

подчеркнуть, что наиболее опасная бессимптомная форма псороптоза (клинически почти незаметная), но которая имеет важное значение в эпизоотологии данной болезни, так как мы её наиболее часто регистрировали у крольчих, которые часто являются источником заражения молодых кроликов. Клинические признаки псороптоза могут наблюдаться у кроликов в возрасте 1,5 – 2-х месяцев.

Заключение: Клещи *Psoroptes cuniculi* строго видоспецифичны, так как при перекрестном заражении кроликов другими видами рода *Psoroptes* животные индифферентны. Кошки, собаки и крысы не могут быть носителями (резервуарами) данных клещей.

Литература. 1. А.А.Шевцов ветеринарная паразитология.- Москва «Колос»1965.-с.296-298 2. П.С.Хагбердиев., Ф.Б.Ибрагимов Ветеринарная протозоология и арахноэнтомология.- Ташкент, 2020.-с.191-202. 3. Н.Х.Жакупбаев Видовая специфичность клещей рода *psoroptes*. Сб. научн. работ. Астана, 2001. -с.39-42. 4. К.И.Абуладзе Практик по диагностике инвазионных болезней сельского хозяйства. джив.- М «Колос» 1978.-с.227. 5. А.В.Викторов, В.А.Дриняев Ивермектин, развитие резистентности. Ветеринария,2002-№4.-с.50-54. 6. А.Н.Давлетишин, . Н.Х.Жакупбаев Саркаптоидозы плотоядных животных. Екатеринбург, 2000.-с.24-38. 7. Л.Л.Демьяненко Морфо-биологические особенности возбудителя и меры борьбы с псороптозом кроликов, автореферат дисс.биол.наук.-Уфа,2004,с,-25

УДК: 636.934.57:578.834.1

РЕЗУЛЬТАТЫ ВИРУСОВЫДЕЛЕНИЯ SARS-COV-2 НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Борисовец Д.С., Каяк Ю.А., Семижон П.А., Толяронок Г.Е.
РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

*В статье приведены современные литературные данные по восприимчивости разных видов животных, в т.ч. норки к коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. **Ключевые слова:** норки, вирус, COVID-19, SARS-CoV-2, инфекция.*

RESULTS OF SARS-COV-2 VIRUS RELEASE ON CELL CULTURE

Borisovets D.S., Kayak Yu.A., Semizhon P.A., Tolyaronok G.E.
RUP "S.N. Vyshellessky Institute of Experimental Veterinary Medicine",
Minsk

The article presents current literature data on the susceptibility of various

animal species, including minks, to coronavirus infection caused by the SARS-CoV-2 virus. Keywords: mink, virus, COVID-19, SARS-CoV-2, infection.

Введение. Коронавирусы – это семейство вирусов, содержащих в качестве генетического материала одноцепочечную (+) РНК, со специфическими гликопротеидными шипами вокруг вирусного капсида, которые при электронном микроскопировании похожи на солнечную корону [1]. Семейство коронавирусов делится на несколько подсемейств, включающих четыре рода (от альфа- до дельта-), которые потенциально патогенны для различных видов млекопитающих, включая человека [2]. За последние 20 лет, кроме ранее известных видов из семейства коронавирусов, патогенных для человека, входящих в структуру сезонных ОРВИ, были описаны новые более 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].

Изучение факторов патогенности коронавируса SARS-CoV-2 показало, что в клетки человека он проникает через рецепторы к ангиотензинпревращающему ферменту 2-го типа (ACE2), который достаточно широко представлен в различных тканях: он экспрессируется в легких на уровне альвеол, кишечнике, гонадах, почках и т.д. [5]. Поэтому потенциально при новой коронавирусной инфекции могут поражаться не только дыхательные пути, но и другие ткани и органы [1, 5, 6]. С диагностической точки зрения это означает, что вирусная РНК может детектироваться не только в биоматериале из дыхательных путей (назофарингеальные соскобы, БАЛ, мокрота), но и в других биологических жидкостях (фекалии, моча, кровь) [1, 5, 7, 8].

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

Культура клеток почки африканской зеленой мартышки Vero E6 (ТУ ВУ 100558032.273-2014 изм. «1») была получена из коллекции культур клеток Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-

исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» (г. Москва) и хранилась в криохранилище с жидким азотом.

Подготовка образцов клинического материала для выделения изолятов вируса SARS-CoV-2 использовали образцы биологического материала от животных, положительные на наличие РНК SARS-CoV-2. Образцы патологического материала (10-20 % суспензия легких и селезенки на фосфатно-буферном растворе pH7.4) в объеме 1 мл предварительно пропускали 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°C. 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°C 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.

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 - М-MuLV-50» производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Постановку ПЦР проводили с использованием коммерческих реагентов «Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 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).

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

Результаты исследований. По имеющимся литературным данным, для культивирования коронавируса 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 маргаритки Vero E6. В исследование брали образцы биологического материала животных: 2 пробы (проба №1/3947 и №5/3948) патологического материала (селезенка, легкое), отобраного от павших норок в

УП «Молодеченское зверохозяйство Белкоопсоюза». Образцы биологического материала были предварительно протестированы на наличие РНК SARS-CoV-2 с использованием коммерческих наборов реагентов. 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 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, 2 показаны результаты ЦПД для клеток, инокулированных различным исходным материалом.

Из представленных рисунков видно, что для клеток, инокулированных образцами №1/3947 (Б) – патологический материал от павших норок (селезенка), третьи сутки инкубации, и №5/3948 (Г) – биологический материал от норок (легкое), четвертые сутки инкубации, наблюдается выраженный цитопатический эффект по сравнению с контролем (А, В). По достижению ЦПД 70-80% флаконы с клетками двукратно замораживали-оттаивали для увеличения выхода вирусных частиц в среду, затем клеточный дебрис удаляли центрифугированием, вирусосодержащую культуральную жидкость использовали для последующих пассажей. Всего таким образом было выделено 2 изолята и для каждого из них проведено по 3 последовательных пассажа, 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.

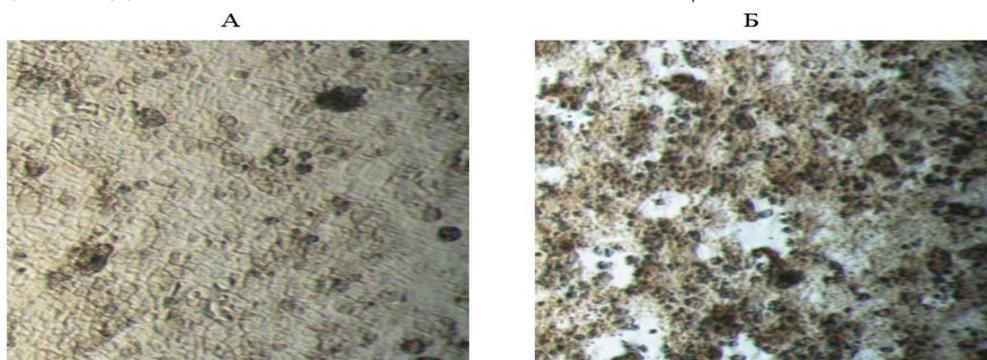
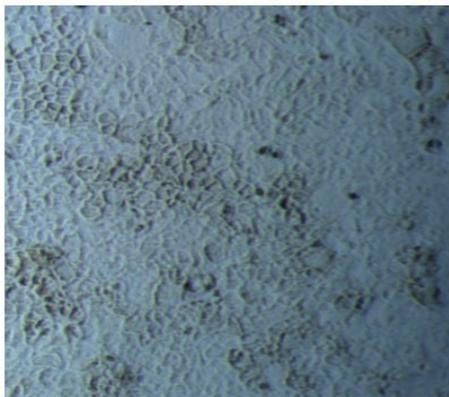


Рисунок 1 – Результаты ЦПД для клеток, инокулированных различным исходным материалом: А – контроль Vero E6; Б – Vero E6 / образец 3947

В



Г

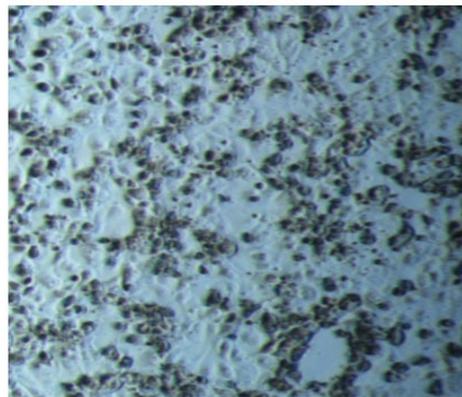


Рисунок 2 – Результаты ЦПД для клеток патологического материала образца №5 норок, инокулированных различным исходным материалом: В – контроль Vero E6; Г – Vero E6 / образец 3948

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 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 + антибиотик (гентамицин 0,24 мг/мл). 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 CO_2 - инкубатор при 37 °С и 5% CO_2 . Результаты титрования учитывали в течение 4-7 суток инкубирования по проявлению цитопатического действия. Инфекционный титр вируса выражали в $TCID_{50}$ (50% я тканевая цитопатическая доза) и рассчитывали по методу Кербера.

На рисунке 3 представлены результаты изменения титров вируса на протяжении десяти последовательных пассажей.

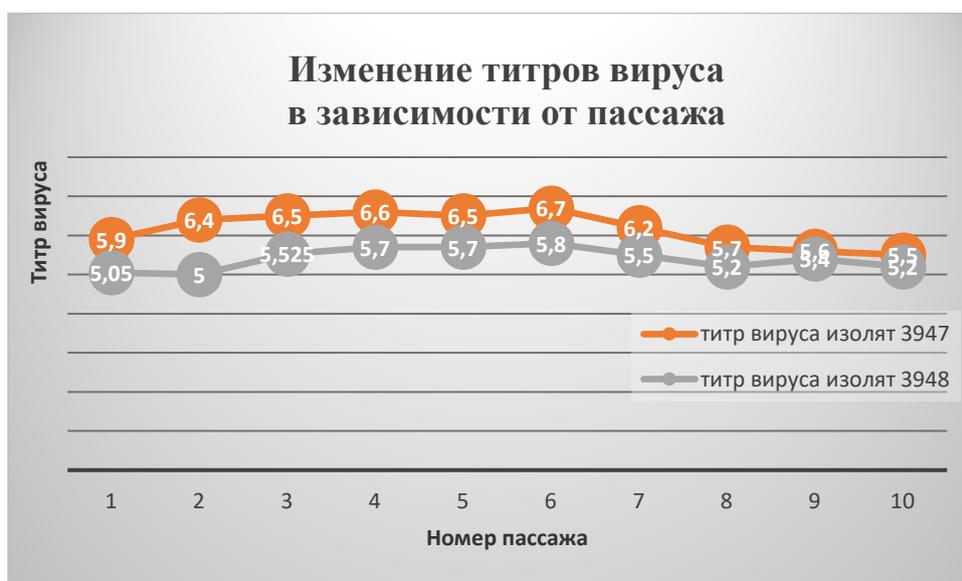


Рисунок 3 – Изменение титров вируса на протяжении десяти последовательных пассажей

Как видно из представленного рисунка 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.

Изолят коронавируса SARS-CoV-2 №1/3947 был выбран в качестве кандидатного штамма для получения инактивированного вирусного антигена. Для данного изолята были выполнены работы по накоплению вируса (вирусодержащая культуральная жидкость) в культуре клеток Vero E6, проведена его инаktivация, осуществлена проверка полноты инаktivации.

Заключение. Проведенные исследования по выделению изолятов вируса SARS-CoV-2, на перевиваемой культуре клеток Vero E6 из переданных образцов биологического материала от животных: 2 пробы (проба №1/3947 и №5/3948) патологического материала (селезенка, легкое), отобранных от павших норок в УП «Молодеченское зверохозяйство Белкоопсоюза», подтвержденные в ПЦР на наличие антигена вируса SARS-CoV-2, проведена адаптация выделенных изолятов коронавируса SARS-CoV-2 к перевиваемым культурам клеток млекопитающих, определены оптимальные параметры культивирования вируса (множественность инфицирующей дозы, длительность культивирования, температура культивирования, концентрация сыворотки в составе поддерживающей среды). Проведен анализ выделенных изолятов с использованием метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени; выполнено по 10 последовательных пассажей для каждого изолята и осуществлена их закладка на криохраниение.

Литература. 1. Paoli D, Pallotti F, Colangelo S, Basilico F, Mazzuti L, Turriziani O, et al. Study of SARS-CoV-2 in semen and urine samples of a volunteer

with positive naso-pharyngeal swab. *Journal of Endocrinological Investigation [Internet]. Springer Science and Business Media LLC.* 2020 Apr 23. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01261-1>. 2. Ashour HM, Elkhatib WF, Rahman MM, Elshabrawy HA. *Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks. Pathogens [Internet]. MDPI AG;* 2020;4: 9 (3):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.jhu.edu/map.html> 4. Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, Dulebohn SC, Di Napoli R (2020) Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19). *StatPearls Publishing.* Accessed 3 Apr 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/> 5. Chen Y, Guo Y, Pan Y, Zhao ZJ. *Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. Biochemical and Biophysical Research Communications [Internet]. Elsevier BV.* 2020;525 (1):135-1405. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. *Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Eurosurveillance [Internet]. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC).* 2020;25(3). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045>. 7. Xie C, Jiang L, Huang G, Pu H, Gong B, Lin H, et al. *Comparison of different samples for 2019 novel coronavirus detection by nucleic acid amplification tests. International Journal of Infectious Diseases [Internet]. Elsevier BV.* 2020;93:264-267. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.050>. 8. Peng X, Xu X, Li Y, Cheng L, Zhou X, Ren B. *Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. International Journal of Oral Science [Internet]. Springer Science and Business Media LLC.* 2020;12(1). <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0075-9> 9. 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-

УДК 619:616.993:615:636.2.053

К ПРОБЛЕМЕ КРИПТОСПОРИДИОЗА ТЕЛЯТ В ХОЗЯЙСТВАХ ВИТЕБСКОЙ ОБЛАСТИ.

Бородин Ю.А.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Распространение криптоспоридиоза жвачных в условиях Республики Беларусь. Ключевые слова: криптоспоридиоз, распространение.

ON THE PROBLEM OF CRYPTOSPORIDIOSIS IN CALVES ON FARMS OF THE VITEBSK REGION.