

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 см<sup>2</sup>. 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.

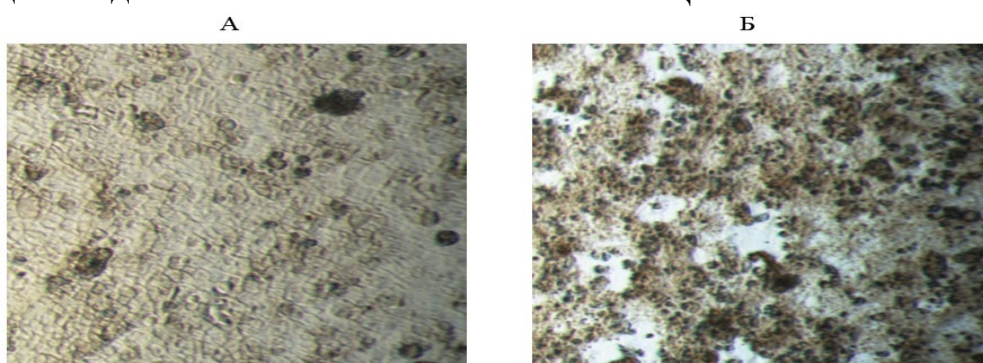
Постановку ПЦР проводили с использованием коммерческих реагентов «Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV-2 методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «SARS-CoV-2/SARS-CoV» (ДНК-технология, Российская Федерация), тест-система «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 TCID<sub>50</sub>, 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

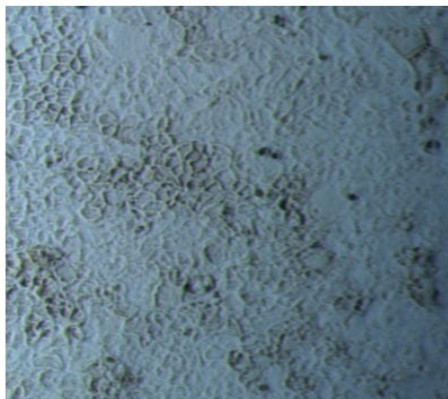
УП «Молодеченское зверохозяйство Белкоопсоюза». Образцы биологического материала были предварительно протестированы на наличие РНК SARS-CoV-2 с использованием коммерческих наборов реагентов. Для выделения вируса использовали культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup>, содержащие суточную культуру 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<sup>-2</sup> до 10<sup>-7</sup> с последующим выделением РНК и постановкой ОТ-ПЦР.

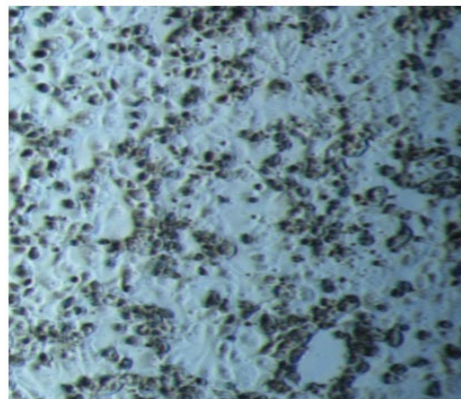


**Рисунок 1 – Результаты ЦПД для клеток, инокулированных различным исходным материалом: А – контроль Vero E6; Б – Vero E6 / образец 3947**

В



Г



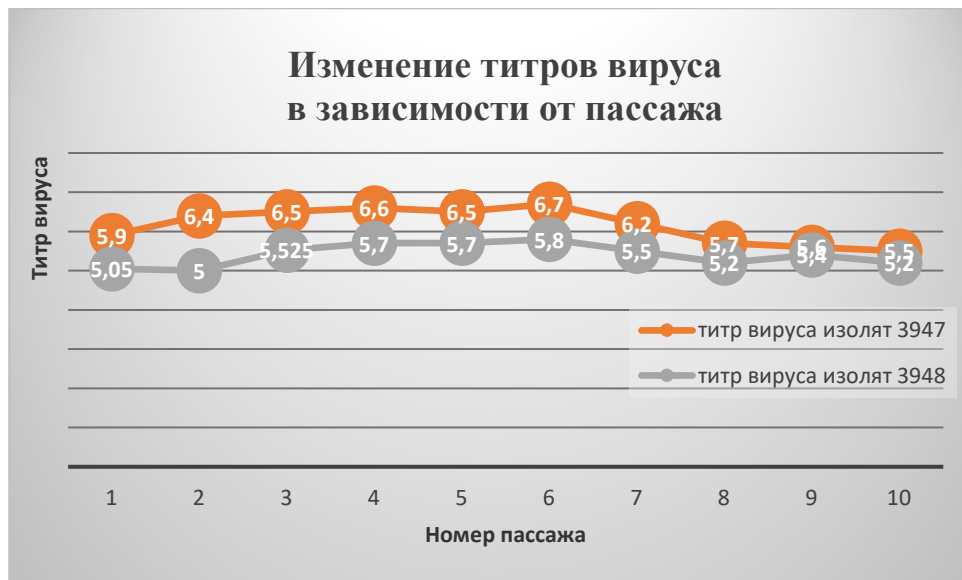
**Рисунок 2 – Результаты ЦПД для клеток патологического материала образца №5 норок, инокулированных различным исходным материалом: В – контроль Vero E6; Г – Vero E6 / образец 3948**

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 (вирусосодержащая 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.**