

МРНТИ: 34.25.01

Д.И. МҰЗАРАП¹, Ш.Т. ТАБЫС¹, Н.А. СӘРСЕНҚҰЛОВА¹, М.К. КЕНЖЕБАЕВА¹,
М. МАМБЕТАЛИЕВ¹, А.К. НАХАНОВ¹, К.Д. ЖУГУНИСОВ¹, О. ЭРГАНИШ²

¹Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
пгт. Гвардейский, Казахстан

²Сельчукский университет, Конья, Турция

*e-mail: m.dias00@mail.ru

ОСВЕЖЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОГО ШТАММА ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ПРОВЕРКА ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ НА ЦЕЛЕВЫХ ЖИВОТНЫХ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.11

Аннотация

Поддержание штаммов в рабочем состоянии, сохранение их ценных свойств являются важными условиями практически любой работы с микроорганизмами – от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепаратов. В связи с этим в данной статье представлены результаты исследования по освежению штамма, возбудителя одного из таких инфекционных заболеваний, как парагриппа-3 крупного рогатого скота (ПГ-3 КРС) в культуре клеток ПТ и изучение патогенных свойств штамма на естественно восприимчивых животных. В результате освежения вируса в культуре клеток инфекционная активность образцов штамма составила в пределах от $6,87 \pm 0,17$ до $7,33 \pm 0,14$ lg ТЦД₅₀/мл. При изучении патогенности освеженного штамма на животных установлено, что у телят, зараженных освеженным вирусом, с 3-х по 9-е сутки наблюдались клинические признаки характерные для ПГ-3 КРС, такие как повышение температуры тела до $+41,2^\circ\text{C}$, потеря аппетита, а также истечение из носа и глаз. Вирусологические и серологические исследования назальных смывов и сывороток крови, отобранных у телят, подтверждали наличие вируса и формирование к нему вируснейтрализующих антител в титрах от 1:64 до 1:256. После проведенных работ вирусную суспензию штамма лиофилизировали, проверяли на стерильность и биологическую активность для дальнейшего хранения и исследования.

Ключевые слова: вирус ПГ-3 КРС, освежение штамма, клинические признаки, защитная среда, лиофилизированные ампулы.

Вирусы парагриппа-3 представляют собой одноцепочечные РНК-вирусы с оболочкой, которые относятся к семейству *Paramyxoviridae*, подсемейству *Orthoparamyxovirinae*, роду *Respirovirus*, виду *Bovine respirovirus-3* [1,2]. Возбудитель данной болезни состоит из семи белков и имеет геном с отрицательной полярностью, состоящий из 15 000 нуклеотидов в длину [3]. Данное заболевание распространено во многих странах, возбудители его представляет собой вирусы с липидной оболочкой со спикулами гликопротеинов, обладающие гемоагглютинирующей и гемолитической активностью [9]. Вирусы парагриппа-3 связываются и реплицируются в реснитчатых эпителиальных клетках верхних и нижних дыхательных путей и связаны с широким спектром заболеваний, а степень инфекции коррелирует с пораженным местом [4-7]. Порой респираторные проявления включают апноэ, брадикардию, паротит, респираторный дистресс-синдром и редко диссеминированную инфекцию [8].

Вирус ПГ-3 КРС вызывает серьезные респираторные инфекции у копытных и может вызывать заболевание отдельно или в сочетании с другими патогенами, в основном вирусами, бактериями и микоплазмами [10]. Считается, что антитела к ПГ-3 КРС выявлены почти у 80% молочного и мясного скота, что может демонстрировать широкое распространение вируса [11].

Вирус ПГ-3 КРС был впервые идентифицирован в Соединенных Штатах Америки в 1959 году, когда вирус был выделен из носовых мазков телят с такими симптомами, как

отсутствие аппетита, кашель, выделения из носа, другие респираторные признаки, лихорадка, слезотечение и конъюнктивит [12]. Хотя ПГ-3 КРС обычно обнаруживается у крупного рогатого скота, сообщалось о случаях заражения мелких жвачных животных, буйволов, яков, верблюдовых, лошадей, свиней, собак и обезьян, а также людей [13-17]. Заболеваемость и смертность могут быть выше в случаях коинфекции с другими патогенами, поскольку важной ролью респираторных вирусных возбудителей КРС является иммуносупрессия [18,19]. ПГ-3 КРС в основном поражает КРС в возрасте от двух до шести месяцев, вероятно, из-за снижения пассивного материнского иммунитета животного, хотя было зарегистрировано несколько вспышек у более молодых животных [20]. Более того, дополнительные стрессы, вызванные более суровым климатом во многих странах, наряду с увеличением затрат на лечение, низкими показателями роста голов и снижением стоимости туш наносят значительный экономический ущерб молочным и мясным фермам, составляющим примерно 1 миллиард долларов в год [21].

В коллекции микроорганизмов РГП НИИПББ МЗ РК хранятся и поддерживаются возбудители ряда инфекций, используемые для разработки профилактических и диагностических средств против опасных инфекций с целью обеспечения биологической безопасности на территории Республики Казахстан. Эти музейные штаммы микроорганизмов периодически подвергаются проверке остаточной биологической активности, а также по необходимости освежаются на чувствительных системах культивирования.

В этой связи целью наших исследований является проверка остаточной биологической активности и сохранение патогенных свойств образцов штамма вируса ПГ-3 КРС за период хранения в условиях коллекции.

Материалы и методы исследования

1.1. Вирус и клеточная культура

Для проведения исследований были использованы 2 образца штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС, хранящиеся в условиях коллекции в течение 30 и 20 лет (1993 г. и 2003 г. изготовления). Испытуемые образцы штамма вируса хранились в лиофилизированном состоянии под вакуумом с защитной питательной средой, состоящей из 5 % пептона и 3 % сахарозы. Для их освежения и определения их биологической активности, согласно паспортным данным, была использована первично трипсинизированная культура клеток почки телят (ПТ). Клеточная культура выращена в питательной среде DMEM с содержанием 10 % фетальной сыворотки крови КРС. Определение их остаточной биологической активности проводили согласно методике [22].

1.2. Освежение патогенного вируса ПГ-3 КРС

Для освежения исследуемого вируса образцы штамма «Белорусский» наработали по общепринятой методике [16, 23] в культуре клеток ПТ. Для определения биологической активности полученных вирусосодержащих суспензий (ВСС) приготовили разведения начиная с 10^{-1} до 10^{-8} в 3-повторностях и разлили в 96-луночные культуральные планшеты с монослоем культуры клеток ПТ.

1.3. Опыты на целевых животных

Для оценки патогенных свойств штамма нами были проведены опыты на целевых животных в специальных помещениях-вивариях, которые соответствуют условиям биологической безопасности (ABSL-2) для окружающей среды и персонала. Перед опытом были выбраны 4 головы 4-6 месячных телят серонегативных к вирусу ПГ-3 КРС. Серонегативность КРС к данному вирусу была определена в реакции нейтрализации (РН) с постоянной дозой вируса и разными разведениями исследуемой сыворотки крови, согласно методике [24,25]. До начала опыта животных выдерживали на карантине в течение 14 дней.

Заражение было проведено с использованием ингаляционного аппарата (ИНГАЛЯТОР FLEXINEB E3 2020 MODEL), как показаны на рисунке 1.



Рисунок 1 - Аэрозольное заражение телят вирулентным вирусом ПГ-3 КРС с помощью ингалятора

Для заражения надевали вышеуказанный специальный ингалятор на морду животных, заливали в резервуар разведенный вирус в объеме 5 мл и выдержали 15 мин до полного распыления вируса. Заражение телят вирусом ПГ-3 КРС проводилось освеженным на культуре клеток ПТ материалом 5 пассажа штамма «Белорусский» (от 29.12.1993 г.). После заражения каждый теленок содержался отдельно в изолированном боксе в течение 14 суток.

За весь период эксперимента подопытные животные в карантине имели свободный доступ к воде и корму.

При использовании подопытных животных для научно-исследовательских работ были строго соблюдены нормы биоэтики, согласно международным правилам и руководству по уходу и использованию лабораторных животных [26-29], а протокол эксперимента был одобрен Комитетом по этике экспериментов на животных RIBSP Комитета по науке Министерства образования и науки Республики Казахстан (номера разрешений: KZ0522/013).

Во время опыта за животными устанавливали наблюдение, регулярно фиксируя клинические проявления характерные для ПГ-3 КРС. В течение всего периода опыта ежедневно регистрировалось общее состояние, клинические признаки, аппетит и температура тела. У заболевших животных отобрали назальные смывы для выявления наличия вируса ПГ-3 КРС в реакции гемагглютинации (РГА) согласно методике [30]. В конце опыта у животных отбирали сыворотки крови для проверки формирования вируснейтрализующих антител к вирусу ПГ-3 КРС.

1.4. Лиофилизация вируса ПГ-3 КРС

После вышеописанной работы к наработанной вирусосодержащей суспензии добавляли защитную питательную среду, состоящую из 5% пептона и 3% сахарозы в конечных концентрациях в соотношении 1:1, разливали по ампулам и высушивали. После сушки проверяли биологическую активность и хранили в коллекции с биологической активностью 7,25 Ig ТЦД₅₀/мл для дальнейшего исследования.

Результаты и обсуждение

2.1 Определение остаточной инфекционной активности и освежение патогенного вируса ПГ-3 КРС

Остаточная инфекционная активность двух образцов штамма «Белорусский» определена в культуре клеток ПТ и наработана вирусосодержащая суспензия с последующей проверкой ее патогенных свойств. Биологическая активность после освежения была определена по наличию характерных ЦПД в монослое культуры клеток. Результаты опыта представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Инфекционная активность образцов штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС в культуре клеток ПТ

Образцы штамма вируса ПГ-3 КРС	Исходный остаточный титр образцов штамма после хранения, lg ТЦД ₅₀ /мл	Инфекционная активность образцов штамма после освежения в культуре клеток		
		4-пассаж	5-пассаж	6-пассаж
Образец №1 от 29.12.1993г.	5,83±0,08	6,87± 0,17	7,33± 0,14	н.и.
Образец №2 от 12.03.2003г.	6,00±0,14	н.и.	7,12± 0,17	7,16± 0,38
Примечания: «н.и.» - не исследовано				

Как видно из данных таблицы 1, инфекционная активность исследуемых образцов штамма «Белорусский» несмотря на длительность хранения сохранилась довольно в высоких титрах (5,83±0,08 lg ТЦД₅₀/мл образца 29.12.1993 г. и 6,00±0,14 lg ТЦД₅₀/мл образца от 12.03.2003 г.). При проведении последовательных пассажей материалов титрования их титр к 5–6 пассажному уровню повысился до (7,12± 0,17) и (7,33± 0,14) lg ТЦД₅₀/мл.

2.2. Проверка патогенных свойств освеженного штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС на телятах.

Для проверки патогенных свойств штамма нами выбран вирусный материал 5 пассажа образца от 29.12.1993 г. изготовления, показавший более высокую инфекционную активность в культуре клеток (7,33±0,14 lg ТЦД₅₀/мл). Патогенные свойства штамма вируса ПГ-3 КРС проверяли на 4-х телятах 4-6 месячного возраста, одного из которых использовали в качестве контроля.

Наблюдение и учет результатов заражения проводились в течение всего периода опыта. За период наблюдения за инфицированными животными клинические признаки болезни наблюдались у одного теленка начиная с 3 суточного срока. При этом отмечено повышение температуры тела до +39,7 °С (рисунок 2В), потеря аппетита и истечение из носа (рисунок 2А) и глаз (рисунок 2Б). С 4-х суток эти клинические признаки болезни отмечались у остальных инфицированных телят с повышением температуры тела до +41,2 °С. Клинические признаки болезни у заболевших животных наблюдались в течение 10-11 суток.

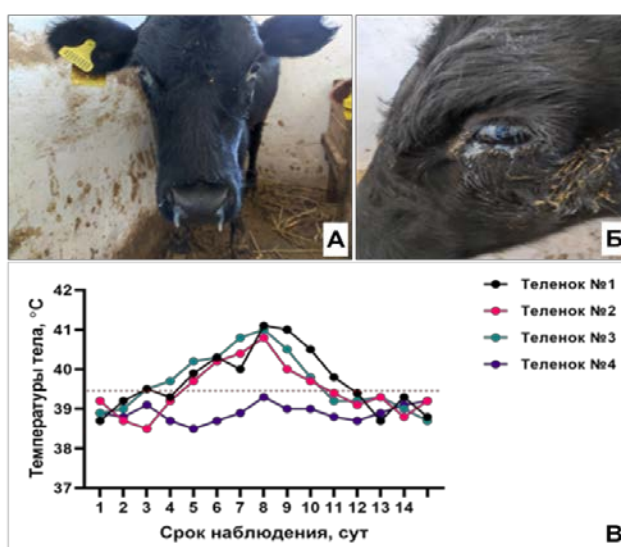


Рисунок 2 – Результаты изучения патогенности вируса ПГ-3 на естественно восприимчивых животных. А – истечение из носа; Б – истечение из глаз; В - температурная реакция животных, инфицированных штаммом «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС

С 11-12 сут. телята начали выздоравливать и их общее состояние стало удовлетворительным. На 7 сутки у заболевших телят отбирали назальные смывы для выявления наличия вируса ПГ-3 КРС в РГА и на 14 сутки - сыворотки крови для проверки наличия вируснейтрализующих антител к вирусу ПГ-3 КРС. Результаты исследований в РГА и РН представлены в таблице 2.

Таблица-2. Результаты вирусологических исследований телят, инфицированных вирусом ПГ-3 КРС

Номер теленка	Гемагглютинирующая активность вируса в РГА	Титр вируснейтрализующих антител	
		до заражения, 0 сут	после заражения, 14 сут
I	1:8	0	1:64
II	1:32	0	1:256
III	1:16	0	1:128
IV (контрольный)	0	0	0

Как видно из данных таблицы 2, в крови у всех испытуемых телят до заражения отсутствуют вируснейтрализующие антитела к вирусу ПГ-3 КРС. Проверка сыворотки крови, полученная на 14 сутки после заражения, подтвердила наличие вируснейтрализующих антител у инфицированных животных в титрах 1:64-1:256. Также пробы смывов носовой полости, отобранные на 7 сутки у инфицированных телят, показали в РГА гемагглютинацию в титрах 1:8-1:32, что подтверждает присутствие вируса в организме инфицированных животных. Результаты анализа контрольного теленка показали серонегативность к исследуемому вирусу.

После подтверждения патогенности вируса в ВСС добавили в равном объеме защитную среду и лиофилизировали, так как при лиофилизации влажность из материала удаляется без нарушения нативной структуры белков, резко замедляются или прекращаются биохимические реакции, в результате чего они становятся более устойчивыми к факторам внешнего воздействия и сохраняют первоначальные свойства в течение длительного периода хранения [31].

Вирус ПГ-3 КРС одно из давно известных и наиболее серьезных заболеваний крупного рогатого скота, которое нанесло серьезный экономический ущерб животноводству во всем мире [32]. Несмотря на широкую распространённость в популяциях КРС, в настоящее время данная недооцененная эндемичная инфекция чаще всего встречается у телят с плохим пассивным иммунитетом или распавшимися материнскими антителами.

Для ПГ-3 КРС характерно стопроцентное заболевание всего поголовья в течение 1-2 недель. Инкубационный период болезни составляет 1-5 дней. Передача возбудителя осуществляется воздушно-капельным, контактным, фекально-оральным и половым путями. Факторами передачи возбудителя являются молоко больных восприимчивых животных, сперма, корма, вода, подстилка, инвентарь и иные материально-технические средства, контаминированные возбудителем [33].

По данным литературных источников, чувствительными к вирусу ПГ-3 КРС считаются такие культуры клеток, как диплоидные культуры клеток легкого (ЛЭК) и почки эмбриона (ПЭК) коровы, перевиваемые линии почки молодого бычка (MDBK), почки теленка (ПТ) и первичная культура клеток легкого эмбриона коровы (ЛЭК) [23]. В нашем эксперименте нами была использована культура клеток ПТ – как наиболее чувствительная к данному вирусу. Культивирование вируса ПГ-3 КРС в культуре клеток ПТ вызывало ярко выраженные признаки ЦПД – формирование симпластов, удлинение клеток с образованием пустот через 48 часов и максимальное ЦПД через 72 часа после заражения. Инфекционный титр вируса достигал максимальных значений – до 10^7 ТЦД₅₀/мл. Уровень репродукции вируса ПГ-3 КРС свидетельствовал о высокой чувствительности культуры клеток ПТ к этому возбудителю. Аналогичные результаты были получены в исследованиях,

проведенных авторами в культуре клеток легкого плода КРС [34]. Многие члены семейства *Paramyxoviridae* могут вызывать этот тип морфологических изменений в культивируемых клетках, но степень образования синцитии зависит от типа клеток. Специфические изменения в монослое характеризуются вакуолизацией, гранулированием симпластов, возникающих на месте слияния нескольких клеток, формированием синцитий с несколькими ядрами (малые) и формированием большие – с несколькими десятками ядер [35].

В некоторых зарубежных литературных источниках опасно, что заражение вирусом ПГ-3 КРС проводили посредством аэрозолизации, а в двух других испытаниях вакцинировали как интраназально, так и интратрахеально [36-38]. Выполнение этих трех методов отличается тем, что они аналогичны процессу естественного заражения. Также клинические признаки после заражения схожи с естественными симптомами данного заболевания. В том числе преимущество метода инфицирования посредством аэрозолизации заключается в удобстве выполнения и эффективности, так как он основан на дисперсном распылении на сверхмалые частицы ВСС, которое дает возможность проникать во все отделы дыхательной системы. В связи с этим, нами был выбран данный метод заражения для проведения опыта на животных.

Обычно клинические проявления, такие как состоящее из лихорадки, выделений из слизистых оболочек и сухого кашля, частично сопровождаются с местными иммунодепрессивными эффектами. Инфекция ПГ-3 КРС часто осложняется коинфекцией другими респираторными вирусами и бактериями, следовательно, является важным компонентом энзоотической пневмонии у телят и комплекса респираторных заболеваний КРС на откормочных площадках. Так как исследуемый вирус чаще поражает дыхательную систему, при вскрытии удастся выявить пораженные бронхи и легкие у павших животных, как было показано авторами [39]. Активную инфекцию можно диагностировать путем выделения вируса из носовых мазков. Время отбора проб имеет решающее значение для получения окончательных результатов диагностических тестов [20].

Как известно, на длительность сохранения штаммами микроорганизмов своих иммунобиологических свойств влияют такие факторы как агрегатное состояние биоматериала, температура их хранения, состав стабилизирующей среды и др. Испытанные нами образцы штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС были изготовлены в 1993 и 2003 гг., т.е. 30 и 20 лет назад с добавлением защитных питательных сред, в состав которых входят 5 % пептона и 3 % сахарозы в конечной концентрации и хранились при минус 40 °С, что позволило довольно хорошо сохранить основные биологические свойства штамма за длительный период хранения.

С целью дальнейшего хранения штамма в ВСС добавляли защитную среду, указанную в паспорте, и штамм высушивали отработанным методом лиофильной сушки. Качество лиофильной сушки оценивали по следующим основным показателям, таким как: растворимость препарата (1-2 мин); остаточная влажность (не превышающая 1-3%) и целостность ампулы; характерная структура высушенного материала; рН среды; сохранение биологической активности, специфичности и других свойств, как указано в источнике [40].

После оценки качества освеженного и высушенного образца штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС ампулы в количестве 30 шт. заложили на хранение в коллекцию микроорганизмов.

Заключение

Результаты проведенных работ по проверке остаточной биологической активности штамма «Белорусский» вируса ПГ-3 КРС в культуре клеток и патогенных свойств на восприимчивых животных показали, что испытанные образцы штамма за период хранения (в течение 20, 30 лет) сохранили свои биологические свойства, что свидетельствует об эффективности использованной защитной среды и условий хранения. Полученные

результаты исследования позволяют хранить штамм вируса парагриппа-3 без освежения не менее 20 лет.

Благодарности

Авторы выражают благодарность к А.А. Ашимовой и К.С. Исламову за помощь в проведении научно-исследовательской работы.

Литература:

- 1 Branche, A. R., & Falsey, A. R. (2016). Parainfluenza Virus Infection. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 37(4), 538–554. (<https://doi.org/10.1055/s-0036-1584798>)
- 2 Henrickson K. J. (2003). Parainfluenza viruses. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 242–264. (<https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003>)
- 3 Spilki, F. R. (2016) 'Bovine parainfluenza virus type 3.', CABI Books. CABI International. (<https://doi.org/10.1079/9781780644172.009>)
- 4 Glezen, W. P., Frank, A. L., Taber, L. H., & Kasel, J. A. (1984). Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *The Journal of infectious diseases*, 150(6), 851–857. (<https://doi.org/10.1093/infdis/150.6.851>)
- 5 Glezen, W. P., Loda, F. A., Clyde, W. A., Jr, Senior, R. J., Sheaffer, C. I., Conley, W. G., & Denny, F. W. (1971). Epidemiologic patterns of acute lower respiratory disease of children in a pediatric group practice. *The Journal of pediatrics*, 78(3), 397–406. ([https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(71\)80218-4](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(71)80218-4))
- 6 Henrickson, K. J., Kuhn, S. M., & Savatski, L. L. (1994). Epidemiology and cost of infection with human parainfluenza virus types 1 and 2 in young children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 18(5), 770–779. (<https://doi.org/10.1093/clinids/18.5.770>)
- 7 Marx, A., Török, T. J., Holman, R. C., Clarke, M. J., & Anderson, L. J. (1997). Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. *The Journal of infectious diseases*, 176(6), 1423–1427. (<https://doi.org/10.1086/514137>)
- 8 Denny, F. W., Murphy, T. F., Clyde, W. A., Jr, Collier, A. M., & Henderson, F. W. (1983). Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics*, 71(6), 871–876
- 9 [Электрон.ресурс]. - URL: (<https://www.ivami.com/en/molecular-veterinary-microbiology/5548-bovine-parainfluenza-type-3-pi3-molecular-diagnosis-rt-pcr>)
- 10 Muftuoglu, B., Kurucay, H. N., Elhag, A. E., Yildirim, S., Cicek-Yildiz, Y., Tamer, C., Ozan, E., Sahna, K. C., Yildirim, Y., Albayrak, H., Okur-Gumusova, S., & Yazici, Z. (2021). A serosurvey for bovine respirovirus 3 in Turkish domestic ruminants: The first comparison study of A and C genotypes. *Veterinary medicine and science*, 7(5), 1625–1632. (<https://doi.org/10.1002/vms3.534>)
- 11 Figueroa-Chávez, D., Segura-Correa, J. C., García-Márquez, L. J., Pescador-Rubio, A., & Valdivia-Flores, A. G. (2012). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. *Tropical animal health and production*, 44(7), 1417–1421. (<https://doi.org/10.1007/s11250-012-0081-9>)
- 12 Gueriche, A., Galiullin, A. K., Gumerov, V. G., Karimullina, I. G., & Shaeva, A. Y. (2020). The etiological role of the parainfluenza-3 virus in the respiratory pathology of young cattle // *BIO Web of Conferences*. – Vol.17. –e.00080. (<https://doi.org/10.1051/bioconf/20201700080>)
- 13 Giangaspero, M., Savini, G., Orusa, R., Osawa, T., & Harasawa, R. (2013). Prevalence of antibodies against Parainfluenza virus type 3, Respiratory syncytial virus and bovine Herpesvirus type 1 in sheep from Northern Prefectures of Japan. *Veterinaria italiana*, 49(3), 285–289. (<https://doi.org/10.12834/VetIt.0810.01>)
- 14 Intisar, K. S., Ali, Y. H., Khalafalla, A. I., Rahman, M. E., & Amin, A. S. (2010). Respiratory infection of camels associated with parainfluenza virus 3 in Sudan. *Journal of virological methods*, 163(1), 82–86. (<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.08.017>)
- 15 Maidana, S. S., Lomonaco, P. M., Combessies, G., Craig, M. I., Diodati, J., Rodriguez, D., Parreño, V., Zabal, O., Konrad, J. L., Crudelli, G., Mauroy, A., Thiry, E., & Romera, S. A. (2012). Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC veterinary research*, 8, 83. (<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-83>)
- 16 Ren Y, Chen X, Tang C, Yue H. First Isolation and Characteristics of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 from Yaks. *Pathogens*. 2022; 11(9):962. (<https://doi.org/10.3390/pathogens11090962>)

- 17 Yener, Z., Sağlam, Y. S., Timurkaan, N., & Ilhan, F. (2005). Immunohistochemical detection of parainfluenza type 3 virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 52(6), 268–271. (<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2005.00724.x>)
- 18 Fulton R. W. (2009). Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Animal health research reviews*, 10(2), 131–139. (<https://doi.org/10.1017/S146625230999017X>)
- 19 Woolums AR. The bronchopneumonias (respiratory disease complex of cattle, sheep, and goats) // In: Smith BL, ed. *Large Animal Internal Medicine*, 5th ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier. – 2015. – p.584–603.
- 20 Ellis J. A. (2010). Bovine parainfluenza-3 virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 26(3), 575–593. (<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.08.002>)
- 21 Griffin D. (1997). Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 13(3), 367–377. ([https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30302-9](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30302-9))
- 22 Сюрин В.Н., Иванова Г.А. Титрование вирусов. // в книге Сюрин В.Н., Иванова Г.А. *Руководство по ветеринарной вирусологии* // М. Изд-во «Колос». – 1965. 687.с:141-144
- 23 Leal É, Liu C, Zhao Z, Deng Y, Villanova F, Liang L, Li J, Cui S. Isolation of a Divergent Strain of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 (BPIV3) Infecting Cattle in China. *Viruses*. 2019; 11(6):489. (<https://doi.org/10.3390/v11060489>)
- 24 Широбоков В. П. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студ. высш. мед. учеб. заведений. – М. : Винница Нова Книга, 2015. – 262 с.
- 25 Научно-производственный журнал «Ветеринария» КолосС, 2003.№11. – 12с.
- 26 [Электрон.ресурс]. - URL: (<https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>)
- 27 Reinhardt W., Reinhardt A. W. Comfortable quarters for cattle in research institutions. 2002 // *Comfort rooms for laboratory animals*, 9th ed. Washington: Institute for Animal Welfare. – p.89-95
- 28 *Cattle: Good Management Practices*, 1st ed. 2008. RSPCA, Division of Animal Research. Available at; as of August 6, 2010
- 29 [Электрон.ресурс]. - URL: (www.rspca.org.uk/servlet/BlobServer?blobtable=RSPCABlob&blobcol=urloblob&blobkey=id&blobwhere=1220375292149&blobheader=application/pdf)
- 30 [Электрон.ресурс]. - URL: (https://studref.com/437125/agropromyshlennost/reaktsiya_gemagglutinatsii#389)
- 31 [Электрон.ресурс]. - URL: (https://biotechno.ru/about_company/articles/liofilizatsiya-mikrobiologi_cheskikh-preparatov/)
- 32 Miles D. G. (2009). Overview of the North American beef cattle industry and the incidence of bovine respiratory disease (BRD). *Animal health research reviews*, 10(2), 101–103. (<https://doi.org/10.1017/S1466252309990090>)
- 33 [Электрон.ресурс]. - URL: (http://www.rsn-kld.ru/news/paragripp_3_krupnogo_rogatogo_skota/)
- 34 [Электрон.ресурс]. - URL: (https://i.moscow/patents/ru2515915c1_20140520)
- 35 [Электрон.ресурс]. - URL: (<https://repo.vsavm.by/handle/123456789/5603>)
- 36 Tsai, K. S., & Thomson, R. G. (1975). Bovine parainfluenza type 3 virus infection: ultrastructural aspects of viral pathogenesis in the bovine respiratory tract // *Infection and immunity*. – Vol.11(4). – p.783–803. (<https://doi.org/10.1128/iai.11.4.783-803.1975>)
- 37 Xue, W., Ellis, J., Mattick, D., Smith, L., Brady, R., & Trigo, E. (2010). Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. *Vaccine*, 28(22), 3784–3792. (<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.043>)
- 38 Peters, A. R., Thevasagayam, S. J., Wiseman, A., & Salt, J. S. (2004). Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. *Preventive veterinary medicine*, 66(1-4), 63–77. (<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.08.001>)
- 39 Baghezza, S., Mamache, B., Bennoune, O., & Ghougal, K. (2021). Pathological study and detection of Bovine parainfluenza 3 virus in pneumonic sheep lungs using direct immunofluorescence

antibody technique. Comparative clinical pathology, 30(2), 301–310. (<https://doi.org/10.1007/s00580-021-03211-6>)

40 [Электрон.ресурс]. - URL: (https://biotechno.ru/about_company/articles/liofilizatsiya-mikrobiologicheskikh-preparatov/)

Д.И. МҰЗАРАП¹, Ш.Т. ТАБЫС¹, Н.А. СӘРСЕНҚҰЛОВА¹, М.К. КЕНЖЕБАЕВА¹,
М.М.МАНБЕТАЛИЕВ¹, А.К. НАХАНОВ¹, К.Д. ЖУГУНИСОВ¹, О. ЭРГАНИШ²

¹Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, қта.

Гвардейский, Қазақстан

²Сельчук университеті, Конья, Түркия

*e-mail: m.dias00@mail.ru

ЖАСУША ӨСІНДІСІНДЕ ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ ПАРАГРИПП-3 ВИРУЛЕНТТІ ШТАММЫН ЖАҢАРТУ ЖӘНЕ СЕЗІМТАЛ ЖАНУАРЛАРДА ПАТОГЕНДІК ҚАСИЕТТЕРІН ТЕКСЕРУ

Түйін

Штаммдардың жарамдылығын, әрі олардың құнды қасиеттерін сақтау – алғашқы зерттеулерден бастап оларды әртүрлі биопрепараттар өндірісінде қолдануға дейінгі микроорганизмдермен кез-келген зерттеу жұмыстарының маңызды алғышарты болып табылады. Осыған байланысты, ұсынылған мақалада ПТ жасуша өсінділерінде ірі қара малдың парагрипп-3 (ПГ-3) сынды жұқпалы ауру штаммын жаңарту және табиғи сезімтал жануарлардағы оның патогендік қасиеттерін зерттеу нәтижелері келтірілген. Жасуша өсіндісінде вирусты жаңарту нәтижесінде штамм үлгілерінің инфекциялық белсенділігі $6,87 \pm 0,17$ және $7,33 \pm 0,14$ lg ТЦД₅₀/мл аралығын қамтыды. Жануарларда жаңартылған штаммның патогенділігін бағалау барысында жұқтырған бұзаулардың 3-9 тәулік аралығында дене температурасының 41,2°C-қа дейін жоғарылауы мен тәбеттің төмендеуі, сондай-ақ мұрын мен көздің ағуы сынды клиникалық белгілері байқалды. Әрі қарай, вирусологиялық және серологиялық зерттеулер нәтижесінде бұзаулардан алынған мұрын сынамалары мен қан сарысуларында вирустың анықталуы және 1:64-тен 1:256-ға дейінгі титрлерде вирусты бейтараптандыратын антиденелердің түзілуі расталды. Жүргізілген жұмыстардан кейін вирустық суспензия лиофилизацияланып, одан әрі зерттеулер жүргізу үшін коллекцияға қойылды.

Кілтгі сөздер: ІҚМ ПГ-3 вирусы, штамм жаңарту, клиникалық белгілері, қорғаныш ортасы; лиофилизацияланған ампулалар.

IRSTI 34.25.01

D.I. MUZARAP¹, Sh.T. TABYS¹, N.A. SARSENKULOVA¹, M.K. KENZHEBAEVA¹,
M.M.MAMBETALIEV¹, A.K. NAKHANOV¹, K.D. ZHUGUNISSOV¹, O. ERGANIS²

¹Research institute for biological safety problems Gvardeyskiy, Kazakhstan

²Selcuk University, Konya, Turkey

*e-mail: m.dias00@mail.ru

REFRESHMENT OF A VIRULENT STRAIN OF BOVINE PARAINFLUENZA-3 VIRUS IN CELL CULTURE AND DETERMINATION OF PATHOGENIC PROPERTIES IN CALVES

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.11

Abstract

Maintaining strains in working condition and preserving their valuable properties are important conditions for almost any work with microorganisms – from primary study to their use in the production of

various biological products. In this regard, this article presents the results of a study on the refreshment of a strain of one of such infectious diseases as bovine parainfluenza-3 virus (BPIV-3) in calf kidney (CK) cell culture and study the pathogenic properties of the strain on naturally susceptible animals. As a result of virus refreshment in cell culture, the infectious titer of strain samples ranged from 6.87 ± 0.17 to 7.33 ± 0.14 lg TCID₅₀/ml. When studying the pathogenicity of the refreshed strain in animals, it was found that calves infected with the refreshed virus from 3 to 9 days had an increase in body temperature to 41.2 °C was observed and pronounced symptoms were noted, such as loss of appetite, as well as leakage from the nose and eyes. Further, virological and serological studies of nasal swabs and blood serums taken from calves confirmed the presence of the virus and the formation of virusneutralizing antibodies was found in titers from 1:64 to 1:256. After the work carried out, the viral suspension was lyophilized for further storage and research.

Keywords: bovine parainfluenza-3 virus, cell culture, strain refreshment, calves; clinical signs, protective environment; lyophilized vials.

Bovine parainfluenza-3 (BPIV-3) viruses are single-stranded RNA viruses with a shell that belong to the *Paramyxoviridae* family, the *Orthoparamyxovirinae* subfamily, the genus *Respirovirus*, the species *Bovine respirovirus-3* [1,2]. The causative agent of this disease consists of seven proteins and has a genome with negative polarity consisting of 15,000 nucleotides in length [3]. This disease is widespread in many countries and is a lipid-coated virus with glycoprotein spicules with hemoagglutinating and hemolytic activity [9]. Parainfluenza-3 viruses bind and replicate in ciliated epithelial cells of the upper and lower respiratory tracts and are associated with a wide range of diseases, and the degree of infection correlates with the affected site [4-7]. Sometimes respiratory manifestations include apnea, bradycardia, mumps, respiratory distress syndrome and rarely disseminated infection [8].

The BPIV-3 causes serious respiratory infections in ungulates and can cause disease alone or in combination with other pathogens, mainly viruses, bacteria and mycoplasmas [10]. Antibodies to BPIV-3 have been detected in almost 80% of dairy and beef cattle, which may demonstrate the widespread spread of the virus [11].

The BPIV-3 was first identified in the United States in 1959, when the virus was isolated from nasal swabs of calves with symptoms such as lack of appetite, cough, nasal discharge, other respiratory signs, fever, lacrimation and conjunctivitis [12]. Although BPIV-3 is usually found in cattle, cases of infection of small ruminants, buffaloes, yaks, camels, horses, pigs, dogs and monkeys, as well as humans have been reported [13-17]. Morbidity and mortality may be higher in cases of co-infection with other pathogens, since immunosuppression is an important role of respiratory viral pathogens of cattle [18,19]. BPIV-3 mainly affects cattle aged two to six months, probably due to a decrease in passive maternal immunity of the animal, although several outbreaks have been reported in more young animals [20]. Moreover, additional stresses caused by a more severe climate in many countries, along with the accumulation of treatment costs, low head growth rates and a decrease in the cost of carcasses, cause significant economic damage to dairy and meat farms, amounting to approximately \$ 1 billion per year [21].

The collection of microorganisms of the Research Institute for Biological Safety Problems of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan stores and supports pathogens of a number of infections used to develop preventive and diagnostic tools against dangerous infections in order to ensure biological safety on the territory of the Republic of Kazakhstan. These museum strains of microorganisms are periodically checked for residual biological activity, and, if necessary, refreshed on sensitive cultivation systems.

In this regard, the purpose of our research is to check the residual infectious activity and preserve the pathogenic properties of samples of the BPIV-3 strain during the storage period in the collection.

Materials and methods of research

1.1. Virus and cell culture

For the research, 2 samples of the Belarusian strain of the BPIV-3 isolated from cattle were used, stored in a collection for 30 and 20 years (1993 and 2003 of manufacture). The test samples of the virus strain were stored in a freeze-dried state under vacuum with a protective medium consisting of 5% peptone and 3% sucrose. To refresh them and determine their infectious activity, according to passport data, a primary trypsinized culture of calf kidney cells was used. The cell culture was grown in a DMEM nutrient medium containing 10% fetal blood serum of cattle. Determination of their residual infectious activity was carried out according to the method [22].

1.2. Refreshment of the pathogenic BPIV-3

To refresh the studied virus, samples of the Belarusian strain were obtained according to the generally accepted method [16, 23] in calf kidney cell culture. To determine the infectious activity of the obtained viral suspensions, dilutions were prepared starting from 10^{-1} to 10^{-8} in 3 replicates and poured into 96-well culture plates with a monolayer of calf kidney cell culture.

1.3. Experiments in calves and bioethics

To assess the pathogenic properties of the strain, we conducted experiments on target animals in special rooms-vivariums that meet the conditions of biological safety (ABSL-2) for the environment and personnel. Before the experiment, 4 heads of 4-6 months old calves seronegative to the BPIV-3 were selected. The seronegativity of cattle to this virus was determined in the serum neutralization test (SNT) with a constant dose of the virus and different dilutions of the studied blood serum, according to the method [24,25]. Before the start of the experiment, the animals were quarantined for 14 days.

The infection was carried out using an inhalation device (FLEXINEB E3 2020 MODEL INHALER) as shown in Figure 1.



Figure 1 - Aerosol infection of calves with BPIV-3 virulent virus using an inhaler.

For infection, the above-mentioned special inhaler was put on the animals' muzzle, diluted virus in a volume of 5 ml was poured into the tank and kept for 15 minutes until the virus was completely sprayed. Infection of calves with the BPIV-3 was carried out with the material of passage 5 of the Belorussian strain refreshed on calf kidney cell culture (dated 12/29/1993). After infection, each calf was kept separately in isolated boxes for 14 days.

During the entire period of the experiment, the experimental animals in quarantine had free access to water and feed.

When using experimental animals for scientific research, the norms of bioethics were strictly observed, according to international rules and guidelines for the care and use of laboratory animals

[26-29], and the experimental protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the RIBSP of the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (permit numbers: KZ0522/013).

During the experiment, the animals were monitored, regularly recording clinical manifestations characteristic of BPIV-3. During the entire period of the experiment, the general condition, clinical signs, appetite and body temperature were recorded daily. Nasal flushes were taken from diseased animals to detect the presence of the BPIV-3 in the hemagglutination assay (HA) according to the method [30]. At the end of the experiment, blood serums were taken from animals to check the formation of virus neutralizing antibodies to the BPIV-3.

1.4. Lyophilization of BPIV-3 virus

After the above work, a protective medium consisting of 5% peptone and 3% sucrose in final concentrations in a ratio of 1:1 was added to the accumulated viral suspension, poured into ampoules and dried. After drying, the infectious activity was checked and stored in a collection with a infectious activity of $7.25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ for further studies.

Results and discussion

2.1 Determination of residual infectious activity and refreshment of the pathogenic BPIV-3

The residual infectious activity of two samples of the Belarusian strains were determined in the culture of calf kidney cells and a viral suspension was developed with subsequent verification of its pathogenic properties. The infectious activity after refreshment was determined by the presence of characteristic CPE in the monolayer of cell culture. The results of the experiment are presented in Table 1.

Table 1 – Infectious activity of samples of the Belarusian strain of the BPIV-3 in calf kidney cell culture

Samples of the BPIV-3 virus strain	Initial residual titer of strain samples after storage, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$	Infectious activity of strain samples after refreshment in cell culture		
		4-passage	5-passage	6-passage
Sample No. 1 of 29.12.1993	$5,83 \pm 0,08$	$6,87 \pm 0,17$	$7,33 \pm 0,14$	NT
Sample No. 2 dated 12.03.2003	$6,00 \pm 0,14$	NT	$7,12 \pm 0,17$	$7,16 \pm 0,38$
Notes: "NT" - not tested				

As seen from the data in Table 1, the infectious activity of the studied samples of the Belarusian strain, despite the duration of storage, remained quite high titers ($5.83 \pm 0.08 \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ of the sample on 29.12.1993 and $6.00 \pm 0.14 \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ of the sample from 12.03.2003). When carrying out successive passages of titration materials, their titers to 5-6 passage the level increased to (7.12 ± 0.17) and $(7.33 \pm 0.14) \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$.

2.2. Determination the pathogenic properties of the refreshed BPIV-3 Belarusian strain on calves

To test the pathogenic properties of the strain, it was selected the viral material of the 5th passage of the sample from 29.12.1993, which showed higher infectious activity in cell culture ($7.33 \pm 0.14 \lg \text{TCID}_{50}/\text{ml}$). The pathogenic properties of the BPIV-3 were tested on 4 calves 4-6 months old. At the same time, one of them was used as a control calf (Table-2).

Monitoring and recording of the results of infection was carried out during the entire period of the experiment. During the period of observation of infected animals, clinical signs of the disease were observed in one calf starting from day 3. At the same time, an increase in body temperature to $39.7 \text{ }^\circ\text{C}$ was noted (Fig. 2C), loss of appetite and discharge from the nose (Fig. 2A) and eyes (Fig. 2B). These clinical signs of the disease were observed in the remaining infected calves with an increase in body temperature to $41.2 \text{ }^\circ\text{C}$, at 4th days. Clinical signs in diseased animals were observed for 10-11 days.

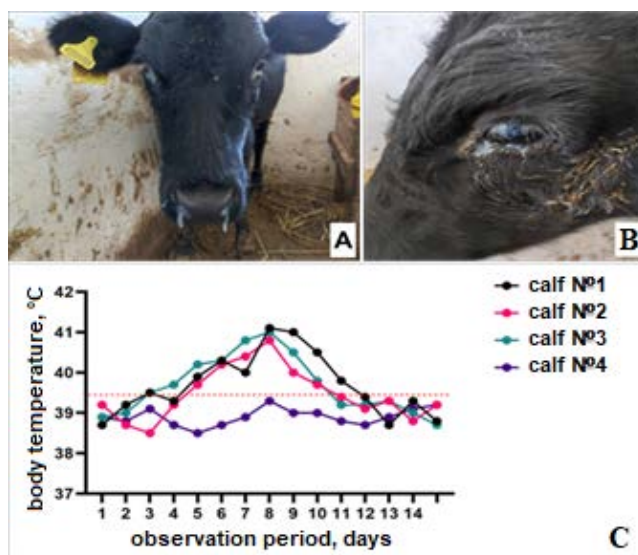


Figure 2 – Results of studying the pathogenicity of the BPIV-3 in naturally susceptible animals. A – discharge from the nose; B – discharge from the eyes; C - temperature reaction of animals infected with the BPIV-3 Belarusian strain

From 11-12 days the calves began to recover and their general condition became satisfactory. On day 7, nasal flushes were taken from sick calves to detect the presence of the BPIV-3 in the HA and on day 14, blood to check for the presence of virusneutralizing antibodies to the BPIV-3. The results of studies in HA and SRT are presented in Table 2.

Table-2. Results of virological studies on the calves infected with BPIV-3

Calf number	Hemagglutinating activity of the virus in HA	Titer of virus neutralizing antibodies	
		before infection, 0 days	after infection, 14 days
I	1:8	0	1:64
II	1:32	0	1:256
III	1:16	0	1:128
IV (control)	0	0	0

As can be seen from the data in Table 2, there are no virus neutralizing antibodies to the BPIV-3 in the blood sera samples of all tested calves before infection. Blood sera obtained on day 14 after infection, and tested in terms of virus neutralizing antibodies6 and found at the titers 1:64-1:256 by VNT. Also, samples of nasal cavity flushes taken for 7 days. HA was shown in the titers 1:8-1:32, which confirms the presence of the virus in the body of infected animals. The control calf, which was not given the virus, was seronegative with VNT.

After confirmation of the pathogenicity of the virus, an equal amount of protective medium was added to the viral suspension and lyophilized, since during lyophilization, moisture is removed from the material without disturbing the native structure of proteins, biochemical reactions are sharply slowed down or stopped, as a result of which they become more resistant to external factors and retain their original properties for a long period of storage [31].

The BPIV-3 is one of the long-known and most serious diseases of cattle, which has caused serious economic damage to animal husbandry worldwide [32]. Despite the widespread prevalence in cattle populations, this underestimated endemic infection is most often found in calves with poor passive or decayed maternal antibodies.

BPIV-3 are characterized by one hundred percent disease of the entire livestock within 1-2 weeks. The incubation period of the disease is 1-5 days. Transmission of the pathogen is carried

out by airborne droplets, contact, fecal-oral and sexual routes. The factors of transmission of the pathogen are milk of susceptible animals, semen, feed, water, bedding, inventory and other material and technical means contaminated with the pathogen [33].

According to literature sources, such cell cultures as diploid lung cell cultures and embryo kidney of cow, transplanted kidney lines of young bull (MDBK), calf kidney and primary lung cell culture of cow embryo are considered sensitive to the BPIV-3 [23]. In our experiment, we used a culture of calf kidney cells – as the most sensitive to this virus. The cultivation of the BPIV-3 in the culture of calf kidney cells caused pronounced signs of CPE – the formation of symplasts, elongation of cells with the formation of voids after 48 hours and maximum CPE 72 hours after infection. The infectious titer of the virus reached maximum values – up to 10^7 TCID₅₀/ml. The reproduction level of the BPIV-3 testified to the high sensitivity of the calf kidney cell culture to this pathogen. Similar results were obtained in studies conducted by the authors in the culture of fetal lung cells of cattle [34]. Many members of the Paramyxoviridae family can cause this type of morphological changes in cultured cells, but the degree of syncytium formation depends on the cell type. Specific changes in the monolayer are characterized by vacuolization, granulation of symplasts arising at the site of fusion of several cells by the formation of syncytia with several nuclei (small) and large – with several dozen nuclei [35].

In some literature sources, infection with the BPIV-3 was carried out by means of aerosolization, and in the other two trials they were vaccinated both intranasally and intratracheal [36-38]. The implementation of these three methods differs in that they are similar to the process of natural infection. The clinical signs after infection are similar to the natural symptoms of this disease. In particular, the advantage of the method of infection by aerosolization lies in the convenience of implementation and efficiency, since it is based on dispersed spraying on ultra-small particles of virus-containing suspension, which makes it possible to penetrate into all parts of the respiratory system. In this regard, we have chosen this method of infection for conducting experiments on animals.

Usually, clinical manifestations, consisting of fever, mucosal secretions and dry cough, are partially accompanied with local immunosuppressive effects. Infection of BPIV-3 is often complicated by coinfection with other respiratory viruses and bacteria, therefore, it is an important component of enzootic pneumonia in calves and a complex of respiratory diseases of cattle in feedlots. Since the studied virus more often affects the respiratory system, during autopsy it is possible to detect empty bronchi and lungs in fallen animals, as was shown by the authors [39]. An active infection can be diagnosed by isolating the virus from nasal smears. The sampling time is crucial for obtaining the final results of diagnostic tests [20].

As is known, factors such as the aggregate state of the biomaterial, their storage temperature, the composition of the stabilizing medium, etc. influence the duration of preservation of their immunobiological properties by strains of microorganisms. The samples of the Belarusian strain of the BPIV-3 tested by us were manufactured in 1993 and 2003, i.e. 30 and 20 years ago with the addition of protective media of 5% peptone and 3% sucrose in the final concentration and stored at minus 40 °C, which made it possible to preserve the basic biological properties of the strain fairly well for a long time storage period.

For the purpose of further storage of the strain, the protective medium specified in the passport was added to the virus-containing suspension and dried by the spent method of freeze drying. The quality of freeze drying was assessed by the following main indicators such as: solubility of the preparation (1-2 min); residual moisture (not exceeding 1-3%) and integrity of the ampoule; characteristic structure of the dried material; pH of the medium; preservation of biological activity, specificity and other properties as indicated in the source [40].

After assessing the quality of the refreshed and dried sample of the Belarusian strain of the BPIV-3, ampoules in the amount of 30 pcs. were deposited in the collection of microorganisms.

Conclusion

The results of the work carried out to check the residual infectious activity of the Belarusian strain of the BPIV-3 in cell culture and pathogenic properties on susceptible animals showed that the tested samples of the strain during the storage period (for 20, 30 years) they have retained their biological properties, which indicates the effectiveness of the protective environment used and the storage condition. The obtained results of the study allow storing the strain of the parainfluenza-3 virus without lighting for at least 20 years.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to A.A. Ashimova and K.S. Islamov for their help in carrying out research work.

References:

- 1 Branche, A. R., & Falsey, A. R. (2016). Parainfluenza Virus Infection. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 37(4), 538–554. (<https://doi.org/10.1055/s-0036-1584798>)
- 2 Henrickson K. J. (2003). Parainfluenza viruses. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 242–264. (<https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003>)
- 3 Spilki, F. R. (2016) ‘Bovine parainfluenza virus type 3.’, CABI Books. CABI International. (<https://doi.org/10.1079/9781780644172.009>)
- 4 Glezen, W. P., Frank, A. L., Taber, L. H., & Kasel, J. A. (1984). Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *The Journal of infectious diseases*, 150(6), 851–857. (<https://doi.org/10.1093/infdis/150.6.851>)
- 5 Glezen, W. P., Loda, F. A., Clyde, W. A., Jr, Senior, R. J., Sheaffer, C. I., Conley, W. G., & Denny, F. W. (1971). Epidemiologic patterns of acute lower respiratory disease of children in a pediatric group practice. *The Journal of pediatrics*, 78(3), 397–406. ([https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(71\)80218-4](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(71)80218-4))
- 6 Henrickson, K. J., Kuhn, S. M., & Savatski, L. L. (1994). Epidemiology and cost of infection with human parainfluenza virus types 1 and 2 in young children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 18(5), 770–779. (<https://doi.org/10.1093/clinids/18.5.770>)
- 7 Marx, A., Török, T. J., Holman, R. C., Clarke, M. J., & Anderson, L. J. (1997). Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. *The Journal of infectious diseases*, 176(6), 1423–1427. (<https://doi.org/10.1086/514137>)
- 8 Denny, F. W., Murphy, T. F., Clyde, W. A., Jr, Collier, A. M., & Henderson, F. W. (1983). Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics*, 71(6), 871–876.
- 9 [Electronic resource]. - URL: (<https://www.ivami.com/en/molecular-veterinary-microbiology/5548-bovine-parainfluenza-type-3-pi3-molecular-diagnosis-rt-pcr>)
- 10 Muftuoglu, B., Kurucay, H. N., Elhag, A. E., Yildirim, S., Cicek-Yildiz, Y., Tamer, C., Ozan, E., Sahna, K. C., Yildirim, Y., Albayrak, H., Okur-Gumusova, S., & Yazici, Z. (2021). A serosurvey for bovine respirovirus 3 in Turkish domestic ruminants: The first comparison study of A and C genotypes. *Veterinary medicine and science*, 7(5), 1625–1632. (<https://doi.org/10.1002/vms3.534>)
- 11 Figueroa-Chávez, D., Segura-Correa, J. C., García-Márquez, L. J., Pescador-Rubio, A., & Valdivia-Flores, A. G. (2012). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. *Tropical animal health and production*, 44(7), 1417–1421. (<https://doi.org/10.1007/s11250-012-0081-9>)
- 12 Gueriche, A., Galiullin, A. K., Gumerov, V. G., Karimullina, I. G., & Shaeva, A. Y. (2020). The etiological role of the parainfluenza-3 virus in the respiratory pathology of young cattle // *BIO Web of Conferences*. – Vol.17. –e.00080. (<https://doi.org/10.1051/bioconf/20201700080>)
- 13 Giangaspero, M., Savini, G., Orusa, R., Osawa, T., & Harasawa, R. (2013). Prevalence of antibodies against Parainfluenza virus type 3, Respiratory syncytial virus and bovine Herpesvirus type 1 in sheep from Northern Prefectures of Japan. *Veterinaria italiana*, 49(3), 285–289. (<https://doi.org/10.12834/VetIt.0810.01>)

- 14 Intisar, K. S., Ali, Y. H., Khalafalla, A. I., Rahman, M. E., & Amin, A. S. (2010). Respiratory infection of camels associated with parainfluenza virus 3 in Sudan. *Journal of virological methods*, 163(1), 82–86. (<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.08.017>)
- 15 Maidana, S. S., Lomonaco, P. M., Combessies, G., Craig, M. I., Diodati, J., Rodriguez, D., Parreño, V., Zabal, O., Konrad, J. L., Crudelli, G., Mauroy, A., Thiry, E., & Romera, S. A. (2012). Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC veterinary research*, 8, 83. (<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-83>)
- 16 Ren Y, Chen X, Tang C, Yue H. First Isolation and Characteristics of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 from Yaks. *Pathogens*. 2022; 11(9):962. (<https://doi.org/10.3390/pathogens11090962>)
- 17 Yener, Z., Sağlam, Y. S., Timurkaan, N., & İlhan, F. (2005). Immunohistochemical detection of parainfluenza type 3 virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 52(6), 268–271. (<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2005.00724.x>)
- 18 Fulton R. W. (2009). Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Animal health research reviews*, 10(2), 131–139. (<https://doi.org/10.1017/S146625230999017X>)
- 19 Woolums AR. The bronchopneumonias (respiratory disease complex of cattle, sheep, and goats) // In: Smith BL, ed. *Large Animal Internal Medicine*, 5th ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier. – 2015. – p.584–603.
- 20 Ellis J. A. (2010). Bovine parainfluenza-3 virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 26(3), 575–593. (<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.08.002>)
- 21 Griffin D. (1997). Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 13(3), 367–377. ([https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30302-9](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30302-9))
- 22 Syurin V.N., Ivanova G.A. Titrovanie virusov. // v knige Syurin V.N., Ivanov G.A. Rukovodstvo po veterinarnoj virusologii // M. Izd-vo «Kolos». – 1965. 687.p:141-144.
- 23 Leal É, Liu C, Zhao Z, Deng Y, Villanova F, Liang L, Li J, Cui S. Isolation of a Divergent Strain of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 (BPIV3) Infecting Cattle in China. *Viruses*. 2019; 11(6):489. (<https://doi.org/10.3390/v11060489>)
- 24 Shirobokov V. P. Medicinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya: uchebnik dlya stud. vyssh. med. ucheb. zavedenij. – M. : Vinnica Nova Kniga., 2015. – p.262
- 25 Nauchno-proizvodstvennyj zhurnal "Veterinary" KolosS, 2003. No.11. – p.12
- 26 [Elektron.resurs]. - URL: (<https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>)
- 27 Reinhardt W., Reinhardt A. W. Comfortable quarters for cattle in research institutions. 2002 // *Comfort rooms for laboratory animals*, 9th ed. Washington: Institute for Animal Welfare. – p.89-95
- 28 *Cattle: Good Management Practices*, 1st ed. 2008. RSPCA, Division of Animal Research. Available at; as of August 6, 2010
- 29 [Elektron.resurs]. - URL: (www.rspca.org.uk/servlet/BlobServer?blobtable=RSPCABlob&blobcol=urloblob&blobkey=id&blobwhere=1220375292149&blobheader=application/pdf)
- 30 [Elektron.resurs]. - URL: (https://studref.com/437125/agropromyshlennost/reaktsiya_gemagglyutinatsii#389)
- 31 [Elektron.resurs]. - URL: (https://biotechno.ru/about_company/articles/liofilizatsiya-mikrobiologi_cheskikh-preparatov/)
- 32 Miles D. G. (2009). Overview of the North American beef cattle industry and the incidence of bovine respiratory disease (BRD). *Animal health research reviews*, 10(2), 101–103. (<https://doi.org/10.1017/S1466252309990090>)
- 33 [Elektron.resurs]. - URL: (http://www.rsn-kld.ru/news/paragripp_-3_krupnogo_rogatogo_skota/)
- 34 [Elektron.resurs]. - URL: (https://i.moscow/patents/ru2515915c1_20140520)
- 35 [Elektron.resurs]. - URL: (<https://repo.vsavm.by/handle/123456789/5603>)
- 36 Tsai, K. S., & Thomson, R. G. (1975). Bovine parainfluenza type 3 virus infection: ultrastructural aspects of viral pathogenesis in the bovine respiratory tract // *Infection and immunity*. – Vol.11(4). – p.783–803. (<https://doi.org/10.1128/iai.11.4.783-803.1975>)

37 Xue, W., Ellis, J., Mattick, D., Smith, L., Brady, R., & Trigo, E. (2010). Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. *Vaccine*, 28(22), 3784–3792. (<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.043>)

38 Peters, A. R., Thevasagayam, S. J., Wiseman, A., & Salt, J. S. (2004). Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. *Preventive veterinary medicine*, 66(1-4), 63–77. (<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.08.001>)

39 Baghezza, S., Mamache, B., Bennoune, O., & Ghougal, K. (2021). Pathological study and detection of Bovine parainfluenza 3 virus in pneumonic sheep lungs using direct immunofluorescence antibody technique. *Comparative clinical pathology*, 30(2), 301–310. (<https://doi.org/10.1007/s00580-021-03211-6>)

40 [Elektron.resurs]. - URL: (https://biotechno.ru/about_company/articles/liofilizatsiya-mikrobiologicheskikh-preparatov/)