

ІЗОЛЯЦІЯ КОРОНАВІРУСУ ВРХ В КУЛЬТУРАХ КЛІТИН**А. С. БЕРЕЗЕНКО**, здобувач**В. В. НЕДОСЄКОВ**, доктор ветеринарних наук, професор*Національний університет біоресурсів та природокористування України***О. В. ГОДОВСЬКИЙ**, кандидат ветеринарних наук**ТОВ «Біотестлаб»**

E-mail: Nastia4477@gmail.com, nedosekov1@rambler.ru, a_godovskiy@biotestlab.net

<https://doi.org/dopovidi2021.04.001>

***Анотація.** Одним із найбільш поширених у світі вірусів, що спричиняє захворювання у великої рогатої худоби є коронавірус ВРХ (ВСоV). Цей вірус є збудником інфекції респіраторного та шлунково-кишкового тракту в новонароджених телят, що призводить до значних економічних втрат, як у молочному, так і в м'ясному напрямках тваринництва. З огляду на складну епізоотичну ситуацію щодо коронавірусів у світі та часткову антигенну спорідненість ВСоV з коронавірусами інших видів тварин та людини, вкрай важливим і актуальним стає виділення нових штамів коронавірусів, їх ідентифікація та оптимізація умов культивування.*

Метою наших досліджень було визначити особливості методів виділення коронавірусу ВРХ та підібрати способи його культивування в культурі клітин із метою отримання вірусу з найбільшими титрами інфекційної активності.

Експериментально доведена чутливість культуральних систем до вірусу і встановлено, що використання перещеплюваної лінії культури клітин нирки теляти (МДБК) та первинно-трипсинізованої культури клітин нирки ембріона теляти (НЕТ) дозволяють отримати вірусовмісну суспензію з титром інфекційної активності $5,54 \pm 0,16 \lg \text{ТЦД}_{50}/1,0 \text{ мл}$ та $5,59 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/1,0 \text{ мл}$ відповідно, що є перспективним для біотехнологічних розробок.

Подальші дослідження планується спрямувати на дослідження отриманого вірусного ізоляту для послідувочої розробки засобів діагностики та імунопрофілактики коронавірусної інфекції у ветеринарній медицині.

***Ключові слова:** Coronaviridae, біологічні властивості, коронавірус великої рогатої худоби, культивування вірусів, культура клітин, інфекційна активність*

Актуальність. Коронавірус ВРХ (ВСоV) – один із найбільш поширених у світі вірусів, що спричиняє захворювання поміж великої рогатої худоби [14]. Цей вірус є збудником

зимової дизентерії в корів та інфекції респіраторного та шлунково-кишкового тракту в новонароджених телят, що призводить до значних економічних втрат, як у молочному,

Березенко А. С., Недоссков В. В., Годовський О. В. так і в м'ясному напрямку тваринництва [4].

ВCoV сричиняє діарею в новонароджених телят у перші три тижні життя, коли ще немає належного рівня природної та набутої резистентності, що сильно ускладнює профілактику цього захворювання в телят. Завдяки тому, що коронавірус вражає епітеліальні клітини кишечника, порушується всмоктування поживних речовин, а також накопичуються продукти розпаду, що призводить у подальшому до загибелі тварин. Персистентна коронавірусна інфекція у дорослих тварин зумовлює зниження молочної та м'ясної продуктивності поголів'я, та є джерелом вірусу для новонароджених телят [4].

Україна є неблагополучною щодо коронавірусу великої рогатої худоби і на цей момент в світі немає розроблених противірусних засобів терапії і тому проведення імунопрофілактичних заходів є ефективним способом контролю та ерадикації даної хвороби на території нашої країни [1, 2, 3]. Однак, пріоритетним в розробці ефективної вакцини є визначення особливостей ізоляції коронавірусу ВРХ та підбір способів його репродукції в культурі клітин з максимальним рівнем накопичення вірусу.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Коронавіруси (CoVs) – плеоморфні, діаметром від 60 до 220 нм, віруси, що мають оболонку, яка включає булавовидні глікопротеїни (S), довжиною приблизно 12-25 нм. CoVs містять одноланцюгову позитивну РНК від 26 до 32 kb [11]. CoVs існують як квазивиди і мають високий рівень мутації та рекомбінації [7]. Це сприяє появі нових штамів CoV із зміненими тропізмиами до клітин та специфікою господаря, що сприяє їх міжвидовій передачі для опанування нових господарів поміж видів тварин та людини.

Родина Coronaviridae у порядку Nidovirales складається з чотирьох родів: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus, та Deltacoronavirus. Разом з коронавірусом ВРХ, коронавірус людей OC43, коронавірус собак, SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV та рHEV належать до роду Betacoronavirus [6].

Багатьма дослідникам було встановлено, що ВCoV накопичується у культурах клітин (КК) трахеї та кишечника, у культурі HRT-18 (пухлина прямої кишки людини-18) та Vero (нирка африканської зеленої мавпи), BEK-1 (бичачої ембріональної нирки), D2BFS (КК селезінки ВРХ), BEL 14 (ембріональної легені ВРХ), MDBK (КК бичачої нирки Мадін

Березенко А. С., Недоссков В. В., Годовський О. В. Дарбі), MDCKI (КК собачої нирки Мадін Дарбі 1) тощо. Здатність накопичуватися в культурах клітин різного видового походження підтверджує широкий тропізм вірусу і можливість передачі збудника між видами тварин [9].

Mebus з колегами [10] ще в 1973 р. вперше продемонстрував, що коронавірус, виділений від теляти, з діареєю, може бути адаптований до культури клітин. Уперше вірус був ізольований у первинно-трипсинізованій культурі клітин нирки плода великої рогатої худоби, а потім адаптований до субкультури клітин нирок плода корови. Встановлено, що вірус реплікувався у клітинах, що було підтверджено фарбуванням міченим флуоресцеїном кролячим гамма-глобуліном проти цього вірусу, та спричиняв цитопатичну дію (ЦПД), яка спостерігалася після 24 пасажів у культурі клітин і характеризувалася утворенням синцитій, округленням і втратою адгезії клітин.

Takahashi та ін. [13] також використовували первинну первинно-трипсинізовану культуру клітин нирок плода ВРХ для виділення штаму Kakegawa (який виділено з фекалій корови з епізоотичною діареєю). ЦПД, що характеризувалася формуванням синцитій та зернистістю клітин, а також позитивна імунофлуоресценція,

стали помітними на 8 пасажі вірусу в КК.

Inaba та ін. [8] та Sato та ін. [12] використовували перещеплювану клітинну лінію ВЕК-1, (нирка великої рогатої худоби), для накопичення польового ізоляту коронавірусу Mebus. ЦПД уперше проявилася через 3 дні й характеризувалася округленням клітин, яке прогресувало до злиття клітин та розпаду моношару. Після подальших пасажів вихід вірусу становив від 10^4 до 10^5 ТЦД₅₀/мл.

Dea з колегами [5] продемонстрували, що перещеплювані КК Vero, MDBK та РК-15 (нирка свині) були придатними для ізоляції та розмноження штаму Mebus. ЦПД та позитивне імунофлуоресцентне фарбування спостерігались у всіх клітинних лініях, що були використані. ЦПД характеризувалася округленням клітин, відшаруванням та повним руйнуванням моношару через 96 год. Вихід вірусу коливався від 10^6 до 10^7 ТЦД₅₀/мл.

Отже, відповідно до аналізу наукових досягнень до коронавірусу можуть бути чутливі культури клітин різного видового походження, але вони відрізняються як за можливістю виділення вірусу так і за ступенем накопичення.

Польові ізоляти ВCoV здатні розмножуватися в первинно-трипсинізованих культурах клітинах

Березенко А. С., Недоссков В. В., Годовський О. В. великої рогатої худоби та перещеплюваній культурі клітин Vero. Ці типи клітин можуть бути використані, як для ізоляції вірусу, так і для кількісного визначення вірусу.

Метою наших досліджень було вивчення особливостей ізоляції коронавірусу ВРХ, оптимізація умов його культивування та отримання високоактивного вірусомісного матеріалу для конструювання засобів діагностики та імунопрофілактики.

Методи. Відбір зразків проводили у двох фермерських, стаціонарно неблагополучних за інфекційних кишково-шлункових захворювань ВРХ, господарствах, які спеціалізуються на молочному напрямі тваринництва та розташовані в межах Київської області. Утримання тварин на фермах вільно-вигульне безприв'язне.

Для проведення досліджень відбирали проби фекалій, змиви з прямої кишки та з носової порожнини, проби ділянок кишечника з найбільш вираженими ознаками захворювання від 15 живих та 5 мертвих телят (згідно з таблицею 1).

Проби фекалій відбирали безпосередньо з прямої кишки за допомогою одноразової резинової рукавички в стерильний контейнер для збору фекалій. Змиви з носової порожнини та прямої кишки проводили з використанням

одноразових стерильних свабів (зонд-тампонів) у пробірках із середовищем для транспортування вірусів (ТМ Deltalab). Від трупів телят відбирали проби ділянок тонкого кишечника з використанням стерильних інструментів, кінці кишечника перев'язали. Транспортували в замороженому вигляді в контейнері.

Лабораторна діагностика.

Діагностику на коронавірусну інфекцію проводили постановкою Real-Time PCR (VetMAX™ Ruminant Respiratory Screening Kit, Thermo Fisher Scientific, США). Додатково проводили дослідження калових мас – методом флотації, седиментації та мікроскопії нативного мазку – з метою виключення гельмінтів та простіших, а також бактеріологічне дослідження шляхом прямого посіву – для виключення дисбактеріозу.

Культури клітин: Для проведення ізоляції вірусу використовували культури клітин MDBK, Vero (закладені в банк культур клітин) та первинно-трипсинізовані культури клітин легень та нирок ВРХ зі сформованими моношарами клітин, адаптовані до середовища Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM - Sigma-Aldrich®) та з додаванням 10 % фетальної сироватки ВРХ (FBS - Sigma-Aldrich®).

Березенко А. С., Недоссков В. В., Годовський О. В.

Підготовка проб до ізоляції вірусу: Підготовка позитивних за ПЛР проб:

- До проб фекалій додавали 4-кратний об'єм фосфатно-сольового буферу (ФСБ, рН – 7,2-7,4).

- Проби тканин кишечника подрібнили, розтерли у ступці зі скляним піском, розвели розчином ФСБ (рН - 7,2).

- Для підготовки змивів із носової порожнини та прямої кишки в асептичних умовах внесли в стерильні пробірки по 10,0 см³ ФСБ та помістили в них відповідні аплікатори зі змивами, ретельно перемішуючи ними рідину. Після чого рідину з аплікаторів, якими відбирали проби, віджали за допомогою стерильних пінцетів.

Усі проби після підготовки центрифугували (3000 г, 30 хвилин) та послідовно фільтрували супернатант через фільтри з діаметром пор 0,45 та 0,22 μm. (Merck (Millipore), Німеччина).

Виділення вірусу в культурах клітин: Для ізоляції вірусу використовували культури клітин віком 2-4 дні зі сформованими моношарами в культуральних флаконах площею 25 см². Перед внесенням проб із культуральних флаконів видаляли ростове поживне середовище та перед інокуляцією двічі промивали моношар КК розчином поживного середовища DMEM без

додавання сироватки крові. Фільтровану суспензію вірусу по 1,0 см³ інокулювали в клітини та проводили адсорбцію упродовж 20 хвилин за температури 37 ± 0,5 °С. Після адсорбції рідину видаляли та додавали до моношару клітин середовище DMEM без додавання сироватки крові. Інкубацію вірусу в культурі клітин проводили за температури 37±0,5 °С до прояву цитопатичної дії вірусу, або упродовж 5 діб за відсутності ЦПД, після чого проводили наступний «сліпий» пасаж.

Цитопатичний ефект спостерігали упродовж 2-5 діб після інокуляції вірусу.

Культуральні флакони з культурою клітин заморожували після прояву цитопатичної дії вірусу або після 5 діб культивування за відсутності ЦПД. Для проведення послідовних «сліпих» пасажів на відповідних культурах клітин використовували по 1,0 см³ попереднього пасажу. Виділення ізоляту вірусу вважали вдалим у випадку прояву характерної цитопатичної дії до 5-го, серійного пасажу матеріалу в культурі клітин та після отримання позитивних результатів його ПЛР-дослідження.

Ідентифікація вірусу: вірус ідентифікували за допомогою Real-Time PCR.

Березенко А. С., Недоссков В. В., Годовський О. В.

Інфекційну активність вірусу визначали титраційним способом вірусного матеріалу в гомологічній культурі клітин зі сформованим моношаром у 96-луночному плоскодонному культуральному планшеті упродовж 7 днів (з проведенням обліку результатів

починаючи з 3-го дня після титрації). Розрахунок титру вірусу проводили за методом Ріда та Менча.

Результати. Поміж отриманих із фермерських господарств проб від 20 тварин методом Real-Time PCR було виявлено ВСоV у зразках від 16 тварин (згідно з таблицею 1).

1. Зведені результати дослідження отриманих від тварин зразків

№	Вік тварини, дні	Клінічні ознаки захворювання	Відібраний матеріал	Відбір матеріалу, день захворювання	Виявлено ВСоV в ПЛР	Виділено вірус в КК
1	8	Діарея, дегідратація, анорексія, гіповолемічний шок	Фекалії, змиви з кишечника	4	+	-
2	31	Діарея, дегідратація, відсутність апетиту	Фекалії, змиви з кишечника	3	-	-
3	16	Слизові носові виділення, апатія, відсутність апетиту	Змиви з носової порожнини	8	+	-
4	7	Діарея, анорексія, гіповолемічний шок	Фекалії, змиви з кишечника	2	+	+
5	27	Слизові носові виділення, апатія	Змиви з носової порожнини	3	-	-
6	19	Діарея, дегідратація, гіповолемічний шок	Проби кишечника	Посмертно	+	-
7	9	Діарея, анорексія, дегідратація	Фекалії, змиви з кишечника	1	+	+
8	9	Діарея, апатія, гіповолемічний шок	Проби кишечника	Посмертно	+	-
9	15	Діарея, дегідратація, гіповолемічний шок	Проби кишечника	Посмертно	+	-
10	10	Діарея, дегідратація, анорексія, апатія	Фекалії, змиви з кишечника	2	+	-
11	5	Діарея, відсутність апетиту, гіповолемічний шок	Проби кишечника	Посмертно	+	+
12	45	Діарея, анорексія, відсутність апетиту	Фекалії, змиви з кишечника	6	-	-
13	13	Серозні носові виділення, анорексія, апатія	Змиви з носової порожнини	7	+	-

Березенко А. С., Недоссков В. В., Годовський О. В.

14	12	Діарея, дегідратація, гіповолемічний шок	Змиви з носової порожнини	6	+	-
15	11	Діарея, відсутність апетиту, дегідратація	Проби кишечника	Посмертно	+	-
16	22	Слизові носові виділення, відсутність апетиту	Змиви з носової порожнини	5	-	-
17	13	Серозні носові виділення, відсутність апетиту, зневоднення	Змиви з носової порожнини	4	+	-
18	10	Діарея, дегідратація, відсутність апетиту	Фекалії, змиви з кишечника	2	+	+
19	19	Діарея, анорексія, гіповолемічний шок	Фекалії, змиви з кишечника	10	+	-
20	15	Діарея, відсутність апетиту, анорексія	Фекалії, змиви з кишечника	9	+	-

З 16 зразків від позитивних тварин лише в 4 з них (№4, №7, №11 та №18) було виявлено характерний для коронавірусу цитопатичний ефект починаючи з 1-го до 5 пасажу в культурах клітин НЕТ (нирки ембріона теляти) та МДБК. Наявність коронавірусу ВРХ в отриманих

вірусомісних матеріалах на рівні 5-го пасажу підтвердили в Real-Time PCR. Проте ці зразки від позитивних тварин не мали характерної цитопатичної дії в культурах клітин ЛЕТ та Vero упродовж перших 5-ти пасажів культивування.

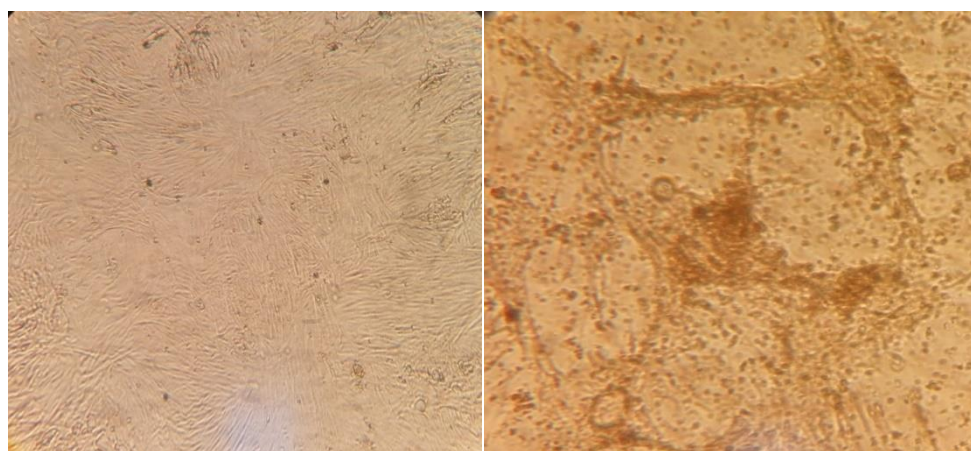


Рис. 1 та 2. Культура клітин НЕТ, інфікована ПЛР-позитивним ізолятом BCoV. Контроль культури клітин – зліва. Культура клітин з ознаками ЦПД через 48 год після інфікування – справа.



Рис. 3 та 4. Культура клітин MDBK, інфікована ПЛР-позитивним ізолятом BCoV. Контроль культури клітин – зліва. Культура клітин з ознаками ЦПД через 72 год після інфікування – справа.

Інші зразки від ПЛР-позитивних тварин не виявляли характерної ЦПД за перших 2х пасажів культивування в усіх досліджуваних культурах клітин.

Визначення інфекційної активності отриманих вірусомісних

матеріалів (з характерним для коронавірусу ВРХ проявом цитопатичної дії) проводили на рівні 4-го та 5-го пасажів культивування. Результати представлені в таблиці 2.

2. Результати визначення інфекційної активності Коронавірусу ВРХ на рівні 4 та 5 пасажів у культурах клітин НЕТ та МДБК

№	4 пасаж		5 пасаж	
	МДБК	НЕТ	МДБК	НЕТ
Зразок № 4	5,18	5,36	5,45	5,53
Зразок № 7	5,36	5,45	5,73	5,50
Зразок № 11	5,03	5,50	5,45	5,70
Зразок № 18	5,53	5,36	5,73	5,45

Висновки і перспективи. У дослідженні з 20 живих та мертвих телят, які мали в анамнезі ознаки респіраторної та/або кишково-шлункової інфекції, позитивний діагноз на коронавірус ВРХ за діагностики Real-Time PCR отримали лише 16. Відповідно до результатів

представлених у таблиці 1, можна зробити висновки, що у пробах кишечника, змивах із прямої кишки та носової порожнини, а також фекаліях, відібраних від телят на початку захворювання, можна виявити вірус у ПЛР.

Березенко А. С., Недоссков В. В., Годовський О. В.

Усі 16 проб від ПЛР-позитивних тварин мали яскраво виражену ЦПД під час проведення 1-го пасажу, яка проявилася через 24-36 год після інокуляції вірусу та може бути пояснена високою токсичністю ізольованого патологічного матеріалу.

Проте після проведення 2-го пасажу характерне ЦПД для VCoV виявили лише в 4 зразків і спостерігали його до 5-го послідовного пасажу на культурах клітин МДБК та НЕТ. Позитивний результат ізоляції спостерігали в зразках, відібраних від тварин віком 5-10 днів безпосередньо на початку прояву захворювання (1-3 дні). Тож, можна судити про те, що своєчасний відбір проб у відповідної за віком групи тварин збільшує шанс на успішну ізоляцію коронавірусу ВРХ у культурах клітин.

Через 48 годин після інокуляції вірусу в КК МДБК та НЕТ інфіковані клітини виявляли такі ознаки ЦПД як вакуолізація та скупчення, а до 72 години після інокуляції, клітини мали схильність до формування синцитіїв та округлення, більшість клітин відшаровувалися від поверхні культурального посуду. Ці результати співпадають з даними, представленими іншими науковцями (зокрема з Mebus та Takahashi).

Відповідно до результатів визначення інфекційної активності 4 та 5 пасажів коронавірусу ВРХ на КК НЕТ

та МДБК, можна зробити висновок, що в КК НЕТ VCoV напрацьовується в більш високих титрах – $5,59 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/1,0$ мл, аніж в КК МДБК – $5,54 \pm 0,16 \lg \text{ТЦД}_{50}/1,0$ мл за 5-го пасажу. Але внаслідок великої кількості затрат під час отримання первинно-трипсинізованих КК, цей режим ізоляції може бути неприйнятним для фармацевтичних компаній та лабораторій.

Також після проведення 5 пасажу вірусний матеріал досліджувався в Real-Time PCR для підтвердження ізоляції VCoV – дослідження 4 проб із ЦПД мало позитивний результат у ПЛР. Відповідно, наявність коронавірусу ВРХ в інфікованих КК можна підтвердити через проведення Real-Time PCR.

Проте, з 12 позитивних за Real-Time PCR зразків не вдалося виділити вірус у перещеплюваних культурах клітин МДБК та Vero, а також у первинно-трипсинізованих культурах клітин легень та нирок ВРХ. Цей факт може свідчити про наявність циркуляції різних штамів VCoV у фермерських господарствах нашої країни та необхідність підбору відповідних оптимальних режимів культивування та культур клітин для їх ізоляції.

Подальші дослідження будуть спрямовані на визначення оптимальних режимів ізоляції різних штамів VCoV

Березенко А. С., Недосєков В. В., Годовський О. В. та виявлення нових та невідомих штамів BCoV, циркулюючих на території України. Також будуть продовжуватися роботи з підбору умов культивування отриманого вірусного

ізоляту та вивчення його антигенної спорідненості задля розробки засобів діагностики та імунопрофілактики у ветеринарній медицині.

References

1. Nedosiekov, V. V., Blakha, T., Sytiuk, M. P., Martyniuk, O. H., Melnyk, V. V., & Yustyniuk, V. Ye. (2021). Osnovy biobezpeky ta blahopoluchchia tvaryn. [Fundamentals of biosafety and animal welfare] Nizhyn.
2. Nedosiekov, V., Khaunkhorst, E., Sytnik, V., Shevchuk, V., & Zhukovskiy, M. (2019). Orhanizatsiia ta ekonomika veterynarnoi spravy. [organization and economics of veterinary affairs]: navch. posibnyk. Kyiv: NUBiP Ukrainy.
3. Bok, M., Alassia M., Frank, F., Vega, C. G., Wigdorovitz, A., Parreno, V. (2018). Passive immunity to control bovine coronavirus diarrhea in a dairy herd in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 50:23–30. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.03.007>
4. Clark, M. A. (1993). Bovine coronavirus. *Br Vet J.* 149:51–70. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(05\)80210-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(05)80210-6)
5. Dea, S., Roy, R. S., & Begin, M. E. (1980). Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines. *American journal of veterinary research*, 41(1), 30-38.
6. Decaro, N., & Lorusso, A. (2020). Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Veterinary microbiology*, 244, 108693. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108693>.
7. Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., & Sironi, M. (2017). Molecular evolution of human coronavirus genomes. *Trends in microbiology*, 25(1), 35-48.

8. Inaba, Y., Sato, K., Kurogi, H., Takahashi, E., Ito, Y., Omori, T., ... & Matumoto, M. (1976). Replication of bovine coronavirus in cell line BEK-1 culture. *Archives of virology*, 50(4), 339-342.

9. Jerez, J. A., Gregori, F., Brandão, P. E., Rodriguez, C. A. R., Ito, F. H., Buzinaro, M. D. G., & Sakai, T. (2005). Isolation of bovine coronavirus (BCoV) in monolayers of HmLu-1 cells. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(3), 207–210. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822005000300001>

10. Mebus, C. A., CA, M., EL, S., MB, R., & MJ, T. (1973). Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation and characteristics of a coronavirus-like agent.

11. Saif, L. J., Wang, Q., Vlasova, A. N., Jung, K., & Xiao, S. (2019). Coronaviruses. *Diseases of swine*, 488-523.

12. Sato, K., Inaba, Y., Kurogi, H., Takahashi, E., Ito, Y., Goto, Y., ... & Matumoto, M. (1977). Physico-chemical properties of calf-diarrhea coronavirus. *Veterinary Microbiology*, 2(1), 73-81.

13. Takahashi, E., Inaba, Y., Sato, K., Ito, Y., Kurogi, H., Akashi, H., ... & Omori, T. (1980). Epizootic diarrhoea of adult cattle associated with a coronavirus-like agent. *Veterinary Microbiology*, 5(2), 151-154.

14. NCBI Taxonomy Browser URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=11128&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

ИЗОЛЯЦИЯ КОРОНАВИРУСА КРС В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

А. С. Березенко, В. В. Недосєков, А. В. Годовский

Аннотація. Одним из самых распространенных в мире вирусов, вызывающих заболевание у крупного рогатого скота является коронавирус КРС (BCoV). Этот вирус – возбудитель инфекции респираторного и желудочно-кишечного тракта у

Березенко А. С., Недоссков В. В., Годовський О. В.

новорожденных телят, что приводит к значительным экономическим потерям, как в молочном, так и в мясном направлениях животноводства. Учитывая сложную эпизоотическую ситуацию по коронавирусам в мире и частичное антигенное родство BCoV с коронавирусами других видов животных и человека, крайне важным и актуальным становится выделение новых штаммов коронавирусов, их идентификация и оптимизация условий культивирования.

Целью наших исследований было определить особенности методов выделения коронавируса КРС и подобрать способы его культивирования в культуре клеток с целью получения вируса с наибольшими титрами инфекционной активности.

Экспериментально доказана чувствительность культуральных систем к вирусу и установлено, что использование перевиваемой линии культуры клеток почки телят (МДБК) и первично-трипсинизованной культуры клеток почки эмбриона телят (НЕТ) позволяют получить вируссодержащую суспензию с титром инфекционной активности $5,54 \pm 0,16 \lg \text{TCD}_{50}/1,0 \text{ мл}$ и $5,59 \pm 0,14 \lg \text{TCD}_{50}/1,0 \text{ мл}$ соответственно, что является перспективным для биотехнологических разработок.

Дальнейшие исследования планируется направить на исследование полученного вирусного изолята для последующей разработки средств диагностики и иммунопрофилактики коронавирусной инфекции в ветеринарной медицине.

Ключевые слова: *Coronaviridae, биологические свойства, коронавирус крупного рогатого скота, культивирование вирусов, культура клеток, инфекционная активность*

ISOLATION OF BOVINE CORONAVIRUS (BCOV) IN CELL CULTURES

A. Berezenko, V. Nedosekov, O. Godovskiy

Abstract. *One of the most common viruses in the world that causes disease in cattle is the bovine coronavirus (BCoV). This virus is the causative agent of respiratory and gastrointestinal infections in newborn calves, resulting in significant economic losses in both dairy and meat farming. Considering the complex epizootic situation with the coronaviruses in the world and partial antigenic affinity of BCoV with coronaviruses of other species of animals and humans, the isolation of new strains of coronaviruses, their identification and optimization of cultivation conditions becomes extremely important and relevant.*

The aim of our research was to determine the features of methods of isolation of bovine coronavirus and to select methods for its cultivation in cell culture in order to obtain the virus with the highest titers of infectious activity.

The susceptibility of culture systems to the virus has been experimentally proven and it has been established that the use of the continuous calf kidney cell culture line (MDBK) and the primary-trypsinized calf kidney culture (CK) allows to obtain a virus-containing suspension with a titer of infectious activity of $5.54 \pm 0.16 \lg \text{TCD}_{50}/\text{ml}$ and $5.59 \pm 0.14 \lg \text{TCD}_{50}/\text{ml}$, respectively, which is promising for biotechnological developments.

Березенко А. С., Недоссков В. В., Годовський О. В.

Further research is planned to be focused on studying of the obtained viral isolate for the subsequent development of tools for the diagnosis and immunoprophylaxis of coronavirus infection in veterinary medicine.

Keywords: *Coronaviridae, biological properties, bovine coronavirus, virus cultivation, cell culture, infectious activity*