

**ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ
ВОЗБУДИТЕЛЯ КОРОНАВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК В
ПЕРВИЧНО-ТРИПСИНИЗИРОВАННЫХ И СУБКУЛЬТУРАХ
КЛЕТОК**

Комарова А.А., Галкина Т.С.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»,
г. Владимир, Российская Федерация

*Исследование культуральных свойств изолятов возбудителя коронавируса энтерита собак, выделенных в различных первично-трипсинизированных и субкультурах клеток, показывает, что наиболее чувствительной к данному вирусу является культура клеток почки щенка, в которой вирус вызывает характерные цитопатические изменения с первого пассажа культивирования и накапливается в наибольшем титре. **Ключевые слова:** первично-трипсинизированные и субкультуры клеток, вирусывыделение, коронавирусный энтерит собак*

**ISOLATION AND CULTURAL PROPERTIES OF ISOLATES OF THE
CAUSATIVE AGENT OF CANINE CORONAVIRUS ENTERITIS IN
PRIMARY TRYPSINIZED AND SUBCULTURES OF CELLS**

Komarova A.A., Galkina T.S.

Federal Centre for Animal Health» (FGBI «ARRIAH»), Vladimir,
Russian Federation

*A study of the cultural properties of isolates of the causative agent of canine coronavirus enteritis, isolated in various primary trypsinized and subcultures of cells, shows that the most sensitive to this virus is the culture of puppy kidney cells, in which the virus causes characteristic cytopathic changes from the first passage of cultivation and accumulates in the highest titer. **Key words:** primary trypsinized and subcultured cells, virus isolation, canine coronavirus enteritis*

Введение. Возбудитель коронавируса энтерита собак (ССоV) был впервые выделен в 1971 году и более 30 лет считался патогеном, вызывающим у щенков энтерит легкой или умеренной степени тяжести с незначительной вероятностью летального исхода [1, 2]. Однако, в последние десятилетия в зарубежной литературе часто появляются сообщения о выделении новых штаммов ССоV, вызывающих системное заболевание и гибель щенков, что указывает на значительные изменения, которые претерпел возбудитель в процессе эволюции и рост его вирулентности [3 - 5]. Выделение изолятов

ССоV, изучение их биологических свойств позволит расширить знания о данном возбудителе с последующим совершенствованием арсенала средств профилактики данной инфекции.

Материалы и методы исследований. В период 2021 года было отобрано 11 проб патологического материала от больных и погибших щенков в возрасте 1-3 мес. с симптомами гастроэнтерита. Из 11 проб в 3 пробах – установлено наличие возбудителя коронавирусного энтерита. Из положительных образцов биоматериала (тонкий кишечник, фекалии) по общепринятой методике готовили 10-% суспензию и заражали монослойные культуры клеток, выращенные в культуральных флаконах. Ежедневно после инокуляции вируса монослой просматривали под микроскопом на наличие признаков цитопатического действия (ЦПД).

Для выделения изолятов ССоV использовали следующие первично-трипсинизированные и субкультуры клеток, полученные из сектора культуры клеток (СКК) ФГБУ «ВНИИЗЖ»: культура клеток почки щенка (КК ПЩ); культура клеток селезенки щенка (КК СЩ); культура клеток почки котенка (КК ПК); культура клеток селезенки котенка (КК СК). Определение инфекционной активности изолятов ССоV проводили в культуре клеток почки кошки (CRFK), выращенной в 96-луночных планшетах Costar (Corning, США). Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/см³. Всего было проведено пять пассажей. Наличие антигена ССоV в культуральной жидкости после каждого пассажа определяли иммунохроматографическими тест-системами (ИХТС), и при отрицательном результате дальнейшее культивирование считали нецелесообразным.

Результаты исследований.

Из трех положительных на наличие ССоV образцов биоматериала выделить изоляты возбудителя в культурах клеток удалось из двух образцов. У изолята № 3 в течение трех пассажей не наблюдали характерного ЦПД ни в одной из испытанных культур клеток, а ИХТС на втором и третьем пассаже показал отрицательный результат на наличие антигена ССоV. Изоляты № 1 и № 2 удалось выделить в трех испытанных культурах клеток. В КК ПЩ и КК СЩ характерное ЦПД вируса наблюдалось с 1-го пассажа у обоих изолятов, в то время как в культурах клеток ПК и СК ЦПД не обнаруживалось.

Таблица 1 - Выделение изолята № 1 возбудителя коронавирусного энтерита собак в первично-трипсинизированных и субкультурах клеток (n=3)

Культура клеток	Титр вируса и стандартное отклонение, lg ТЦД ₅₀ /см ³				
	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж
ПК	<1,00	<1,00	<1,00	-*	-
СК	1,00±0,00	1,25±0,00	1,33±0,14	1,42±0,14	1,42±0,14
ПЩ	1,25±0,00	1,33±0,25	2,00±0,25	2,25±0,25	2,50±0,25
СЩ	1,25±0,25	1,50±0,25	1,75±0,25	1,66±0,29	1,75±0,25

*не исследовали

Таблица 2 - Выделение изолята № 2 возбудителя коронавирусного энтерита собак в первично-трипсинизированных и субкультурах клеток (n=3)

Культура клеток	Титр вируса и стандартное отклонение, lg ТЦД ₅₀ /см ³				
	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж
ПК	2,33±0,14	<1,00	<1,00	-*	-
СК	1,50±0,25	2,58±0,14	2,92±0,14	2,92±0,14	3,42±0,14
ПЩ	3,00±0,00	3,92±0,14	4,5±0,25	4,5±0,00	5,08±0,14
СЩ	4,42±0,14	4,33±0,14	4,42±0,14	4,33±0,14	4,5±0,25

Изолят № 2 накапливался в титре 2,33±0,14 lg ТЦД₅₀/см³ в КК ПК на уровне 1-го пассажа, на 2-ом пассаже ИХТС показал положительный результат на наличие антигена ССоV, однако, при титровании в культуре клеток CRFK характерного ЦПД в лунках планшета не наблюдалось. На уровне 3-го пассажа результат ИХТС был отрицательным, поэтому дальнейшее культивирование вируса считали нецелесообразным. Изолят № 1 в КК ПК не репродуцировался.

Максимальное накопление вируса у изолятов № 1 и № 2 отмечали в КК ПЩ на уровне 5-го пассажа. В КК СЩ изолят № 2 накапливался в течение 5 пассажей в титре не ниже 4,33±0,14 lg ТЦД₅₀/см³. В КК СК инфекционная активность была ниже. Изолят № 1 в целом показал меньшую по сравнению с изолятом № 2 инфекционную активность во всех испытанных культурах, но культуры клеток ПЩ, СЩ, СК являлись перmissive для обоих изолятов.

Заключение. Выделение возбудителя возможно в первично-трипсинизированных и субкультурах клеток ПЩ, СЩ, СК. В культуре клеток ПЩ характерное ЦПД наблюдалось на уровне 1-го пассажа у обоих выделенных изолятов, а к 5-му пассажиру вирус накапливался в максимальном титре, в связи с этим данную культуру можно считать наиболее целесообразной для выделения изолятов возбудителя коронавирусного энтерита собак.

Литература. 1. *Диагностика и профилактика инфекционных болезней собак и кошек: руководство для практикующих ветеринарных врачей / Алипер Т. И. [и др.]; под редакцией доктора биологических наук, профессора Алипера Т. И. - Москва: ЗооВетКнига, 2017. – 300 с.* 2. *Ольшанская А.А. Диагностика и профилактика коронавирусной инфекции собак/ А.А. Ольшанская // Ветеринарная патология. – 2006. - № 3.- с. 26-31.* 3. *Alfano F. Circulation of pantropic canine coronavirus in autochthonous and imported dogs, Italy / F. Alfano, G. Fusco, V. Mari [et al.]// Transboundary and Emerging Diseases.- 2020. – Vol.67, №5. – P. 1991–1999.* 4. *Buonavoglia C. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs / C. Buonavoglia, N. Decaro, V. Martella [et al.]// Emerging Infectious Diseases. – 2006. – Vol.12, №3. – P. 492-494.* 5. *Zicola A. Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium/ A. Zicola, S. Jolly, E. Mathijs [et al.]// The Journal of Small Animal Practice. – 2012. - Vol.53, №5. – P. 297-30.*