

УДК 616-097+578.1

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСА SARS-CoV-2, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ НОРОК В БЕЛАРУСИ***Борисовец Д.С., *Каяк Ю.А., *Толяронок Г.Е., **Семижон П.А., **Счеслёнок Е.П., **Сухоцкая Е.А.**

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

**Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», г. Минск, Республика Беларусь

*В статье авторами предоставлена информация об исследованиях, направленных на выделение изолята коронавируса Sars-CoV-2, выделенного от норок, при конструировании бивалентной вакцины и определении его биологических свойств. **Ключевые слова:** коронавирус, Sars-CoV-2, инфекция, норки, изолят, биологические свойства.*

BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE SARS-CoV-2 VIRUS ISOLATED FROM MINKS IN BELARUS***Borisovets D.C., *Kayak Yu.A., *Tolyaronok G.E., **Semizhon P.A., **Scheslenok E.P., **Sukhotskaya E.A.**

*RUE «S.N. Vyshellesky Institute of Experimental Veterinary Medicine», Minsk, Republic of Belarus

**Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology
State institution «Republican center for Hygiene, Epidemiology and Public Health»
Minsk, Republic of Belarus

*In the article, the authors provide information on studies aimed at isolating the Sars-CoV-2 coronavirus isolate isolated from minks in the design of a bivalent vaccine and determining its biological properties. **Keywords:** corona-virus, Sars-CoV-2, infection, mink, isolate, biological properties.*

Введение. Семейство коронавирусов, которые в качестве генетического материала содержат одноцепочечную (+) РНК, со специфическими гликопротеидными шипами вокруг вирусного капсида, при электронном микроскопировании похожи на корону [1]. Коронавирусы делятся на несколько подсемейств, включающих четыре рода (от альфа- до дельта-), они потенциально патогенны для различных видов млекопитающих, включая человека [2]. За последнее двадцатилетие, кроме ранее известных видов из семейства коронавирусов, патогенных для человека, которые входят в структуру сезонных вирусных инфекций, были описаны новые патогенные виды: SARS-CoV, описанный в 2002 г., который в 2002–2003 гг. явился причиной вспышки атипичной пневмонии в Китае; MERS-CoV, который в 2012 г. вызвал вспышку ближневосточного респираторного синдрома в Саудовской Аравии и в 2015 г. – в Южной Корее (MERS), и новый коронавирус SARS-CoV-2, который вызвал вспышку болезни, названной COVID-19, в китайской провинции Ухань, которая на настоящее время переросла в глобальную пандемию [3]. Достаточно высокая степень передачи нового коронавируса (средний индекс репродукции – 2.2) и потенциальная тяжесть последствий респираторного заболевания, вызываемого данным вирусом, превратили его в главнейшую медицинскую проблему 2020 г. [1, 4, 5].

Целью исследования является определение биологических свойств изолятов вируса SARS-CoV-2, на перевиваемой культуре клеток из образцов биологического материала от норок, подтверждение методом ПЦР наличие антигена вируса SARS-CoV-2 от павших норок.

Материалы и методы исследований. Объекты исследований – выделенные изоляты вируса SARS-CoV-2, полученные из биологического материала норок. Образцы биологического материала от животных: 2 пробы (проба №1 – вх. 3947 и №5 – вх. 3948) патологического материала (селезенка, легкое), отобранного от павших норок в УП «Борановичское зверохозяйство Белкоопсоюза», подтвержденные в ПЦР на наличие антигена вируса SARS-CoV-2.

При подготовке образцов материала для выделения изолятов вируса SARS-CoV-2 использовали биологический материал от животных, положительных на наличие РНК SARS-CoV-2. Образцы патологического материала (10-20 % суспензия легких и селезенки на фосфатно-буферном растворе рН 7.4) в объеме 1 мл предварительно пропустили через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, на адсорбцию брали 700 мкл суспензии из расчета площади культурального флакона 25 см². Адсорбцию проводили в течение 1 часа при +37 °С. Далее вносили среду поддержки (DMEM +2 % СЭК). Флаконы инкубировали от 3-х до 5 суток до появления цитопатического действия (ЦПД). После чего проводили два цикла замораживания-оттаивания, клеточную суспензию центрифугировали при 6 тыс. об/мин. при +4 °С в течение 15 мин. Вирусосодержащую культуральную жидкость анализировали методом ОТ-ПЦР на наличие РНК SARS-CoV-2 и использовали в кратных разведениях для последующих пассажей.

Определение инфекционной активности вируса по цитопатическому действию (ЦПД) проводили микрометодом на 96-луночных культуральных планшетах (Costar) с клетками Vero E6 (посевная доза 15000-18000 на лунку) для определения титра вируса нескольких образцов с использованием не менее четырех параллельных рядов.

Для заражения вирусом использовали монослойную культуру клеток линии Vero E6, выращенную на флаконах для культивирования клеток: 25 см² (посевная доза: 0,8x10⁶–1x10⁶ на флакон) и 75 см² (посевная доза: 3x10⁶ на флакон) для получения монослоя клеток 80-90 % на первые сутки после посева. При оценке монослоя клеток, выращенных на культуральных флаконах, путем микроскопии, полнота монослоя была не менее 80-90 %. Перед заражением ростовую среду ДМЕМ, содержащую 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), удалили и клетки промыли бессывороточной средой ДМЕМ с антибиотиком (гентамицин - 0,24 мг/мл) в объеме 5 мл для флаконов 25 см² и 20 мл для флаконов 75 см². После этого оставшуюся среду тщательно отбирали и вносили соответствующее количество подготовленного вирусного материала. Адсорбцию вируса на клетках осуществляли в термостате при +37 °С в течение часа с периодическим покачиванием флаконов через 15-20 мин. После адсорбции вирусосодержащую жидкость удалили и вносили среду поддержки (ДМЕМ +2 % ЭТС + гентамицин 0,24 мг/мл) в объеме 5 мл для флаконов 25 см² и 20-25 мл для флаконов 75 см². Зараженные культуры клеток инкубировали в термостате при +37 °С.

Для титрования вируса на 96-луночных культуральных планшетах готовили 10-кратные его разведения (от 10⁻¹ до 10⁻⁷) на поддерживающей среде ДМЕМ, содержащей 2 % ЭТС + 0,24 мг/мл гентамицин. Каждым разведением вируса заражали по четыре лунки. Из каждой лунки с культурой удаляли ростовую среду и вносили по 0,2 мл соответствующего разведения вируса. В качестве контроля использовали четыре лунки со сформировавшимся клеточным монослоем. Подготовленный планшет помещали в СО₂ - инкубатор при 37 °С и 5 % СО₂. После заражения клетки ежедневно исследовали под малым увеличением микроскопа, сравнивая инфицированные культуры клеток с контрольными для оценки проявления цитопатического эффекта, визуализируемого в виде потери клетками способности закрепляться к пластику флакона, принятием ими шаровидной формы, отделением от пластика флакона и свободным плаванием в культуральной жидкости. При поражении вирусом 75-80 % клеток, основная масса репродуцирующегося вируса выходила в культуральную жидкость. При наличии 70-90 % цитопатического действия (ЦПД) вируса на клетки флаконы, инфицированные вирусом, снимали с инкубирования и помещали в морозильную камеру (при температуре минус 18-20 °С).

Результаты титрования учитывали в течение 4-7 суток инкубирования по проявлению цитопатического действия. Инфекционный титр вируса выражали в TCID₅₀ (50 %-ная тканевая цитопатическая доза) и рассчитывали по методу Кербера.

Для очищения вирусной суспензии от клеточного дебриса флаконы, инфицированные вирусом, после замораживания на -20 °С разморозили при комнатной температуре. Вирусосодержащую культуральную жидкость собирали и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин. при +4 °С (для удаления дебриса). Полученную суспензию вируса поместили на -20 °С в морозильник, предварительно отобрав аликвоты для определения титра вируса.

Выделение вирусной РНК для исследования методом ОТ-ПЦР проводили с использованием коммерческих наборов реагентов: набор реагентов для одновременного выделения ДНК и РНК из биологического материала методом преципитации «НК ЭКСТРА» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Постановку обратной транскрипции на матрице РНК проводили с использованием набора реагентов для постановки реакции обратной транскрипции РНК «РЕВЕРТАЗА - M-MuLV-50» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Постановку ПЦР проводили с использованием коммерческих реагентов «Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV-2 методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «SARS-CoV-2/SARS-CoV» (ДНК-технология, Российская Федерация), тест-система «АртТест COVID-19» (АртБиоТех, Беларусь), набора реагентов «COVID-19-скрин» для выявления генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии).

Идентификацию основных вирусных антигенов в изоляте концентрированного вирусного материала коронавируса SARS-CoV-2/3947 осуществляют в ПААГ-электрофорезе по методу Laemmli. Концентрация разделяющего геля составляет 12 %, фокусирующего – 2 %. Пробы для нанесения в ПААГ предварительно проходят термическую обработку при 95 °С на водяной бане (БВ-11) в течение 5-7 мин. и затем осаждаются центрифугированием на микроцентрифуге (М-22). Электрофорез проводится при напряжении 200 V и силе тока до 100 мА в течение 1-1,5 часа с использованием прибора для вертикального электрофореза (ВЭ-17) и источника питания (И-18). После окончания электрофореза гель окрашивается раствором Кумасси R-250. Молекулярную массу полипептидов определяют по распределению в геле относительно распределения маркерных белков.

Определение инфекционной активности вируса проводили по TCID₅₀, расчет титров вируса осуществляли по методу, предложенному Spearman-Kärber [5].

Результаты исследований. По приведенным данным в литературе, для культивирования вируса SARS-CoV, была эффективно использована такая клеточная линия, как Vero E6. Эта же клеточная линия была эффективно использована и для выделения SARS-CoV-2. В связи с этим для выделения изолятов вируса SARS-CoV-2 нами была использована культура клеток почки африканской зеленой мартышки Vero E6. Для выделения вируса использовали культуральные флаконы

площадью 25 см², содержащие суточную культуру клеток с 80-90 % монослоем клеток. После проведения адсорбции в течение часа вносили среду поддержки ДМЕМ, содержащую гентамицин и 2 % сыворотку эмбрионов коров (СЭК). На 3-4-е сутки наблюдали эффект так называемого цитопатического действия (ЦПД), визуализируемого в виде потери клетками способности закрепляться к пластику флакона, принятием ими шаровидной формы, отделением от пластика флакона и свободным плаванием в культуральной жидкости по сравнению с контролем. На рисунках 1-4 представлены результаты ЦПД для клеток, инокулированных различным исходным материалом.

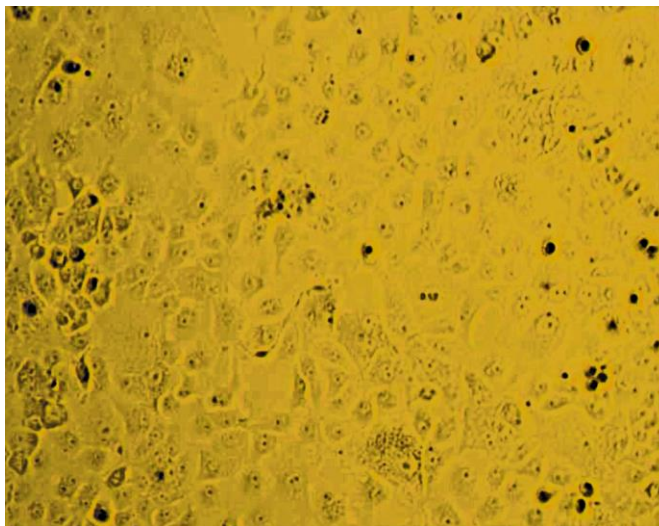


Рисунок 1 – Нормальный монослой культуры клеток Vero E6

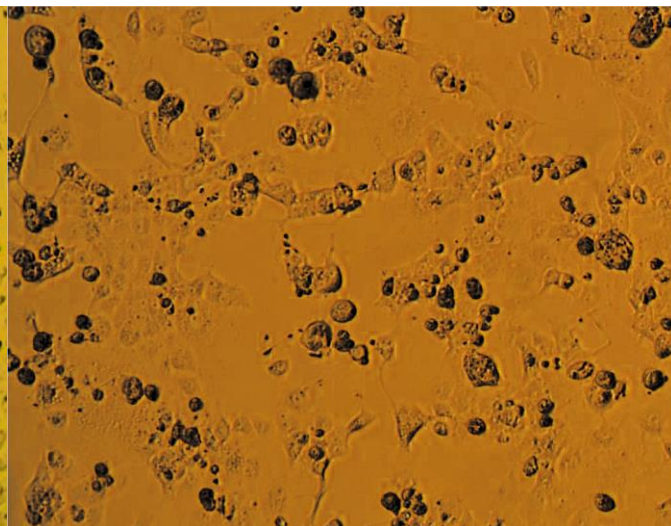


Рисунок 2 – ЦПД клеток Vero E6 на 3 сутки после воздействия вируса SARS-CoV-2

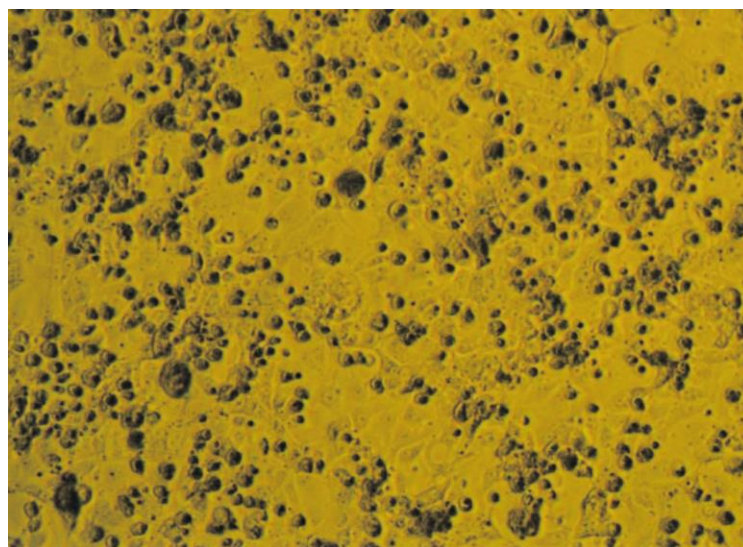


Рисунок 3 – ЦПД клеток Vero E6 на 5 сутки после воздействия вируса SARS-CoV-2

Из представленного рисунка видно, что для клеток, инокулированных образцами №1/3947 (рисунок 2) – патологический материал от павших норок (селезенка), третьи сутки инкубации, и №5/3948 (рисунок 3) – биологический материал от норок (легкое), четвертые сутки инкубации, наблюдается выраженный цитопатический эффект по сравнению с контролем (рисунок 1).

По достижению ЦПД 70-80 % флаконы с клетками двукратно замораживали-оттаивали для увеличения выхода вирусных частиц в среду, затем клеточный детрит удаляли центрифугированием, вирусосодержащую культуральную жидкость использовали для последующих пассажей. Всего таким образом было выделено 2 изолята и для каждого из них проведено по 10 последовательных пассажей, наличие РНК вируса SARS-CoV-2 для каждого пассажа подтверждалось приготовлением кратных разведений от 10⁻² до 10⁻⁷ с последующим выделением РНК и постановкой ОТ-ПЦР.

Далее нами проведены исследования по оценке инфекционной активности вируса SARS-CoV-2.

На рисунке 4 представлены результаты изменения титров вируса на протяжении десяти последовательных пассажей.



Рисунок 4 – Изменение титров вируса на протяжении десяти последовательных пассажей

Как видно из представленного рисунка 4, наибольшие титры вируса достигались к пятому - шестому пассажиру и составляли 6,5–6,7 для изолята №1/3947 и 5,7–5,8 – для изолята №5/3948. Соответственно, для последующего накопления биомассы вируса с целью дальнейшего накопления вирусного антигена был использован изолят №1/3947 (шестой пассаж) с максимальным титром вируса.

Для идентификации вируса использована ПЦР.

В результате молекулярно-генетических исследований установлено, что выделенные изоляты являются вирусом SARS-CoV-2.

Далее нами изучались биологические свойства вируса SARS-CoV-2.

При изучении физико-химических свойств вирус чувствителен к кислотам, спирту, УФЛ, УФО и неустойчив к высоким температурам: сразу инактивируется при 40°C.

Вирус содержит 4 белка. Геном SARS-CoV-2 представляет собой длинную последовательность РНК, состоящую почти из 30 000 нуклеотидов, которые работают в строгой последовательности. Вирионы снабжены липидной оболочкой с булавовидными пепломерами длиной 5–10 нм, формируемыми тримерами белка S (180–220 кДа, 1128–1472 а.о.). Наличие этих пепломеров, напоминающих зубцы короны. Пентамеры белка E (9–12 кДа, 74–109 а.о.), выявленные в количестве всего нескольких копий на вирион, способны формировать ионные каналы и важный фактор вирулентности. Нуклеокапсид (60–70 нм) имеет спиральную симметрию и формируется фосфорилированным белком N (50–60 кДа, 349–470 а.о.) в комплексе с вирионной РНК.

Сохраняет исходные свойства при длительном культивировании на культуре клеток (25 пассажей). Не обладает реверсивностью в течении 5 пассажей через мозг восприимчивых лабораторных животных. Для изолята №1/3947, используемого в качестве кандидатного вакцинного, выполнено десять последовательных пассажей, при этом наибольшие титры вируса достигались к пятому-шестому пассажиру и составляли 6,5–6,7. Соответственно, для последующего накопления биомассы вируса с целью дальнейшего накопления вирусного антигена был использован изолят №1/3947 (шестой пассаж) с максимальным титром вируса.

Размножается в перевиваемых культурах клеток африканской зеленой мартышки (VERO).

На 21-30 день после иммунизации вызывает образование вируснейтрализующих антител.

Изолят вируса SARS-CoV-2 хранят при температуре минус 70 °С в виде вирусосодержащей культуральной жидкости. Сохраняет свойства в течение 12 месяцев.

Изоляты SARS-CoV-2 адаптированы к культуре клеток линии Vero E6, выращенной на среде DMEM. Для культивирования коронавируса SARS-CoV-2 использовали культуру клеток линии Vero E6. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 2мМ L-глутамин (Sigma, США), 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco), антибиотик «Гентамицин» (РУП «Белмедпрепараты», раствор 40 мг/мл) в количестве 40 мкг/мл среды в атмосфере 5 % CO₂ при температуре 37 °С. Пересев клеток осуществили общепринятым методом. Для диссоциации клеток использовали 0,25 % раствор трипсина (Sigma, США) и 0,02 % раствор Версена в соотношениях 1:3.

При контроле идентичности очищенного вирусного препарата коронавирусу SARS-CoV-2 установлено наличие специфических белков коронавируса SARS-CoV-2: нуклеокапсидного белка N – с распределением в области 50 кДа, три формы спайкового белка S – с распределением в области от ≈100 до ≈ 300 кДа, и матричного белка М – с распределением в области 17-18 кДа, подтверждают принадлежность полученного препарата вируса к коронавирусу SARS-CoV-2.

Таким образом, изолят коронавируса SARS-CoV-2 №1/3947 был выбран в качестве кандидатного штамма для получения инактивированного вирусного антигена.

Заключение. Проведенные исследования по выделению изолятов вируса SARS-CoV-2, на перевиваемой культуре клеток Vero E6 из образцов биологического материала от животных, под-

твержденных методом ПЦР на наличие генома вируса SARS-CoV-2 от павших норок, подтверждают, что выделены 2 изолята (проба №1/3947 и №5/3948), которые в дальнейшем можно использовать для изготовления вакцины.

Литература. 1. Study of SARS-CoV-2 in semen and urine samples of a volunteer with positive nasopharyngeal swab / D. Paoli [et al.] // *Journal of Endocrinological Investigation*. Springer Science and Business Media LLC. – 2020. - № 23. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01261-1>. 2. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks / H. M. Ashour, W. F. Elkhatib, M. M. Rahman, H. A. Elshabrawy // *Pathogens*. MDPI AG. – 2020. - № 4. - P. 186. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030186>. 3. Center for Systems Science and Engineering (2020) Coronavirus COVID-19 global cases // Johns Hopkins University. Accessed 3 Apr 2020. <https://coronavirus.sjhu.edu/map.html>. 4. Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19) / M. Cascella, M. Rajnik, A. Cuomo, S. C. Dulebohn, R. Di Napoli // *StatPearls Publishing*. – 2020. - № 3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>. 5. Баден, Л. П. COVID-19 - поиск эффективной терапии / Л. П. Баден, Е. Ю. Рубин // *J. Medical technology*. – 2020. 6. Чепурнов, А. А. Антигенные свойства изолята коронавируса Sars-CoV-2, выделенного от пациента в Новосибирске / К. А. Шаршов, Е. И. Казачинская // *Журнал инфектологии*. – 2020. – Т. 12. – №3. doi: 10.22625/2072-6732-2020-12-3-42-50.

Поступила в редакцию 09.10.2024.

УДК 619:616.993.192.1:615:636.5:614.31

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ «ФИТОКОКЦИДИН» И «КОКЦИЛИН В ПЛЮС» ПРИ ЭЙМЕРИОЗЕ У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ И ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ОЦЕНКА ПРОДУКТОВ УБОЯ ПРИ ИХ ПРИМЕНЕНИИ

Емельянов М.А.

РДУП «Опытная научная станция по птицеводству», г. Заславль, Республика Беларусь

*Противоэймериозные растительные препараты «Фитококцидин» и «Кокцилин В плюс» доказали высокую лечебно-профилактическую эффективность при эймериозах у цыплят-бройлеров. Применение препаратов «Фитококцидин» и «Кокцилин В плюс» у цыплят-бройлеров не ухудшает биологическую ценность мяса и санитарные показатели продуктов убоя. **Ключевые слова:** противоэймериозные растительные препараты «Фитококцидин» и «Кокцилин В плюс», цыплята-бройлеры, эффективность.*

THERAPEUTIC EFFECTIVENESS OF THE PREPARATIONS "PHYTOCOCCIDIN" AND "COCCILIN B PLUS" FOR EIMERIOSIS IN BROILER CHICKENS AND VETERINARY AND SANITARY EVALUATION OF KILLING PRODUCTS IN THEIR APPLICATION

Yemelyanau M.A.

RSUSE «Experimental Scientific Station for Poultry Breeding», Zaslavl, Republic of Belarus

*Anti-eimeriosis herbal preparations «Phytococcidin» and «Cocccilin B plus» have proven high therapeutic and prophylactic effectiveness for eimeriosis in broiler chickens. The use of the preparations «Phytococcidin» and «Cocccilin B plus» in broiler chickens does not worsen the biological value of meat and the sanitary parameters of killing products. **Keywords:** anti-eimeriosis herbal preparations, «Phytococcidin» and «Cocccilin B plus», broiler chickens, effectiveness.*

Введение. Внедрение в ветеринарную практику различных средств фитотерапии актуально ввиду физиологичности их действия, экологической и экономической целесообразности. Это свидетельствует о необходимости дальнейших изысканий новых отечественных эффективных средств из местного растительного сырья [2, 5, 6].

Цыплята-бройлеры очень подвержены заражению эймериозами, а следовательно разработка и внедрение в ветеринарную практику новых эффективных растительных препаратов для лечения цыплят-бройлеров будет способствовать повышению продуктивности птицы и снижению расхода кормов на единицу продукции. При длительном использовании в птицеводстве ряда противопаразитарных средств у паразитов вырабатывается к ним определенная устойчивость. Ряд ветеринарных препаратов, особенно препараты химического синтеза, могут ухудшать санитарные показатели продуктов убоя животных и быть опасными при употреблении в пищу для человека. Безопасность пищевых продуктов – это один из наиболее часто обсуждаемых вопросов современности. Она подразумевает отсутствие риска для здоровья человека. Повышение санитарного качества, а также пищевой и биологической полноценности продуктов питания, их полной безвредности имеет немаловажное значение для сохранения здоровья людей. Важным пунктом в решении этих задач является проведение ветеринарно-санитарной экспертизы и ветеринарно-санитарная оценка продуктов убоя животных и птиц [1, 3, 4].

Следовательно изучение терапевтической эффективности новых противоэймериозных растительных препаратов у цыплят-бройлеров и проведение ветеринарно-санитарной оценки продуктов убоя птицы позволяет в полной мере оценить качество разрабатываемых противопаразитарных препаратов.