

УДК 619:578.834.1:636.934.57

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹**Каяк Ю.А.**, аспирант¹**Толяронок Г.Е.**, кандидат ветеринарных наук, доцент¹**Семижон П.А.**, кандидат биологических наук²**Счеслёнок Е.П.**, кандидат биологических наук²**Сухоцкая Е.А.**, младший научный сотрудник²¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск, Республика Беларусь²ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ИЗ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОТ ЖИВОТНЫХ НА КУЛЬТУРЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Резюме

Проведены исследования по выделению изолята коронавируса SARS-CoV-2. В результате выделен изолят вируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова: норки, вирус, COVID-19, SARS-CoV-2, инфекция.

Summary

Research has been carried out to isolate an isolate of the coronavirus SARS-CoV-2. As a result, an isolate of the SARS-CoV-2 virus was isolated.

Keywords: minks, virus, COVID-19, SARS-CoV-2, infection.

Поступила в редакцию 02.05.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусы – семейство вирусов, содержащих в качестве генетического материала одноцепочечную (+) РНК со специфическими гликопротеидными шипами вокруг вирусного капсида, которые при электронном микроскопировании похожи на 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 последнее двадцатилетие, кроме ранее известных видов из семейства коронавирусов, патогенных для человека, входящих 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, переросшей 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].

С первых случаев заражения человека SARS-CoV-2 до сегодняшнего времени в мире зафиксировано более 704 753 890 случаев, 7 010 681 человек погибло. Существуют сведения, как влияет вирус SARS-CoV-2 на домашних, сельскохозяйственных и диких животных. Анализ литературных источников показал, что домашние кошки и собаки инфицируются SARS-CoV-2, но остаются бессимптомными вирусносителями или же у них развиваются легкие клинические признаки заболевания. Норки и хорьки также восприимчивы к заболеванию, и у норки может развиваться смертельное заболевание, а вирус может передаваться от норки к человеку и наоборот [5].

Целью исследования является выделение изолятов вируса SARS-CoV-2 на перевиваемой культуре клеток из образцов биологического материала от норок, подтверждение методом ПЦР наличия антигена вируса SARS-CoV-2 от павших норок, адаптация к перевиваемым культурам клеток млекопитающих, закладка изолятов на хранение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являются изоляты вируса SARS-CoV-2, полученные из биологического материала норок (селезенка, легкое): проба № 1 – вх. 3947 и проба № 5 – вх. 3948, отобранного от павших животных 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.

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%-ная суспензия легких и селезенки на фосфатно-буферном растворе pH 7.4) в объеме 1,0 мл предварительно пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, на адсорбцию брали 700,0 мкл суспензии из расчета площади культурального флакона 25,0 см². Адсорбцию проводили в течение 1 часа при температуре +37 °С. Далее вносили среду поддержки (DMEM +2%-ная сыворотка эмбрионов коров (СЭК). Флаконы инкубировали от 3 до 5 суток до появления цитопатического действия (ЦПД), после этого проводили два цикла замораживания-оттаивания, клеточную суспензию центрифугировали при 6 тыс. об/мин. при температуре +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.

Выделение вирусной РНК для исследования методом ОТ-ПЦР проводили с использованием коммерческого набора 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 набора 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-системы «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-Kärber [5].

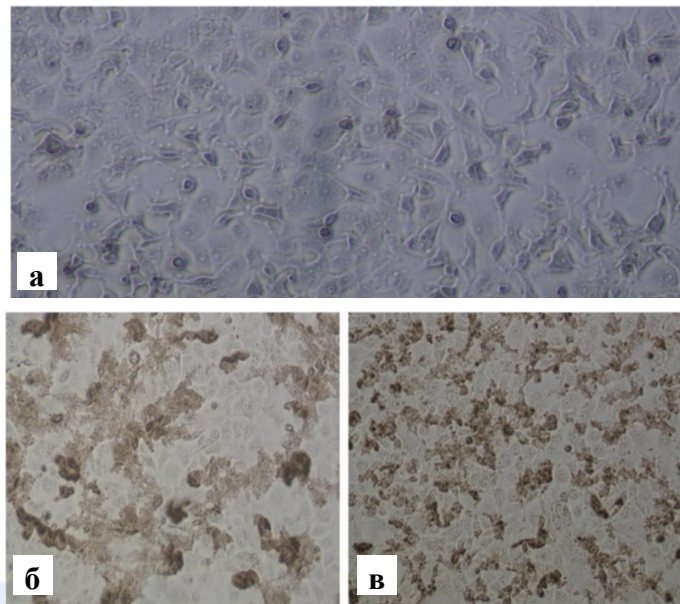
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По имеющимся литературным данным, для культивирования вируса SARS-CoV была эффективно использована клеточная линия Vero E6. Эта же клеточная линия 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 25,0 см², содержащие суточную культуру клеток с 80–90%-ным монослоем клеток. После проведения адсорбции в течение часа вносили среду поддержки DMEM, содержащую гентамицин и 2%-ную СЭК. На 3-4-е сутки наблюдали эффект так называемого цитопатического действия, 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 рисунке 1 представлены результаты ЦПД для клеток, инокулированных различным исходным материалом.

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

контролем (а). По достижению ЦПД 70–80 % флаконы с клетками двукратно замораживали-оттаивали для увеличения выхода вирусных частиц в среду, затем клеточный дебрис удаляли центрифугированием, вирусодержащую 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.



а – контроль Vero E6; б – Vero E6 / образец 3947, в – Vero E6 / образец 3948

Рисунок 1 – Результаты ЦПД для клеток, инокулированных различным исходным материалом

Определение инфекционной активности вируса по 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%-ную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) + 0,24 мг/мл гентамицина. 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 температуре 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%-ная тканевая цитопатическая доза) и рассчитывали по методу Кербера.

На рисунке 2 представлены результаты изменения титров вируса на протяжении десяти последовательных пассажей.



Рисунок 2 – Изменение титров вируса на протяжении десяти последовательных пассажей

Как видно из рисунка 2, наибольшие титры вируса достигались к пятому-шестому пассажу 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 кандидата 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 инактивация, осуществлена проверка полноты инактивации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены исследования по выделению изолятов вируса SARS-CoV-2 на пере-

виваемой культуре клеток Vero E6 из образцов биологического материала от животных, подтвержденные методом ПЦР на наличие антигена вируса SARS-CoV-2 от павших норок, выделены 2 пробы (проба № 1/3947 и № 5/3948).

Выделенные изоляты успешно адаптированы к перевиваемым культурам клеток млекопитающих. Определены оптимальные параметры культивирования вируса. Для каждого изолята выполнено по 10 последовательных пассажей и определена динамика изменения титров вируса в зависимости от пассажа. Титры вируса к пятому-шестому пассажу были достаточно высокими, а изоляты – пригодными для изготовления биопрепаратов. Лучшим для накопления вирусного антигена был изолят № 1/3947.

Осуществлена закладка изолятов № 1/3947 и № 5/3948 на криохрани-

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Study of SARS-CoV-2 in semen and urine samples of a volunteer with positive naso-pharyngeal swab / D. Paoli [et al.] // *Journal of Endocrinological Investigation [Internet]. Springer Science and Business Media LLC.* 2020 Apr 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 [et al.] // *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. Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19) / M. Cascella [et al.] – StatPearls Publishing. Accessed 3 Apr 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>.
5. Баден, Л. Р. COVID-19 – поиск эффективной терапии / Л. Р. 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.