



# Изучение культуральных свойств изолята возбудителя коронавирального энтерита собак в различных культурах клеток

А. А. Комарова, Т. С. Галкина

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

## РЕЗЮМЕ

Этиология заболеваний, сопровождающихся поражением желудочно-кишечного тракта у собак, многообразна. Вторым наиболее распространенным у собак энтеропатогеном вирусной природы в мире после парвовируса является коронавирус CCoV. Обширные исследования, проведенные учеными из разных стран, доказывают повсеместное распространение коронавиральной инфекции в популяции собак. В связи с этим не теряют актуальности вопросы профилактики данного заболевания, в первую очередь изготовление эффективных иммунобиологических препаратов, обеспечивающих надежную защиту от данной инфекции. Целью настоящей работы являлось изучение культуральных свойств изолята CCoV, выбор наиболее подходящей для его репродукции клеточной системы и оптимизация параметров культивирования вируса в чувствительных клеточных линиях. В опытах использовали изолят CCoV, выделенный из патологического материала, полученного от погибшего щенка с симптомами энтерита. В ходе исследований было испытано семь перевиваемых и две первично трипсинизированные культуры клеток и установлено, что наиболее чувствительной клеточной системой для репродукции данного изолята является перевиваемая культура клеток почки кошки CRFK, в которой на 2-е сут культивирования отмечалось характерное цитопатическое действие. Титр инфекционной активности вируса в данной культуре был на уровне  $3,58 \pm 0,14 \text{ Ig TCID}_{50}/\text{cm}^3$ . Определено, что такие клеточные линии, как перевиваемая культура клеток селезенки кошки (FS) и первично трипсинизированная культура клеток селезенки котенка (СК), также чувствительны к изоляту CCoV, но в меньшей степени, чем CRFK. Также в ходе опытов изучалось влияние на накопление коронавируса таких показателей, как множественность заражения, время культивирования, способ заражения, срок предварительного контакта (адсорбции) вируса с культурой клеток и возраст клеточной системы для некоторых выбранных культур клеток. Сделан вывод, что линии клеток CRFK и FS могут быть использованы для получения вирусного материала с целью разработки средств диагностики и специфической профилактики коронавирального энтерита собак.

**Ключевые слова:** коронавирус собак (CCoV), коронавиральный энтерит собак, кишечные инфекции собак, культивирование вирусов, перевиваемые культуры клеток, первично трипсинизированные культуры клеток

**Благодарности:** Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам сектора культуры клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ».

**Для цитирования:** Комарова А. А., Галкина Т. С. Изучение культуральных свойств изолята возбудителя коронавирального энтерита собак в различных культурах клеток. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (1): 23–28. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-1-23-28.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Комарова Анна Александровна, аспирант, ведущий ветеринарный врач отдела профилактики болезней мелких домашних животных ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: komarova\_aa@arriah.ru.

## Study of cultural properties of canine enteric coronavirus isolate in different cell cultures

A. A. Komarova, T. S. Galkina

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

## SUMMARY

The etiology of the diseases affecting gastrointestinal tract of dogs is variable. The second most important enteric viral pathogen in the world after parvovirus is coronavirus (CCoV). Vast studies by scientists from different countries evidence the ubiquitous spread of coronavirus infection in dog populations. In this regard, the prevention of this disease is still an acute problem; firstly this means the development of effective vaccines, which can provide a reliable protection from the infection. The aim of this work was to study the CCoV isolate cultural properties, the selection of cell cultures most suitable for its reproduction and optimization of virus cultivation parameters in sensitive cell lines. The CCoV isolate recovered from the pathological material of a dead puppy with enteritis symptoms was used in the study. Seven continuous and two primary trypsinized cell cultures were tested during the study and it was established that the most sensitive cell culture for the reproduction of this isolate was continuous Crandell-Rees Feline Kidney Cells (CRFK) in which a typical cytopathic effect was noted on Day 2 of the cultivation. Virus infectivity titer in this culture was  $3.58 \pm 0.14 \text{ Ig TCID}_{50}/\text{cm}^3$ . It was established that such cell lines as feline spleen cells (FS) and primary trypsinized kitten spleen cells (KS) are also sensitive to the CCoV isolate but less than CRFK cells. Effect of such parameters as multiplicity of infection, cultivation time, inoculation technique, adsorption period and cell line age on coronavirus growth rate was studied for some selected cell cultures. It was concluded that CRFK and FS cells can be used for the propagation of viral material to develop diagnostic tools and vaccines against canine enteric coronavirus.

**Keywords:** canine coronavirus (CCoV), canine enteric coronavirus, canine intestinal infections, virus culture, continuous cell lines, primary trypsinized cells

**Acknowledgements:** The authors are deeply grateful to the employees of the FGBI "ARRIAH" Cell Culture Sector.

**For citation:** Komarova A. A., Galkina T. S. Study of cultural properties of canine enteric coronavirus isolate in different cell cultures. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (1): 23–28. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-1-23-28.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**For correspondence:** Anna A. Komarova, Post-Graduate Student, Leading Veterinarian, Department for Pet Disease Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: komarova\_aa@arriah.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Симптомы расстройства желудочно-кишечного тракта у щенков – частая причина обращений в ветеринарную клинику. Этиологические факторы, ответственные за их возникновение, разнообразны. Коронавирус собак (CCoV) является вторым по распространенности в мире после парвовируса энтеропатогеном собак вирусной этиологии [1–3].

Серологические и вирусологические исследования показали, что CCoV широко распространен в популяции собак, особенно в питомниках и приютах для животных [4]. Он также обнаружен у диких псовых, в том числе лисиц, енотовидных собак и волков [5–7]. Начиная с конца 1990-х и в 2000-х гг. учеными разных стран неоднократно выявлялись высоковирулентные штаммы возбудителя коронавирусной инфекции собак [8–10]. В 2005 г. в Италии был выделен пантропный CCoV (pCCoV), вызывающий системное заболевание у щенков с последующим летальным исходом [11]. В 2008 г. случаи заболевания, связанного с пантропным CCoV, зарегистрированы во Франции и Бельгии [12], в 2010 г. – в Греции [13]. В 2020 г. большое количество случаев гастроэнтерита, вызванного коронавирусной инфекцией собак, зафиксировано в Великобритании [14, 15].

Результаты исследований по молекулярной эпизоотологии CCoV, проведенные в Италии и Австралии, позволяют утверждать, что вирус меняется и его вирулентность постепенно растет [16]. В связи с этим остается актуальным вопрос о необходимости разработки вакцин, обеспечивающих надежную защиту от новых, в том числе пантропных, штаммов возбудителя коронавирусной инфекции собак, так как существующие вакцины показали ограниченную эффективность [17].

Целью данной работы являлось изучение культуральных свойств изолята коронавируса собак в первичных и перевиваемых культурах клеток для дальнейшего применения в изготовлении иммунологических препаратов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали изолят CCoV, выделенный из патологического материала, полученного от погибшего щенка с симптомами энтерита.

Для изучения культуральных свойств вируса были выбраны следующие культуры клеток:

– первично трипсинизированные и субкультуры клеток: почки котенка (ПК), селезенки котенка (СК);

– перевиваемые культуры клеток: почки кошки (CRFK), селезенки кошки (FS), почки собаки (MDCK), а также почки зеленой мартышки (Vero-76), нейробластомы мыши (Neuro-2a), почки свиньи (IB-RS-2) и яичники домашней козы (ЯДК-04).

Культуры клеток были получены из сектора культуры клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Использовали 2 способа заражения культур клеток:

– заражение монослойной культуры клеток: вирус вносили на полностью сформированный клеточный монослой первично трипсинизированных и перевиваемых культур клеток;

– заражение суспензии клеток: вирус вносили в суспензию клеток при их посеве.

Вирус культивировали в пластиковых флаконах с площадью рабочей поверхности 25 см<sup>2</sup> (T25).

Перед инокуляцией вируса на клеточный монослой из флаконов удаляли питательную среду. Затем вносили вирус и помещали культуральные флаконы на 60 мин в CO<sub>2</sub>-инкубатор при (37,0 ± 0,5) °C для контакта (адсорбции) вируса с клеточным монослоем. После контакта (адсорбции) во флаконы добавляли поддерживающую среду. В качестве поддерживающей среды использовали полусинтетическую питательную среду ПСС, приготовленную по прописи ФГБУ «ВНИИЗЖ», с добавлением 2% фетальной сыворотки КРС, 2% L-глутамин, стрептомицина (100 мкг/см<sup>3</sup>) и пенициллина (100 ЕД/см<sup>3</sup>).

По окончании культивирования каждый культуральный флакон подвергался замораживанию при температуре минус (45 ± 5) °C и оттаиванию при (20 ± 2) °C с дезагрегацией монослоя путем периодического встряхивания флакона, после чего из флаконов отбирали пробы для определения титра инфекционной активности изолята CCoV.

Инфекционную активность изолята CCoV определяли в культуре клеток CRFK, выращенной в 96-луночных планшетах Costar® (Corning, США), методом микротитрования по общепринятой методике. Микропланшеты ежедневно просматривали под инвертированным микроскопом Olympus CKX53 (Япония), отмечая количество лунок с характерным цитопатическим действием (ЦПД) вируса. Расчет титра инфекционной активности проводили по методу Кербера и выражали в Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Материал дополнительно тестировали на наличие возбудителя коронавирусного энтерита собак посредством коммерческих иммунохроматографических тест-систем Asan Easy Test® CCV Ag (Asan Pharmaceutical Co., Ltd., Республика Корея).

**Таблица 1**  
Чувствительность различных перевиваемых культур клеток к изоляту ССoV ( $n = 3$ )

**Table 1**  
Sensitivity of different continuous cell lines to the ССoV isolate ( $n = 3$ )

Номер пассажа вируса	Титр инфекционной активности, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>						
	CRFK	MDCK	FS	Vero-76	ЯДК-04	Neuro-2a	IB-RS-2
1	3,08 ± 0,14	1,25 ± 0,25	2,50 ± 0,25	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
2	3,33 ± 0,14	< 1,0	2,92 ± 0,14	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
3	3,58 ± 0,14	< 1,0	3,08 ± 0,14	–	–	–	–
4	3,58 ± 0,14	–*	3,08 ± 0,14	–	–	–	–
5	3,58 ± 0,14	–*	3,08 ± 0,14	–	–	–	–

\* не исследовали (not tested).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения чувствительности различных клеточных культур к изоляту коронавируса собак было проведено 5 последовательных пассажей в перевиваемых (CRFK, MDCK, FS, Vero-76, ЯДК-04, Neuro-2a, IB-RS-2), первично трипсинизированных и субкультурах клеток (ПК, СК). Наличие антигена ССoV в культуральной жидкости после каждого пассажа определяли иммунохроматографическими тест-системами (ИХТС).

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Установлено, что изолят ССoV активно репродуцировался и накапливался только в культурах клеток CRFK и FS. В других культурах клеток ССoV не размножался. Максимальное накопление вируса отмечали с 3-го пассажа в клеточной культуре CRFK ( $3,58 \pm 0,14$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>), а при микроскопировании культуры клеток начиная с 1-го пассажа наблюдалось характерное ЦПД (рис. 1–4).

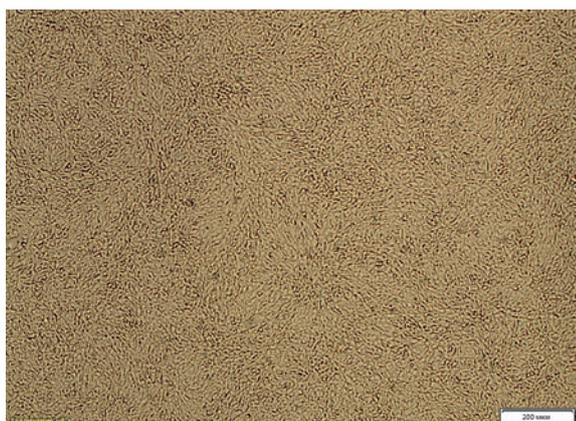


Рис. 1. Клетки монослоя CRFK без инокуляции ССoV через 3 сут (увеличение 40×)

Fig. 1. ССoV not-inoculated CRFK monolayer after 3 days (40× magnification)

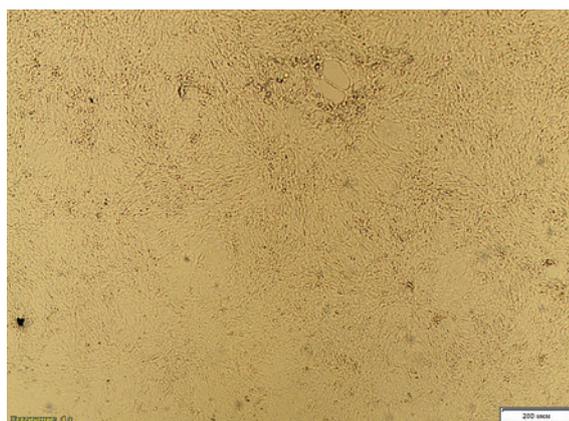


Рис. 2. Клетки монослоя CRFK после инфицирования изолятом ССoV через 2 сут (увеличение 40×)

Fig. 2. CRFK monolayer 2 days post inoculation with ССoV isolate (40× magnification)

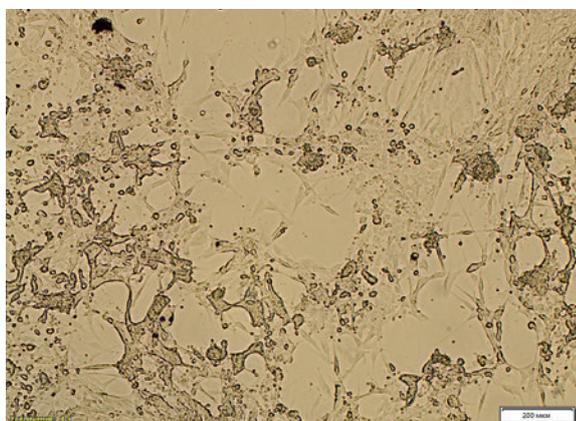


Рис. 3. Клетки монослоя CRFK после инфицирования изолятом ССoV через 3 сут (увеличение 40×)

Fig. 3. CRFK monolayer 3 days post inoculation with ССoV isolate (40× magnification)

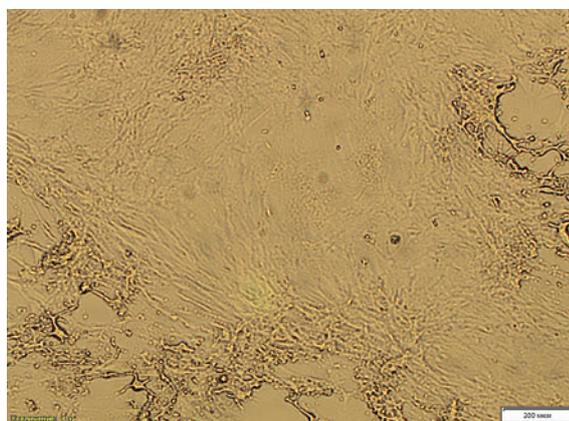


Рис. 4. Клетки монослоя CRFK после инфицирования изолятом ССoV через 3 сут (увеличение 100×)

Fig. 4. CRFK monolayer 3 days post inoculation with ССoV isolate (100× magnification)

Оно выражалось в округлении клеток, истончении цитоплазмы отростков клеток, образовании симпластов и постепенной дегенерации монослоя.

В культуре клеток FS вирус накапливался в меньших количествах, начиная с 3-го пассажа титр составлял  $3,08 \pm 0,14 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , при микроскопировании характерного ЦПД не наблюдали. При культивировании вируса в культуре клеток MDCK отмечалось минимальное накопление вируса в 1-м пассаже на уровне  $1,25 \pm 0,25 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , однако далее при микротитровании в культуре клеток CRFK не выявлялось характерного ЦПД, а на уровне 4-го пассажа в ИХТС получен отрицательный результат. В других культурах пассирование изолята CCoV оказалось нецелесообразно после 2-го пассажа, так как при микротитровании в лунках с культурой клеток CRFK характерное ЦПД не отмечалось, а ИХТС показали отсутствие антигена возбудителя коронавирусного энтерита собак.

Результаты изучения культуральных свойств изолята CCoV в первично трипсинизированных и субкультурах СК и ПК представлены в таблице 2.

Культивирование вируса в первично трипсинизированной и субкультуре клеток ПК приводило к постепенному снижению его инфекционной активности. На уровне 2-го пассажа ИХТС показал положительный результат на наличие антигена возбудителя коронавирусного энтерита собак. 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 в первично трипсинизированной и субкультуре клеток ПК стало нецелесообразным. Культивирование изолята CCoV в первично трипсинизированной и субкультуре клеток СК приводило к постепенному накоплению вируса, в результате чего на уровне 5-го пассажа титр инфекционной активности был равен  $3,42 \pm 0,14 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . При этом характерного ЦПД в данной культуре клеток не наблюдалось.

Следует отметить, что из всех испытанных культур клеток наиболее подходящими для репродукции данного изолята CCoV можно считать перевиваемые культуры клеток CRFK и FS.

Дальнейшие исследования заключались в изучении влияния на накопление вируса таких показателей, как время культивирования вируса в культурах клеток, в которых изолят CCoV не вызывал ЦПД, множественность заражения, способ заражения, срок предварительного контакта (адсорбции) вируса с культурой клеток и возраст клеточной системы.

Для изучения динамики накопления изолята CCoV в зависимости от времени культивирования использовали культуры клеток, в которых изолят CCoV не вызывал характерного ЦПД и плотный монослой сохранялся в течение всего времени культивирования. Такими культурами являлись перевиваемая культура клеток FS, первично трипсинизированная и субкультура клеток СК. Изолят CCoV культивировали в течение 48, 72, 96 и 120 ч. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Анализ полученных результатов показал, что культивирование изолята CCoV в течение 48 ч является недостаточным для его максимального накопления, титр инфекционной активности через 2 сут был самым низким. Установлено, что наиболее оптимальным временем культивирования коронавируса является 72 ч (3 сут). Титр инфекционной активности изолята CCoV при этом был самым высоким и находился на уровне  $3,17 \pm 0,14$  и  $3,42 \pm 0,14 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  в культурах клеток FS и СК соответственно. При дальнейшем культивировании в обеих культурах клеток титр инфекционной активности вируса снижался.

Для изучения влияния множественности заражения на инфекционную активность изолята CCoV применяли следующие дозы инфицирования: 0,0001; 0,001; 0,01 и 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Исследования проводили с использованием двух перевиваемых культур клеток CRFK и FS. Инкубацию вируса в культуре клеток CRFK прекращали при 80%-м разрушении монослоя и отслоении клеток от стекла. В культуре клеток FS вирус инкубировали в течение 72 ч, так как более ранние опыты показали, что данное время является оптимальным для максимального накопления изолята CCoV в указанной культуре клеток. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 4.

Установлено, что инфекционная активность изолята CCoV в культуре клеток CRFK при множественности заражения 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл составляла  $3,58 \pm 0,14 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$ . При более низких дозах заражения (0,0001 и 0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл) инфекционная активность существенно уменьшалась, а время проявления ЦПД увеличивалось до 96 ч. При множественности заражения, равной 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл, наблюдалось более быстрое проявление ЦПД и разрушение 80% монослоя клеток. Однако титр вируса был ниже и находился на уровне  $3,25 \pm 0,25 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , что связано, вероятно, со слиш-

Таблица 2

Репродукция изолята CCoV в первично трипсинизированных и субкультурах клеток СК и ПК (n = 3)

Table 2

CCoV isolate reproduction in primary trypsinized and subculture cells (PC and SC) (n = 3)

Культура клеток	Номер пассажа вируса	Время культивирования, ч	Титр инфекционной активности, $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	Результат ИХТС
СК	1	72	$1,50 \pm 0,25$	+
	2	72	$2,58 \pm 0,14$	+
	3	72	$2,92 \pm 0,14$	+
	4	72	$2,92 \pm 0,14$	+
	5	72	$3,42 \pm 0,14$	+
ПК	1	72	$2,33 \pm 0,14$	+
	2	72	< 1,0	+
	3	72	—*	—

\* не исследовали (not tested).

Таблица 3

Динамика накопления изолята CCoV в зависимости от времени культивирования в перевиваемой, первично трипсинизированной и субкультуре клеток (n = 3)

Table 3

CCoV isolate growth dynamics depending on culture time in continuous, primary and subculture cells (n = 3)

Культура клеток	Титр инфекционной активности, $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$			
	48 ч	72 ч	96 ч	120 ч
FS	$2,75 \pm 0,25$	$3,17 \pm 0,14$	$2,83 \pm 0,29$	$2,67 \pm 0,14$
СК	$3,00 \pm 0,25$	$3,42 \pm 0,14$	$3,17 \pm 0,14$	$3,08 \pm 0,29$

ком быстрым разрушением монослоя, в результате чего вирус не успевал накопиться в максимальной концентрации. Таким образом, оптимальная множественность заражения культуры клеток CRFK изолятом ССоV равна 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл.

Инфекционная активность изолята ССоV в культуре клеток FS при множественности заражения 0,1 и 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл составила  $3,17 \pm 0,14$  и  $3,08 \pm 0,14$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> соответственно. При более низких дозах заражения (0,0001 и 0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл) инфекционная активность вируса уменьшалась, поэтому целесообразно проводить заражение культуры клеток FS дозой 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл.

На следующем этапе работы провели сравнение двух методов инфицирования культур клеток CRFK и FS: внесение вируса непосредственно в суспензию клеток и с адсорбцией на сформированном клеточном монослое в течение часа.

Из результатов, представленных в таблице 5, видно, что титр инфекционной активности изолята ССоV был максимальным при заражении на клеточный монослой. В культурах клеток CRFK и FS он составил  $3,58 \pm 0,14$  и  $3,17 \pm 0,14$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> соответственно. При заражении суспензии клеток CRFK и FS инфекционная активность вируса была ниже указанных показателей.

Также в настоящем исследовании было изучено влияние на динамику накопления изолята ССоV такого фактора, как время предварительного контакта (адсорбции) вируса с монослоем перевиваемой культуры клеток CRFK. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 6.

Установили, что культивирование изолята ССоV без предварительного контакта (адсорбции) с монослоем культуры клеток CRFK сопровождалось низким накоплением вируса, титр инфекционной активности находился на уровне  $2,42 \pm 0,14$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. С увеличением времени предварительного контакта (адсорбции) вируса с клеточным монослоем титр инфекционной активности изолята ССоV постепенно увеличивался с  $3,08 \pm 0,14$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> при адсорбции в течение 30 мин до  $3,33 \pm 0,14$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> при адсорбции в течение 60 мин. В дальнейшем при увеличении времени адсорбции до 90 мин инфекционная активность вируса незначительно снижалась. Таким образом, оптимальным временем контакта (адсорбции) вируса с монослоем клеток можно считать 60 мин.

Завершающим этапом работы являлось изучение влияния возраста культуры клеток на инфекционную активность изолята ССоV. С этой целью была выбрана культура клеток CRFK, так как именно в ней вирус накапливается в максимальной концентрации и проявляет видимое ЦПД. Для исследований использовали культуру клеток с полностью сформированным клеточным монослоем.

Как видно из таблицы 7, при инокуляции изолята ССоV на одно- и двухсуточный монослой культуры клеток CRFK показатели титра инфекционной активности вируса не отличались и находились на уровне  $3,08 \pm 0,14$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. При введении вируса в трехсуточную культуру клеток CRFK инфекционная активность изолята ССоV увеличивалась несущественно и составила  $3,17 \pm 0,14$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. При инфицировании изолятом ССоV четырехсуточной культуры клеток репродукция вируса снижалась до  $2,92 \pm 0,14$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, а время культивирования возрастало до 96 ч. Снижение

**Таблица 4**  
Влияние множественности заражения на инфекционную активность изолята ССоV ( $n = 3$ )

**Table 4**  
Effect of multiplicity of infection on CCoV isolate infectivity ( $n = 3$ )

Культура клеток	MOI, ТЦД <sub>50</sub> /кл	Время культивирования, ч	Титр инфекционной активности, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>
CRFK	0,1	48	$3,25 \pm 0,25$
	0,01	72	$3,58 \pm 0,14$
	0,001	96	$1,50 \pm 0,25$
	0,0001	96	$1,08 \pm 0,14$
FS	0,1	72	$3,17 \pm 0,14$
	0,01	72	$3,08 \pm 0,14$
	0,001	72	$2,92 \pm 0,38$
	0,0001	72	$2,08 \pm 0,14$

MOI – множественность заражения (multiplicity of infection).

**Таблица 5**  
Влияние метода заражения на инфекционную активность изолята ССоV в перевиваемых культурах клеток ( $n = 3$ )

**Table 5**  
Effect of inoculation technique on CCoV isolate infectivity in continuous cells ( $n = 3$ )

Метод заражения	MOI, ТЦД <sub>50</sub> /кл	Время культивирования, ч	Культура клеток	Титр инфекционной активности, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>
Монослой	0,01	72	CRFK	$3,58 \pm 0,14$
Суспензия	0,01	48		$3,17 \pm 0,14$
Монослой	0,01	72	FS	$3,17 \pm 0,14$
Суспензия	0,01	72		$2,75 \pm 0,25$

MOI – множественность заражения (multiplicity of infection).

**Таблица 6**  
Влияние времени предварительного контакта (адсорбции) на динамику накопления изолята ССоV в культуре клеток CRFK ( $n = 3$ )

**Table 6**  
Effect of adsorption period on CCoV isolate growth rate in CRFK cells ( $n = 3$ )

Показатели	Время адсорбции, мин			
	без контакта (адсорбции)	30	60	90
MOI, ТЦД <sub>50</sub> /кл	0, 01			
Титр инфекционной активности, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	$2,42 \pm 0,14$	$3,08 \pm 0,14$	$3,33 \pm 0,14$	$3,25 \pm 0,25$

MOI – множественность заражения (multiplicity of infection).

**Таблица 7**  
Влияние возраста перевиваемой культуры клеток CRFK на инфекционную активность изолята ССоV ( $n = 3$ )

**Table 7**  
Effect of CRFK cell age on infectivity of CCoV isolate ( $n = 3$ )

Возраст культуры, сут	Время культивирования, ч	Титр инфекционной активности, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>
1	48	$3,08 \pm 0,14$
2	72	$3,08 \pm 0,14$
3	72	$3,17 \pm 0,14$
4	96	$2,92 \pm 0,14$

инфекционной активности вируса может быть связано со старением культуры клеток CRFK и замедлением обменных процессов в клетках. Таким образом, для накопления изолята СCoV в максимальном количестве целесообразно использовать культуру клеток CRFK с полностью сформированным 1–3-суточным монослоем.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе исследовали возможность репродукции изолята возбудителя коронавирусного энтерита собак в различных линиях перевиваемых и первично трипсинизированных культур клеток гомологичного и гетерологичного происхождения. При изучении чувствительности перевиваемых культур клеток к изоляту СCoV установлено, что эффективными системами для получения высокоактивной вирусной суспензии являются культуры клеток CRFK и FS. Указанные линии клеток могут быть использованы для получения вирусного материала с целью разработки средств диагностики и специфической профилактики коронавирусного энтерита собак. Как показали исследования, оптимальной дозой заражения культуры клеток CRFK является 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл, при которой титр инфекционной активности вируса составил  $3,58 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . Для культуры клеток FS целесообразно использовать дозу заражения 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Установлено, что вирус накапливается в максимальном количестве при инфицировании культуры клеток CRFK в полностью сформированный 1–3-суточный клеточный монослой и культивировании в течение 48–72 ч, а для культуры клеток FS оптимальными условиями являются инокуляция вируса на сформированный клеточный монослой и культивирование в течение 72 ч.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Alves C. D. B. T., Granados O. F. O., Budaszewski R. D. F., Streck A. F., Weber M. N., Cibulski S. P., et al. Identification of enteric viruses circulating in a dog population with low vaccine coverage. *Braz. J. Microbiol.* 2018; 49 (4): 790–794. DOI: 10.1016/j.bjm.2018.02.006.
- McElligott S., Collins P. J., Sleator R. D., Martella V., Decaro N., Buonavoglia C., O’Shea H. Detection and genetic characterization of canine parvoviruses and coronaviruses in southern Ireland. *Arch. Virol.* 2011; 156 (3): 495–503. DOI: 10.1007/s00705-010-0861-3.
- Decaro N., Desario C., Billi M., Mari V., Elia G., Cavalli A., et al. Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *Vet. J.* 2011; 187 (2): 195–199. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.10.027.

- Decaro N., Buonavoglia C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet. Microbiol.* 2008; 132 (3–4): 221–234. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.06.007.
- Ma G. G., Lu C. P. Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in the fecal samples of healthy foxes and raccoon dogs. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2005; 45 (2): 305–308. PMID: 15989282. (in Chinese)
- Rosa G. M., Santos N., Grøndahl-Rosado R., Fonseca F. P., Tavares L., Neto I., et al. Unveiling patterns of viral pathogen infection in free-ranging carnivores of northern Portugal using a complementary methodological approach. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 69:101432. DOI: 10.1016/j.cimid.2020.101432.
- Zarnke R. L., Evermann J., Ver Hoef J. M., McNay M. E., Boertje R. D., Gardner C. L., et al. Serologic survey for canine coronavirus in wolves from Alaska. *J. Wildl. Dis.* 2001; 37 (4): 740–745. DOI: 10.7589/0090-3558-37.4.740.
- Sanchez-Morgado J. M., Poynter S., Morris T. H. Molecular characterization of a virulent canine coronavirus BGF strain. *Virus Res.* 2004; 104 (1): 27–31. DOI: 10.1016/j.virusres.2004.02.038.
- Evermann J. F., Abbott J. R., Han S. Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005; 17 (6): 610–614. DOI: 10.1177/104063870510700618.
- Escutenaire S., Isaksson M., Renström L. H., Klingeborn B., Buonavoglia C., Berg M., et al. Characterization of divergent and atypical canine coronaviruses from Sweden. *Arch. Virol.* 2007; 152 (8): 1507–1514. DOI: 10.1007/s00705-007-0986-1.
- Buonavoglia C., Decaro N., Martella V., Elia G., Campolo M., Desario C., et al. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12 (3): 492–494. DOI: 10.3201/eid1203.050839.
- Zicola A., Jolly S., Mathijs E., Ziant D., Decaro N., Mari V., Thiry E. Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium. *J. Small Anim. Pract.* 2012; 53 (5): 297–300. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2011.01178.x.
- Ntafis V., Mari V., Danika S., Fragkiadaki E., Buonavoglia C. An outbreak of canine coronavirus in puppies in a Greek kennel. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2010; 22 (2): 320–323. DOI: 10.1177/104063871002200231.
- Radford A. D., Singleton D. A., Jewell C., Appleton C., Rowlingson B., Hale A. C., et al. Outbreak of severe vomiting in dogs associated with a canine enteric coronavirus, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27 (2): 517–528. DOI: 10.3201/eid2702.202452.
- Collins M., Singleton D. A., Noble P. J. M., Pinchbeck G. L., Smith S., Brant B., et al. Small animal disease surveillance 2020/21: SARS-CoV-2, syndromic surveillance and an outbreak of acute vomiting in UK dogs. *Vet. Rec.* 2021; 188 (8):304. DOI: 10.1002/vetr.427.
- Pratelli A., Elia G., Martella V., Tinelli A., Decaro N., Marsilio F., et al. M gene evolution of canine coronavirus in naturally infected dogs. *Vet. Rec.* 2002; 151 (25): 758–761. PMID: 12521247.
- Wang X., Li C., Guo D., Wang X., Wei S., Geng Y., et al. Co-circulation of canine coronavirus I and IIa/b with high prevalence and genetic diversity in Heilongjiang Province, Northeast China. *PLoS One.* 2016; 11 (1):e0146975. DOI: 10.1371/journal.pone.0146975.

Поступила в редакцию / Received 22.12.2022

Поступила после рецензирования / Revised 25.01.2023

Принята к публикации / Accepted 10.02.2023

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Комарова Анна Александровна**, аспирант, ведущий ветеринарный врач отдела профилактики болезней мелких домашних животных, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1876-2025>, e-mail: komarova\_aa@arriah.ru.

**Галкина Татьяна Сергеевна**, кандидат ветеринарных наук, заведующий отделом профилактики болезней мелких домашних животных, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9494-8537>, e-mail: galkina\_ts@arriah.ru.

**Anna A. Komarova**, Post-Graduate Student, Leading Veterinarian, Department for Pet Disease Prevention, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1876-2025>, e-mail: komarova\_aa@arriah.ru.

**Tatyana S. Galkina**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Department for Pet Disease Prevention, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9494-8537>, e-mail: galkina\_ts@arriah.ru.