, показывающая связи между последовательностями 2 сегмента штаммов/изолятов ВБ, представленных в базе данных GenBank, и штаммами Gil-Gil, BTV3, полученными из ГК ФГБНУ ФИЦВиМ /

Fig. 6. Maximum Likelihood dendrogram showing the relationships between the sequences of segment 2 of BTV strains/isolates represented in the GenBank database and Gil-Gil, BTV3 strains obtained from the GC of FRCVM

Заключение. В результате проведенных исследований определены две наиболее перmissive клеточные линии ВНК-21/13 и ПСГК-60 для культивирования вируса блютанга штамма Gil-Gil. Выбранные клеточные линии способны к культивированию не только стационарным, роллерным, но и суспензионными методами, т. е. они являются перспективными клеточными субстратами для крупномасштабного производства вируса при необхо-

димости изготовления вакцины. Использование для титрования единой клеточной линии Vero позволяет стандартизованно оценивать накопление вируса в различных клеточных культурах. С помощью «золотого стандарта» – реакции нейтрализации и методами молекулярно-генетических исследований подтверждено, что штамм Gil-Gil вируса блютанга относится к 3-му серотипу.

References

1. Maclachlan N. J. Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. Preventive Veterinary Medicine. 2011;102(2):107–111. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.005>
2. Ries C., Vögtlin A., Hüsey D., Jandt T., Gobet H., Hilbe M. et al. Putative Novel Atypical BTV Serotype '36' Identified in Small Ruminants in Switzerland. Viruses. 2021;13(5):721. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13050721>
3. MacLachlan N. J. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 1994;17(3-4):197–206. DOI: [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(94\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0147-9571(94)90043-4)
4. Lorusso A., Sghaier S., Di Domenico M., Barbria M. E., Zaccaria G., Megdich A. et al. Analysis of bluetongue serotype 3 spread in Tunisia and discovery of a novel strain related to the bluetongue virus isolated from a commercial sheep pox vaccine. Infection, Genetics and Evolution. 2018;59:63–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.01.025>
5. Cappai S., Rolesu S., Loi F., Liciardi M., Leone A., Marcacci M. et al. Western Bluetongue virus serotype 3 in Sardinia, diagnosis and characterization. Transboundary and Emerging Diseases. 2019;66:1426–1431. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13156>

6. Aguilar-Vega C., Fernández-Carrión E., Sánchez-Vizcaíno J. M. The possible route of introduction of bluetongue virus serotype 3 into Sicily by windborne transportation of infected *Culicoides* spp. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2019;66:1665–1673. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13201>
7. Golender N., Klement E., Kovtunen A., Even-Tov B., Zamir L., Tiomkin E. et al. Comparative Molecular and Epidemiological Analyses of Israeli Bluetongue Viruses Serotype 1 and 9 Causing Outbreaks in 2018–2020. *Microorganisms*. 2023;11(2):366. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020366>
8. Holwerda M., Santman-Berends I., Harders F., Engelsma M., Vloet R., Dijkstra E. et al. Emergence of Bluetongue Virus Serotype 3, the Netherlands, September 2023. *Emerging Infectious Diseases*. 2024;30(8):1552–1561. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid3008.231331>
9. Boender G.-J., Hagenaars T. J., Holwerda M., Spiereburg M. A. H., van Rijn P. A., van der Spek A. N., Elbers A. R. W. Spatial transmission characteristics of the bluetongue virus serotype 3 epidemic in the Netherlands, 2023. *Viruses*. 2024;16(4):625. DOI: <https://doi.org/10.3390/v16040625>
10. King S., Nicholls M., Scales J., Gubbins S., Pearce-Kelly P., Saverimuttu S. et al. The efficacy of vector-proof accommodation for the protection of livestock against *Culicoides* biting midges. *Parasites & Vectors*. 2025;18:108. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-025-06736-9>
11. Van den Brink K. M. J. A., Santman-Berends I. M. G. A., Harkema L., Scherpenzeel C. G. M., Dijkstra E., Bisschop P. I. H. et al. Bluetongue virus serotype 3 in ruminants in the Netherlands: Clinical signs, seroprevalence and pathological findings. *VetRecord*. 2024;195(4):e4533. DOI: <https://doi.org/10.1002/vetr.4533>
12. Voigt A., Kampen H., Heuser E., Zeiske S., Hoffmann B., Höper D. et al. Bluetongue Virus Serotype 3 and Schmallenberg Virus in *Culicoides* Biting Midges, Western Germany, 2023. *Emerging Infectious Diseases*. 2024;30(7):1438–1441. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid3007.240275>
13. Voigt A., Kampen H., Heuser E., Zeiske S., Hoffmann B., Höper D. et al. Emergence of bluetongue virus serotype 3 in western Germany, October 2023, and *ad-hoc* monitoring in *Culicoides* biting midges. *BioRxiv*. 2024. 8 p. DOI: <https://doi.org/10.1101/2024.02.26.582175>
14. Newbrook K., Obishakin E., Jones L. A., Waters R., Ashby M., Batten C., Sanders C. Clinical disease in British sheep infected with an emerging strain of bluetongue virus serotype 3. *VetRecord*. 2025;196(4):e4910. DOI: <https://doi.org/10.1002/vetr.4910>
15. Barros S. C., Henriques A. M., Ramos F., Luís T., Fagulha T., Magalhães A. et al. Emergence of Bluetongue Virus Serotype 3 in Portugal (2024). *Viruses*. 2024;16(2):1845. DOI: <https://doi.org/10.3390/v16121845>
16. Golender N., Bumbarov V., Eldar A., Lorusso A., Kenigswald G., Varsano J. S., Savini G. Bluetongue Serotype 3 in Israel 2013–2018: Clinical Manifestations of the Disease and Molecular Characterization of Israeli Strains. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7:00112. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00112>
17. WOAHE Terrestrial Manual 2021. Chapter 3.1.3. – Bluetongue (infection with bluetongue virus). 2021. pp. 1–20. URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.01.03_BLUETONGUE.pdf
18. Бальшева В. И., Нестеров Е. А., Луницин А. В., Живодеров С. П., Горшкова Т. Ф., Лаптева О. Г. и др. Эффективность трехвалентной инактивированной вакцины против блютанга для мелкого и крупного рогатого скота. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2013;(4):49–51. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=19124962> EDN: QCNHQP
19. Balysheva V. I., Nesterov E. A., Lunitsin A. V., Zhivoderov S. P., Gorshkova T. F., Lapteva O. G. et al. Efficacy of a trivalent inactivated vaccine against bluetongue cattle and small ruminants. *Doklady Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk* = Reports of the Russian Academy of agricultural sciences. 2013;(4):49–51. (In Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=19124962>
20. Лаптева О. Г., Филатова М. А., Нестеров Е. А. Репродукция вирусов блютанга и бешенства в различных сублиниях клеток ВНК-21/13. Актуальные проблемы инфекционной патологии ветеринарной медицины: мат.-лы конф. молодых ученых. Псков: ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, 2009. С. 200–206.
21. Lapteva O. G., Filatova M. A., Nesterov E. A. Reproduction de virus de Bluetongue et de rage dans diverses sous-lignées de cellules de VNK-21/13. Problèmes actuels de pathologie infectieuse de la Médecine vétérinaire: Jeunes scientifiques. Pskov: *VNIi veterinarnoy virusologii i mikrobiologii*, 2009. pp. 200–206.
22. Бальшева В. И., Сливко В. В., Жестерев В. И. Культивирование вируса блютанга в культурах клеток животных. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2002;(6):46–48.
23. Balysheva V. I., Slivko V. V., Zhesterev V. I. Culture du virus de Bluetongue dans des cultures de cellules animales. *Doklady Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk* = Reports of the Russian Academy of agricultural sciences. 2002;(6):46–48. (In Russ.).
24. Maan S., Maan N. S., Samuel A. R., Rao S., Attoui H., Mertens P. P. C. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *Journal of General Virology*. 2007;88(2):621–630. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.82456-0>

Сведения об авторах

✉ **Лаптева Оксана Георгиевна**, кандидат вет. наук, старший научный сотрудник лаборатории лекарственных средств для животных, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», ул. Академика Бакулова, стр. 1, пос. Вольгинский, Петушинский р-он, Владимирская обл., Российская Федерация, 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4435-8368>, e-mail: oksana-lapteva@rambler.ru

Луницин Андрей Владимирович, кандидат вет. наук, зам. директора по производству и качеству, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», ул. Академика Бакулова, стр. 1, пос. Вольгинский, Петушинский р-он, Владимирская обл., Российская Федерация, 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5043-446X>

Чадаева Анна Александровна, кандидат биол. наук, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», ул. Академика Бакулова, стр. 1, пос. Вольгинский, Петушинский р-он, Владимирская обл., Российская Федерация, 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9615-9758>

Поволяева Ольга Сергеевна, кандидат биол. наук младший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», ул. Академика Бакулова, стр. 1, пос. Вольгинский, Петушинский р-он, Владимирская обл., Российская Федерация, 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5635-6677>

Кольцов Андрей Юрьевич, кандидат биол. наук ведущий научный сотрудник лаборатории геномики вирусов, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», ул. Академика Бакулова, стр. 1, пос. Вольгинский, Петушинский р-он, Владимирская обл., Российская Федерация, 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3294-6602>

Юрков Сергей Григорьевич, доктор биол. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», ул. Академика Бакулова, стр. 1, пос. Вольгинский, Петушинский р-он, Владимирская обл., Российская Федерация, 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6801-9424>

Information about the authors

✉ **Oksana G. Lapteva**, PhD in Veterinary Science, senior researcher, the Laboratory of Drugs for Animals, Federal Research Center for Virology and Microbiology, Akademik Bakulov str., building 1, Volginsky settlement, Vladimir region, Russian Federation 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4435-8368>, e-mail: oksana-lapteva@rambler.ru

Andrey V. Lunitsin, PhD in Veterinary Science, Deputy Director for Production and Quality, Federal Research Center for Virology and Microbiology, Akademik Bakulov str., building 1, Volginsky settlement, Vladimir region, Russian Federation 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5043-446X>

Anna A. Chadaeva, PhD in Biological Science, junior researcher, the Laboratory of Molecular Virology, Federal Research Center for Virology and Microbiology, Akademik Bakulov str., building 1, Volginsky settlement, Vladimir region, Russian Federation 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9615-9758>

Olga S. Povolyaeva, PhD in Biological Science, junior researcher, the Laboratory of Molecular Virology, Federal Research Center for Virology and Microbiology, Akademik Bakulov str., building 1, Volginsky settlement, Vladimir region, Russian Federation 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5635-6677>

Andrey Yu. Koltsov, PhD in Biological Science, leading researcher, the Laboratory of Virus Genomics, Federal Research Center for Virology and Microbiology, Akademik Bakulov str., building 1, Volginsky settlement, Vladimir region, Russian Federation 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3294-6602>

Sergey G. Yurkov, DSc in Biological Science, professor, chief researcher, the Laboratory of Molecular Virology, Federal Research Center for Virology and Microbiology, Akademik Bakulov str., building 1, Volginsky settlement, Vladimir region, Russian Federation 601125, e-mail: info@ficvim.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6801-9424>

✉ – Для контактов / Corresponding author