

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

На правах рукописи

Комарова Анна Александровна

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММА «РИЧ» ВИРУСА
КОРОНАВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ДЛЯ
ИЗГОТОВЛЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ**

4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
кандидат ветеринарных наук
Галкина Татьяна Сергеевна

Владимир-2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Общие сведения о коронавирусном энтерите.....	13
1.2. Характеристика возбудителя.....	15
1.2.1. Таксономическое положение.....	15
1.2.2. Морфология возбудителя.....	16
1.2.3. Генетическая эволюция и антигенное родство.....	18
1.2.4. Устойчивость к физико-химическим факторам.....	20
1.2.5. Культивирование вируса.....	21
1.3. Патогенез.....	23
1.4. Клиническая картина коронавирусного энтерита собак.....	24
1.5. Патоморфология и гистологические изменения.....	26
1.6. Диагностика коронавирусного энтерита собак.....	28
1.7. Специфическая профилактика коронавирусного энтерита собак.....	30
1.8. Заключение по обзору литературы.....	33
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	36
2.1. Материалы.....	36
2.2. Методы.....	38
3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	45
3.1. Выделение изолятов вируса коронавирусного энтерита собак из проб патологического материала	45
3.2. Секвенирование и филогенетический анализ выделенных изолятов.....	49
3.3. Адаптация выделенных изолятов вируса коронавирусного энтерита собак к перевиваемым культурам клеток различного происхождения.....	51

3.4. Определение оптимальных параметров культивирования в культуре клеток FS и культуре клеток CRFK для максимального накопления вируса коронавирусного энтерита собак.....	54
3.5. Депонирование штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак.....	61
3.6. Изучение патогенности и антигенной активности штамма «Рич» на лабораторных животных.....	63
3.7. Инактивация вируса коронавирусного энтерита собак.....	68
3.8. Антигенные свойства штамма «Рич» в опытах на естественно-восприимчивых животных.....	75
3.9. Патогенность штамма «Рич» для естественно-восприимчивых животных.....	78
3.10. Иммуногенные свойства штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак.....	84
3.11. Устойчивость вируса коронавирусного энтерита собак при различных температурах хранения.....	90
3.12. Концентрирование и очистка вируса коронавирусного энтерита собак для получения гипериммунных сывороток от животных.....	94
3.13. Антигенные свойства ассоциированной вакцины против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак «Карникан-4»	99
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
4.1. Выводы.....	104
4.2. Практические предложения.....	105
4.3. Перспективы дальнейших исследований.....	106
5. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	108
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	131

Приложение А (обязательное) Справка о депонировании штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак для целей патентной процедуры ...	132
Приложение Б (обязательное) Паспорт на штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак	133
Приложение В (обязательное) Патент на штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак	135
Приложение Г (обязательное) Патент на ассоциированную вакцину против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак	136
Приложение Д (обязательное) СТО 00495527-0410-2021 «Штаммы вируса коронавирусного энтерита собак производственные и контрольные»	137
Приложение Е (обязательное) СТО 00495527-0413-2023 Вакцина против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак «Карникан-4»	139
Приложение Ж (обязательное) Методические рекомендации по титрованию вируса коронавирусного энтерита собак микрометодом	141
Приложение И (обязательное) Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу коронавирусного энтерита собак в реакции нейтрализации микрометодом	142
Приложение К (обязательное) Методические рекомендации по выделению вируса коронавирусного энтерита собак в культуре клеток	143
Приложение Л (обязательное) Методические рекомендации по получению гипериммунных сывороток к вирусу коронавирусного энтерита собак для использования в диагностических целях	144
Приложение М (обязательное) Методические рекомендации по очистке и концентрированию вируса коронавирусного энтерита собак	145

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В последние годы в России значительно увеличилось число домашних животных. В 2020 году по данным исследования Mars Petcare численность популяции собак и кошек составляла 63,5 млн. особей, а в 2025 году по данным Центра питания и благополучия животных достигла 80 млн. особей. Численность собак при этом выросла на 7% с 2020 года и в 2024 году достигла 25,5 млн. особей [34, 39]. Несмотря на развитие биопромышленности и разнообразие представленных на рынке средств специфической профилактики, охват вакцинацией домашних животных остается низким, а рост численности влечет за собой увеличение риска распространения различных инфекционных болезней.

Особенно часто в ветеринарной практике у собак регистрируют случаи вирусных энтеритов. По данным Центра ветеринарии чаще всего происходит заражение собак парвовирусом. Возбудитель коронавирусного энтерита считается вторым по распространенности в мире энтеропатогеном после парвовируса, однако, по исследованиям некоторых авторов регистрируется у щенков чаще парвовируса [76, 77, 84, 107, 144, 172]. Согласно литературным данным, распространенность коронавирусного энтерита у собак в возрасте до 6 месяцев составляет 43%, у собак в возрасте 6 месяцев и старше – 27% [87].

Долгое время считалось, что коронавирусный энтерит характеризуется низкой летальностью и протекает в легкой форме с симптомами диареи и умеренной дегидратации, обычно не требующими ветеринарного вмешательства. Однако, позднее было доказано, что наибольшую опасность коронавирусная инфекция представляет в случае сочетанного заражения с другими инфекционными агентами, особенно парвовирусом, т.к. в этом случае коронавирус значительно усугубляет тяжесть течения инфекции [37, 74, 102].

Особую опасность представляет генетическая изменчивость вируса коронавирусного энтерита. В 2005 году в Италии был выделен новый штамм, вызывающий полиорганный поражение и гибель животных [51]. Затем подобные

случаи, связанные с новым пантропным штаммом, неоднократно фиксировались в других странах [47, 87, 96, 124]. В настоящее время методы молекулярной биологии позволили подробно изучить генетическую эволюцию вируса коронавирусного энтерита и лишней раз подтвердить его высокую степень изменчивости и генетическое разнообразие, а в последние несколько лет настороженность научного сообщества вызывает возможность межвидовой передачи вируса [111, 130].

Рост численности домашних, а вместе с ними бродячих собак, широкое распространение среди них коронавирусного энтерита, высокая степень генетической изменчивости возбудителя, появление в стране новых породных групп, бесконтрольное перемещение животных, ограниченная эффективность ранее разработанных вакцин, изготовленных на основе штаммов, выделенных несколько десятилетий назад, против вновь возникающих мутантных штаммов с измененными свойствами – все это указывает на необходимость дальнейшего изучения свойств коронавируса собак и совершенствования средств диагностики и профилактики, поиска и разработки новых более эффективных биопрепаратов, что является актуальным, несмотря на их существующее разнообразие.

Степень разработанности темы исследования. Возбудитель коронавирусного энтерита собак был впервые выделен L.N.Binn et al. в 1971 г. в Германии от заболевших собак войскового подразделения [151]. В 1980-1990-е годы появились сообщения о выявлении данного возбудителя в Японии, Италии, США и других странах, что говорило о его распространении по всему миру. Начали активно изучаться методы диагностики и дифференцирования данной болезни посредством иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции [86, 120, 136]. В 1980-е годы были разработаны первые инаktivированные вакцины для собак против коронавирусной инфекции, а затем и ассоциированные вакцины, содержащие аттенуированные штаммы [81, 95, 154, 167]. Изучение возбудителя коронавирусной инфекции собак продолжилось в 2000-е годы. Широкое применение средств молекулярной биологии позволило глубже изучить генетическую эволюцию вируса [122, 123, 124, 139]. В 2005 г. в Италии был

выявлен первый пантропный штамм вируса коронавирусного энтерита собак, вызывающий системное заболевание у щенков с последующим летальным исходом, а в дальнейшем высоковирулентные штаммы выявлялись и изучались другими исследователями из Бельгии, Франции, Греции, Швеции, США [47, 51, 94, 96, 102]. В настоящее время проблему коронавирусного энтерита собак активно изучают как в Европе, так и в странах Азии (Вьетнам, КНР, Республика Корея) [93, 116, 117, 142, 160].

В России в 1980-1990-е годы изучением возбудителя коронавирусного энтерита собак занимались такие исследователи, как Уласов В.И., Захарова Е.Д., Ольшанская А.А. [7, 21, 24]. В 1989 г. был выделен и депонирован штамм «49», входящий в состав отечественной вакцины «Мультикан», а в 1997 г. штамм «Карат» [7, 24]. Однако, в последние десятилетия в России изучение коронавирусного энтерита велось лишь с точки зрения эпизоотологии и терапии. Исследований по выделению новых штаммов из патологического материала, изучению их молекулярно-биологических свойств не проводилось, информация по данной теме не обновлялась.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы являлось изучение иммунобиологических свойств вируса коронавирусного энтерита собак, выделенного на территории Российской Федерации, направленное на получение производственно-контрольного штамма с оптимальными биотехнологическими характеристиками, пригодного для разработки биопрепаратов. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1) выделить изоляты возбудителя коронавирусного энтерита собак, циркулирующие на территории Российской Федерации в культуре клеток;

2) провести поиск наиболее технологичных и производительных систем культивирования изолятов коронавируса собак, оптимизировать параметры культивирования в перевиваемых культурах клеток и выбрать штамм-кандидат, пригодный по своим биотехнологическим характеристикам для разработки биопрепаратов;

3) изучить антигенные свойства штамма в опытах на лабораторных и естественно-восприимчивых животных;

4) определить оптимальный режим инаktivации вируса коронавирусного энтерита собак для получения вирусного материала с высокой антигенной активностью с целью его дальнейшего использования для изготовления вакцинных препаратов;

5) определить патогенность выбранного штамма для естественно-восприимчивых животных с целью его использования для контрольного заражения;

6) определить иммуногенные свойства штамма в опытах на естественно-восприимчивых животных;

7) получить гипериммунные сыворотки к вирусу коронавирусного энтерита собак для применения в качестве контрольных положительных в реакции нейтрализации;

8) разработать ассоциированную вакцину, содержащую в своем составе выбранный штамм коронавируса собак, провести оценку ее антигенных свойств в опытах на естественно-восприимчивых животных.

Научная новизна результатов. Научная новизна результатов заключается в следующем:

1) выделен и адаптирован к перевиваемым культурам клеток изолят вируса коронавирусного энтерита собак, который был депонирован во Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» (далее – ФГБУ «ВНИИЗЖ») под регистрационным номером: № 376–деп/22-10 – ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» (приложения А и Б);

2) изучены иммунобиологические свойства штамма, оптимизированы параметры его культивирования;

3) разработана и зарегистрирована ассоциированная вакцина против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак («Карникан-4»).

Научная новизна исследования подтверждена патентами Российской Федерации:

– Патент RU2796988C1 «Штамм "Рич" вируса коронавирусного энтерита собак для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики коронавирусного энтерита собак» (приложение В);

– Патент RU2806164C1 «Ассоциированная вакцина против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак» (приложение Г).

Теоретическая и практическая значимость проведенных исследований.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что в результате проведенных исследований впервые с 1997 года в Российской Федерации выделен новый штамм вируса коронавирусного энтерита собак, депонированный во Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ» под наименованием «Рич». Охарактеризованы основные иммунобиологические свойства штамма, что позволяет применять его для изготовления диагностических и вакцинных препаратов.

Полученные результаты являлись основой для разработки следующей нормативной документации:

1. Стандарт ФГБУ «ВНИИЗЖ» «Штаммы вируса коронавирусного энтерита собак производственные и контрольные. Методы изготовления и контроля посевных материалов (СТО 00495527-0410 -2021)» (приложение Д);

2. Стандарт ФГБУ «ВНИИЗЖ» «Вакцина против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак «Карникан-4» (СТО 00495527-0413 -2023)» (приложение Е);

3. «Методические рекомендации по титрованию вируса коронавирусного энтерита собак микрометодом» (протокол Ученого совета № 5 от 14.06.2022 г.) (приложение Ж);

4. «Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу коронавирусного энтерита собак в реакции нейтрализации микрометодом» (протокол Ученого совета №06 от 18.10.2022 г.) (приложение И);

5. «Методические рекомендации по выделению вируса коронавирусного энтерита собак в культуре клеток» (протокол Ученого совета № 5 от 11.09.2024 г.) (приложение К);

6. «Методические рекомендации по получению гипериммунных сывороток к вирусу коронавирусного энтерита собак для использования в диагностических целях» (протокол Ученого совета № 7 от 29.11.2024 г.) (приложение Л);

7. «Методические рекомендации по очистке и концентрированию вируса коронавирусного энтерита собак» (протокол Ученого совета № 8 от 25.12.2024 г.) (приложение М).

Методология и методы исследования. В зависимости от характера исследований применялись различные методы: вирусологические (вирусовыделение, адаптация вирусов к культурам клеток, титрование), молекулярно-биологические (ОТ-ПЦР и секвенирование), серологические (реакция нейтрализации), физико-химические (приготовление растворов, питательных сред, центрифугирование и т.д.). Результаты, полученные в ходе исследований, обрабатывали в программе для работы с электронными таблицами Microsoft Office Excel, вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Достоверность результатов и существенность различий между величинами показателей оценивали по t-критерию Стьюдента (для зависимых выборок) и U-критерию Манна-Уитни (для независимых выборок). В качестве доверительного интервала был выбран уровень вероятности $P = 0,95$ (различия между величинами считались значимыми при $p \leq 0,05$).

Положения, выносимые на защиту. На защиту выносятся следующие положения:

1. Выделение возбудителя коронавирусного энтерита собак из проб патологического материала в культурах клеток;
2. Адаптация выделенных изолятов к различным перевиваемым культурам клеток, оптимизация параметров культивирования;
3. Иммунобиологические свойства штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак;
4. Получение гипериммунных сывороток, применяемых в качестве контрольных в реакции нейтрализации;
5. Оценка антигенных свойств ассоциированной вакцины «Карникан-4», содержащей в своем составе штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита в опытах на естественно-восприимчивых животных.

Личный вклад соискателя. Автором самостоятельно написаны все разделы диссертации, подготовлены таблицы и графический материал, публикации и доклады на конференции. Также автор лично осуществлял планирование опытов и их непосредственное проведение, сбор и анализ данных, статистическую обработку результатов.

Работа выполнена в 2020-2025 гг. за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в соответствии с планами научно-исследовательских работ по теме «Ветеринарное благополучие».

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность за консультативную и методическую помощь в выполнении отдельных этапов работы: научному руководителю, кандидату ветеринарных наук Галкиной Т.С., доктору биологических наук Доронину М.И., сотрудникам лаборатории профилактики ящура, сотрудникам центра доклинических исследований, сотрудникам сектора культур клеток. Автор также благодарит сотрудников лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных за помощь в проведении экспериментальной работы.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты исследований достоверны, что подтверждается комиссионными испытаниями разработанных СТО и методических рекомендаций.

Материалы диссертации доложены, обсуждены и получили положительную оценку на заседаниях Ученого совета и методической комиссии ФГБУ «ВНИИЗЖ» (2020-2023 гг.); на VI Международной научной конференции «Достижения ученых – в ветеринарную практику», посвященной 60-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир, 22-23 марта 2022 г.); Международной научно-практической конференции молодых ученых «Молодые ученые - науке и практике АПК» (Республика Беларусь, г. Витебск, 25-26 апреля 2024 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано пять статей, три из которых в журнале из перечня рецензируемых ВАК научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. В соавторстве получено два патента Российской Федерации на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 145 страницах компьютерного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, список сокращений, список литературы, приложения. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 30 рисунками. Список использованной литературы включает 176 источников, из которых 39 на русском языке.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о коронавирусном энтерите

Коронавирусный энтерит собак (возбудитель *Canine coronavirus* или *Canine enteric coronavirus* – общепринятая в научной литературе аббревиатура: CCoV, CCV, CECoV) – высококонтагиозная инфекция, поражающая взрослых собак и щенков, характеризующаяся гастроэнтеритом легкой или умеренной степени, а в тяжелых случаях геморрагическим энтеритом, дегидратацией, анорексией и гибелью [7, 21, 46, 50, 172].

Впервые возбудитель был выделен в 1971 г. Binn et al. и долгое время считался патогеном, вызывающим у щенков гастроэнтерит легкой или умеренной степени, не нуждающийся в лечении [73, 151]. Ветеринарное вмешательство требовалось только в случае развития микст-инфекций, при которых коронавирусный энтерит собак протекает тяжелее и часто приводит к гибели животного [57, 69, 73, 84, 120, 128]. Однако, пластичность генома CCoV крайне высока. Возбудитель претерпел значительные изменения в результате генетических мутаций, и большое количество исследований указывает на рост его вирулентности [51, 54, 60, 96, 99, 170]. Кроме собак возбудитель коронавирусного энтерита был обнаружен у большого количества видов диких животных. Особенно восприимчивы к нему представители семейства псовых (лат. *Canidae*): обыкновенная лисица (лат. *Vulpes vulpes*), енотовидная собака (лат. *Nyctereutes procyonoides*), волк (лат. *Canis lupus*), койот (лат. *Canis latrans*), гиеновидная собака (лат. *Lycaon pictus*), кустарниковая собака (лат. *Speothos venaticus*) [45, 56, 66, 69, 78, 108, 117, 156, 158, 164]. Известны случаи выделения вируса от больших панд (лат. *Ailuropoda melanoleuca*) в КНР [110, 160]. В силу антигенного родства CCoV и FCoV (коронавируса кошек) и тропизма обоих вирусов к рецепторам APN клеток-мишеней, возможно заражение кошек коронавирусом собак [69, 114]. Также вызывает беспокойство зоонозный потенциал коронавирусов и их способность преодолевать межвидовой барьер [70, 132]. Недавние случаи выделения CCoV из

биологических жидкостей пациентов с признаками респираторной инфекции и его филогенетический анализ подтвердили передачу вируса от собак человеку, однако случаев передачи от человека к человеку выявлено не было [111, 130].

Возбудитель коронавирусного энтерита считается вторым по распространенности в мире энтеропатогеном после парвовируса собак, а по исследованиям некоторых авторов (Soma T. et al., 2010; Iemura R. et al., 2013) встречается у молодых собак чаще парвовируса [76, 77, 84, 107, 144, 172]. К болезни восприимчивы собаки всех возрастов и пород, но наиболее чувствительны к CCoV щенки 5-12-недельного возраста при групповом методе содержания (питомники и приюты), где вероятность заражения коронавирусным энтеритом значительно выше [72, 77, 121, 144, 156, 161]. Согласно литературным данным, распространенность коронавируса у собак в возрасте до 6 месяцев составила 43%, у собак в возрасте 6 месяцев и старше - 27% [87]. Заболеваемость коронавирусным энтеритом мало зависит от времени года, но общая распространенность весной выше, чем в другие сезоны [87].

В настоящее время существует два генотипа кишечного коронавируса собак – CCoV-I и CCoV-II, последний в свою очередь подразделяется на два субгенотипа – CCoV-IIa и CCoV-IIb, часто встречающихся в научной литературе, но не являющихся частью официальной таксономии [87, 90, 102]. Распространенность обоих типов в различных популяциях собак не одинакова, а заражаться собаки могут как одним типом CCoV, так и обоими одновременно [64, 77, 136, 142, 146, 169, 172]. Возбудитель коронавирусного энтерита часто встречается в ассоциации с другими бактериальными и вирусными патогенами, причем уровень смертности в таких случаях выше, чем при моно-инфекции [37, 64, 84, 121]. Широко распространено бессимптомное носительство CCoV, на что указывает выделение его из образцов фекалий собак без каких-либо клинических симптомов гастроэнтерита. Предполагается, что такие собаки являются резервуаром инфекции CCoV и способствуют его распространению в популяции [121, 141, 146].

Обнаружение возбудителя коронавирусного энтерита в образцах фекалий различными методами, в том числе ОТ-ПЦР и ИХА, показало следующие

результаты: в Италии ССоV выявлялся в 38,5% образцов, 15,5% в Турецкой Республике, 33% в КНР, 16% в Японии, 27% в Колумбии, 52,3% в Египте [54, 55, 87, 88, 127, 172].

Серопревалентность к возбудителю коронавирусного энтерита в популяциях собак разных стран варьируется. В Турецкой Республике исследователями зафиксирован уровень серопревалентности от 24,46% до 96,5%, при этом отмечается, что в питомниках и приютах серопревалентность значительно выше – у 94,2% невакцинированных собак обнаруживали антитела к ССоV [53, 54, 104]. Также высокий уровень серопревалентности был выявлен у собак в Республике Корея – 87,9%, Вьетнаме – 43,3% и Японии: 44,1% в 1999 году и 77,7% в исследовании 2015 года [55, 58, 143, 157]. В Италии у 97,0% щенков и 86,1% собак старше года обнаружены антитела к коронавирусу [159]. Ранее той же группой авторов были получены схожие результаты: серопревалентность к ССоV в Италии составила 88,99% [145].

Учитывая широту распространения ССоV и очевидную значимость в возникновении гастроэнтеритов у собак, его дальнейшее изучение и мониторинг эпизоотической ситуации являются актуальными проблемами ветеринарии.

1.2. Характеристика возбудителя

1.2.1. Таксономическое положение

Первый представитель коронавирусов, вызывавший ранее неизвестное респираторное заболевание цыплят, был открыт в 1931 г. американскими исследователями А. Schalk и М.С. Hawn и получил в русскоязычной литературе название «инфекционный бронхит кур». В последующие годы было открыто множество коронавирусов, вызывающих разнообразные по симптоматике болезни у различных видов животных и птиц, и в 1968 г. их объединили в группу *Coronavirus*. В 1971 г. коронавирусы объединили в отдельный род, а в 1976 г. в каталоге Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) они получили ранг «семейство», куда был в числе прочих включен недавно открытый

коронавирус собак (CCoV). В 1996 г. на X Международном вирусологическом конгрессе был утвержден отряд *Nidovirales* (включивший в себя семейство *Coronaviridae*). В 2011 г. достижения в изучении коронавирусов потребовали изменения классификации, и род *Coronavirus* перешел в категорию подсемейства, а вместо него были описаны четыре новых рода: *Alphacoronavirus* (включающие родственные коронавирусы собак, кошек, свиней и хорьков), *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, *Deltacoronavirus*. Последние изменения в классификацию были внесены в 2018 г., когда была введена новая таксономическая категория «подрод», а два подсемейства объединили в одно - *Orthocoronavirinae*. В настоящее время появление новых способов изучения и обработки информации, открытие новых представителей семейства и углубленное изучение существующих привносят новые данные к уже известным, в связи с чем не исключены дальнейшие изменения настоящей классификации [11, 36, 118, 176].

Согласно современной классификации ICTV вирус коронавирусного энтерита собак относится к сфере *Riboviria*, царству *Orthornavirae*, типу *Pisuviricota*, классу *Pisoniviricetes*, отряду *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae*, роду *Alphacoronavirus*, виду *Alphacoronavirus suis* [17].

1.2.2. Морфология возбудителя

Все представители семейства *Coronaviridae*, независимо от круга хозяев, принадлежности к тому или иному роду, клинических признаков, тяжести вызываемых заболеваний обладают одинаковым морфологическим строением и механизмом репликации с некоторыми незначительными отличиями, характерными для отдельных видов [36]. Возбудитель коронавирусного энтерита собак представляет собой оболочечный вирус сферической формы, 100-125 нм в диаметре (по некоторым данным до 220 нм), с большой (27-32 кб) одноцепочечной положительной РНК [2, 7, 118]. Особенностью семейства являются булабовидные выступы (пепломеры) на поверхности, напоминающие корону, за что семейство получило свое название [7, 71, 114, 118]. Схематичное

изображение коронавируса собак представлено на рисунке 1.

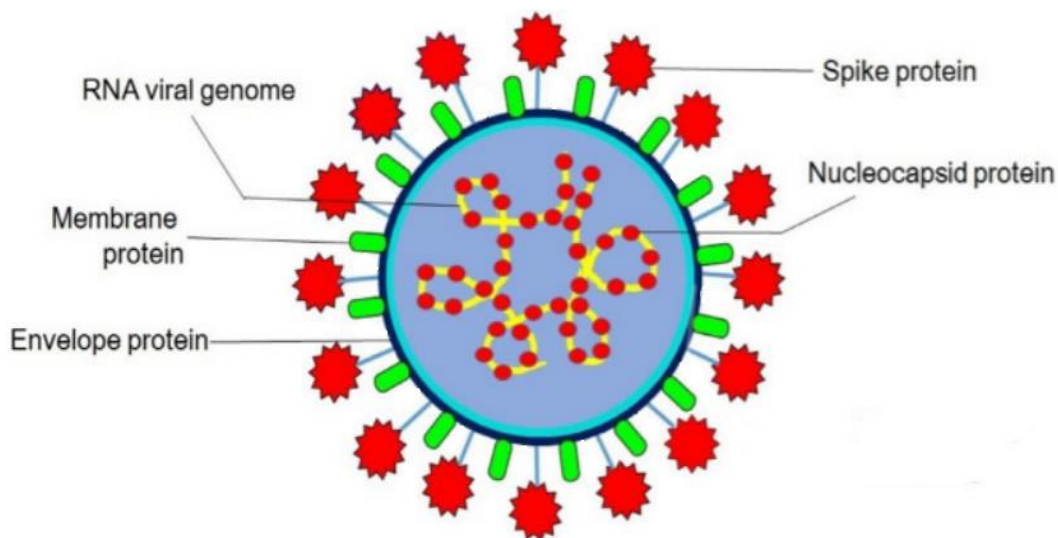


Рисунок 1 – Схематичное изображение коронавируса собак (Parkhe P, Verma S., 2021)

В ассоциации с вирусной РНК белок N (60-70 кДа) образует спирально симметричный нуклеокапсид, который в свою очередь заключен в бислойную липидную оболочку (суперкапсид), содержащую три других вирусных белка: М (25-30 кДа), Е (9-12 кДа), S (150-220 кДа) [36, 61, 69, 71, 118]. Белок Е (малый мембранный белок) встроен в оболочку вируса, основной его функцией считается сборка вирусной оболочки и участие в выходе вируса за пределы клетки. М-белок является самым распространенным компонентом вирусной мембраны и представляет по своей химической структуре гликопротеин, функция которого состоит в межбелковых взаимодействиях, необходимых для морфогенеза, а взаимодействуя с нуклеокапсидом, данный белок способствует завершению сборки вириона. S-белок также является гликопротеином, располагается на поверхности оболочки вируса, образуя пепломеры (15-20 нм) и состоит из двух субъединиц S1 и S2. S1 связывается с рецепторами на поверхности клетки-хозяина, а S2, изменяя свою конформацию, способствует слиянию оболочки вируса и мембраны клетки-хозяина. Вероятно, мутации в генах, кодирующих данный белок, определяют возможность вируса изменять свой тропизм и заражать новые виды [15, 32, 71, 114, 118].

Помимо основных структурных белков, геном вируса кодирует ряд вспомогательных, которые не отвечают за репликацию, но могут влиять на проникновение вируса в клетку и блокировать врожденный иммунный ответ хозяина [114, 118].

1.2.3. Генетическая эволюция и антигенное родство

На основании близкого родства коронавирус собак (CCoV) наряду с вирусом трансмиссивного гастроэнтерита свиней (TGEV), эпизоотической диареи свиней (PEDV), коронавирусом хорьков (FRECV), коронавирусом норок (MinkCoV), кошачьим коронавирусом (FCoV) и респираторным коронавирусом альпак относится к роду *Alphacoronavirus* [42, 116]. На сегодняшний день известны два генотипа CCoV: тип I и тип II, которые имеют до 96% идентичных нуклеотидов в геноме, но сильно отличаются по последовательности гена S [42, 61, 101, 149]. Кроме того, CCoV-I содержит новую открытую рамку считывания (ORF3), которая кодирует гликозилированный белок, секретируемый инфицированными клетками. Оба генотипа CCoV часто выявляются в фекалиях больных собак [123, 149]. Обнаружение в 2009 году нового коронавируса собак, характеризующегося двойной рекомбинацией посредством частичного обмена S-генами с TGEV, позволило разделить II тип на два подтипа: CCoV-IIa, представляющий собой «классический» CCoV, и CCoV-IIb, возникший в результате рекомбинации гена CCoV-IIa и TGEV [42, 61, 125, 150]. На основании схожести этих двух вирусов было высказано предположение, что TGEV произошел от CCoV-II в результате межвидовой передачи, что подтверждается также наличием остатков ORF3 в геномах CCoV-II и TGEV [149]. Также ряд исследователей указывает на возможность происхождения FCoV типа II от CCoV в результате двойной гомологичной рекомбинации между генами S и M, а рекомбинация с предковым вирусом привела к появлению FCoV типа I и CCoV типа I. Дальнейшая рекомбинация между CCoV типа II и TGEV, произошедшая в гене S, привела к обратной рекомбинации и появлению TGEV-подобного коронавируса (CCoV-IIb)

[42, 73, 139, 165]. Эволюция коронавируса представлена на рисунке 2.

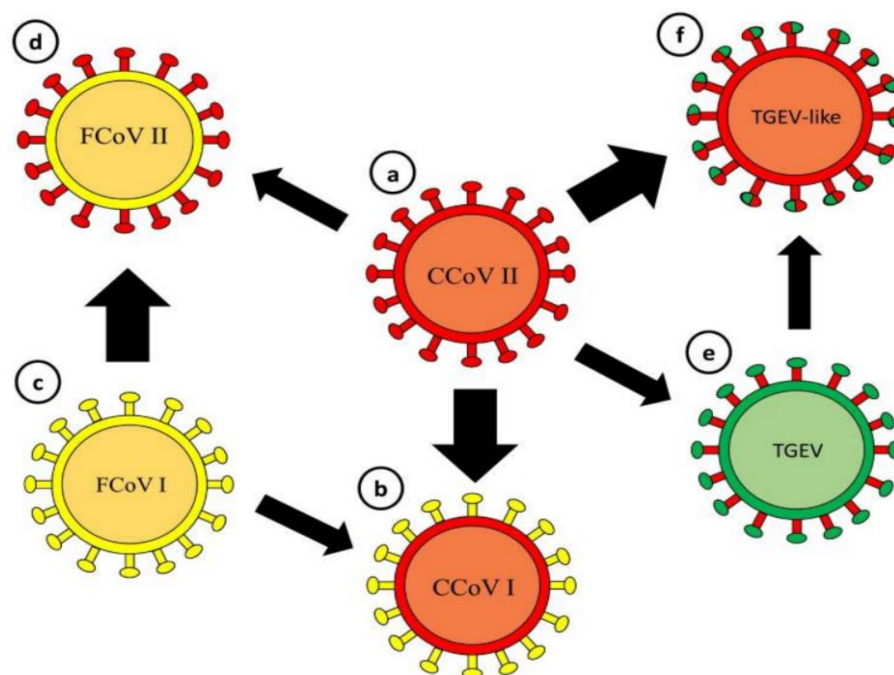


Рисунок 2 – Схематичное изображение эволюции CCoV и вероятное происхождение FCoV типа II, CCoV типа I и TGEV-подобного CCoV в результате рекомбинации (Pratelli A. et al., 2021)

Примечания: а) CCoV-II: “классический” коронавирус собак II типа; б) CCoV-I: коронавирус собак I типа (желтым выделен белок S, происходящий от кошачьего коронавируса I типа); в) FCoV-I: коронавирус кошек I типа; д) FCoV-II: коронавирус кошек II типа (красным выделен S-белок, происходящий от CCoV-II); е) TGEV: вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней (красным выделен S-белок, происходящий от CCoV-II); ф) TGEV-like: TGEV- подобный, коронавирус собак (зеленым цветом выделен S-белок, полученный из CCoV-II типа)

Генетический анализ недавно обнаруженного в КНР штамма B906_ZJ_2019 и его сходство с штаммом A-76, выделенным в питомнике биглей (Cornell University, Ithaca, NY), показал, что S-ген данных штаммов является рекомбинантом между CCoV типа I и CCoV типа II, что, возможно, требует пересмотра существующей классификации и выделения данных штаммов в новый тип CCoV-IIc [93, 115].

Появление в 2002 году высокопатогенного SARS-CoV-1, эпидемия ближневосточного респираторного синдрома MERS-CoV и пандемия COVID-19 в очередной раз напомнили о высокой генетической изменчивости коронавирусов и способности преодолевать межвидовые барьеры, передаваясь от животных человеку. В 2017–2018 гг. в Малайзии у детей, больных пневмонией, был

обнаружен штамм NuPn-2018, схожий с ССoV. На основании сходства геномов было предположено, что вирус перешел непосредственно от собак к людям [130]. Идентичный на 99,4% штамм, обозначенный как NuCCoV_Z19Haiti, был выделен в 2017 году на Гаити из образцов мочи медработника с симптомами гипертермии [111]. Выделение подобных штаммов ещё раз обращает внимание на мутационную изменчивость коронавирусов, которая способствует появлению новых генетических вариантов, способных заражать людей. NuPn-2018 и NuCCoV_Z19Haiti показали низкую вирулентность, однако, это не исключает необходимости мониторинга в свете высокой способности коронавирусов, и в том числе коронавируса собак, к рекомбинации, что дает вновь появляющимся вариантам эволюционное преимущество по сравнению с исходными.

1.2.4. Устойчивость к физико-химическим факторам

Вирус коронавирусного энтерита собак, как все представители семейства *Coronaviridae*, относится к микроорганизмам с умеренной степенью устойчивости во внешней среде [2]. ССoV устойчив к воздействию низких температур, способен сохранять инфекционную активность до 9 мес. при температуре минус 4°C, не менее 2 лет при температурах минус 20°C и минус 70°C [21, 138]. Объединенный со стабилизирующими добавками и лиофилизированный сохраняет свои исходные свойства не менее года при минус 40°C и 280 дней при 4°C [24]. Способен длительно сохраняться в фекалиях собак в зимнее время года. Однако, при воздействии высоких температур вирус быстро теряет инфекционную активность. При температуре 56°C вирус полностью инактивируется через 60 мин., при температуре 65°C через 40 мин., а при температуре 75°C – через 30 мин. [138].

Данные о влиянии концентрации ионов водорода на стабильность ССoV представлены у нескольких исследователей. В целом, можно утверждать, что вирус кислотоустойчив, стабилен при pH 6,0-7,5, однако pH 3,0-3,5 вызывает снижение инфекционной активности на 3,0 lg ТЦД₅₀/см³ в течение 24 ч [21, 138]. Изменение концентрации ионов водорода в щелочную сторону до значений pH 8,0 и выше

приводит к инаktivации вируса в течение 1 ч. Данное явление недостаточно изучено, но предполагается, что оно связано с влиянием pH на S-гликопротеин вируса, который отвечает за функцию слияния вирусной оболочки и мембраны клеток, и в котором при смещении pH в сторону экстремальных значений происходят необратимые изменения [138].

ССoV чувствителен к липидным растворителям, таким как хлороформ, эфир, бензол, быстро инаktivируется гипохлоритом, формальдегидом, глутаровым альдегидом, фенолом, спиртом [14, 21, 138]. Формальдегид и глутаровый альдегид инаktivируют вирус в течение 24 ч при температуре 22°C [138]. Для эффективной дезинфекции поверхностей раствором 3%-ой хлорной извести, требовалась экспозиция 6 ч, раствором гипохлорита натрия с содержанием 1,5% активного хлора – 1 ч [21].

Ультрафиолетовое облучение с длиной волны 200-280 нм не оказывает существенного влияния на вирус коронавирусного энтерита собак в течение 15 мин., а для полной инаktivации вируса требуется облучение в течение 72 ч [138].

1.2.5. Культивирование вируса

Представленные в различных литературных источниках данные по выделению и культивированию вируса коронавирусного энтерита собак неоднородны. Некоторые исследователи отмечают определенные трудности в выделении изолятов ССoV и адаптации их к культурам клеток, по другим данным вирус успешно репродуцируется в первично-трипсинизированных и перевиваемых культурах клеток гомологичного и гетерологичного происхождения [7, 21, 22, 44, 105, 126]. Впервые возбудителя коронавирусного энтерита выделили Binn et al. в 1971 г. в первично-трипсинизированной культуре клеток почки щенка (ПЩ) [151]. В отечественной практике штамм «Карат» (Ольшанская и др., 1997 г.) также впервые выделен в КК ПЩ и отмечается высокая степень пермиссивности данной культуры для изолятов ССoV [21, 22, 25]. В более поздних статьях можно встретить информацию, что ССoV успешно выделяется и культивируется в клеточной линии

А-72 (карциномы собаки), что является предпочтительным, так как не требует использования донорских органов для приготовления первичных КК, однако, имеет ограниченное применение, например, для изготовления из данного вирусного материала вакцин в связи с онкогенностью КК А-72 [44, 51, 52, 83].

Изучение перmissивности различных КК к вирусу коронавируса энтерита собак в отечественной практике установило, что также вирус репродуцируется с высоким титром в КК почки кошки (CRFK), где через 72 ч выявлялось характерное ЦПД. Зарубежные литературные источники также описывают частое использование КК CRFK для культивирования коронавируса собак [21, 22, 86, 120, 174]. Ольшанская А.А. и др. в своем исследовании сообщают о репродукции вируса в гомологичной КК почки собаки (MDCK) с появлением характерного ЦПД, напротив Abdelgadir A. et al. отметили, что КК MDCK не чувствительна к выделенному штамму CCoV HuPn-2018 [21, 22, 44].

Не чувствительны к вирусу такие первично-трипсинизированные культуры, как ПЭС (почка эмбриона свиньи), ККЭ (клетки куриных эмбрионов), КЭП (клетки эмбрионов перепела), ТБ (тестикулы бычка) перевиваемая культура клеток Vero (почка зеленой мартышки) [21]. Также перевиваемые линии клеток человеческого происхождения (аденокарциноидные клетки базального эпителия лёгких человека (A549), клеточная линия фибробластов лёгких человека (MRC-5)), клетки семенников свиней (ST) не подходят для репродукции CCoV [44]. В некоторых источниках отмечается, что репродукция CCoV успешно осуществляется в различных клеточных линиях кошачьих эмбрионов [110, 171, 175]. В 2024 г. Radzyhovskyi M. et al. сообщили о выделении нового штамма CCoV в культуре клеток сирийского хомяка (ВНК-21), что является первым сообщением о репродукции CCoV в клеточной линии ВНК-21 [65].

В связи с затрудненным выделением и культивированием коронавирусов, ряд авторов в своих работах приводят различные способы совершенствования данной технологии [9, 22, 28, 162]. Им Леап и др. отметили положительное влияние на репродукцию вируса добавления в инокулят 25 мкг/см³ ДЭАЭ-декстрана, что ускоряло время проявления ЦПД и увеличивало накопление вируса в полученном

материале. Однако, слишком высокая концентрация ДЭАЭ-декстрана (50 мкг/см³ и выше) являлась токсичной для клеток [9, 151]. Также одним из способов увеличить накопление вируса при культивировании в различных клеточных линиях является внесение в поддерживающую среду или приготовление инокулята на среде с добавлением трипсина. Данное свойство трипсина - влиять на адаптацию вирусов к различным клеточным линиям представлено во многих исследованиях [9, 22, 29, 35, 162]. Считается, что оно обусловлено способностью различных протеаз, в т.ч. трипсина, активировать расщепление между S1 и S2-субъединицами в S-белке, что необходимо для проникновения вируса в клетку и начала слияния вирусной оболочки и клеточной мембраны [115, 162, 168]. Различные авторы указывают, что концентрация трипсина 5 мкг/см³ или 10 мкг/см³ в поддерживающей среде ускоряет проявление ЦПД вируса и увеличивает его титр на 1,0-2,0 lg ТЦД₅₀/см³ [9, 22, 168]. Схожее действие оказывает и предварительная экспозиция вирусного инокулята в среде, содержащей трипсин.

1.3. Патогенез

Путь передачи коронавирусного энтерита в основном алиментарный. Не выяснено, возможна ли передача другими путями, например, воздушно-капельным, но подобная возможность не исключена [14, 16, 42, 71, 115]. Инкубационный период короткий – 24-96 ч.

Жизненный цикл вируса начинается с взаимодействия вируса с клеткой-хозяином. Прикрепление вируса к клетке опосредовано взаимодействием S-белка с рецепторами APN на поверхности клетки. Связывание с рецептором вызывает конформационные изменения в S-белке, в результате чего происходит слияние вируса с мембраной клетки-хозяина, вирус попадает в цитоплазму, где высвобождается вирусный геном [114, 133]. Проникнув в тонкий кишечник, ССоV обычно инфицирует и реплицируется в цитоплазме зрелых энтероцитов по бокам и на кончиках кишечных ворсинок, не затрагивая эпителий, выстилающий кишечные крипты. Инфицированные клетки подвергаются дегенерации, что

приводит к отторжению некротических клеток в просвет кишечника. Дегенерация зрелых энтероцитов приводит к истончению щеточной каймы на поверхности ворсинок, и в конечном счете, к атрофии ворсинок. В ответ на гибель зрелых энтероцитов повышается митотическая активность эпителия крипт и увеличивается количество незрелых энтероцитов [14, 115]. В результате данных изменений происходит нарушение пищеварительной и всасывательной функции кишечника, в просвете скапливаются некротизированные клетки и нерасщепленные продукты пищеварения, что повышает осмотическое давление, вызывая разжижение содержимого и диарею [14, 115]. Диарея начинается через 18-72 часа после заражения и обычно продолжается 6-9 суток, до тех пор, пока выработка IgA не ограничит развитие инфекции [42, 100]. Восстановление эпителия ворсинок в тонком кишечнике занимает около недели, по мере регенерации эпителия уменьшается экскреция вируса с фекалиями, которая, однако, может продолжаться до шести месяцев [7, 14, 71].

1.4. Клиническая картина коронавирусного энтерита собак

Клиническая картина коронавирусного энтерита собак обычно неспецифична и схожа с таковой при заболевании другими энтеритами вирусной, бактериальной, паразитарной или неинфекционной этиологии, что создает определенные трудности в постановке точного диагноза, важного для оказания своевременной и квалифицированной ветеринарной помощи [14, 16, 60, 69, 84, 96]. Тяжесть клинических признаков зависит от многих факторов, но, в первую очередь, обусловлена генетическими характеристиками вируса [42].

Коронавирусный энтерит собак протекает в трех формах: сверхострой, острой и субклинической [14, 16]. Субклиническая форма чаще всего встречается у собак старше года, в этом случае в подавляющем большинстве болезнь протекает бессимптомно или с симптомами энтерита легкой степени, не требующего специального лечения. Достаточно часто SCoV выявляется в фекалиях взрослых собак без симптомов энтерита, в результате чего является дискуссионным вопрос,

способен ли он самостоятельно вызывать болезнь или же является второстепенным кишечным патогеном. Некоторые исследователи связывают обнаружение SCoV у здоровых собак с его длительным периодом выделения с фекалиями – до 156 суток [58, 67, 85, 107, 141, 153, 161]. Большую опасность коронавирусный энтерит представляет для щенков в возрасте 5-12 недель, у которых болезнь протекает в сверхострой и острой формах [115]. У щенков возбудитель вызывает энтерит легкой и средней тяжести, сопровождающийся симптомами рвоты и диареи, которые, однако, могут самопроизвольно исчезнуть в течение 8-10 суток, но при скученном содержании, дефиците питания, стрессах, осложнении секундарными инфекциями болезнь протекает тяжелее и требует лечения [46, 67, 99]. Также сверхострые формы болезни могут развиваться при инфицировании собак высоковирулентными штаммами SCoV, такая инфекция в большинстве случаев заканчивается летально [51, 59, 94, 155].

Инкубационный период коронавирусного энтерита варьируется от одних до четырех суток [14, 16]. Заболевание начинается с таких неспецифических симптомов, как снижение или отсутствие аппетита, вялость или умеренное угнетение, увеличение частоты дефекации. В легких случаях течения заболевания активность животного не меняется, в средних и тяжелых может наблюдаться угнетение, переходящее в апатию. На второй-третий день развиваются характерные симптомы гастроэнтерита: рвота и диарея. Рвота может быть однократной или многократной, в одних случаях является доминирующим симптомом, в других, напротив, не отмечается [131, 161]. Диарея может быть слабо выраженной или умеренной степени. Фекалии при коронавирусной инфекции зловонные, водянистые, желто-зеленого или ярко-желтого цвета. В отдельных случаях наблюдается профузная или геморрагическая диарея, быстро приводящая к дегидратации, которую, однако, некоторые исследователи связывают с возникновением ко-инфекции [7, 14, 16, 21, 62, 161]. Гипертермии обычно не отмечается или наблюдается незначительное повышение температуры [30]. В некоторых случаях коронавирусный энтерит сопровождается абдоминальными болями и коликами [47, 103, 106, 115]. Гематологические и биохимические

показатели крови остаются неизменными или фиксируются незначительные изменения, такие как лимфопения, лейкопения, эритроцитопения, тромбоцитопения, повышение уровня щелочной фосфатазы, гипопроteinемия [30, 62, 163]. В случае неосложненного течения заболевания, даже без ветеринарной помощи, выздоровление наступает в течение 7-10 суток.

Инфекция, вызванная высоковирулентными и пантропными штаммами коронавируса собак, протекает значительно тяжелее и в большинстве случаев является летальной [51, 94, 96, 99, 115, 122]. Клинические признаки развиваются стремительно, в течение 24-48 ч. Болезнь начинается с повышения температуры тела до 40,0°C, апатии и отказа от корма, развития острого респираторного дистресс-синдрома. Также в течение 48 ч развивается многократная рвота и геморрагическая диарея, которые в течение небольшого периода времени приводят к тяжелой дегидратации организма. В некоторых случаях отмечают неврологические симптомы: судороги, атаксию. При гематологическом исследовании выявляют снижение уровня лейкоцитов и лимфоцитов ниже 60%, моноцитоз [147]. Гибель наступает в течение 48-72 ч. Аналогичные симптомы наблюдаются и в результате экспериментального заражения щенков пантропным штаммом SCoV, выделенным из патологического материала [43, 51, 96, 97, 147].

1.5. Патоморфология и гистологические изменения

При заболевании щенков коронавирусным энтеритом, вызванным «классическими» штаммами SCoV (подтип SCoV-IIa), различными исследователями установлено, что патологоанатомические изменения сосредоточены в основном в тонком кишечнике и мезентериальных лимфоузлах [12, 14, 74]. В зависимости от степени поражения при аутопсии обнаруживаются минимальные или серьезные патоморфологические изменения в виде локальных или обширных участков энтерита. Серозная оболочка кишечника утолщена, гиперемирована, иногда изъязвлена, цвет варьируется от бледно-розового до красного. На разрезе стенка кишечника утолщена, гиперемирована, иногда

наблюдаются полосчатые или точечные кровоизлияния на слизистой оболочке тощей кишки. Петли расширены, содержимое водянистое, желтого или коричневого цвета [12, 14, 74]. Мезентериальные лимфоузлы увеличены, отечны, беловато-серого цвета с розовым оттенком, после продольного разреза края не совмещаются, иногда в паренхиме лимфоузлов обнаруживаются петехии [12, 99]. Патологических изменений в других органах обычно не отмечают или выявляются незначительные в виде кровенаполнения и увеличения в размере печени и селезенки, края органов притуплены. Печень серо-коричневого цвета, дряблой консистенции, рисунок на разрезе сглажен [12, 74]. Известны редкие случаи илеоцекальной инвагинации кишечника в результате нарушения перистальтики [103]. В отдельных случаях выявляют серозно-воспалительный отек поджелудочной железы и гипертрофию левого желудочка сердца [14]. На гистологическом уровне выявляется десквамация эпителия тонкого кишечника, деструкция энтероцитов в апикальной части ворсинок, атрофия ворсинок, слияние двух и более ворсинок с разрушенным эпителием в боковой или апикальной части («слипание»), зернистая дистрофия эпителиоцитов, некроз крипт, уменьшение количества бокаловидных клеток, также наблюдается гиперплазия базального эпителия ворсинок, истощение лимфоидной ткани [14, 74, 98].

Заражение животных высоковирулентными штаммами коронавирусного энтерита вызывает патологический процесс во многих органах и системах организма. При проведении аутопсии собак, погибших в результате естественного или экспериментального заражения, обнаруживают геморрагический энтерит, затрагивающий весь тонкий кишечник. Со стороны серозной оболочки поверхность кишечника шероховатая, темно-красного цвета, слизистая гиперемирована, с изъязвлениями [51, 96, 99, 125, 161]. Мезентериальные лимфоузлы увеличены в 1,5-2 раза, отечны, с многочисленными кровоизлияниями [125]. В брюшной полости большое количество серозно-геморрагической жидкости [51, 112, 133]. В толстом кишечнике небольшое количество черного дегтеобразного кала. Участки некроза и кровоизлияния обнаруживают в миндалинах и печени [161]. Печень увеличена в размерах, гиперемирована,

рыхлая, желто-коричневого цвета [51, 112]. Селезенка также увеличена в размерах, с многочисленными кровоизлияниями под капсулой [51, 74, 99]. Патоморфологические изменения в легких варьируют в разных случаях. Некоторые авторы отмечают очаговые уплотнения, участки эмфиземы, бронхопневмонию в каудальных и краниальных долях, сопровождаемая выпотом в грудную полость, фибринозную пневмонию [43, 51, 74, 112, 125]. В почках обнаруживаются кровоизлияния и геморрагические инфаркты, дегенерация коры [51, 74]. Патоморфологические изменения в мозге и сердце, как правило, не специфичны. На гистологическом уровне выявляют: атрофию и слипание ворсинок, расширение и некроз крипт, лимфоцитарную инфильтрацию собственной пластинки слизистой оболочки, лимфоидное истощение пейеровых бляшек [43, 96, 133, 161]. В печени: дегенерация и умеренная жировая дистрофия гепатоцитов, внутриядерные базофильные включения. В лимфоузлах: истощение лимфоидной ткани (лимфоидная дистрофия), уменьшение количества и некроз лимфоцитов [161].

1.6. Диагностика коронавирусного энтерита собак

Диагностика коронавирусного энтерита собак, основанная на эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, является затруднительной, так как клиническая и патологоанатомическая картины неспецифичны и по ряду признаков схожи с таковыми для энтеритов вирусной, бактериальной и неинфекционной этиологии, а эпизоотологические данные часто отсутствуют или недостоверны. Также коронавирусный энтерит во многих случаях протекает в ассоциации с другими вирусными и бактериальными патогенами, что приводит к развитию микст-инфекций [13, 20, 31, 40, 89]. В связи с вышесказанным диагноз «коронавирусный энтерит» ставится, как правило, на основании проведения лабораторных исследований, методы которых в настоящее время обладают достаточной точностью и удобством применения в условиях ветеринарной клиники.

Для диагностики коронавирусного энтерита собак применяются следующие методы: вирусологический (выделение в перmissive культуре клеток), иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), метод флуоресцирующих антител (МФА), электронная микроскопия (ЭМ), тест-системы, основанные на иммунохроматографическом анализе (ИХА) [4, 19, 21, 22, 41, 79, 86, 91, 129, 148, 166].

Выделение вируса в культуре клеток является одним из первых методов в вирусологии, однако, в отношении ССоV данный метод несколько ограничен в силу ассоциативного течения заболевания и трудностей, связанных с тем, что не все изоляты репродуцируются в перmissive культурах клеток [84, 105, 151]. Для выделения вируса применяют первично-трипсинизированные и перевиваемые линии культур клеток. Наиболее чувствительными считаются первично-трипсинизированная КК ПЩ (почки щенка) и перевиваемая КК А-72 (карциномы собаки), где через 48-72 ч вирус вызывает характерное ЦПД, видимое в световой микроскоп [1, 151]. Патологическим материалом, где вирус накапливается в наибольших количествах, служат тонкий кишечник и фекалии, при заражении высоковирулентными штаммами также печень, легкие и селезенка. Однако, отрицательный результат выделения вируса из фекалий или органов-мишеней в КК не всегда является достоверным показателем его отсутствия в организме животного [79].

ЭМ также является одним из старых методов обнаружения вирусов, достаточно достоверна и иногда позволяет обнаружить интересные находки, связанные с изменением морфологии вируса при воздействии физико-химических факторов, однако, не является общедоступным методом, так как требует наличия высокотехнологичного оборудования и определенной квалификации исследователя [5, 7, 21, 79].

Метод флуоресцирующих антител (МФА), основанный на связывании антигена со специфическими антителами, мечеными флуоресцентными маркерами, является экспресс-методом, позволяющим идентифицировать возбудителя в образцах в течение нескольких часов. Данный метод для обнаружения и

дифференцирования CCoV был разработан сотрудниками Всероссийского государственного Центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ»), однако, не нашел широкого применения на практике [21, 22].

На сегодняшний день в условиях крупных ветеринарных лабораторий часто применяется иммуноферментный анализ (ИФА) в различных модификациях, позволяющий с высокой точностью обнаружить как антиген CCoV, так и антитела в сыворотках собак, что может быть полезно для исследования распространения коронавирусного энтерита в популяции животных [86, 92, 166]. Другим доступным и относительно простым методом, используемым в условиях лабораторий, являются различные модификации полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), позволяющие установить не только наличие возбудителя коронавирусного энтерита, но и его генетическую группу, а при использовании мультиплексных технологий и другие кишечные патогены собак в образцах [19, 41, 79, 91, 129, 148].

В условиях небольших ветеринарных клиник широко применяются наборы для иммунохроматографического анализа (ИХА), основанные на связывании антигена с моноклональными антителами, мечеными различными соединениями, которые позволяют быстро (в течение десяти минут) и с относительно высокой точностью поставить предварительный диагноз [4, 19, 33].

1.7. Специфическая профилактика коронавирусного энтерита собак

История вакцинопрофилактики коронавирусного энтерита собак насчитывает более 40 лет. Первые инактивированные вакцины были представлены в 1980-х годах, однако их применение вызывает споры до сих пор. Данные вакцины ограничивали развитие болезни и появление клинических признаков у вакцинированных животных, но не защищали от заражения и репликации вируса в кишечнике [15, 49, 167]. В 1983 году в США была зарегистрирована первая модифицированная живая трехвалентная вакцина для профилактики чумы

плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтерита собак. Через два месяца данная вакцина была отозвана из-за большого количества побочных реакций, включающих поражение центральной нервной системы и гибель вакцинированных животных [15, 50, 119, 173]. Неудачный опыт повторился в начале 2000-х годов, когда в США была лицензирована «живая» бивалентная вакцина против чумы плотоядных на основе штамма «Rockborn» и аттенуированного штамма коронавирусного энтерита, ранее показавшего свою эффективность и безопасность, но в данном сочетании компонентов вызывавшего у иммунизированных собак развитие энцефалита. Новая вакцина, представляющая собой комбинацию аттенуированного штамма CCoV, но в сочетании с вирусом чумы плотоядных на основе вектора оспы канареек поствакцинальных осложнений не вызывала [50].

В 2004 году A. Pratelli et al. представили вакцину, содержащую аттенуированный штамм CCoV 257/98-3с [140, 154]. Исследования показали ее высокую эффективность в защите щенков от клинических проявлений коронавирусного энтерита при введении внутримышечно и ороназально, при этом введение ороназальным путем профилактировало выделение вируса с калом при заражении полевыми штаммами [154].

По состоянию на 2025 год Международная ветеринарная ассоциация мелких животных (WSAVA) относит вакцинацию против коронавирусного энтерита собак к числу необязательных, так как ее эффективность противоречива [6]. Среди аргументов низкая инцидентность летальных случаев и недостаточно эффективная защита от заражения «полевыми» штаммами [167]. Однако, большое количество исследований показывает необходимость иммунизации в местах группового содержания животных, таких как питомники и приюты, где возбудитель циркулирует длительное время и есть риск заражения парвовирусом собак, который в ассоциации с коронавирусом протекает тяжелее [37]. Также отмечается высокая изменчивость и рост вирулентности CCoV, требующие актуализации штаммового состава вакцин [8, 50, 72, 89, 139, 161].

Несмотря на спорную эффективность, инактивированные вакцины широко

применяются для профилактики коронавирусного энтерита, на что указывает их огромное разнообразие в разных странах мира [1, 25, 68, 71, 82, 109, 134, 152]. Несмотря на решающую роль Ig A на поверхности слизистой кишечника в защите от заражения коронавирусным энтеритом, сероконверсия гуморальных антител также является важным фактором, предотвращающим развитие выраженных клинических признаков и тяжелых форм болезни. Исследователи отмечали, что у 85% иммунизированных животных не наблюдалось симптомов заболевания при контрольном заражении, и лишь у 15% развивалась диарея легкой степени, в то время как у 80% собак контрольной группы наблюдались симптомы гастроэнтерита различной степени тяжести, а в отдельных случаях гибель животных. Также, несмотря на то что инактивированные вакцины не предотвращают полностью выделение CCoV с калом у зараженных собак, они значительно уменьшают время выделения вируса, что помогает снизить его распространение в группах животных [82, 109, 152].

На отечественном рынке до 2022 года были представлены две вакцины, разработанные компанией «Zoetis Inc.» (США), содержащие в своем составе штаммы CCoV: Дюрамун Макс 5-CvK/4L (аттенуированный штамм TN-449) и Вангард Плюс 5 L4 CV (инактивированный штамм NL-18) [3, 81]. Аналогом данных вакцин в России является вакцина «Мультикан», разработанная НПО «Нарвак», содержащая в своем составе аттенуированный штамм «№ 49» вируса коронавирусного энтерита собак [1, 7]. Данные вакцины рекомендованы для вакцинации щенков с 6-8 недельного возраста и вызывают формирование иммунного ответа против возбудителя коронавирусного энтерита через 14-21 сутки после двукратного введения.

1.8. Заключение по обзору литературы

Кишечные инфекции вирусной этиологии широко распространены в популяции собак. Возбудитель коронавирусного энтерита, который согласно классификации ICTV относится к роду Alphacoronavirus, семейству Coronaviridae, является вторым по распространенности в мире энтеропатогеном после парвовируса, вызывающим у животных болезнь с симптомокомплексом энтерита [76, 77, 84, 107, 144, 172]. По данным литературы обнаружение возбудителя в образцах фекалий больных собак варьировалось в широком диапазоне от 15,5% случаев в Турецкой Республике до 52,3% случаев в Египте [54, 88]. Серопревалентность также находится на высоком уровне, достигая 97% в Италии, 96,5% в Турецкой Республике и 87,9% в Республике Корея, при этом отмечается, что в питомниках и приютах серопревалентность значительно выше, чем у собак в отдельных домохозяйствах [54, 157, 159]. Несмотря на то, что в Российской Федерации мониторинг данной инфекции не ведется, анализ зарубежных источников, информирующих об эпизоотической ситуации по коронавирусу собак в других странах, показал, что данная инфекция циркулирует в популяции собак по всему миру.

Вирус коронавируса собак, как все представители семейства Coronaviridae, характеризуется высокой степенью мутационной изменчивости. Долгое время считалось, что коронавирусный энтерит в большинстве случаев не требует обращения в ветеринарную клинику, однако, многие исследователи неоднократно указывали на появление новых высоковирулентных штаммов, в том числе штаммов, способных вызывать у собак разных возрастов тяжелую форму течения энтерита и полиорганные поражения [51, 54, 60, 96, 99, 170]. В последние десятилетия, после эпидемии SARS-CoV-1 и MERS-CoV, а также пандемии COVID-19 способность коронавирусов преодолевать межвидовые барьеры вызывает настороженность научного сообщества. Выделение в 2017-2018 гг. от людей штаммов SCoV в очередной раз обращает внимание на мутационную изменчивость коронавирусов и необходимость их углубленного изучения [11, 130].

Выделение новых штаммов, их адаптация к культурам клеток и получение большого количества ВСМ с высоким титром необходима как для изучения биологических свойств штаммов, так и для разработки средств диагностики и профилактики данной инфекции. Несмотря на достаточно успешное выделение коронавируса собак в первично-трипсинизированных культурах клеток, его адаптация к перевиваемым культурам не всегда сопровождается положительным результатом [7, 21, 22, 44, 105, 126]. Расширение спектра клеточных культур гетерологичного и гомологичного происхождения, подходящих для выделения и культивирования CCoV, может способствовать решению данной проблемы.

Коронавирус собак протекает с симптомами энтерита различной степени тяжести, однако, существует большое количество незаразных болезней и инфекций, протекающих со схожими симптомами и патологоанатомической картиной, в результате чего для подтверждения диагноза «коронавирусный энтерит» требуется лабораторное исследование. Данное условие затрудняет сбор сведений о распространенности коронавирусного энтерита, т.к. большинство клиник в небольших населенных пунктах осуществляет диагностику только по клиническим признакам. Наиболее быстрыми и точными методами являются ПЦР и ИФА, помогающие идентифицировать возбудителя, но в условиях небольших ветеринарных клиник возможно использование наборов для ИХА, также обладающих достаточной точностью. Наряду с вышеперечисленными вирусологические (выделение в культуре клеток) и серологические (реакция нейтрализации) методы остаются «золотым стандартом» в диагностике коронавирусного энтерита.

Несколько десятилетий вопросы специфической профилактики коронавирусного энтерита собак остаются дискуссионными. По состоянию на 2025 год Международная ветеринарная ассоциация мелких домашних животных (WSAVA) относит вакцинацию против коронавирусного энтерита собак к числу необязательных [127]. Генетическая пластичность CCoV и ведущая роль иммуноглобулинов слизистых кишечника для предотвращения заражения ограничивают эффективность разработанных вакцин. Однако, большое количество

исследователей указывает на необходимость иммунизации в местах скученного содержания животных (приюты, питомники), где существует высокий риск развития микст-инфекций, которые протекают значительно тяжелее, а условия содержания часто не соответствуют нормам. Вакцинация против коронавирусного энтерита, несмотря на ее ограниченную эффективность, оказывает положительный эффект, т.к. доказанно позволяет снизить распространение вируса в популяции собак и значительно уменьшить тяжесть клинических симптомов.

В связи с вышеизложенным, выделение новых изолятов СCoV и изучение их биологических свойств позволит расширить знания о данном возбудителе с последующим совершенствованием арсенала средств диагностики и профилактики данной инфекции.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материалы

Работа выполнена в период с 2020 по 2025 гг. в лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных ФГБУ «ВНИИЗЖ». Отбор проб биологического материала осуществляли в отдельных ветеринарных учреждениях г. Владимира, г. Гусь-Хрустального, г. Рыбинска, г. Нижнего Новгорода и г. Москвы.

Вирус. В работе использовали штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак. Штамм был выделен из патологического материала (тонкий отдел кишечника), полученного от щенка, погибшего с симптомами гастроэнтерита, идентифицирован и адаптирован методом последовательных пассажей к перевиваемой культуре клеток почки кошки (CRFK). Выделенный штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак депонирован в Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ» под регистрационным номером 376 - деп / 22-10 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2021 г.

Клеточные культуры. В исследованиях использовали следующие первично-трипсинизированные и субкультуры клеток: культура клеток почки котенка (ПК), культура клеток почки щенка (ПЩ), культура клеток селезенки котенка (СК), культура клеток селезенки щенка (СЩ).

Для адаптации изолятов SCoV и изучения культуральных свойств вируса использовали следующие перевиваемые культуры клеток гомологичного и гетерологичного происхождения: культура клеток почки кошки (CRFK), культура клеток селезенки кошки (FS), культура клеток почки собаки (MDCK, линия NBL-9), культура клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero-76), культура клеток почки новорожденного сирийского хомячка (BHK-21), культура клеток почки свиньи (IB-RS-2) и культура клеток почки кролика (RK-13).

Культуры клеток, выращенные в культуральных флаконах и роллерах, получали из сектора культур клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Питательные среды и растворы. В работе использовали общепринятые в вирусологии питательные среды: ПСС, ПСП, DMEM (pH 7,2-7,4) с добавлением 10% фетальной сыворотки КРС для культивирования клеток, и 2% для культивирования вируса. Также в качестве поддерживающей использовалась бессывороточная среда OptiPro (Thermo Fisher Scientific). Промывку конфлюэнтного клеточного монослоя осуществляли солевым раствором Хенкса (pH 7,1-7,2) или фосфатно-буферным раствором (pH 7,0-7,4). Для диспергирования клеток монослоя и отслоения от поверхности культурального флакона применяли растворы трипсина (0,25%-ый на фосфатном буфере) и версена (0,02%-ый на растворе Хенкса).

Оборудование и материалы. При проведении научных исследований использовали следующие приборы и оборудование:

- бокс микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5 (ЗАО «Ламинарные системы», Российская Федерация);
- CO₂ - инкубатор с поддержанием температуры (37,0±0,5) °C и содержания CO₂ на уровне 5% Heracell Vios 160i (Thermo Fisher Scientific, США);
- микроскоп инвертированный Olympus CKX53 с фазовым контрастом и фотодокументированием (Olympus, Япония);
- высокоскоростная настольная центрифуга Eppendorf Centrifuge 5804G (Eppendorf, Германия);
- высокопроизводительная центрифуга Avanti Jxn26 (Beckman Coulter, США);
- высокоскоростная ультрацентрифуга Optima L-80 XP (Beckman Coulter, США);
- амплификатор Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Германия);
- генетический анализатор ABI Prism 3130/3130 xl (Applied Biosystems, США);
- камера для вертикального электрофореза Bio-Rad Protean (Bio-Rad Laboratories, США);

Материалы и реактивы:

- культуральные флаконы с площадью рабочей поверхности 25 см², 75 см², 175 см², 300 см², 850 см² (SPL Lifesciences, Республика Корея);
- физиологический раствор (0,15 М);
- ФБР (фосфатно-буферный раствор), pH 6,8;
- краситель Кумасси G-250 (Bio-Rad, США)
- тест-система «КОРОНАВИР» (производитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);
- набор для иммунохроматографического анализа (Asan Easy Test, Республика Корея).

Другие реактивы, использованные в работе, приводятся в тексте диссертации.

Подопытные животные. В работе использовали следующие виды животных: кроликов породы шиншилла, массой 1,5-2,5 кг (для изучения патогенности и антигенных свойств вируса); хорьков массой 1,5 кг (для изучения патогенности и антигенных свойств вируса); морских свинок массой 300-400 г (для изучения патогенности, антигенных свойств вируса и получения гипериммунных сывороток); песцов массой 6-8 кг (для изучения антигенных свойств вируса). Для воспроизведения инфекции и изучения иммунобиологических свойств штамма использовали беспородных щенков собак в возрасте 1,5-3 месяцев. Работа с животными проводилась в строгом соответствии с СТО 00495527-0002 «Животные лабораторные. Использование для контроля и экспериментов», а также Рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

2.2. Методы

Выделение вируса в культуре клеток. Образцы патологического материала (тонкий кишечник) и биологического материала (фекалий) растирали в ступке с добавлением стекла или мелкого речного песка, стерилизованных автоклавированием, до гомогенного состояния. Из растертого материала готовили

10% суспензию на среде ПСС или физиологическом растворе. Полученный материал подвергали двукратной процедуре «замораживания-оттаивания» для разрушения клеток и освобождения содержащегося в них вируса, после чего центрифугировали в течение 10 минут при 1500 g. Осадок утилизировали, а к супернатанту добавляли антибиотики (пенициллин 100 ЕД/см³, стрептомицин 100 ЕД/см³) и выдерживали при температуре $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин. Затем материал фильтровали через мембранные фильтры («Миллипор») с диаметром пор 0,22 мкм и инокулировали в сформированный клеточный монослой первично-трипсинизированных культур клеток.

Культивирование вируса. Штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак адаптировали к перевиваемым культурам клеток почки кошки (CRFK) и селезенки кошки (FS). Для культивирования вируса использовали культуральные флаконы различной емкости или роллеры с конфлюэнтным монослоем КК. Перед инфицированием ростовую среду сливали, монослой двукратно промывали раствором Хенкса, а затем инокулировали CCoV из расчета 0,01 ТЦД₅₀ на клетку. Культуральные флаконы помещали в термостат при температуре $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ на 60 мин. для контакта вируса с клетками, после чего во флакон вносили поддерживающую среду ПСС (или аналог) с 2 % содержанием фетальной сыворотки крови КРС и 2% содержанием глутамина. При использовании КК CRFK, ежедневно контролировали состояние монослоя под микроскопом, и при поражении ЦПД 80-90% монослоя флаконы замораживали при температуре не выше минус $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. При использовании КК FS культивирование продолжали в течение 72 ч.

Титрование вируса. Определение инфекционной активности вируса коронавирусного энтерита собак осуществляли методом титрования в перевиваемой культуре клеток CRFK, выращенной в лунках микропланшета. Сущность метода заключается в способности вируса вызывать характерные цитопатические изменения (ЦПД) в чувствительной клеточной системе и учете лунок микропланшета, в которых наблюдается характерное ЦПД.

Титрование вируса проводили в два этапа. На первом этапе готовили основные компоненты (приготовление сред, подготовка 96-луночных планшетов

с суточной культурой клеток CRFK). На втором этапе в стерильных микропробирках объемом 1,5-2,0 см³ готовили ряд последовательных десятикратных разведений вируса на среде ПСС (или аналогичной). Из лунок микропланшета удаляли ростовую среду, подготовленные разведения вируса переносили автоматическим многоканальным дозатором в лунки планшета в объеме 0,1 см³. Планшеты закрывали крышкой и помещали в СО₂-инкубатор при температуре 37±0,5 °С, ежедневно просматривая лунки под инвертированным микроскопом на наличие ЦПД, учитывая общее число лунок с ЦПД в каждом разведении. Окончательный учет результатов проводили через 120 ч инкубирования. Результаты титрования считали достоверными при отсутствии признаков бактериального роста и сохранении клеточного монослоя в контроле.

Расчет титра вируса осуществляли по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/см³.

Реакция нейтрализации. Реакцию нейтрализации ставили микрометодом в 96-луночных планшетах с чувствительной культурой клеток, используя рабочее разведение вируса 100 ТЦД₅₀. Исследуемые сыворотки предварительно инактивировали на водяной бане при температуре 56±1°С в течение 30-40 мин., разводили двукратно поддерживающей средой ПСС (или аналог) с 1:2 до 1:256, а затем добавляли рабочее разведение вируса в соотношении 1:1. Планшеты выдерживали в СО₂-инкубаторе в течение 60 мин. при температуре 37±1°С и содержанием СО₂ в атмосфере 5%, а затем в лунки планшета вносили суспензию чувствительной культуры клеток с посевной концентрацией клеток 0,4-0,5×10⁶ кл/см³.

Одновременно с испытуемыми сыворотками ставили контроли: контроль рабочей дозы вируса; контроль культуры клеток; контроль среды ПСС (или аналог); контроль исследуемых сывороток на токсичность.

Планшеты инкубировали в СО₂-инкубаторе, ежедневно просматривая под микроскопом и регистрируя лунки с выраженным ЦПД и/или лунки со сформированным монослоем. Учет окончательного результата проводили через 120 ч. Титром сыворотки считали предельное ее разведение, тормозящее развитие

ЦПД вируса в 50% зараженных лунок с культурой клеток. Расчет титра исследуемых сывороток крови осуществляли по формуле Кербера и выражали в логарифмах с основанием 2 ($\log_2$).

Метод торможения гемагглютинации (HI, РТГА). Антитела в сыворотках крови к вирусу парвовирусного энтерита собак определяли методом торможения гемагглютинации в круглодонных полистероловых планшетах. Сыворотки предварительно инактивировали на водяной бане при температуре $56 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30-40 мин., затем в лунках планшета, заполненных фосфатно-буферным раствором с pH 6,4, готовили серию двукратных разведений сыворотки, начиная с разведения сыворотки 1:2. Далее во все лунки добавляли вирусную суспензию, содержащую рабочую дозу вируса равную 8 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ). После инкубации в течение 60 мин. при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$, в лунки с исследуемыми сыворотками вносили 0,8% суспензию эритроцитов свиньи. Учет реакции осуществляли через 2-3 ч. За титр антител принимали предельное разведение сыворотки, вызывающее полное ингибирование гемагглютинации в лунках (образование «пуговики») и выражали в логарифмах с основанием 2 ($\log_2$).

Концентрирование и очистка вируса. Флаконы с вирусной суспензией дважды замораживали и размораживали, периодически тщательно встряхивая. Чтобы избавиться от клеточного детрита и балластных белков, вирусную суспензию осветляли низкоскоростным центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин. Для очистки от балластных белков надосадочную жидкость пропускали последовательно через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и 0,22 мкм. Полученный ВСМ переносили в центрифужные пробирки, аккуратно подслаивали на дно 20% сахарозу и центрифугировали при 112000 g в течение 2 ч, после чего надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в ФБР pH 6,8-7,2 в соотношении 1/100 от исходного объема. Полученный очищенный антиген хранили в стерильных криопробирках при температуре минус $45 \pm 5^\circ\text{C}$. Инфекционную активность полученного препарата определяли методом титрования в чувствительной культуре клеток почки кошки (CRFK). Степень

чистоты контролировали методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-ПААГ).

Электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофорез белковых фракций проводили по методу Лэммли в 10%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия (SDS) [113]. Для ранжирования молекулярных масс использовали набор маркеров Broad Range («Bio-Rad»). Электрофорез проводили при постоянном напряжении 200В и силе тока 60 мА течение 60 мин. В целях анализа белковых профилей полученные гели подвергали окрашиванию по Кумасси.

Получение гипериммунной сыворотки. Гипериммунные сыворотки к вирусу коронавирусного энтерита собак получали от морских свинок. Для иммунизации животных использовали концентрированный очищенный антиген штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак, полученный по описанному выше методу. Антиген объединяли с адъювантом (полный (ПАФ) или неполный (НАФ) адъювант Фрейнда) в соотношении 1:1 и вводили морским свинкам трехкратно подкожно паравerteбрально в 3-4 точки в объеме 0,5 см³ смеси.

ОТ-ПЦР-РВ. Идентификацию вируса коронавирусного энтерита собак в пробах поступившего биоматериала осуществляли методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием тест-системы «КОРОНАВИР» (производитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя [10].

Секвенирование и филогенетический анализ. Для изучения молекулярно-генетических свойств изолятов вируса коронавирусного энтерита собак проводили секвенирование по Сэнгеру.

Полученные последовательности выравнивали с применением алгоритма Clustal W в программе BioEdit v.7.2.5. Построение и редактирование филогенетических деревьев осуществляли с помощью алгоритма максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) с бутстреп 500 итераций, в программе MEGA 11 с принятыми по умолчанию параметрами. С целью оценки филогенетических связей выделенных изолятов и других штаммов коронавируса

собак нуклеотидные последовательности импортировали из базы данных GenBank (номера доступа GenBank представлены на дендрограмме рядом с названиями изолятов).

Гистологические исследования. Биологический материал, полученный от животных, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Для получения обзорных препаратов проводку материала осуществляли в гистопроцессоре TLP-720 (Россия, Mt PointTM), заливку парафином проводили на станции заливки ESD-2800 (Россия, Mt PointTM), срезы толщиной 5-8 мкм готовили на ротационном полуавтоматическом микротоме RMD-3000 (Россия, Mt PointTM), окрашивали гематоксилином и эозином в стейнере линейном автоматическом ALS-96 (Россия, Mt PointTM). Препараты исследовали с помощью микроскопа Olympus с фотодокументированием.

Определение иммуногенных свойств и учет результатов заражения. Для определения иммуногенных свойств штамма «Рич» CCoV был проведен опыт экспериментального заражения щенков собак в возрасте 1,5-2 месяцев, предварительно иммунизированных против данного вируса.

Культуральную суспензию штамма «Рич» CCoV с титром $5,00 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ инактивировали АЭЭИ в концентрации 0,01% при 37°C в течение 48 ч. К полученному антигену добавляли 3%-гидроокись алюминия (ГОА) в количестве 10% от общего объема в качестве адьюванта и иммунизировали щенков экспериментальной группы двукратно с интервалом 21 сутки. Через 14 суток после второй иммунизации щенков заражали нативным вирусом с титром $5,00 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ комбинированным способом: вводили ВСМ интраперитонеально в объеме 3,0 см³ и перорально в объеме 5,0 см³. За животными после заражения вели наблюдение в течение 21 суток. Ежедневно оценивали общее состояние животных согласно балльной системе, предложенной Decaro N. et al. (представлена в таблице 1) [109].

Сумму суточных баллов по каждой группе делили на количество животных в группе. Полученные данные использовали для построения клинических профилей и статистической оценки результатов исследования. Статистическая

значимость разницы клинических показателей между двумя группами устанавливалась с применением критерия Манна-Уитни.

Таблица 1 – Оценка выраженности клинических признаков при экспериментальном заражении щенков

Критерий клинического осмотра	Степень выраженности клинического признака	Оценка (в баллах)
Общий вид, активность	Соответствует норме	0
	Вялость	1
	Депрессия	2
	Апатия	3
	Гибель	20
Аппетит	Нормальный	0
	Съедает ½ порции	1
	Съедает менее ½ порции	2
	Отказ от пищи	3
Дегидратация	Отсутствует	0
	Слабо выражена	1
	Умеренная	2
	Тяжелая степень	3
Диарея	Отсутствует	0
	Размягченный кал	1
	Жидкий кал	2
	Кал с примесью крови	3
Абдоминальные боли	Отсутствует	0
	Слабо выражена	1
	Умеренно выражена	2
	Сильная болевая реакция	3

Статистическая обработка результатов. Использовали общепринятые методы статистической обработки полученных данных. Вычисление средних арифметических титров антител и антигенов, а также стандартного отклонения производили с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel. Достоверность результатов и существенность различий между величинами показателей оценивали по t-критерию Стьюдента (для зависимых выборок) и U-критерию Манна-Уитни (для независимых выборок). В качестве доверительного интервала был выбран уровень вероятности $P = 0,95$ (различия между величинами считались значимыми при $p \leq 0,05$).

Для построения графиков использовали программу Microsoft Office Excel.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выделение изолятов вируса коронавирусного энтерита собак из проб патологического материала

В период 2021-2022 гг. было отобрано 13 проб биологического и патологического материалов от больных и погибших щенков в возрасте 1-3 мес. с признаками энтерита, содержащихся в ВООО Центр животных «Валента» (г. Владимир), муниципальном приюте «Хвосты» (г. Гусь-Хрустальный), а также принадлежащих частным владельцам (г. Владимир, г. Н. Новгород, г. Москва, г. Рыбинск). Пробы были исследованы на месте отбора посредством наборов, основанных на иммунохроматографическом анализе (ИХА) (Asan Easy Test, Корея) или в коммерческих лабораториях («Веттест», «VetUnion») на наличие возбудителей парвовирусного и коронавирусного энтеритов. Из 13 исследованных проб три пробы были положительными на наличие возбудителя парвовирусного энтерита и три пробы – положительными на наличие возбудителя коронавирусного энтерита. В шести пробах установлена ко-инфекция (парвовирусный/коронавирусный энтериты). Одна проба оказалась отрицательной на наличие возбудителей парвовирусного и коронавирусного энтеритов.

Образцы патологического материала (тонкий кишечник) и биологического материала (фекалий) от щенков с подтвержденным диагнозом «коронавирусный энтерит» подготавливали по методу, описанному в разделе «Материалы и методы» и инокулировали в сформированный клеточный монослой первично-трипсинизированных культур клеток.

Изучение данных литературы показало, что в исследованиях различных авторов упоминается ряд клеточных культур, наиболее подходящих для выделения изолятов ССоV. Из перевиваемых КК такими являются КК А-72 (карциномы собаки) и КК Fcwf-4 (эмбриона котенка), а из первично-трипсинизированных КК ПЩ (почки щенка) [21, 44, 51, 151]. В связи с отсутствием в коллекции культур

клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ» указанных выше перевиваемых линий КК, в настоящем исследовании была использована первично-трипсинизированная и субкультура клеток ПЩ, а также изучена перmissивность ряда других первично-трипсинизированных КК для выделения изолятов ССоV.

В работе использовали следующие первично-трипсинизированные и субкультуры клеток, полученные из сектора культуры клеток (СКК) ФГБУ «ВНИИЗЖ»: почки щенка (КК ПЩ), селезенки щенка (КК СЩ), почки котенка (КК ПК) и селезенки котенка (КК СК).

Контроль наличия вируса в культуральной жидкости осуществляли после каждого пассажа посредством наборов ИХА и при отрицательном результате в течение трех пассажей дальнейшее культивирование считали нецелесообразным. Всего было проведено пять последовательных пассажей. Следует отметить, что с первого пассажа в КК СЩ и КК ПЩ через 48-72 ч культивирования наблюдалось характерное ЦПД (рисунки 3, 4), что позволило определить титр вируса начиная с первого пассажа.

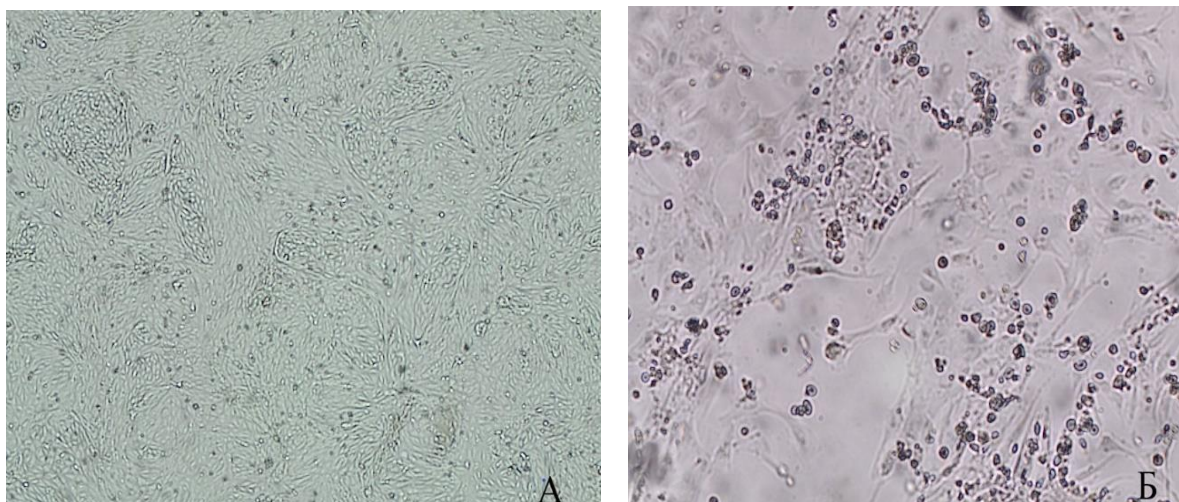


Рисунок 3 – А) клетки монослоя КК ПЩ без инокуляции ССоV через 72 ч. (увеличение $\times 4$); Б) Клетки монослоя КК ПЩ после инфицирования изолятом ССоV через 72 ч (увеличение $\times 10$) (фото из личного архива)

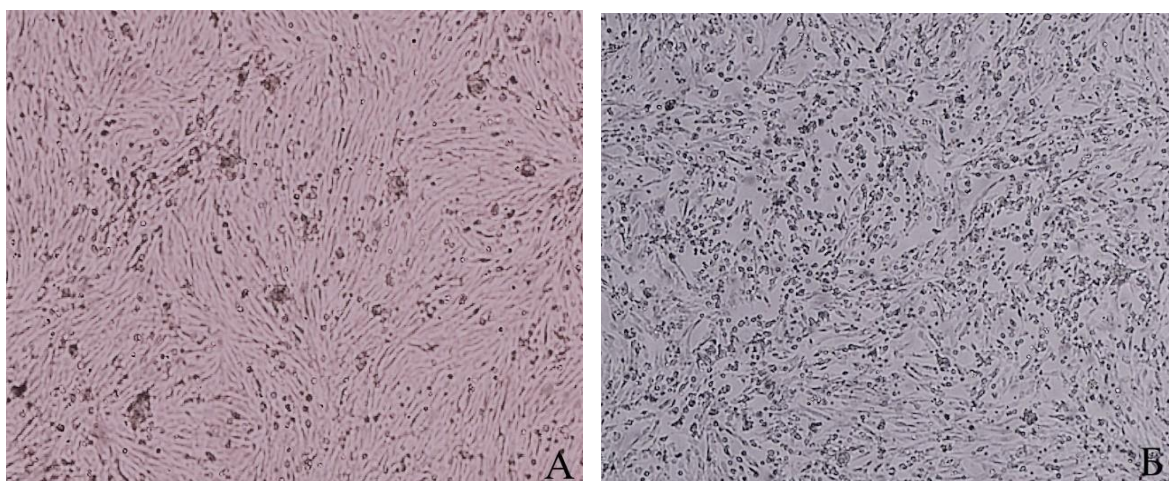


Рисунок 4 – А) Клетки монослоя КК СЩ без инокуляции ССоV через 48 ч. (увеличение $\times 4$); Б) Клетки монослоя КК СЩ после инфицирования изолятом ССоV через 48 ч (увеличение $\times 4$) (фото из личного архива)

Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Выделение изолятов возбудителя коронавирусного энтерита собак в первично-трипсинизированных и субкультурах клеток
($n=3$, $p < 0,05$)

Название изолята	Культура клеток	Титр вируса и стандартное отклонение, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$				
		1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж
№1 «Рич»	ПК	$2,33 \pm 0,14$	$<1,00$	$<1,00$	$<1,00$	-*
	СК	$1,50 \pm 0,25$	$2,58 \pm 0,14$	$2,92 \pm 0,14$	$2,92 \pm 0,14$	$3,42 \pm 0,14$
	ПЩ	$3,00 \pm 0,00$	$3,92 \pm 0,14$	$4,5 \pm 0,25$	$4,50 \pm 0,00$	$5,08 \pm 0,14$
	СЩ	$4,42 \pm 0,14$	$4,33 \pm 0,14$	$4,42 \pm 0,14$	$4,33 \pm 0,14$	$4,50 \pm 0,25$
№ 2 «Берта»	ПК	$<1,00$	$<1,00$	$<1,00$	-*	-*
	СК	$1,00 \pm 0,00$	$1,25 \pm 0,00$	$1,33 \pm 0,14$	$1,25 \pm 0,25$	$1,25 \pm 0,00$
	ПЩ	$1,25 \pm 0,00$	$1,33 \pm 0,25$	$2,00 \pm 0,25$	$2,00 \pm 0,25$	$1,92 \pm 0,14$
	СЩ	$1,25 \pm 0,25$	$1,50 \pm 0,25$	$1,75 \pm 0,25$	$1,66 \pm 0,29$	$1,58 \pm 0,14$
№ 3 «Рекс»	ПК	$<1,00$	$<1,00$	$<1,00$	-*	-*
	СК	$<1,00$	$<1,00$	$<1,00$	-*	-*
	ПЩ	$<1,00$	$<1,00$	$<1,00$	-*	-*
	СЩ	$<1,00$	$<1,00$	$<1,00$	-*	-*

*не исследовали

Из трех образцов биоматериала, исследованных методом ОТ-ПЦР и положительных на наличие вируса коронавирусного энтерита собак, выделить изоляты возбудителя в культурах клеток с увеличением инфекционной активности на протяжении пяти последовательных пассажей удалось из двух образцов (№ 1 «Рич» и № 2 «Берта»). У изолята № 3 «Рекс» в течение трех пассажей не

наблюдалось характерного ЦПД ни в одной из испытанных культур клеток, а ИХА показал отрицательный результат на наличие антигена SCoV. Изоляты № 1 и № 2 удалось выделить с использованием трех испытуемых культур клеток: КК ПЩ, КК СЩ и КК СК. В КК ПЩ и КК СЩ характерное ЦПД вируса наблюдалось с первого пассажа у обоих изолятов, в то время как в культурах клеток ПК и СК ЦПД не обнаруживалось. Изолят № 1 «Рич» накапливался в более высоком титре в первично-трипсинизированных и субкультурах клеток гомологичного происхождения: ПЩ и СЩ, в то время как титры инфекционной активности изолята № 2 «Берта» оставались на одном уровне и не зависели от системы культивирования. Высокий титр накопления изолята № 1 «Рич» наблюдался в культурах клеток ПЩ и СЩ, на уровне пятого пассажа его инфекционная активность достигала $5,08 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $4,50 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно.

В КК СК инфекционная активность была ниже. На уровне пятого пассажа титр инфекционной активности изолята № 1 «Рич» составил $3,42 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, изолята № 2 «Берта» - $1,25 \pm 0,00 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. При этом характерного ЦПД в данной культуре клеток для обоих изолятов вируса не наблюдалось.

Изолят № 1 «Рич» накапливался в КК ПК в титре $2,33 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ на уровне первого пассажа, на втором пассаже ИХА показал положительный результат на наличие антигена SCoV, однако, при культивировании вируса в культуре клеток ПЩ характерного ЦПД не наблюдалось. На уровне третьего и четвертого пассажей результат ИХА был отрицательным, поэтому дальнейшее культивирование вируса считали нецелесообразным. Изолят № 2 «Берта» в КК ПК не репродуцировался и в целом показал меньшую по сравнению с изолятом № 1 «Рич» инфекционную активность во всех испытанных культурах клеток. КК ПЩ, СЩ и СК являлись перmissive для обоих изолятов.

Таким образом, выделение коронавирусного энтерита собак возможно в первично-трипсинизированных и субкультурах клеток ПЩ, СЩ, СК. В культурах клеток гомологичного происхождения ПЩ и СЩ характерное ЦПД наблюдалось на уровне первого пассажа у обоих выделенных изолятов, но в КК ПЩ к пятому

пассажу изоляты № 1 «Рич» и № 2 «Берта» накапливались в более высоком титре ($p < 0,05$), чем в КК СЩ, в связи с этим данную культуру можно считать наиболее подходящей для выделения изолятов возбудителя коронавирусного энтерита собак.

По литературным данным, не все изоляты вируса коронавирусного энтерита собак успешно культивируются в КК. Для этой цели используют малодифференцированные клетки эмбриона котенка, гомологичную культуру клеток опухоли собаки или первично-трипсинизированную культуру почки щенка [44, 105, 171, 175]. Первично-трипсинизированные КК близки к исходным тканям доноров по морфофункциональным характеристикам и рецепторам на поверхности клеток-мишеней, что делает их наиболее чувствительной экспериментальной моделью для выделения вируса [38]. В настоящем исследовании первично-трипсинизированные культуры клеток также показали высокую перmissивность для выделения изолятов СCoV, особенно КК ПЩ, что также согласуется с исследованиями других авторов [21, 151].

3.2. Секвенирование и филогенетический анализ выделенных изолятов

Дальнейшие исследования были направлены на генотипирование выделенных изолятов на основе последовательностей S-гена (ген шипа), т.к. данный ген является основным критерием при классификации подтипов и более других подвержен мутациям [137]. За помощь в выполнении данного этапа диссертационной работы автор благодарит д.б.н. Доронина М.И.

На рисунке 5 представлено филогенетическое положение трех выделенных изолятов коронавируса собак среди других известных изолятов и штаммов *Alphacoronavirus suis*, последовательности которых импортированы из базы данных GenBank.

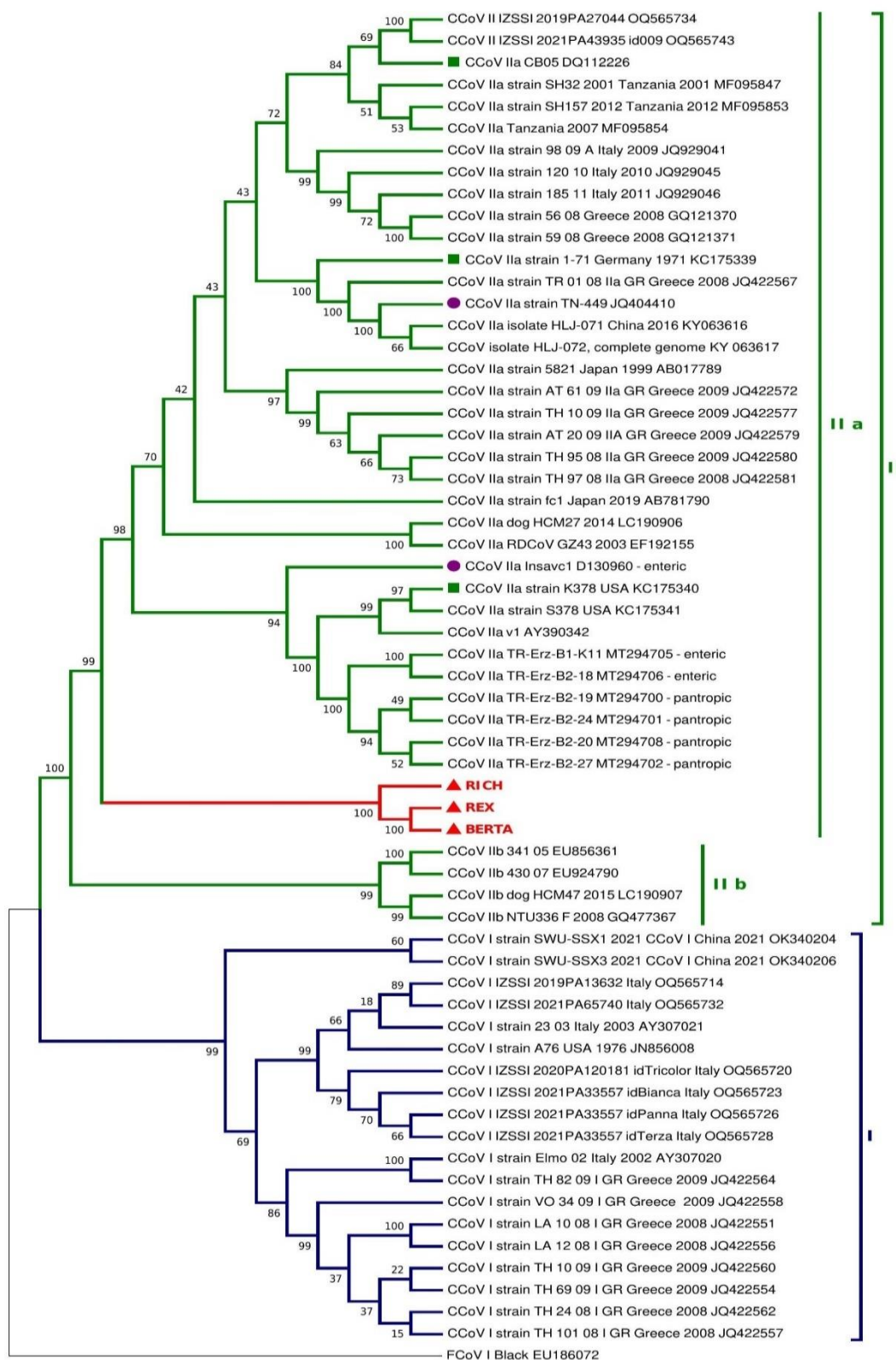


Рисунок 5 – Филогенетическое древо, отражающее родство изолятов «Рекс», «Берта», «Рич» на основе последовательностей S-гена Alphacoronavirus suis, импортированных из базы данных GenBank

Примечание. Штаммы и изоляты CCoV-I (I генотип) – обозначены синим цветом, штаммы и изоляты CCoV-II (II генотип) – обозначены зеленым цветом с разделением на подтипы CCoV-IIa и CCoV-IIb; исследуемые изоляты обозначены красным цветом и значком ▲, вакцинные штаммы -значком ●, референтные штаммы – значком ■

Из данных рисунка 5 видно, что выделенные изоляты принадлежат к генотипу II, подтипу а (ССоV-IIa). В настоящее время все известные, выделенные в КК изоляты, в том числе высоковирулентные, принадлежат к генотипу ССоV-II, т.к. вирусы данного генотипа сравнительно легко культивируются в КК в отличие от ССоV-I, которые выделить в КК не удалось. В связи с этим все доступные в настоящее время вакцины против коронавирусного энтерита собак включают в себя штаммы, относящиеся именно к данному генотипу [56, 101, 155]. Следует также отметить, что частота распространения различных генотипов ССоV в Российской Федерации не исследована, а в публикациях зарубежных авторов эта информация широко варьируется [64, 77, 78, 93, 125, 127, 172]. Перекрестный иммунитет между различными генотипами и подтипами коронавируса собак также недостаточно изучен, однако, его ограниченное наличие, установлено некоторыми авторами [63, 109].

Основываясь на вышеизложенных данных, а также результатах выделения изолятов в первично-трипсинизированных КК, было принято решение дальнейшего изучения двух изолятов коронавируса собак № 1 «Рич» и № 2 «Берта».

3.3. Адаптация выделенных изолятов вируса коронавирусного энтерита собак к перевиваемым культурам клеток различного происхождения

Для производства иммунобиологических препаратов рекомендовано использование перевиваемых линий КК, имеющих очевидные преимущества по сравнению с первичными культурами, одним из которых, в первую очередь, является отсутствие постоянной потребности в донорах органов. В связи с этим дальнейшая работа с выделенными изолятами вируса коронавируса собак была направлена на адаптацию вируса к перевиваемым линиям культур клеток. На основании литературных данных, в опытах по адаптации и изучению перmissивности различных культур клеток к изолятам возбудителя ССоV было испытано семь линий перевиваемых культур клеток, выбранных из имеющихся в коллекции клеточных культур ФГБУ «ВНИИЗЖ»: КК CRFK, КК FS, КК MDCK

(NBL-9), а также такие культуры клеток, как КК Vero-76, КК ВНК-21, КК IB-RS-2 и КК RK-13. Было проведено 10 последовательных пассажей. Вирусосодержащую суспензию, полученную после каждого пассажа, титровали в субкультуре клеток почки щенка (ПЩ) в 96-луночных культуральных планшетах (SPL Lifesciences, Республика Корея). Наличие антигена в культуральной жидкости устанавливали посредством набора для ИХА. Если тест показывал отрицательный результат, то дальнейшее культивирование считалось нецелесообразным. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Пермиссивность различных перевиваемых культур клеток к изолятам ССoV

(n=5, p < 0,05)

Изолят ССoV	Пассаж вируса	Титр вируса и стандартное отклонение, lg ТЦД ₅₀ /см ³						
		CRFK	MDCK NBL-9	FS	Vero-76	RK-13	ВНК-21	IB-RS-2
№ 1 «Рич»	1	3,10±0,14	1,10±0,14	2,55±0,11	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
	2	3,30±0,25	<1,00	2,75±0,18	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
	3	3,55±0,11	<1,00	3,10±0,14	_*	_*	_*	_*
	5	3,85±0,14	_*	3,30±0,11	_*	_*	_*	_*
	10	4,00±0,18	_*	3,25±0,18	_*	_*	_*	_*
№ 2 «Берта»	1	1,00±0,11	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
	2	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
	3	<1,00	_*	_*	_*	_*	_*	_*
	5	_*	_*	_*	_*	_*	_*	_*
	10	_*	_*	_*	_*	_*	_*	_*

*результат ИХА отрицательный, дальнейшее культивирование не проводилось

Из двух выделенных в КК ПЩ изолятов вируса коронавирусного энтерита собак только изолят № 1 «Рич» адаптировался к перевиваемым линиям КК CRFK и FS, активно репродуцировался и накапливался в течение 10 пассажей в титрах от 3,10±0,14 lg ТЦД₅₀/см³ до 4,00±0,18 lg ТЦД₅₀/см³ и от 2,55±0,11 lg ТЦД₅₀/см³ до 3,25±0,18 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. Минимальное накопление изолята № 2 «Берта» отмечалось в КК CRFK на уровне первого пассажа (инфекционная активность определялась на уровне 1,00±0,11 lg ТЦД₅₀/см³). При этом ЦПД в КК появлялось через 72 часа и характеризовалось единичными очагами, без постепенного поражения всего монослоя. При дальнейшем культивировании на

уровне второго и третьего пассажей ЦПД не отмечали, на уровне третьего пассажа ИХА показал отрицательный результат.

В других культурах клеток изолят не репродуцировался, а выявление вируса в первом пассаже связано с переносом исходного вируса при заражении клеточных культур. Начиная с пятого пассажа в клеточной культуре CRFK изолят № 1 «Рич» стабильно накапливался в титре $3,85 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и выше, а при микроскопировании культуры клеток, начиная с первого пассажа, наблюдалось характерное ЦПД (рисунок 6). Оно выражалось в округлении клеток, истончении цитоплазмы отростков клеток, образовании симпластов и постепенной дегенерации монослоя.

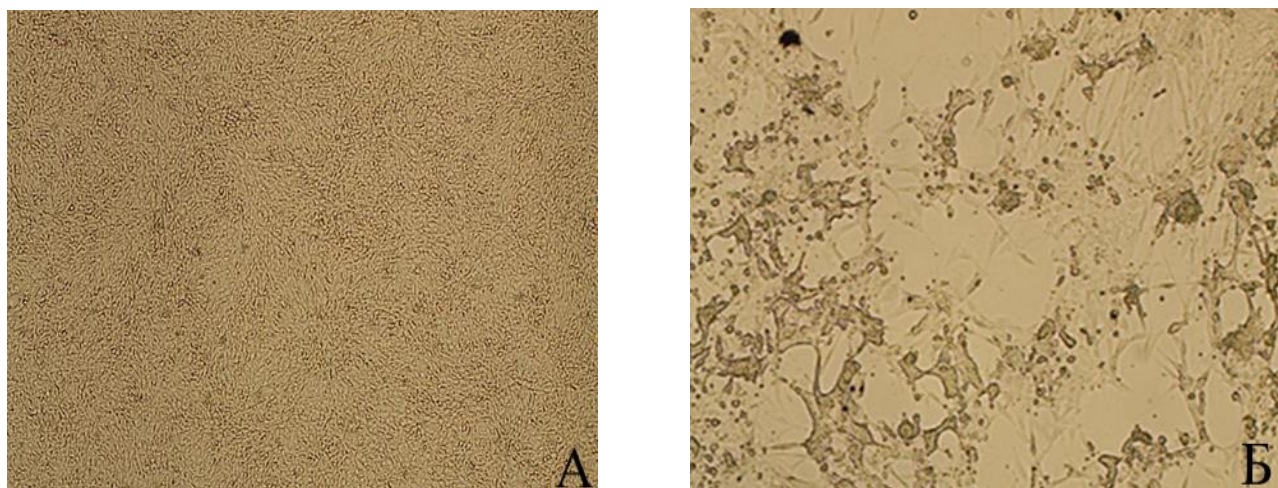


Рисунок 6 – А) Клетки монослоя CRFK без инокуляции SCoV через 72 ч (увеличение $\times 4$); Б) Клетки монослоя CRFK после инфицирования изолятом SCoV через 72ч (увеличение $\times 4$) (фото из личного архива)

В культуре клеток FS на уровне пятого пассажа накопление вируса было значительно меньше – $3,30 \pm 0,11 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, при этом характерного ЦПД при микроскопировании не наблюдали. При культивировании вируса в культуре клеток MDCK отмечалось минимальное накопление вируса в первом пассаже на уровне $1,25 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, однако при дальнейшем культивировании не выявлялось характерного ЦПД, а на уровне третьего пассажа ИХА показал отрицательный результат. В других КК после второго пассажа культивирование изолята № 1 «Рич» SCoV оказалось нецелесообразным, т.к. характерного ЦПД не отмечали, а ИХА показал отсутствие антигена вируса коронавирусного энтерита собак.

Таким образом, по результатам проведенных исследований изолят № 2 «Берта» не удалось адаптировать к перевиваемым культурам клеток, и было принято решение использовать в дальнейшей работе изолят № 1 «Рич». Наиболее перmissive для данного изолята являлись перевиваемые КК CRFK и FS. В них отмечалось достаточно высокое накопление вируса, в то время как первично-трипсинизированные культуры клеток, несмотря на высокий уровень накопления, являются неудобными для производства из-за постоянной потребности в донорах тканей. Высокую перmissive гетерологичной КК CRFK к различным штаммам SCoV отмечали другие авторы [21, 86, 120, 174]. В настоящем исследовании КК CRFK являлась более перспективной для дальнейшего производственного культивирования коронавируса собак, так как титр вируса в данной клеточной системе был достоверно выше, чем в КК FS ($p < 0,05$), а регистрация ЦПД с первого пассажа позволила в дальнейшем использовать КК CRFK для титрования SCoV. Но в связи с тем, что в научной литературе отсутствуют сведения об использовании КК FS для культивирования коронавируса собак, ее дальнейшее изучение может быть интересным для расширения знаний о спектре перmissive по отношению к SCoV перевиваемых культур клеток.

3.4. Определение оптимальных параметров культивирования в культуре клеток FS и культуре клеток CRFK для максимального накопления вируса коронавируса энтерита собак

Следующим этапом работы являлось проведение ряда опытов для получения вирусосодержащего материала (ВСМ) с наиболее высоким титром и выбора оптимальных параметров культивирования, для которого использовали изолят «Рич» и перевиваемые культуры клеток CRFK и FS.

Исследованными параметрами были: множественность заражения (MOI), метод заражения, срок предварительного контакта (адсорбции) вируса с культурой клеток и влияние некоторых компонентов среды на накопление изолята «Рич» вируса коронавируса энтерита собак.

Так как изолят «Рич» SCoV не вызывал в КК FS характерного ЦПД, следовательно, накопление вируса не коррелировало со степенью деструкции монослоя, поэтому изучали зависимость накопления вируса от срока культивирования в данной культуре клеток. Для изучения динамики накопления коронавируса собак в зависимости от времени культивирования в культуре клеток FS изолят «Рич» SCoV культивировали в течение 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч и 120 ч. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Динамика накопления изолята «Рич» SCoV в зависимости от времени культивирования в перевиваемой культуре клеток FS
(n=5, p < 0,05)

Культура клеток	Титр вируса и стандартное отклонение, lg ТЦД ₅₀ /см ³				
	Время культивирования, ч				
	24	48	72	96	120
FS	1,95±0,21	2,60±0,22	3,25±0,18	2,65±0,14	2,55±0,11

Анализ полученных результатов показал, что культивирование изолята «Рич» SCoV в течение 24 ч и 48 ч являлось недостаточным для его максимального накопления, титр вируса через 24 ч был самым низким, однако, с течением времени вирус накапливался, и при культивировании в течение 48 ч титр увеличился. Наиболее оптимальным было культивировать вирус 72 ч. Титр изолята «Рич» SCoV при этом был самым высоким и находился на уровне 3,25±0,18 lg ТЦД₅₀/см³. При дальнейшем увеличении времени культивирования вируса титр снижался и составил при инкубировании в течение 96 ч – 2,65±0,14 lg ТЦД₅₀/см³, 120 ч – 2,55±0,11 lg ТЦД₅₀/см³. Значения титров вируса, полученные при культивировании в течение 96 ч и 120 ч, статистически не различались (p > 0,05).

Важным критерием для успешной репродукции вируса является выбор множественности заражения (MOI), который подбирается индивидуально для каждого вируса. Для изучения влияния MOI на инфекционную активность изолята «Рич» SCoV применяли дозы заражения 0,0001; 0,001; 0,01 и 0,1 ТЦД₅₀/кл. Исследования проводили с использованием двух перевиваемых культур клеток CRFK и FS. Инкубацию вируса в культуре клеток CRFK прекращали при

разрушении 80 % монослоя и отслоении клеток от стекла. Инкубация вируса в культуре клеток FS продолжалась в течение 72 ч, так как более ранние опыты показали, что данное время является оптимальным для максимального накопления изолята «Рич» CCoV в культуре клеток FS. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Определение влияния множественности заражения на инфекционную активность изолята «Рич» CCoV

(n=5, p < 0,05)

Культура клеток	MOI, ТЦД ₅₀ /кл	Время культивирования вируса, ч	Титр вируса и стандартное отклонение, lg ТЦД ₅₀ /см ³
CRFK	0,1	48	3,15±0,13
	0,01	72	3,70±0,21
	0,001	96	1,45±0,11
	0,0001	96	1,10±0,14
FS	0,1	72	3,30±0,21
	0,01	72	3,10±0,13
	0,001	72	2,80±0,08
	0,0001	72	2,05±0,11

Установлено, что инфекционная активность изолята «Рич» CCoV в культуре клеток CRFK при множественности заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл составила $3,70 \pm 0,21$ lg ТЦД₅₀/см³, что являлось статистически самым высоким значением. При более низких дозах заражения (0,0001 и 0,001 ТЦД₅₀/кл) инфекционная активность изолята существенно уменьшалась и составила $1,08 \pm 0,14$ lg ТЦД₅₀/см³ и $1,50 \pm 0,25$ lg ТЦД₅₀/см³ соответственно, а время, требовавшееся для разрушения 80% монослоя, увеличивалось до 96 ч. При более высокой множественности заражения (0,1 ТЦД₅₀/кл) наблюдалось более быстрое проявление ЦПД и разрушение 80% монослоя клеток, однако, накопление вируса было ниже и находилось на уровне $3,15 \pm 0,13$ lg ТЦД₅₀/см³, что связано, вероятно, со слишком быстрым разрушением монослоя, в результате чего вирус не успевал накопиться в максимальной концентрации. Таким образом, оптимальная множественность заражения культуры клеток CRFK изолятом «Рич» CCoV равна 0,01 ТЦД₅₀/кл.

Инфекционная активность изолята «Рич» ССоV в культуре клеток FS при множественности заражения 0,1 и 0,01 ТЦД₅₀/кл составила $3,30 \pm 0,21 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $3,10 \pm 0,13 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно. При более низких дозах заражения (0,0001 и 0,001 ТЦД₅₀/кл) инфекционная активность изолята уменьшалась и составляла $2,05 \pm 0,11 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $2,80 \pm 0,08 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно. Значения титров вируса при множественности заражения 0,1 и 0,01 статистически не отличались, но целесообразно проводить заражение культуры клеток FS дозой 0,01 ТЦД₅₀/кл, т.к. снижается количество израсходованного на заражение материала.

Несмотря на то, что ССоV может репродуцироваться в делящихся клетках, лучше он репродуцируется в клетках, находящихся в стационарной фазе роста [174]. 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. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Влияние метода заражения на инфекционную активность изолята «Рич» ССоV в перевиваемых культурах клеток
(n=5, p < 0,05)

Метод заражения	МОI, ТЦД ₅₀ /кл	Время культивирования вируса, ч	Культура клеток	Титр вируса и стандартное отклонение, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$
Монослой	0,01	72	CRFK	3,60±0,14
Суспензия	0,01	48		3,10±0,14
Монослой	0,1	72	FS	3,30±0,11
Суспензия	0,1	72		2,75±0,00

Из результатов, представленных в таблице 6, видно, что титр вируса был максимальным при заражении на клеточный монослой (p < 0,05). В культурах клеток CRFK и FS он составил $3,60 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $3,30 \pm 0,11 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. При заражении суспензии клеток CRFK и FS инфекционная активность изолята «Рич» ССоV был ниже указанных показателей, титр

определялся на уровне $3,10 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $2,75 \pm 0,00 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно.

Также в настоящем исследовании было изучено влияние на динамику накопления изолята «Рич» ССоV такого фактора как время предварительного контакта (адсорбции) вируса с монослоем перевиваемой культуры клеток CRFK. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Влияние времени предварительного контакта (адсорбции) на динамику накопления изолята «Рич» ССоV в культуре клеток CRFK
(n=3, p < 0,05)

Показатели	Время адсорбции, мин.			
	Без контакта (адсорбции)	30	60	90
МОI, $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$	0,01			
Титр вируса и стандартное отклонение, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	$2,42 \pm 0,14$	$3,17 \pm 0,14$	$3,33 \pm 0,14$	$3,25 \pm 0,25$

Как видно из таблицы 7, культивирование изолята ССоV без предварительного контакта (адсорбции) с монослоем культуры клеток CRFK сопровождалось низким накоплением вируса, титр вируса находился на уровне $2,42 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. С увеличением времени предварительного контакта (адсорбции) вируса с клеточным монослоем титр изолята ССоV постепенно увеличивался с $3,08 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ при адсорбции в течение 30 мин. и до $3,33 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ при адсорбции в течение 60 мин. В дальнейшем, при увеличении времени адсорбции до 90 мин., титр вируса значительно не менялся и определялся на уровне $3,25 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (p > 0,05). Таким образом, оптимальным временем контакта (адсорбции) вируса с монослоем клеток можно считать время 30-90 минут.

Как известно, добавление в питательную среду некоторых компонентов может существенно увеличивать накопление вируса. Одним из необходимых компонентов для синтеза вирусных белков является глютамин, поэтому

обогащение им питательной среды способствует ускорению репродукции вируса [23]. Другим компонентом был выбран трипсин, т.к. положительный эффект от добавления в среду для культивирования вирусов семейства Coronaviridae трипсина отмечали разные исследователи [9, 22, 162]. Данное явление связано с протеолитической активацией S-белка, ответственного за проникновение вируса в клетку.

Результаты изучения влияния обогащения поддерживающей питательной среды трипсином и глютамином в различных концентрациях на накопление изолята «Рич» SCoV при культивировании в КК CRFK представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Влияние обогащения поддерживающей питательной среды глютамином и трипсином на накопление изолята «Рич» SCoV
(n=3, p < 0,05)

Компонент среды	Концентрация в среде	Титр вируса и стандартное отклонение, lg ТЦД ₅₀ /см ³
Трипсин	5 мкг/мл	4,25±0,00
	10 мкг/мл	4,92±0,14
	20 мкг/мл	1,67±0,14
	Без трипсина	3,58±0,14
Глютамин	0,5%	3,42±0,14
	1%	3,92±0,14
	2%	4,00±0,00
	3%	3,50±0,25
	Без глютамина	3,50±0,00

Установлено, что добавление в поддерживающую питательную среду трипсина привело к увеличению титра инфекционной активности вируса. При концентрации трипсина 5 мкг/мл титр вируса значительно возрастал и определялся на уровне 4,25±0,00 lg ТЦД₅₀/см³. Максимальный титр удалось получить при концентрации трипсина в среде 10 мкг/мл (p < 0,05). Также при добавлении в среду трипсина в концентрации 5 мкг/мл и 10 мкг/мл отмечалось более раннее проявление ЦПД изолята «Рич» SCoV. Первые признаки характерного ЦПД регистрировались уже через 18 ч культивирования, что на 6-12 ч раньше, чем при культивировании без трипсина. В то же время установлено, что при концентрации трипсина 20 мкг/мл титр инфекционной активности значительно снижался по

причине деструктивного воздействия трипсина на клетки монослоя ($p < 0,05$). Обогащение питательной среды глутамином также оказывало положительный эффект на накопление вируса. Согласно данным таблицы 7, присутствие в среде глутамин с концентрацией 0,5% не оказывало существенного влияния на накопление изолята «Рич» CCoV, в то же время, увеличение концентрации до 1-2% приводило к увеличению инфекционной активности на $0,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$. Дальнейшее увеличение концентрации глутамин в среде оказывало обратный эффект и приводило к снижению накопления вируса. Также отмечалось влияние глутамин на скорость проявления ЦПД в культуре клеток CRFK. При обогащении питательной среды глутамином даже в низкой концентрации 0,5% проявление ЦПД наблюдалось в среднем на 6-10 ч раньше, чем во флаконе с контрольной культурой клеток.

Таким образом, в результате опытов по изучению оптимальных условий культивирования коронавируса собак был получен вирусный материал с максимальным титром $4,92 \pm 0,14 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$. Максимальное накопление вируса происходило при инфицировании клеточных линий дозой заражения 0,01 $\text{TCID}_{50}/\text{кл}$. В отношении КК CRFK, где CCoV культивируется с проявлением характерного ЦПД, избыточное количество инокулируемого вируса приводит к ранней деструкции клеток, в результате чего вирус не успевает накапливаться, а меньшая доза напротив, приводит к тому, что оказывается заражено недостаточное число клеток, в следствие чего увеличивается время репродукции. Несмотря на то, что в КК FS ЦПД не регистрировалось, слишком большая доза заражения также может обладать эффектом цитотоксичности. Подобный эффект описан в работах некоторых авторов, например, Морозова А.Н. с соавторами [23].

Известно, что большинство перmissive клеток инфицируется в период контакта вируса с клеточным монослоем. В настоящем исследовании также установили, что контакт (адсорбция) вируса с монослоем культур клеток в течение 30-90 мин. способствует большему накоплению вируса, в то время как при отсутствии контакта (адсорбции) титр вируса был достоверно ниже при аналогичных условиях культивирования.

ВСМ с более высоким титром удалось получить при инокуляции вируса на конфлюэнтный клеточный монослой в случае с обеими КК, что согласуется с данными других авторов [174].

Культивирование изолята вируса коронавирусного энтерита в культуре клеток FS в течение 72 ч позволяет получить вирус с максимальной инфекционной активностью в данной КК.

Также исследование показало, что обогащение питательной среды глютамином ускоряет проявление ЦПД вируса и позволяет получить материал с более высоким титром. Оптимальной концентрацией в питательной среде для культивирования CCoV являлась концентрация 1-2%, в то время как концентрации 0,5% и 3% не влияют на титр вируса. Превышение концентрации 3% могут негативно сказываться на метаболизме клеток в связи с цитотоксичностью ионов аммония, образующихся при катаболизме глютамина [23].

В настоящем исследовании концентрация трипсина 10 мкг/мл среды являлась оптимальной и позволяла получить вирус с максимальной инфекционной активностью. Большая концентрация трипсина в питательной среде вызывала деструкцию монослоя КК и, как следствие, быстрое завершение процесса репродукции CCoV и низкое накопление вируса.

Полученный материал в дальнейшем был использован для серии опытов по изучению антигенных свойств CCoV.

3.5. Депонирование штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак

По результатам изучения основных биологических свойств изолята «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак были проведены процедуры его депонирования и паспортизации. Изолят «Рич» CCoV депонирован во Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ» под регистрационным номером 376 - деп / 22-10 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ». Новый штамм вируса коронавирусного энтерита собак получил авторское название «Рич».

Комиссионные испытания провели на базе лаборатории профилактики ящура, лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных, испытательной лаборатории ветеринарных препаратов (ИЛВ) и Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ» (ГКШМ). Для исследования с целью первичного депонирования использован образец исходного посевного коллекционного материала производственно-контрольного штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак.

Испытания проводили по показателям качества в соответствии с СТО 00495527-0410-2021 «Штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак производственный и контрольный. Методы изготовления и контроля посевных материалов».

Посевные материалы штамма «Рич» проверяли по следующим показателям:

- внешний вид;
- наличие вакуума во флаконах;
- растворимость;
- массовая доля влаги;
- контаминация бактериальной и грибковой микрофлорой (в т.ч. микоплазмами);
- контаминация посторонними вирусами (чумы плотоядных, парвовирусного энтерита, аденовирусной инфекции собак);
- генетическая идентификация;
- инфекционная активность по результатам титрования в КК CRFK.

По результатам испытаний посевные материалы штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак соответствовали показателям СТО 00495527-0410-2021 и были пригодны для изготовления и контроля иммунобиологических препаратов.

3.6. Изучение патогенности и антигенной активности штамма «Рич» на лабораторных животных

С целью изучения патогенности для лабораторных животных, а также оценки антигенных свойств культуральную суспензию штамма «Рич» ССоV вводили различными способами подопытным животным. Вирусосодержащий материал (ВСМ) предварительно центрифугировали при 4000 g 30 мин. для осаждения клеточного детрита. Инфекционная активность вируса, определенная титрованием микрометодом в КК CRFK, составила $4,0 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

В исследовании использовали кроликов (лат. *Oryctolagus cuniculus*) массой 2,5–3 кг, хорьков (лат. *Mustela putorius furo*) весом 1,5 кг и морских свинок (лат. *Cavia porcellus*) весом 400–500 г. Эксперименты на животных проводились в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», а также с соблюдением рекомендаций Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. №33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». Из животных сформировали экспериментальные и контрольные группы. Животным экспериментальных групп вводили различными способами ВСМ, а животным контрольных групп теми же способами в том же объеме 0,9% физиологический раствор. Данные по экспериментальным группам представлены в таблице 9.

В течение 35 суток после введения ВСМ проводили наблюдение за подопытными животными. Ежедневно учитывали температуру тела, потребление корма, состояние слизистых, активность, частоту дефекации.

Таблица 9 – Изучение патогенности штамма «Рич» ССоV для лабораторных животных

Вид животных	№ группы	Количество голов в группе	Объем ВСМ, см ³	Способ введения ВСМ
Кролик	1	4	1	внутримышечно
	2	4	1	интраперитонеально
	3	8	-	контроль
Хорек	1	5	1	подкожно
	2	5	1	внутримышечно
	3	10	-	контроль
Морская свинка	1	10	1	подкожно
	2	10	1	интраперитонеально
	3	20	-	контроль

Также определяли титр вируснейтрализующих антител (ВНА) к штамму «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак в сыворотках крови до введения ВСМ и после на 14, 21, 28 и 35 сутки в РН. Результаты серологических исследований сывороток кроликов представлены на рисунке 7.

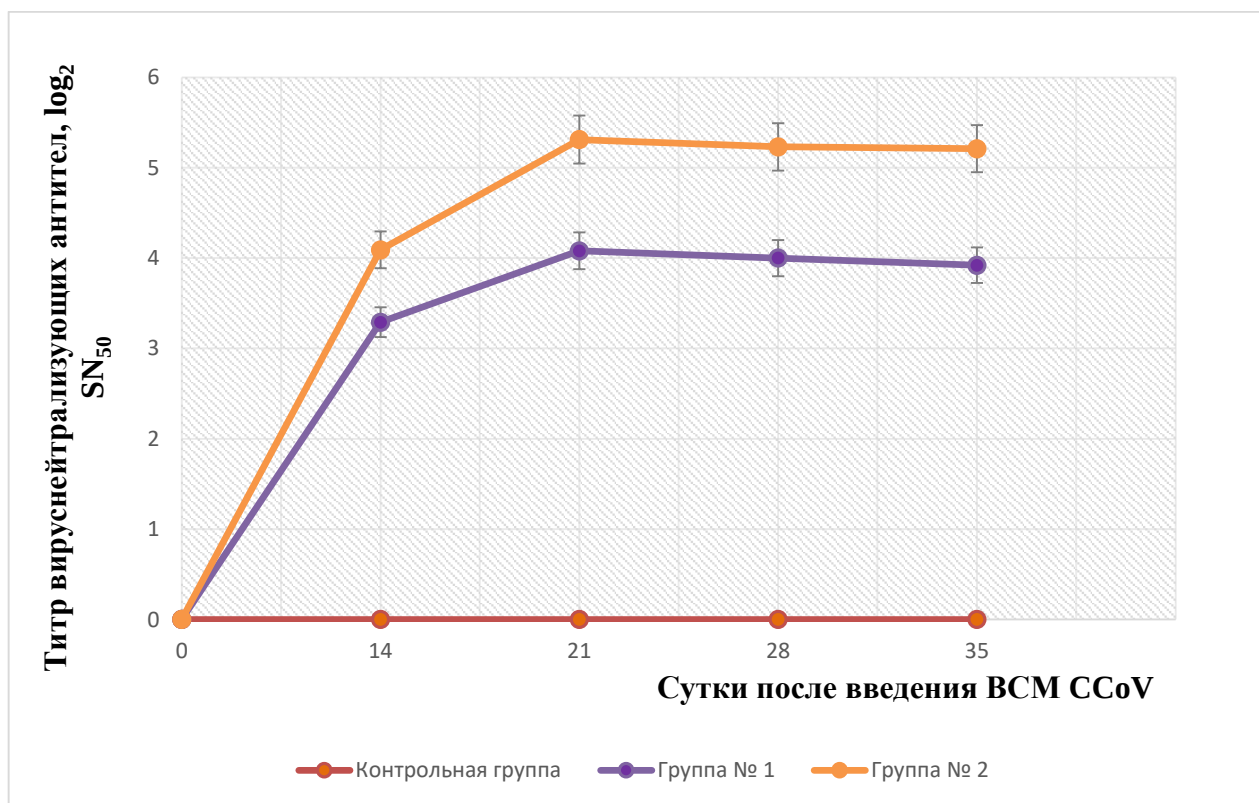


Рисунок 7 – Динамика накопления вируснейтрализующих антител в сыворотках крови кроликов

До введения ВСМ все кролики были серонегативны к штамму «Рич» ССoV. Через 14 суток после иммунизации значения титра ВНА в группах № 1 и № 2 достоверно возрастало ($p < 0,05$) и определялось на уровне $3,29 \pm 0,52 \log_2 \text{SN}_{50}$ и $4,09 \pm 0,15 \log_2 \text{SN}_{50}$ соответственно. Максимального значения титры ВНА в экспериментальных группах после иммунизации достигали на 21 сутки, а уровень антител, определенный на 28 и 35 сутки, статистически от них не отличались, что свидетельствует о фазе стабилизации антителогенеза после 21 суток. Следует отметить, что при интраперитонеальном способе введения ВСМ уровень ВНА был выше, чем при внутримышечном ($p < 0,05$). В контрольной группе в течение всего исследования ВНА в сыворотках крови животных не выявлялись.

Результаты РМН (эксперимент с хорьками) представлены на рисунке 8.

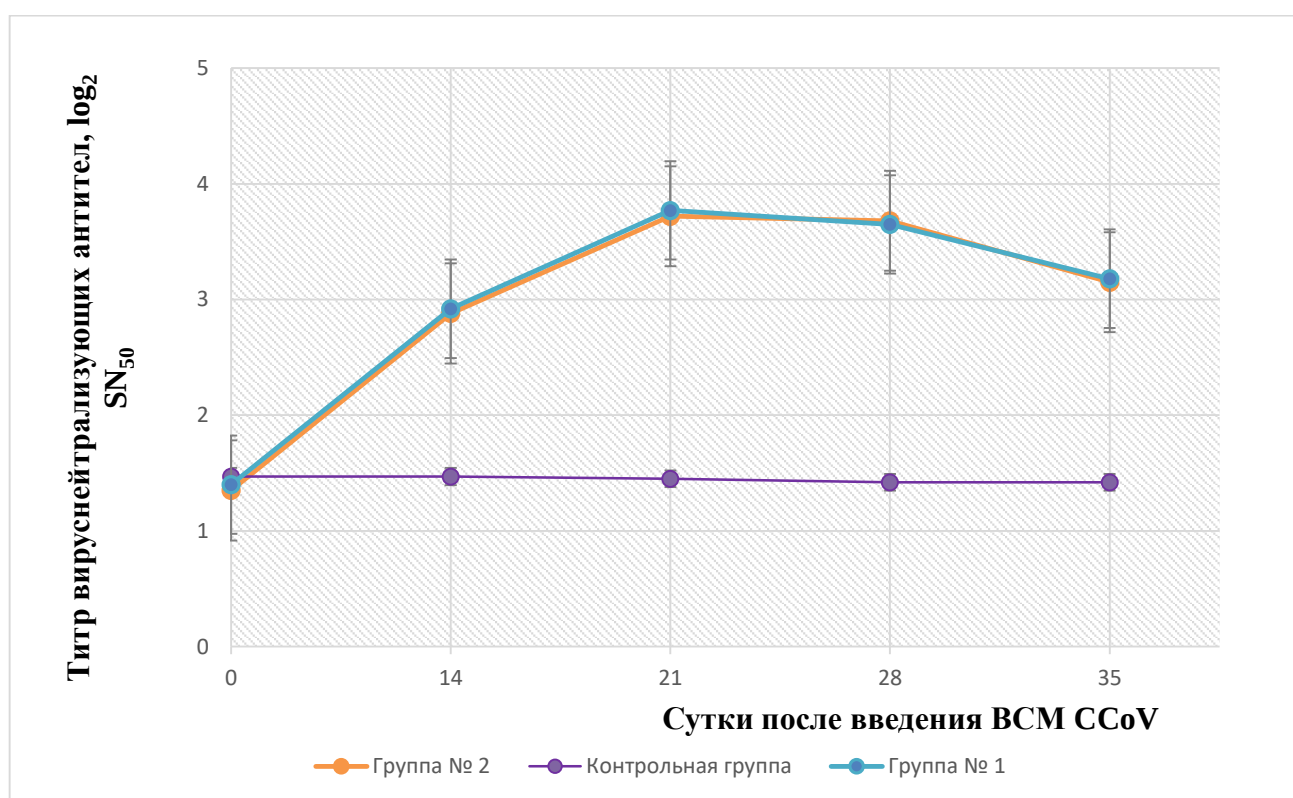


Рисунок 8 – Динамика накопления вируснейтрализующих антител в сыворотках крови хорьков

У подопытных хорьков (включая контрольную группу) до иммунизации обнаруживались ВНА к ССoV на уровне не более $1,5 \log_2 \text{SN}_{50}$. На 14 сутки наблюдался прирост ВНА в обеих группах. Максимальные значения титров антител регистрировали на 21 сутки после иммунизации в среднем по группе

$3,77 \pm 0,63 \log_2 \text{SN}_{50}$ и $3,72 \pm 0,35 \log_2 \text{SN}_{50}$ в группах № 1 и № 2 соответственно. Значения титров ВНА на 28 сутки после иммунизации существенно не отличались от значений предыдущего определения ($p > 0,05$). Через 35 суток после иммунизации титр ВНА снижался, однако, статистически различия не являлись значимыми ($p > 0,05$). Достоверных различий в уровне ВНА в зависимости от способа введения вирусосодержащего материала (внутримышечно или подкожно) не обнаружено. Прироста титра ВНА в контрольной группе не отмечали.

Результаты изучения антигенных свойств штамма «Рич» в экспериментах на морских свинках представлены на рисунке 9.

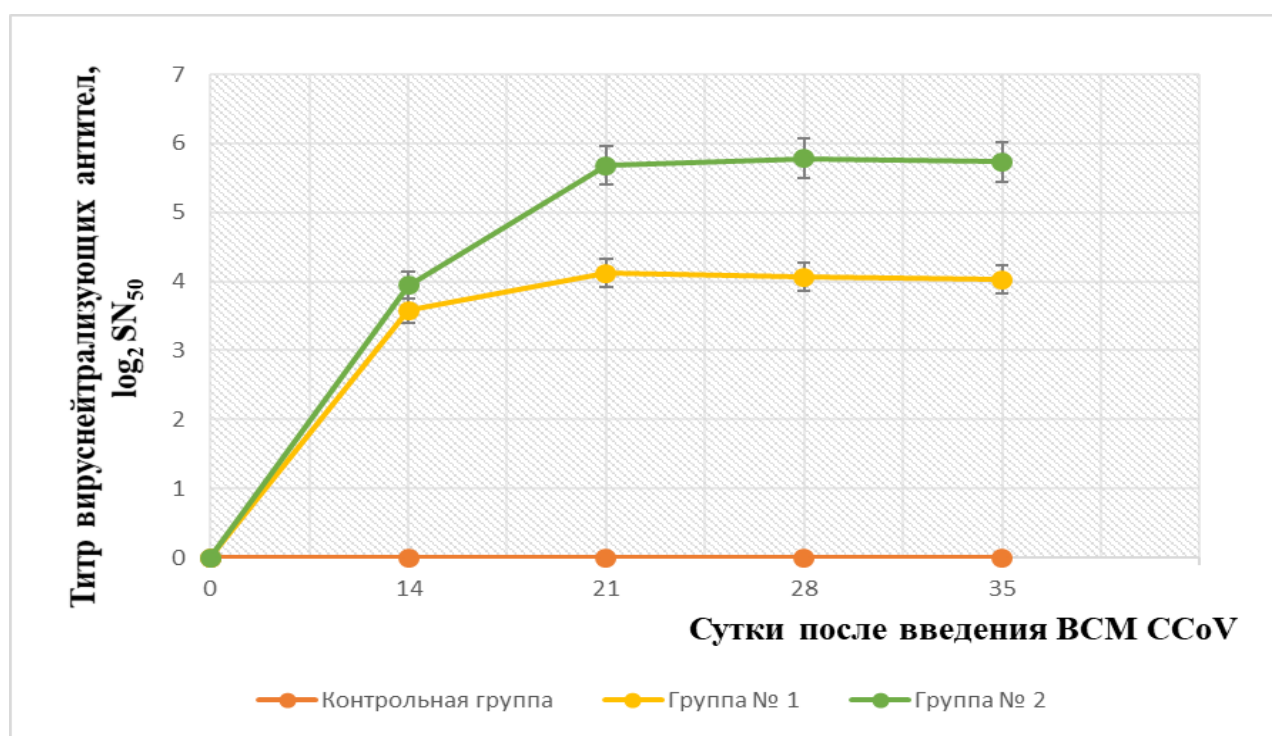


Рисунок 9 – Динамика накопления вируснейтрализующих антител в сыворотках крови морских свинок

По данным РН было установлено, что до иммунизации все морские свинки экспериментальных и контрольной групп были серонегативны к ССoV. После введения вирусного материала морским свинкам экспериментальной группы, на 14-е сутки наблюдался значительный прирост титра ВНА более чем на $3,0 \log_2 \text{SN}_{50}$ в обеих экспериментальных группах. Увеличение титра ВНА было отмечено также на 21-е сутки и достигало максимальных значений. На 28 и 35 сутки после введения

ВСМ титр ВНА оставался на прежнем уровне в группах № 1 и № 2, что свидетельствует о выходе уровня антител на плато после 21 суток ($p < 0,05$). Животные контрольной группы оставались отрицательны на наличие антител к ССоV в течение всего опыта.

В течение периода наблюдения не отмечалось разницы в физиологических показателях между животными экспериментальных и контрольных групп, клинических признаков заболевания не регистрировалось. При аутопсии животных контрольных и экспериментальных групп патологоанатомическая картина не отличалась.

В результате проведенных исследований по изучению антигенных свойств вируса коронавирусного энтерита собак на трех видах лабораторных животных: кроликах, хорьках и морских свинках было установлено, что при подкожном, внутримышечном и интраперитонеальном введении штамм «Рич» ССоV является апатогенным для лабораторных животных и вызывает выработку ВНА, определяемых в РН, через 14 суток после иммунизации. Максимального уровня титр ВНА достигал на 21-е сутки после иммунизации, через 28-35 суток после иммунизации титр ВНА оставался на прежнем уровне. Полученные в ходе опыта на морских свинках результаты согласуются с более ранними исследованиями Ольшанской А.А., а некоторую разницу в данных при изучении антигенных свойств ССоV на кроликах можно объяснить схемой проведения опыта, отличающейся от настоящей [16]. В то же время результаты исследования по изучению антигенных свойств вируса на хорьках не нашли отражения в публикациях других авторов.

Таким образом, полученные результаты исследований показывают, что штамм «Рич» ССоV обладает выраженной антигенной активностью и не вызывает общей или местной патологической ответной реакции организма при подкожном, внутримышечном и интраперитонеальном введении указанным видам лабораторных животных.

3.7. Инактивация вируса коронавирусного энтерита собак

В технологии изготовления инаktivированных вакцин применяется большое количество разнообразных инаktivантов химической природы в виду их экономичности, надежности и удобства использования. По данным научной литературы, предложены различные способы химической инаktivации вируса коронавирусного энтерита собак. Наиболее ранним методом в отечественной практике являлась инаktivация вирусного сырья для производства вакцины против коронавирусного энтерита формальдегидом, однако, в сообщении не указаны концентрация и время экспозиции [25]. Формальдегид широко применяется в качестве инаktivанта при производстве вакцин, однако, в настоящем исследовании формальдегид не рассматривался в качестве инаktivанта, так как он обладает рядом существенных недостатков, в первую очередь токсичностью, потенциальной канцерогенностью и разрушительным влиянием на структуру вирусного белка, что значительно снижает его антигенную активность. В последнее время широко используются в производстве вещества группы азиридинов, в частности 1-(2-аминоэтил)-азиридин (аминоэтилэтиленимин, АЭЭИ) и бета-пропиолактон (БПЛ), относящийся к группе лактонов. Оба вещества соответствуют важному критерию для выбора наиболее подходящего инаktivанта: при полной утрате способности реплицироваться вирус максимально сохраняет свою антигенную активность.

В настоящем исследовании были проведены опыты по изучению воздействия АЭЭИ и БПЛ на инфекционную активность штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак. Воздействие АЭЭИ изучали в двух температурных режимах: при $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ и $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Для проведения опытов был использован культуральный вирусный материал с титром $4,92\pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Действие 1-(2-аминоэтил)-азиридина (АЭЭИ) с рН 7,2-7,6 испытывали в конечных концентрациях 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,15% и 0,2% в течение 48 ч при периодическом помешивании. Образцы суспензии с различными концентрациями АЭЭИ и при температурном режиме $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ отбирали через 4 ч, 8 ч, 16 ч, 24 ч и 48 ч, а при температурном

режиме $37\pm 1^\circ\text{C}$ дополнительно отбирали образцы через 18 ч и 20 ч инаktivации. Остаточное действие АЭЭИ нейтрализовали 25%-рабочим раствором тиосульфата натрия и титровали в 96-луночных планшетах с КК CRFK. Полноту инаktivации вируса проверяли методом проведения трех последовательных пассажей в чувствительной КК CRFK.

По данным литературы, антигенные свойства вируса лучше сохраняются, когда процесс инаktivации осуществляется при температурах ниже $37\pm 1^\circ\text{C}$, в связи с этим воздействие БПЛ на инфекционную активность штамма «Рич» SCoV изучали в следующих температурных режимах: при $22\pm 1^\circ\text{C}$ и $6\pm 2^\circ\text{C}$. В культуральный вирусный материал (титр вируса до инаktivации определялся на уровне $4,92\pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) добавляли БПЛ до конечных концентраций 0,01%, 0,02% и 0,05% и инаktivировали в течение 5 ч при температурах $22\pm 1^\circ\text{C}$ и $6\pm 2^\circ\text{C}$ соответственно, периодически помешивая. Образцы суспензии с различными концентрациями БПЛ отбирали каждый час и титровали в 96-луночных планшетах с КК CRFK. Полноту инаktivации вируса проверяли методом проведения трех последовательных пассажей в чувствительной КК CRFK.

Результаты опытов по инаktivации коронавируса собак с использованием АЭЭИ при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ представлены на рисунке 10.

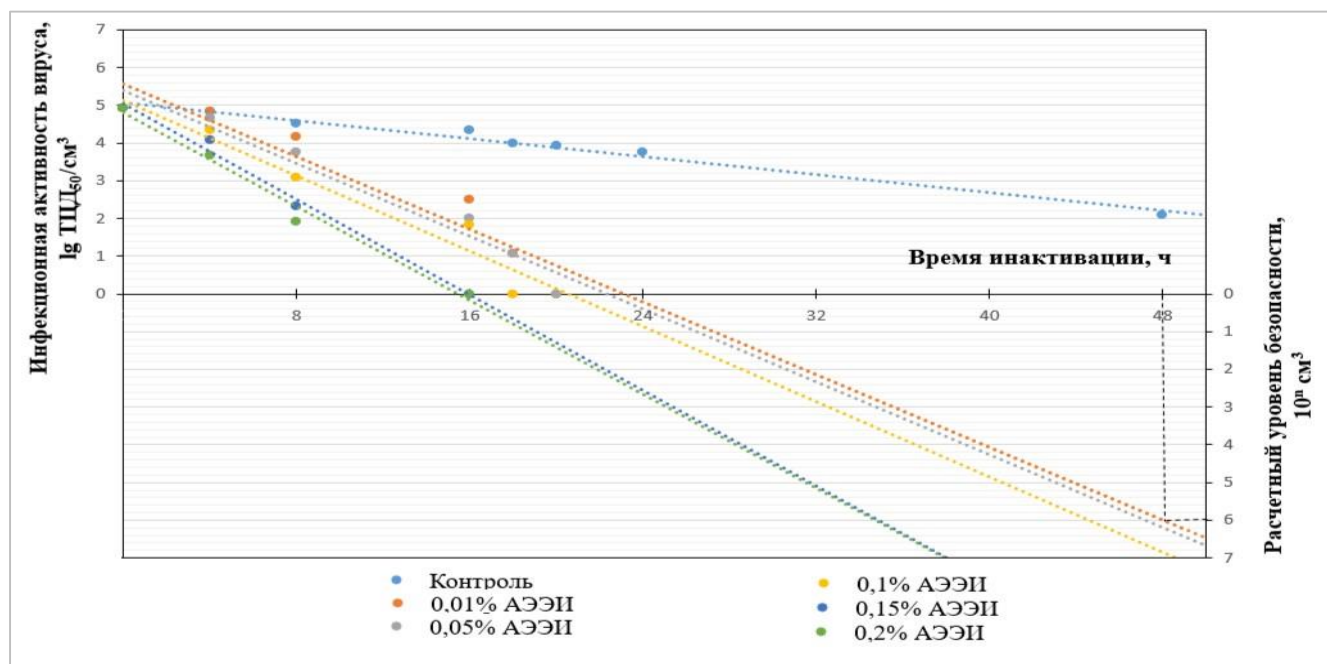


Рисунок 10 – Динамика процесса инаktivации штамма «Рич» вируса коронавирального энтерита собак АЭЭИ при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$

В опытах с применением АЭЭИ при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ достоверное снижение титра вируса через 4 ч отмечалось при концентрациях АЭЭИ 0,1%, 0,15% и 0,2 %, а через 8 ч титр достоверно снижался при всех испытанных концентрациях инактиванта ($p < 0,05$). Снижение титра вируса до $10^0 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$ (1TЦД_{50} в 1 см^3) происходила через 16 ч при концентрациях АЭЭИ 0,2% и 0,15%, через 18 ч при концентрации АЭЭИ 0,1% и через 20 ч при концентрациях АЭЭИ 0,05% и 0,01%. Проведенный регрессионный анализ показал, что при инаktivации в течение 48 ч уровень специфической безопасности будет равен 10^6 см^3 при минимальной концентрации АЭЭИ 0,01%. В контрольных образцах также было зарегистрировано постепенное снижение титра ССоV, к концу срока наблюдения (48 ч) титр ВСМ определялся на уровне $2,08\pm 0,14 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$, что связано с низкой устойчивостью вируса к высоким температурам и его термоинаktivацией [138].

При температуре $22\pm 1^\circ\text{C}$ (рисунок 11) инаktivация ССоV АЭЭИ значительно замедлялась.

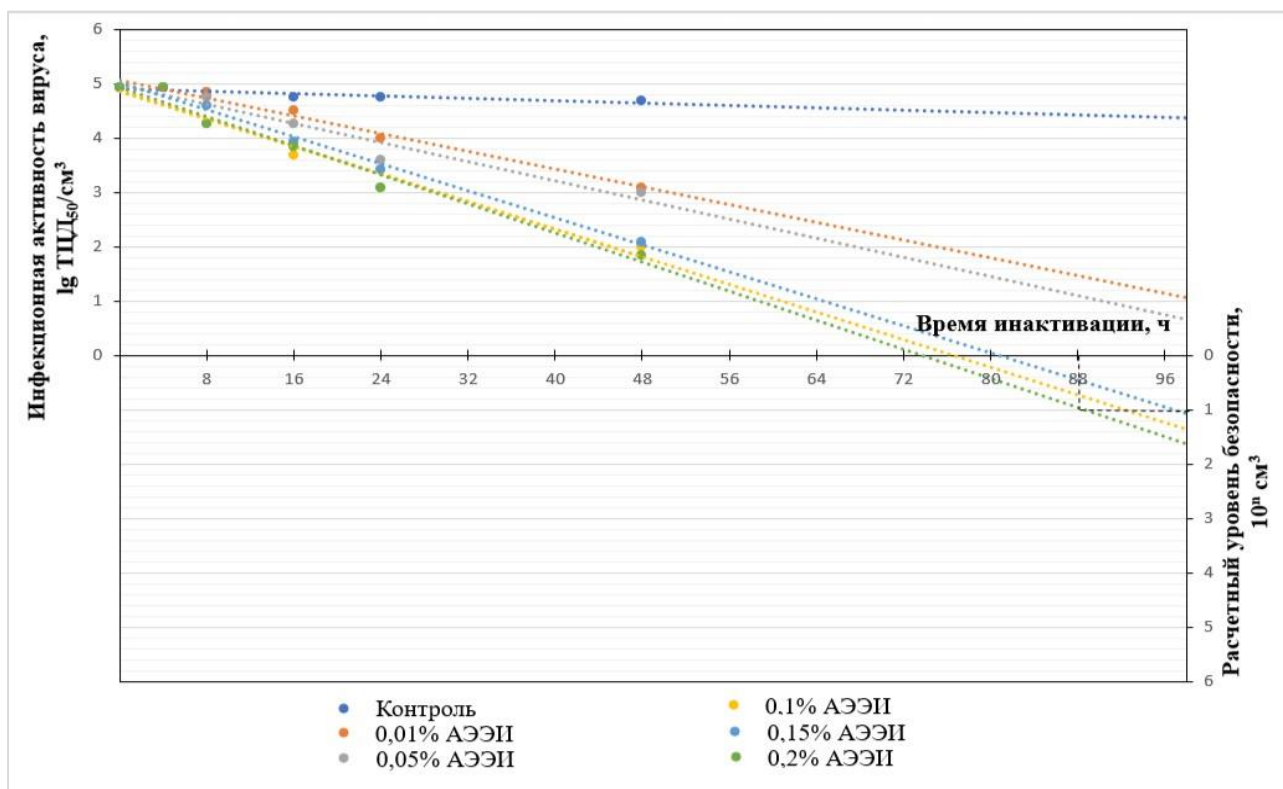


Рисунок 11 – Динамика процесса инаktivации штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак АЭЭИ при температуре $22\pm 1^\circ\text{C}$

Достоверное снижение титра вируса отмечалось через 8 ч при высоких концентрациях АЭЭИ: 0,15% и 0,2%, а через 16 ч при концентрациях 0,05% и выше ($p < 0,05$). Однако, независимо от концентрации инактиванта, инфекционная активность вируса сохранялась в течение 48 ч, и при воздействии АЭЭИ в максимальной концентрации 0,2% определялась на уровне $1,83 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Регрессионный анализ показал, что снижение титра вируса до $10^0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (1ТЦД_{50} в 1 см^3) произойдет не ранее 73 ч при максимальной конечной концентрации АЭЭИ 0,2%, а уровень специфической безопасности 10 см^3 будет достигнут через 88 ч. Достоверного снижения титра вируса в контрольном образце не регистрировалось ($p > 0,05$).

Исследования с применением БПЛ в качестве инактиванта показали, что для утраты вирусом инфекционной активности требуется значительно меньше времени, чем при использовании АЭЭИ. Результаты опытов по инаktivации коронавируса собак с использованием БПЛ при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$ и при температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$ представлены на рисунках 12 и 13.

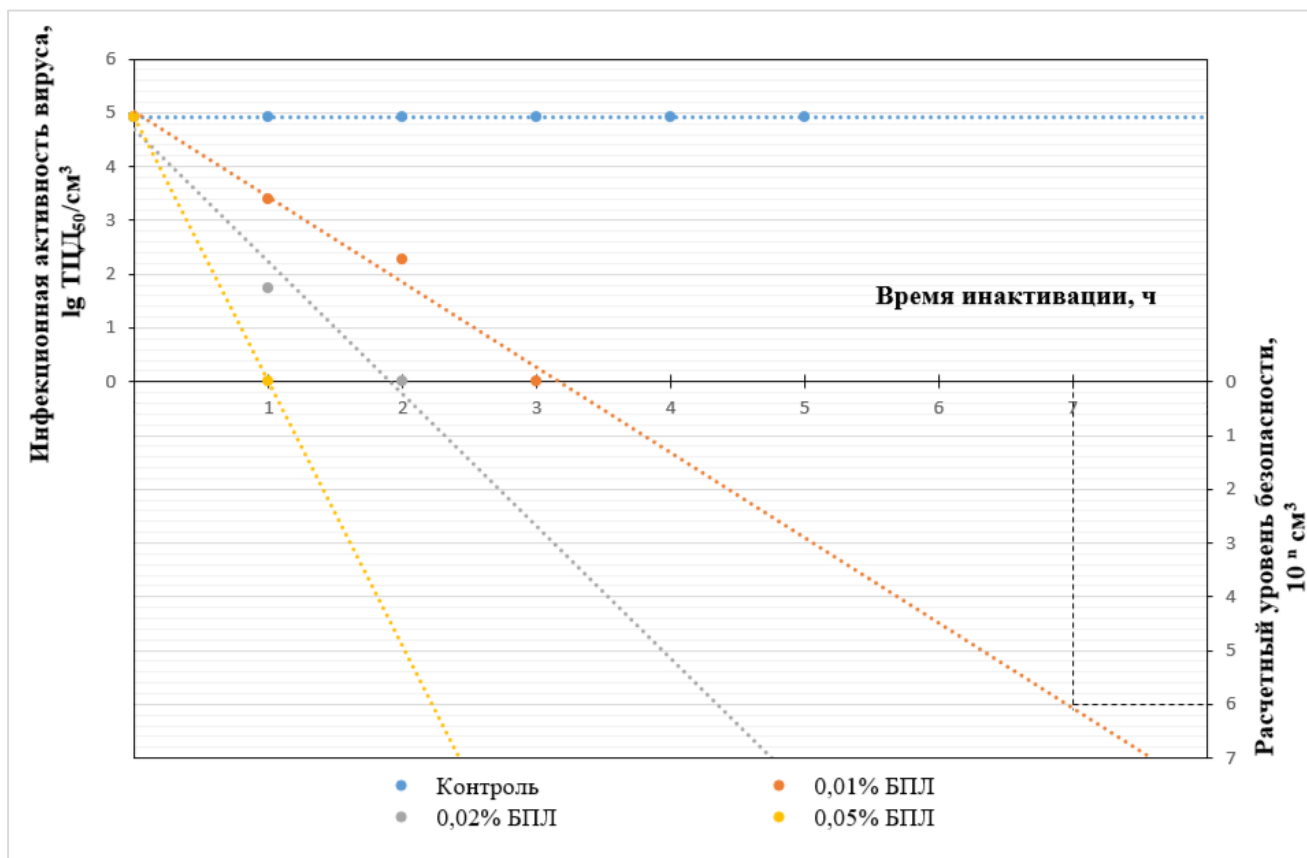


Рисунок 12 – Динамика процесса инаktivации штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак БПЛ при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$

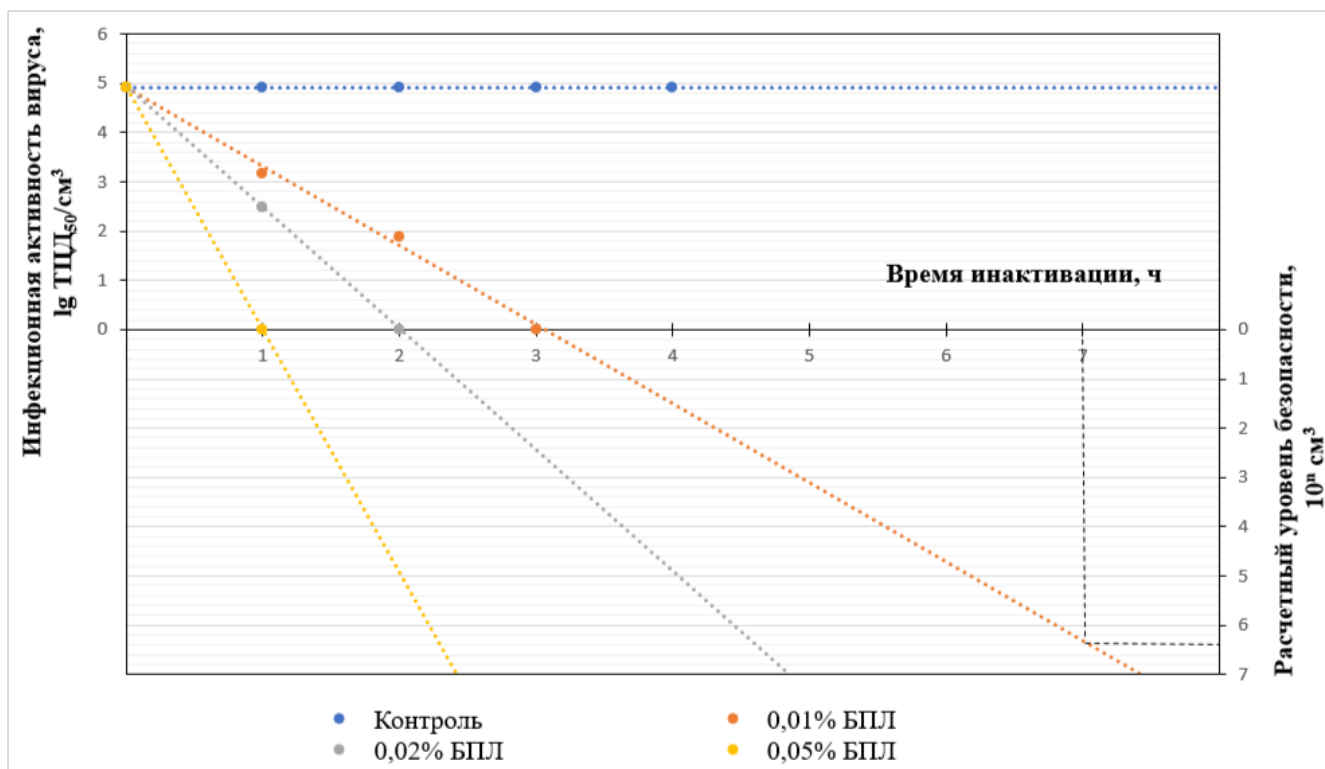


Рисунок 13 – Динамика процесса инаktivации штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак БПЛ при температуре 22±1°C

Было установлено, что при температурных режимах 22±1°C и 6±2°C и концентрации БПЛ 0,01% достоверное снижение титра вируса отмечалось через 1ч экспозиции с инаktivантом. В течение 3 ч титр вируса достигал 10⁰ lg ТЦД₅₀/см³ (1ТЦД₅₀ в 1 см³) при температуре 22±1°C и 6±2°C и концентрации БПЛ 0,01 %. При концентрации БПЛ 0,05% титр вируса достигал 10⁰ lg ТЦД₅₀/см³ (1ТЦД₅₀ в 1 см³) через 1 ч экспозиции с инаktivантом в обоих температурных режимах. При инаktivации вируса в течение 7 ч уровень специфической безопасности составлял 10⁶ см³ при конечной концентрации БПЛ 0,01% и температурном режиме 6±2°C.

Как видно из результатов исследований, инаktivация штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак химическими инаktivантами находилась в прямой зависимости от температурного режима инаktivации и концентрации инаktivанта.

Следующим этапом нашей работы было изучение антигенных свойств штамма «Рич» ССоV, инаktivированного различными концентрациями АЭЭИ и БПЛ на морских свинках. Для изучения воздействия АЭЭИ на антигенную активность вируса были изготовлены пять образцов штамма «Рич» ССоV,

инактивированного при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ и концентрации АЭЭИ: 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,2%. Были сформированы пять экспериментальных групп по пять морских свинок в каждой, шестая группа была оставлена в качестве контрольной. Животным вводили антиген ССоV по $0,5\text{ см}^3$ подкожно в область холки двукратно с интервалом 21 сутки. Животным из группы контроля вводили $0,5\text{ см}^3$ 0,9% физиологического раствора. Кровь у морских свинок отбирали до введения антигена, на 21-е сутки и 35-е сутки опыта. Аналогичным образом были испытаны образцы материала, инактивированные БПЛ при $22\pm 1^\circ\text{C}$ и $6\pm 2^\circ\text{C}$ и конечных концентрациях БПЛ в вирусной суспензии 0,01%, 0,02% и 0,05%. Результаты представлены в таблицах 10 и 11.

Таблица 10 – Динамика сероконверсии у морских свинок к штамму «Рич» ССоV, инактивированному различными концентрациями АЭЭИ
(n=3, p < 0,05)

Концентрация инактиванта	Титр антител и стандартное отклонение (по данным РН), $\log_2 \text{SN}_{50}$		
	До иммунизации	21-е сутки опыта	35-е сутки опыта
0,01% АЭЭИ	<1,00	4,86±0,10	5,94±0,27
0,05% АЭЭИ	<1,00	4,53±0,13	5,86±0,13
0,1% АЭЭИ	<1,00	4,31±0,53	5,00±0,22
0,15% АЭЭИ	<1,00	3,25±0,17	4,75±0,22
0,2% АЭЭИ	<1,00	2,69±0,17	3,97±0,09
Контрольная группа	<1,00	<1,00	<1,00

Таблица 11 – Динамика сероконверсии у морских свинок к штамму «Рич» ССоV, инактивированному различными концентрациями БПЛ
(n=3, p < 0,05)

Температурный режим, $^\circ\text{C}$	Концентрация инактиванта	Титр антител и стандартное отклонение (по данным РН), $\log_2 \text{SN}_{50}$		
		До иммунизации	21-е сутки опыта	35-е сутки опыта
$22\pm 1^\circ\text{C}$	0,01% БПЛ	<1,00	4,11±0,05	6,31±0,10
	0,02% БПЛ	<1,00	4,22±0,05	6,34±0,23
	0,05% БПЛ	<1,00	2,21±0,18	3,11±0,05
$6\pm 2^\circ\text{C}$	0,01% БПЛ	<1,00	4,89±0,10	7,22±0,05
	0,02% БПЛ	<1,00	4,48±0,22	7,17±0,09
	0,05% БПЛ	<1,00	2,25±0,14	3,47±0,05
Контрольная группа		<1,00	<1,00	<1,00

Было установлено, что при концентрации АЭЭИ 0,01% и 0,05% регистрировался максимальный прирост антител у морских свинок к коронавирусу собак. У контрольной группы животных прироста антител к ССоV не отмечалось. Повышение концентрации инактиванта до 0,2% приводило к снижению антигенной активности препарата. В опытах с применением БПЛ в качестве инактиванта при концентрации 0,05% в обоих температурных режимах наблюдался низкий прирост антител у морских свинок к штамму «Рич» ССоV, что, вероятно, связано с сильным химическим воздействием на вирусные белки. Максимальный прирост антител к штамму «Рич» ССоV у морских свинок регистрировался при концентрации БПЛ 0,01% и температуре $6\pm 2^{\circ}\text{C}$.

По результатам исследований установлено, что концентрация АЭЭИ 0,01% при температуре $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 48 ч и концентрация БПЛ 0,01% при температуре $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 7 ч обеспечивает инактивацию вируса коронавирусного энтерита и сохранность его антигенных свойств. Данные режимы инактивации соответствуют заявленным целям и являются наиболее технологичными. Также стоит отметить, что при применении БПЛ в качестве инактиванта титр антител у морских свинок в ответ на введение антигена штамма «Рич» ССоV был достоверно выше, чем при использовании АЭЭИ ($p < 0,05$).

Бета-пропиолактон широко применяется для инактивации коронавирусов, в том числе в производстве медицинских биопрепаратов, однако, его высокая стоимость существенно удорожает производство вакцин [135]. Исходя из этого, в качестве инактиванта была выбрана группа азиридинов, в частности, 1-(2-аминоэтил)-азиридин (аминоэтилэтиленимин, АЭЭИ), обеспечивающий «щадящее» воздействие на антигенную структуру вириона и целесообразный экономически. В зарубежной практике представлены сообщения о способе инактивации вирусного сырья ССоV бинарным этиленимином (BEI), где предложен следующий режим: концентрация BEI 1%, время экспозиции 48 ч при температуре $35-37^{\circ}\text{C}$ [135]. В нашей работе доказана эффективность использования АЭЭИ в меньшей концентрации и при уменьшении времени экспозиции, однако, расхождение результатов может быть обусловлено разницей в исходном титре

вируса, используемом препарате или других условиях, не обозначенных в указанном исследовании.

Таким образом, в результате проведенных исследований были определены концентрации АЭЭИ и БПЛ, температурный режим и время инаktivации, позволяющие получить инаktivированное вирусное сырье CCoV с максимальным сохранением антигенной активности вируса, а также проведен статистический анализ процесса и построены регрессионные модели, позволяющая достаточно точно прогнозировать кинетику процесса инаktivации. Окончательный выбор был сделан в пользу АЭЭИ, показавшего себя как эффективный и экономически выгодный инаktivант, используемый при производстве вакцин для собак.

3.8. Антигенные свойства штамма «Рич» в опытах на естественно-восприимчивых животных

Следующим этапом работы было изучение антигенных свойств штамма «Рич» CCoV на естественно-восприимчивых животных: щенках собак в возрасте 2 - 3 месяцев и песцах в возрасте 6 месяцев. ВСМ предварительно подготавливали: центрифугировали при 3000g 30 мин. для осаждения клеточного детрита и инаktivировали 1-(2-аминоэтил)-азиридином (АЭЭИ) при температуре $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ и концентрации инаktivанта 0,01%. Инфекционный титр до инаktivации составлял $4,83\pm0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Животные содержались в помещениях вивария в индивидуальных клетках по 1 голове в клетке. Условия содержания животных соответствовало ГОСТ 33215 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур». Работа с подопытными животными проводилась в соответствии с СТО 00495527-0002 «Животные лабораторные. Использование для контроля и экспериментов», а также Рекомендациям Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. №33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

Были сформированы следующие группы: две группы щенков (экспериментальная и контрольная) по 4 головы в каждой и две группы песцов (экспериментальная и контрольная) по 5 голов в каждой. Животным экспериментальных групп однократно вводили инактивированный ВСМ внутримышечно в среднюю часть бедра в дозе $1,0 \text{ см}^3$. Животным контрольной группы вводили внутримышечно по 1 см^3 0,9% физиологического раствора. Титр вируснейтрализующих антител (ВНА) к коронавирусу собак в сыворотках крови определяли до иммунизации и через 14, 21, 28 и 35 суток после иммунизации в РН. Ежедневно оценивали физиологическое состояние животных. У щенков проводили термометрию, наблюдали за поведением, аппетитом и дефекацией. У песцов в связи с агрессивным поведением в ответ на манипуляции термометрию не проводили, ограничиваясь визуальным наблюдением за состоянием здоровья, поведением и аппетитом экспериментальной и контрольной групп.

Данные серологических исследований представлены на рисунке 14.

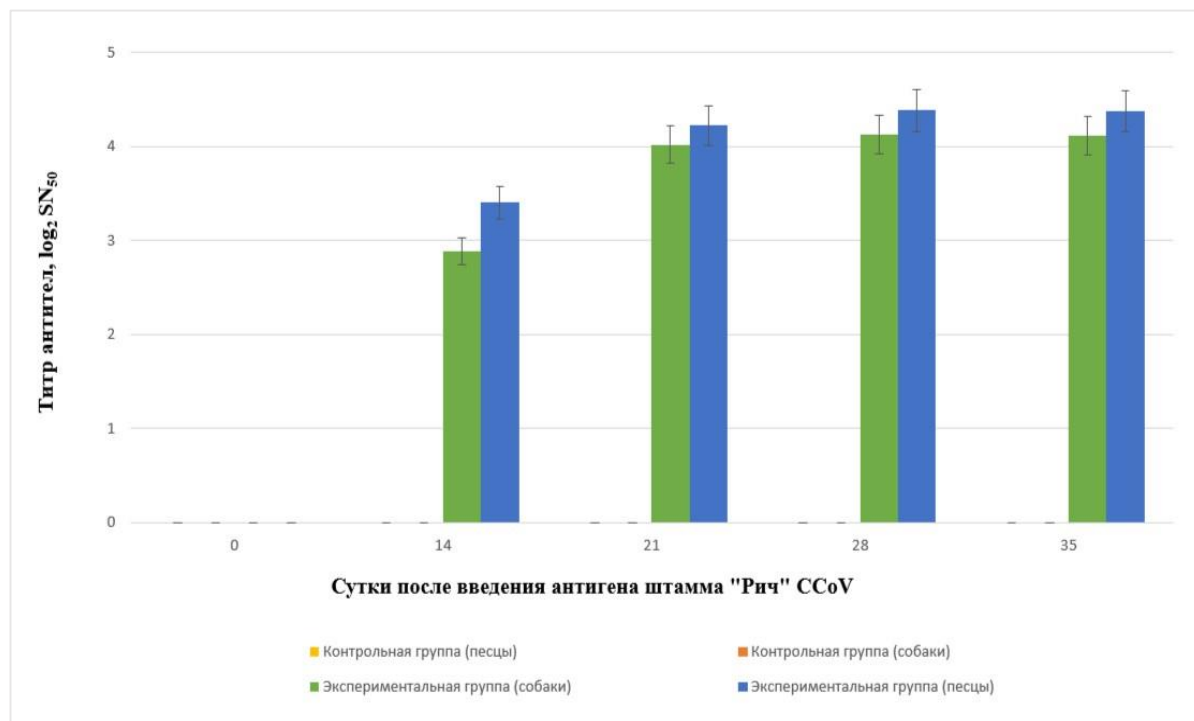


Рисунок 14 – Динамика уровня антител у песцов и собак в ответ на введение антигена штамма «Рич» ССoV

В сыворотках крови, отобранных до введения антигена штамма «Рич» CCoV, ВНА к данному вирусу в экспериментальных и контрольных группах не выявлялись. Прирост титра гуморальных антител более чем на $2,50 \log_2 \text{SN}_{50}$ наблюдался через 14 суток после введения инаktivированного материала. Значения титра ВНА также увеличивались к 21 суткам в экспериментальных группах песцов и собак, а титры ВНА, определенные на 28 и 35 сутки статистически не отличались от значений, определенных на 21 сутки, что говорило о «фазе стабилизации» антителогенеза. В контрольных группах песцов и собак не наблюдалось прироста титра антител к штамму «Рич» CCoV в течение всего периода наблюдений. Следует отметить, что средние значения титров антител, определенные на 14 сутки у песцов были выше, чем у собак ($p < 0,05$), а на 21, 28 и 35 сутки средние значения титров между экспериментальными группами песцов и собак статистически не отличались.

В течение всего опыта физиологические показатели животных экспериментальных и контрольных групп оставались в пределах нормы. Аппетит был сохранен, гиподинамии, учащения дефекации, гипертермии (у собак), изменений поведения не регистрировали.

В исследовании установлено, что введение инаktivированного материала штамма «Рич» CCoV является ареактогенным при внутримышечном введении естественно-восприимчивым животным: собакам и песцам, и индуцирует сероконверсию у подопытных животных через 14 суток после введения, а максимальный уровень титра антител отмечается на 21 сутки.

Полученные в опытах на собаках данные не представляется возможным сравнить с исследованиями зарубежных авторов, так как в научной литературе отсутствуют сведения по изучению антигенных свойств различных штаммов вируса коронавирусного энтерита собак, что, возможно, объясняется юридическими сложностями в проведении опытов на животных во многих странах. В отечественной литературе подобные сведения представлены в работах Олышанской А.А и др., где при экспериментальном заражении вирусом в дозе $6,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ титр антител к CCoV штамма «Карат» на 21 сутки определялся на

уровне 1:256 ($8,0 \log_2 \text{SN}_{50}$) [16]. В наших экспериментах максимальное значение титра антител у собак составило $4,02 \pm 0,25 \log_2 \text{SN}_{50}$, однако, значительную разницу в титрах можно объяснить тем, что в исследованиях Ольшанской А.А. и др. животным вводили нативный вирус с более высоким титром.

В настоящем исследовании титры антител, определенные у песцов, были статистически тождественны таковым у щенков собак. В связи с тем, что в отечественной и иностранной литературе отсутствуют данные об использовании песцов (как одного из представителей семейства псовых (лат. Canidae)) в экспериментах по изучению антигенных свойств различных штаммов CCoV, дальнейшее более глубокое изучение данного вопроса могло бы обосновать выбор песцов в качестве моделей для тестирования вакцин против коронавирусного энтерита собак или прочих исследований данного вируса, т.к. использование в опытах собак сопряжено с рядом этических и практических ограничений.

3.9. Патогенность штамма «Рич» для естественно-восприимчивых животных

Для изучения патогенности штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак для естественно-восприимчивых животных было проведено экспериментальное заражение беспородных щенков собак в возрасте 1,5-2 месяцев, серонегативных к CCoV. Работа с подопытными животными проводилась в соответствии с СТО 00495527-0002 «Животные лабораторные. Использование для контроля и экспериментов», а также Рекомендациям Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». Протоколы опытов были рассмотрены и одобрены биоэтической комиссией ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Животных распределили в две группы по пять голов в каждой. Изучив данные, полученные при экспериментальном заражении щенков Ольшанской А.А. с соавт., Decaro N. et al., Pratelli A. et al., в настоящем исследовании было решено использовать комбинированный метод заражения: экспериментальной группе

щенков вводили штамм «Рич» ССоV интраперитонеально и перорально [24, 81, 109]. Животных предварительно выдерживали в течение 24 ч на голодной диете. Для экспериментального заражения использовали ВСМ ССоV с титром $4,92 \pm 0,14 \lg \text{ TCID}_{50}/\text{см}^3$ в объеме $3,0 \text{ см}^3$ при интраперитонеальном методе заражения, в объеме $5,0 \text{ см}^3$ для перорального заражения. Щенкам контрольной группы аналогичными способами в том же объеме вводили 0,9% физиологический раствор.

За животными вели наблюдение в течение 35 суток. Ежедневно отмечали общее состояние щенков, аппетит, частоту дефекации, проводили термометрию. Ежедневно отбирали пробы фекалий для выявления наличия вирусного генома ССоV методом ОТ-ПЦР с помощью тест-системы «КОРОНАВИР» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) по методу, описанному в разделе «Материалы и методы».

На 3-е сутки после заражения у двух из пяти щенков в группе отмечали снижение аппетита, вялость, разжиженный кал, гипертермию. На 4-е сутки аналогичные симптомы появились еще у трех щенков. У одного щенка из пяти заболевших на 5-е сутки развились апатия, профузная диарея, отказ от корма, дегидратация тяжелой степени, в связи с чем на 6-е сутки была проведена эвтаназия в соответствии с Рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. №33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». После эвтаназии была проведена аутопсия щенка, отобраны образцы органов для гистологического исследования. У трех других заболевших щенков показатели температуры вернулись к физиологической норме ($37,5\text{--}39,5^\circ\text{C}$) на 6-е сутки после заражения и не выходили за ее пределы до конца периода наблюдения. На 8-9-е сутки отмечалось полное восстановление аппетита и улучшение общего состояния. На 9-10-е сутки после заражения восстанавливалась консистенция кала. Период выздоровления составил 10 суток.

Исследование фекалий методом ОТ-ПЦР посредством тест-системы «КОРОНАВИР» (производитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)

показало, что в среднем выделение вируса из организма с фекалиями продолжалось в течение 16 суток.

При проведении аутопсии погибшего щенка были выявлены патологоанатомические изменения, характерные для коронавирусного энтерита (представлены на рисунках 15-18). В основном изменения были сосредоточены в тонком кишечнике: отдельные участки тонкой кишки с признаками воспаления, серозная оболочка красноватого цвета, с полосчатыми и пятнистыми кровоизлияниями, на разрезе видны пятнистые и полосчатые кровоизлияния на слизистой оболочке. Мезентериальные лимфоузлы увеличены, при разрезе края не сходятся. Печень без выраженных патологоанатомических изменений, однако, при гистологическом исследовании выявлены признаки белково-жировой дистрофии, лейкоцитарная инфильтрация, апоптоз гепатоцитов, что также может быть результатом заражения. При гистологическом исследовании тонкого кишечника отмечали отек подслизистого слоя, деструкцию энтероцитов в апикальной части ворсинок, расширение крипт, лейкоцитарную инфильтрацию собственной пластинки слизистой оболочки (представлено на рисунках 19-22). Все представленные фото из личного архива автора.

У щенков контрольной группы не регистрировалось отклонений от физиологической нормы в течение всего периода наблюдения. Результаты исследования проб фекалий методом ОТ-ПЦР на наличие вируса коронавирусного энтерита собак были отрицательными в течение 35 суток.



Рисунок 15 – Экхимозы на слизистой оболочке тонкой кишки (отмечены стрелками), признаки серозно-катарального энтерита



Рисунок 16 – Гиперемия слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки



Рисунок 17 – Экхимозы на серозной оболочке тонкой кишки (отмечены стрелками), признаки серозно-катарального энтерита



Рисунок 18 – Печень без видимых патологоанатомических изменений

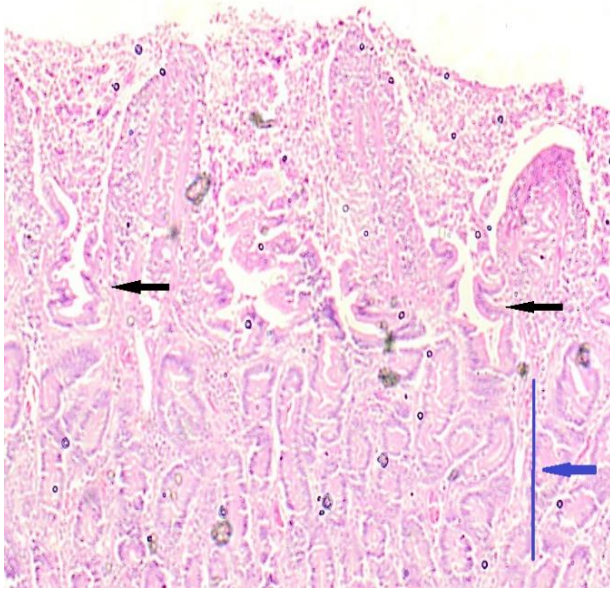


Рисунок 19 – Отек подслизистого слоя тонкого кишечника (синяя стрелка), расширение крипт (черные стрелки)

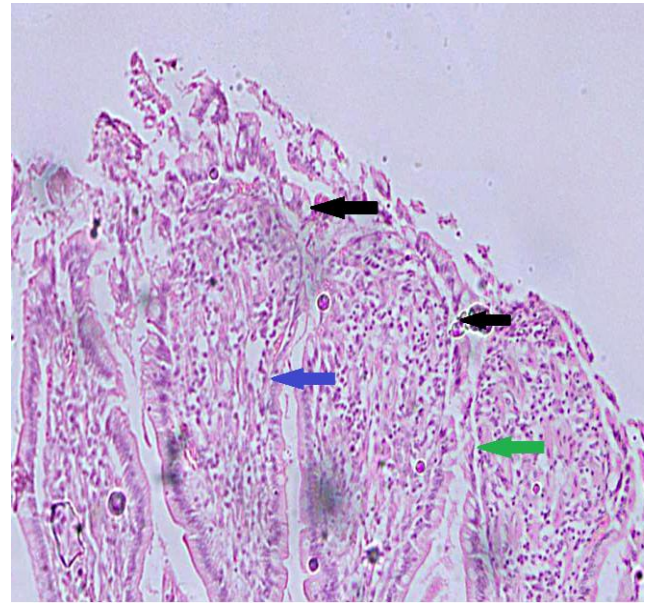


Рисунок 20 – Деструкция энтероцитов (черные стрелки), лейкоцитарная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки (синяя стрелка), слипание ворсинок в боковой части (зеленая стрелка)

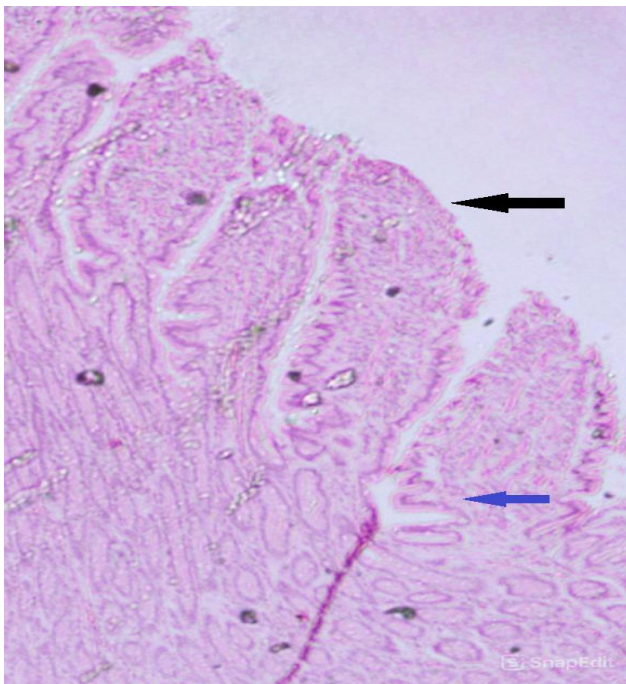


Рисунок 21 – Деструкция энтероцитов в апикальной части ворсинок (черная стрелка), расширение крипт (синяя стрелка)

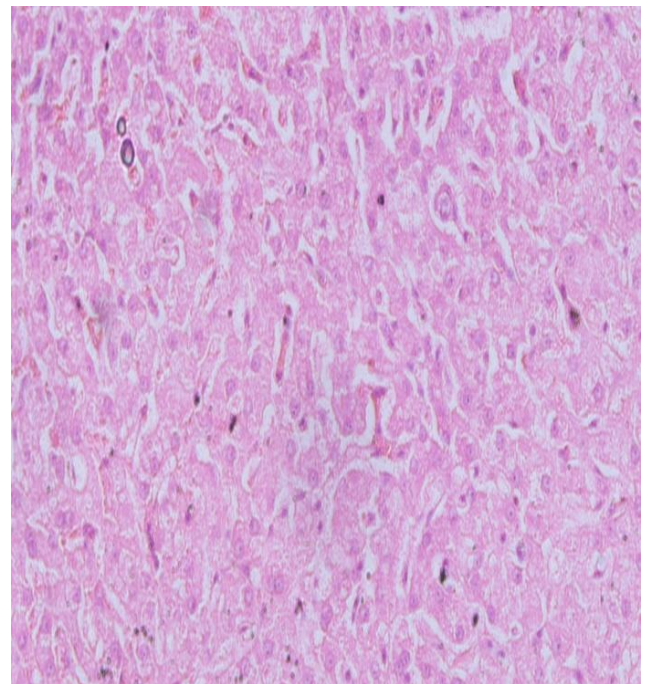


Рисунок 22 – Лейкоцитарная инфильтрация, апоптоз гепатоцитов

Через 14 суток после заражения и далее каждые 7 суток у подопытных животных отбирали кровь для определения титра вируснейтрализующих антител (ВНА). Результаты исследования представлены на рисунке 23.

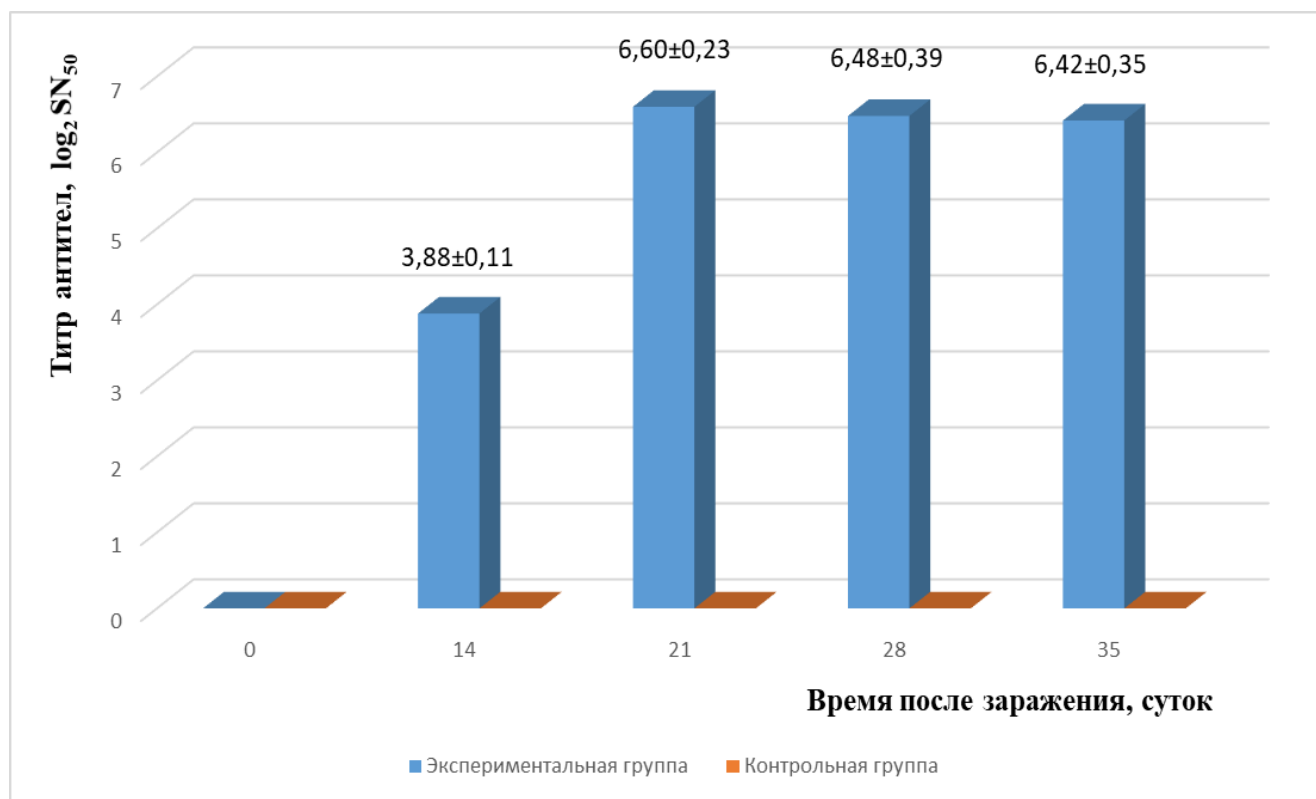


Рисунок 23 – Динамика уровня антител у щенков, экспериментально зараженных штаммом «Рич» ССоV

До экспериментального заражения все щенки были серонегативными к ССоV. Через 14 суток после заражения титр антител определялся на уровне $3,88 \pm 0,11 \log_2 \text{SN}_{50}$. С 14 по 21 сутки наблюдалось постепенное увеличение титра ВНА в экспериментальной группе щенков. На 28 и 35 сутки уровень ВНА существенно не изменился. На 35 сутки титр ВНА составил $6,42 \pm 0,35 \log_2 \text{SN}_{50}$. Щенки контрольной группы оставались серонегативными к ССоV в течение всего периода наблюдения.

Полученные результаты экспериментального заражения коррелируют с результатами исследований других авторов. В отечественной практике экспериментальная инфекция была ранее воспроизведена Ольшанской А.А. при интраперитонеальном заражении щенков штаммом ССоV «Карат», гибель щенков при этом составила 20% [24]. Исследования зарубежных авторов показали, что при

пероральном и интраперитонеальном заражении некоторыми штаммами коронавируса («CB-05», «174/06», «144/01», «SA4» и др.) легко удается экспериментально воспроизвести коронавирусный энтерит у щенков в возрасте до трех месяцев с симптомами диареи и дегидратации разной степени тяжести [51, 82, 109]. L. N. Binn et al. описали экспериментальную инфекцию CCoV, которую удалось воспроизвести при заражении штаммом «1-71» у новорожденных щенков пятидневного возраста [151]. В некоторых случаях репликация вируса коронавирусного энтерита в кишечнике при успешном экспериментальном заражении не сопровождается характерными признаками диареи, которую можно определить визуально при клиническом осмотре, и требует дополнительных исследований различными лабораторными методами (гистологическое исследование, иммуногистохимический анализ, МФА) [74, 134]. Летальность вируса для щенков при экспериментальном заражении варьировалось в исследованиях различных авторов. При заражении «классическими» штаммами вируса коронавирусного энтерита отмечалась низкая летальность, однако заражение пантропными штаммами приводило к системной инфекции и гибели до 100% животных в экспериментальной группе [82, 97, 98, 109].

Таким образом, в наших исследованиях экспериментально воспроизвести коронавирусный энтерит у щенков собак удалось при комбинированном интраперитонеальном и пероральном способе введения ВСМ, у одного щенка из пяти (20%) наблюдались клинические проявления тяжелой степени, в связи с чем его подвергли эвтаназии на 6-е сутки после заражения, у четырех других наблюдались характерные признаки энтерита слабой или умеренной степени, что говорит о патогенности штамма «Рич» для естественно-восприимчивых животных.

3.10. Иммуногенные свойства штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак

Для изучения иммуногенных свойств штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита был проведен опыт экспериментального заражения щенков собак

в возрасте 1,5-2 месяцев, предварительно иммунизированных против данного вируса по методу, описанному в разделе «Материалы и методы».

Животных в количестве 20 голов распределили случайным образом в две группы по 10 голов в каждой: экспериментальную и контрольную. Работа с щенками собак проводилась в строгом соответствии с СТО 00495527-0002 «Животные лабораторные. Использование для контроля и экспериментов», а также Рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». Протоколы опытов рассмотрены и одобрены биоэтической комиссией ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Животных экспериментальной группы иммунизировали инактивированным материалом штамма «Рич» SCoV двукратно с интервалом 21 сутки. Через 14 суток после второй иммунизации щенков заражали нативным вирусом. За животными после заражения вели наблюдение в течение 21 суток. Для оценки прироста антител к вирусу коронавирусного энтерита собак у щенков отбирали кровь до иммунизации, через 21 и 35 суток после иммунизации (перед экспериментальным заражением).

Ежедневно у щенков отбирали ректальные мазки для подтверждения специфичности инфекции и исследования продолжительности экскреции вируса коронавирусного энтерита собак посредством тест-системы «КОРОНАВИР» (производитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Результаты серологических исследований отображены на рисунке 24.

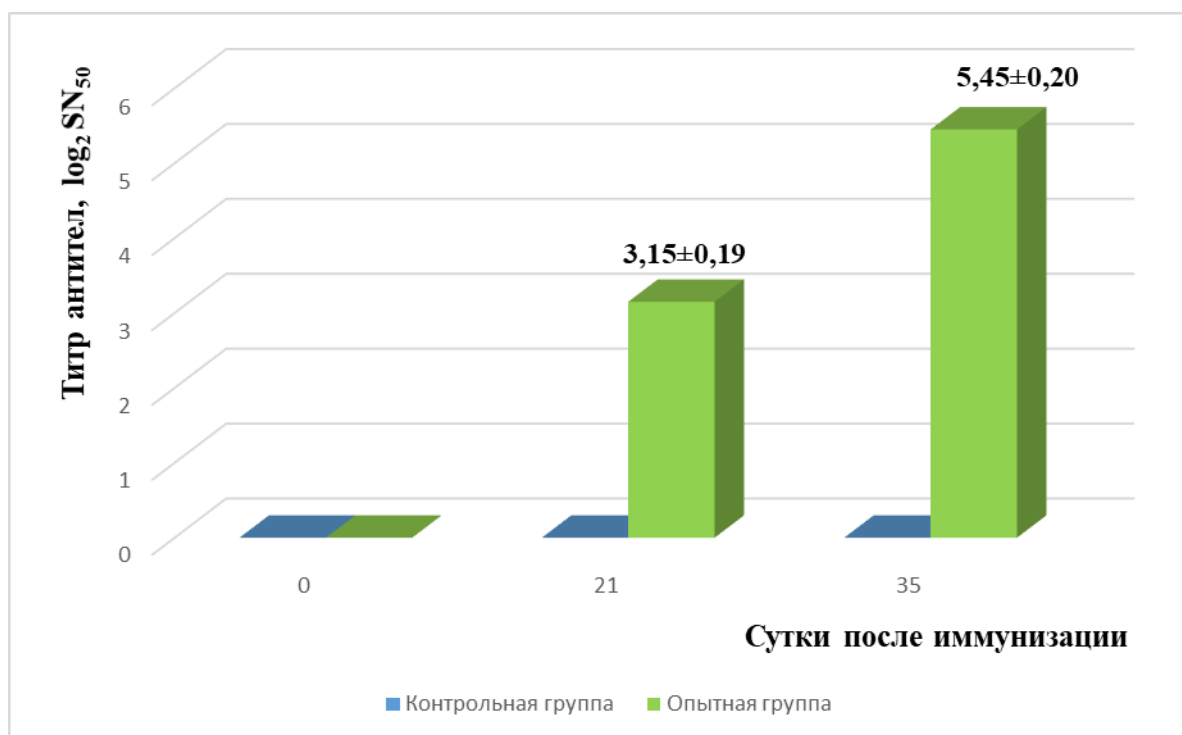


Рисунок 24 – Динамика уровня антител у щенков в ответ на введение инактивированного материала штамма «Рич» CCoV (по данным РН)

До иммунизации животные обеих групп были серонегативны к CCoV. Через 21 сутки у щенков экспериментальной группы, однократно иммунизированных антигеном штамма «Рич» CCoV, регистрировалась положительная динамика прироста ВНА к вирусу коронавирусного энтерита собак. Средний по группе титр ВНА определялся на уровне $3,15 \pm 0,19 \log_2 SN_{50}$. Через 14 суток после бустерной иммунизации также отмечали значительный прирост титра ВНА ($p \leq 0,05$). Среднее по группе значение титра антител перед экспериментальным заражением составило $5,45 \pm 0,20 \log_2 SN_{50}$. Щенки контрольной группы оставались серонегативными к CCoV в течение всего периода наблюдения.

Первые клинические признаки регистрировались у щенков в обеих группах через 72 ч (трое суток) после заражения, однако, более выражены они были в группе не иммунизированных животных (контрольная). В то время как в группе иммунизированных (экспериментальной) отмечалось снижение активности и уменьшение поедаемости корма у двух особей (20%), в контрольной группе у шести щенков из десяти (60%) наблюдались симптомы характерные для коронавирусного энтерита: учащенная дефекация, размягчение кала, вялость,

снижение аппетита. На четвертые сутки в контрольной группе различные симптомы болезни регистрировались у всех десяти щенков (100%). Тяжесть клинических проявлений постепенно нарастала, на пятые сутки у всех щенков отмечался жидкий кал, у одного щенка с примесью крови, снижение аппетита, активности, дегидратацию разной степени и болезненность брюшной стенки. Субфебрильная гипертермия (39,5-40,0°C) регистрировалась у семи щенков из десяти на третьи-пятые сутки после заражения, однако, на шестые сутки температура тела у всех щенков соответствовала физиологической норме. На седьмые сутки один из десяти щенков погиб с симптомами апатии, тяжелой степени дегидратации и профузной диареи. Три щенка из десяти напротив показывали улучшение общего состояния, увеличилась поедаемость корма. На девятые сутки после заражения улучшения отмечались у семи щенков из девяти, на десятые сутки у трех щенков восстановилась консистенция кала, признаков, характерных для коронавирусного энтерита не наблюдалось. Из всех симптомов дольше всего у животных сохранялась диарея. Только к 13-м суткам у всех девяти щенков контрольной группы консистенция кала соответствовала физиологической норме, при этом других клинических признаков не отмечалось. В экспериментальной группе тяжесть клинических симптомов была заметно менее выражена. На четвертые сутки клинические признаки наблюдались у трех щенков из десяти (30%). Отмечали размягченный кал, вялость, снижение аппетита, однако, таких симптомов как профузная диарея, депрессия, полное отсутствие аппетита не регистрировали. У семи щенков из десяти клинических признаков болезни не наблюдалось, состояние соответствовало физиологической норме. Гипертермии у щенков экспериментальной группы не отмечали. На седьмые сутки после заражения состояние щенков улучшалось, на девятые сутки щенки экспериментальной группы демонстрировали отсутствие клинических признаков болезни.

Клинические профили, составленные по средним по группе значениям суточных баллов экспериментальной и контрольной групп, представлены на рисунке 25.

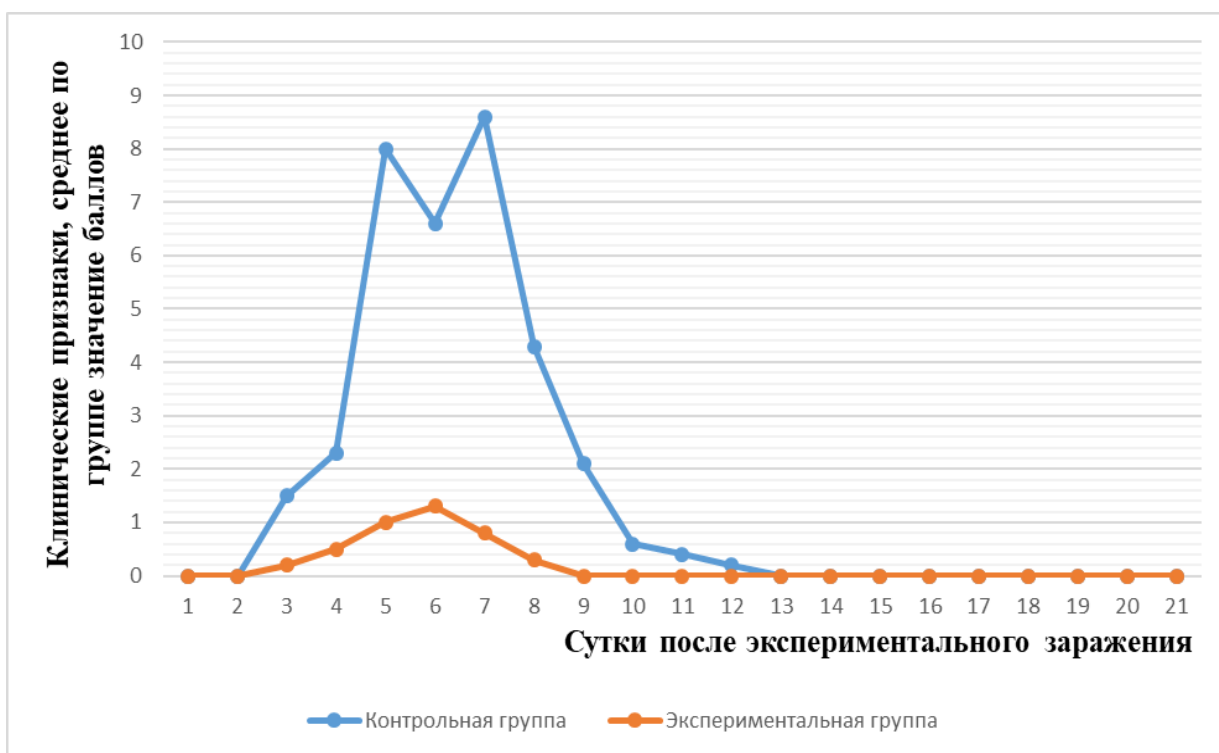


Рисунок 25 – Клинические профили иммунизированных и не иммунизированных щенков после заражения штаммом «Рич» ССоV

Продолжительность течения коронавирусного энтерита у щенков экспериментальной группы составила 9 суток, у щенков контрольной группы – 13 суток.

При статистическом анализе результатов изучения иммуногенных свойств штамма «Рич» ССоV средний клинический балл (сумма средних суточных баллов каждой группы за весь период наблюдения/срок наблюдения) составил 0,195 у иммунизированных щенков и 1,729 у щенков контрольной группы, разница являлась статистически значимой ($p < 0,05$).

Исследование проб фекалий посредством тест-системы «КОРОНАВИР» (производитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) показало, что период экскреции ССоV с фекалиями составил 15 дней в контрольной и 9 дней в экспериментальной группах.

Таким образом, в результате исследований было установлено, что штамм «Рич» ССоV обладает иммуногенными свойствами и может быть использован в качестве штамма-кандидата для изготовления средств специфической профилактики против коронавирусного энтерита у собак. В группе

иммунизированных щенков клинических признаков болезни не наблюдалось у 70% особей, а тяжесть клинических признаков у других 30% заболевших была выражена значительно слабее, чем в контрольной группе, что было подтверждено статистически посредством сравнения клинических профилей ($p < 0,05$). Ни у одного щенка в экспериментальной группе не регистрировалось таких тяжелых симптомов, как полный отказ от корма, профузная диарея или депрессия, что напротив, было отмечено у 60% животных в контрольной группе, при этом один щенок погиб. Также установлено, что иммунизация уменьшает срок экскреции вируса с фекалиями на 6 дней у иммунизированных животных по сравнению с животными контрольной группы, что является важным фактором для уменьшения распространения ССоV в популяции собак, содержащихся в приютах и питомниках, где плотность размещения животных высокая, а санитарные условия не всегда соответствуют утвержденным нормам.

Полученные результаты в целом соотносятся с исследованиями других авторов, в частности, Fulker R. et al. и Decaro N. et al. [82, 109]. Данными авторами также установлено, что иммунизация щенков против коронавируса снижает тяжесть течения инфекции или полностью предотвращает развитие симптомов заболевания, однако, не защищает от репликации вируса в кишечнике и последующей экскреции с фекалиями, хотя значительно снижает ее.

Более глубокое изучение перекрестной реактивности посредством проведения экспериментального заражения гетерологичными штаммами ССоV, отличающимися по своим генетическим свойствам от штамма «Рич», является актуальным, однако, затруднено в связи со сложностью выделения изолятов ССоV из-за частого ко-инфицирования животных вирусом парвовирусного энтерита, культивирующегося в тех же клеточных культурах, что и коронавирус, а также в связи с определенными трудностями в адаптации ССоV к клеточным системам [105]. В силу высокой мутационной изменчивости перекрестный иммунитет между различными штаммами ССоV может быть ограничен, однако, как в зарубежной, так и в отечественной литературе данный вопрос освещен недостаточно и требует дальнейших исследований [74, 109].

3.11. Устойчивость вируса коронавирусного энтерита собак при различных температурах хранения

Производство иммунобиологических препаратов, контроль их качества, поддержание штаммов в коллекции требуют хранения больших объемов вирусной суспензии, а также вируса в лиофилизированном состоянии в течение длительного времени. Информация об устойчивости вируса к различным температурам позволяет определить срок, в течение которого вирус сохраняет инфекционную активность, и в соответствии с этим рекомендовать эффективные температурные режимы для хранения ВСМ в научных или производственных целях.

В ходе данного опыта было изучена сохранность инфекционной активности вируса коронавирусного энтерита в нативном и лиофилизированном виде при температурах $6\pm 2^{\circ}\text{C}$, минус $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, минус $45\pm 1^{\circ}\text{C}$, минус $70\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 месяцев (срок наблюдения). Для этого вирусную суспензию с исходным титром $4,92\pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ разделяли на аликвоты и хранили при указанных температурах.

Для изучения сохранности ССоV в лиофилизированном виде вирусную суспензию объединяли со стабилизаторами (20%-ый гидролизат лактальбумина – 9%; 50%-ый раствор сахарозы – 9%; желатоза – 2% от объема), расфасовывали в стеклянные флаконы по 1 см^3 , замораживали в течение 24 ч при температуре минус $45,0\pm 5,0^{\circ}\text{C}$, а затем сублимационно высушивали в течение 45 ч в режиме глубокого вакуума. Титр вируса после лиофилизации составил $4,75\pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Полученные образцы закладывали на хранение при выше указанных температурах.

Каждый месяц в течение шести месяцев, а затем каждые три месяца отбирали по три пробы из нативных и лиофилизированных образцов и определяли титр инфекционной активности ССоV методом титрования в КК CRFK. Результаты исследований по хранению вирусной суспензии в нативном виде представлены на рисунке 26.

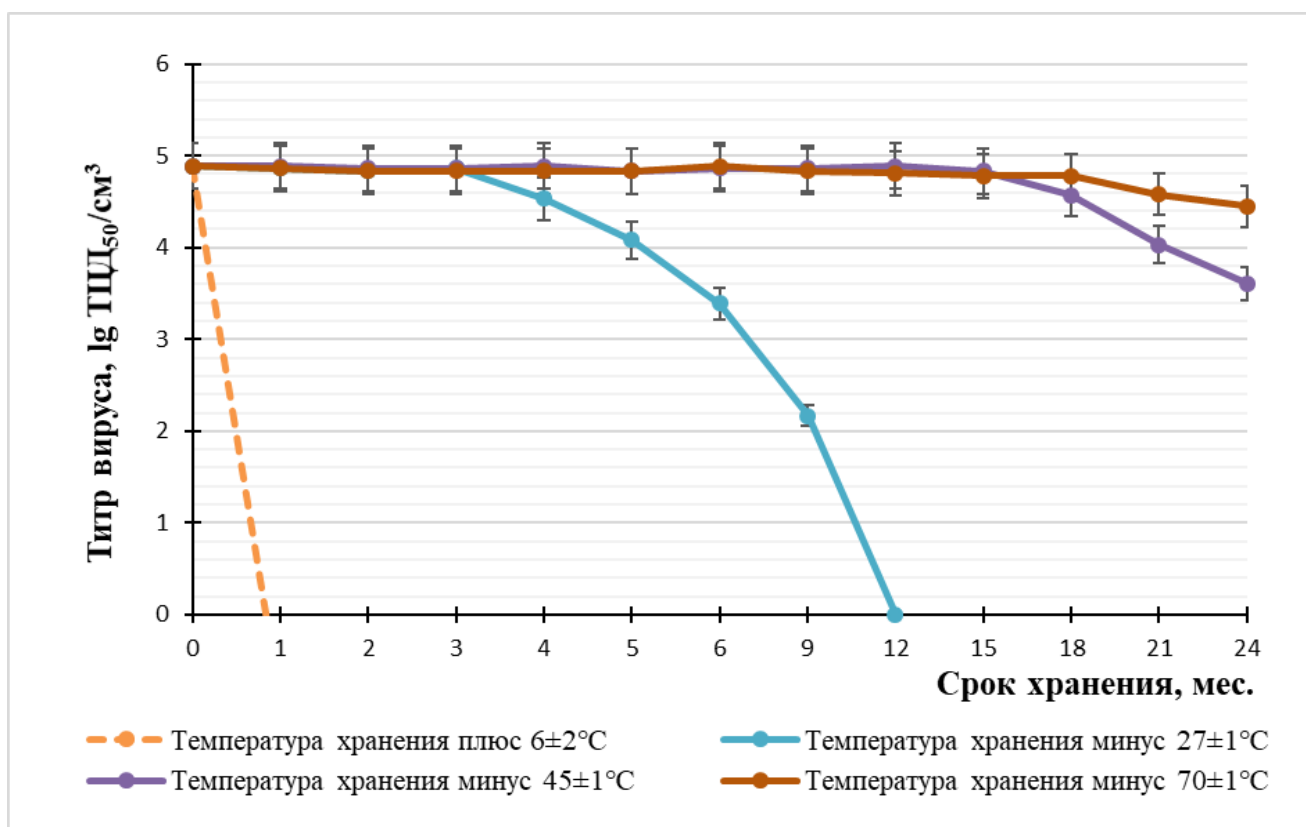


Рисунок 26 – Динамика снижения инфекционной активности в зависимости от времени хранения нативной суспензии

Как видно из представленных на рисунке 26 данных, вирус корнавирусного энтерита собак лучше сохраняет инфекционную активность при хранении в условиях низких температур. При хранении нативного ВСМ при температуре $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение одного месяца наблюдалась полная потеря инфекционной активности вируса. Хранение ССоV при низких температурах значительно продлевало сохранность инфекционной активности вирусной суспензии. При температуре минус $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ не регистрировалось значительной потери инфекционной активности вируса в течение четырех месяцев хранения ($p \geq 0,05$). Через шесть месяцев хранения титр вируса составил $3,39\pm 0,05 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, через 12 месяцев – $10^0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, что являлось неприемлемым для использования вируса в производственных целях. Через 15 месяцев хранения при температуре минус $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ ЦПД при заражении КК CRFK не регистрировалось. Хранение вирусной суспензии при температурах минус $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ и минус $70\pm 1^{\circ}\text{C}$ не вызывало значительной потери инфекционной активности в течение 18 месяцев хранения. При температуре хранения минус $70\pm 1^{\circ}\text{C}$ статистически значимая потеря титра

инфекционной активности ССоV регистрировалась только через 21 месяц ($p \leq 0,05$), титр вируса при этом определялся на уровне $4,58 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Хранение вирусной суспензии коронавирусного энтерита собак при температуре минус $45 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 21 месяца вызывало снижение титра вируса чуть менее, чем на $1,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а через 24 месяца титр вируса определялся на уровне $3,61 \pm 0,10 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Данные экспериментов по хранению ВСМ ССоV в лиофилизированном виде представлены на рисунке 27.

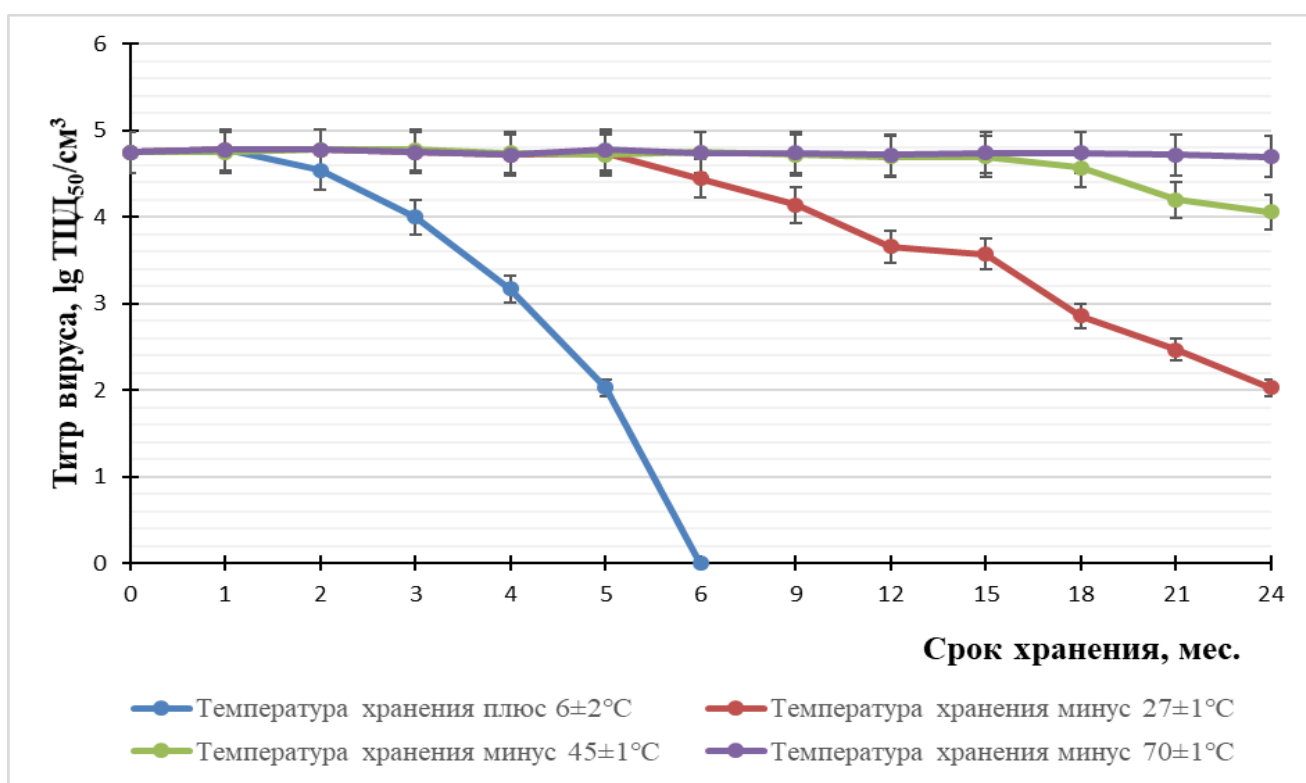


Рисунок 27 – Динамика снижения инфекционной активности в зависимости от времени хранения лиофилизированного материала

В лиофилизированном виде сохранность вирусного материала была выше. Лيوфилизат ССоV сохранял инфекционную активность на уровне исходной в течение 24 месяцев хранения при температуре минус $70 \pm 1^\circ\text{C}$. Статистически значимая потеря инфекционной активности регистрировалась только через 21 месяц хранения лиофилизата при температуре минус $45 \pm 1^\circ\text{C}$ и составила около $0,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Хранение при температуре минус $27 \pm 1^\circ\text{C}$ не вызывало

значительной потери инфекционной активности вируса в течение 6 месяцев, а через 12 месяцев снижение титра вируса составило чуть больше $1,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ от исходного значения, что являлось статистически значимым ($p < 0,05$). Однако, даже несмотря на значительное снижение титра, вирус сохранял способность вызывать цитопатические изменения в КК CRFK даже после 24 месяцев хранения при температуре минус $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Хранение лиофилизата при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение двух месяцев не показало статистически значимой разницы в титре исследуемого вирусного материала по сравнению с исходным ($p > 0,05$). Значительная потеря инфекционной активности регистрировалась через три месяца хранения, а полная потеря способности вируса вызывать цитопатические изменения в КК CRFK отмечалась через девять месяцев хранения лиофилизата.

Вирусы семейства *Coronaviridae* умеренно устойчивы к факторам внешней среды, причем SCoV менее устойчив к воздействию высоких температур [2]. При низких температурах вирус сохраняет свои исходные свойства дольше, чем при температурах выше 0°C [2, 138]. В настоящем исследовании анализ результатов показал, что для сохранности вируса наиболее эффективными методами является лиофилизация с криозащитной средой и хранение при низкой температуре минус $70 \pm 1^\circ\text{C}$. В данном температурном режиме титр SCoV сохранялся на уровне исходного до 24 месяцев (срок наблюдения). При температурах минус $27 \pm 1^\circ\text{C}$ хранение вируса возможно в течение короткого времени (не более четырех месяцев), при минус $45 \pm 1^\circ\text{C}$ дольше, но не более 18 месяцев. Хранение вируса при положительных температурах приводило к достаточно быстрой потере инфекционной активности, однако, в данном опыте для лиофилизации SCoV была использована только одна криозащитная среда. Дальнейшие исследования по применению различных криозащитных сред, возможно, смогут позволить хранить SCoV при положительных температурах более длительное время без потери инфекционной активности, что может быть полезно в случае использования в вакцинах аттенуированных штаммов.

3.12. Концентрирование и очистка вируса коронавирусного энтерита собак для получения гипериммунных сывороток от животных

Культивирование вируса в клеточных линиях сопряжено с добавлением в питательную среду фетальной сыворотки, что приводит к накоплению не только вирусного белка, но и большого количества балластных белков. Высокое содержание таких белков в сырье для изготовления вакцин и диагностических препаратов является недопустимым, так как негативно влияет на их свойства. В связи с этим получение концентрированного и очищенного вирусного антигена является обязательным условием для конструирования биопрепаратов надлежащего качества.

Существует большое количество различных способов концентрирования и очистки вирусной суспензии, выбираемых в зависимости от их эффективности в отношении конкретного вируса и поставленной цели [27]. В настоящее время широкое применение нашел комбинированный метод концентрирования вирусов путем осаждения полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000 Да (ПЭГ-6000) и последующей очисткой другими доступными способами. Данный метод был успешно использован различными авторами в работе с другими вирусами вида *Alphacoronavirus suis*, в частности, вирусами трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС) и инфекционного перитонита кошек (ИПК) [5, 18]. Однако, существенным недостатком ПЭГ-6000 является то, что он адсорбирует из растворов не только вирионы, но и клеточный дебрис, что сказывается на чистоте полученных препаратов и вызывает потерю агрегированного с клетками вируса, который не всегда удастся отделить от клеточных структур при последующей очистке дополнительными методами. Также полученные с использованием высоких концентраций ПЭГ-6000 препараты могут вызывать аллергические реакции при введении животным [26].

Исходя из вышесказанного, было принято решение не использовать для концентрирования штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак ПЭГ-

6000, а применить комбинированный метод высокоскоростного центрифугирования через слой 20% сахарозы.

Очищенную вирусную суспензию получали способом, подробно описанным в «Материалах и методах». Титр вируса коронавирусного энтерита собак до концентрирования составил $4,08 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, после концентрирования $5,92 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Степень очистки вирусной суспензии контролировали методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (ДСН).

Электрофореграмма представлена на рисунке 28.

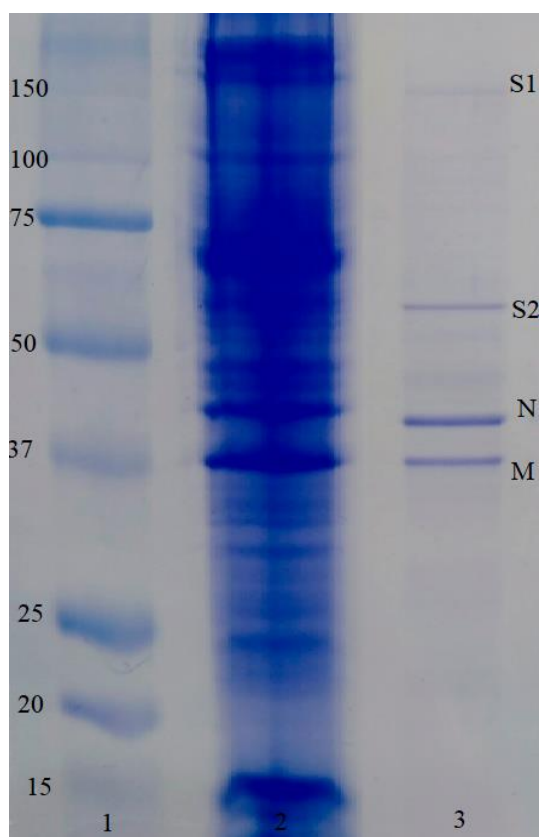


Рисунок 28 – Результаты электрофореза белков вируса коронавирусного энтерита
Примечание: 1 – маркер белков BioRad (указана молекулярная масса белков в кДа); 2 – культуральная суспензия CCoV до очистки; 3 – центрифугированный через слой 20% сахарозы препарат CCoV

На электрофореграмме вирусных белков выявлены полосы, соответствующие фракциям белков вируса коронавирусного энтерита собак: S1(субъединица)~150 кДа, S2 (субъединица) ~56 кДа, N ~ 43-45 кДа, M ~ 35 кДа.

Основным белком в полученном препарате является структурный белок N, остальные присутствуют в меньшем количестве. Следует отметить, что на электрофореграмме S-белок выявляется в виде субъединиц S1 и S2 с более низкой молекулярной массой, чем у белка S, что отмечалось и у других авторов [18, 32].

Полученный очищенный препарат штамма «Рич» CCoV после инактивации использовали для получения специфических сывороток крови морских свинок, пригодных в качестве контрольных в реакции нейтрализации (РН).

В данном опыте были испытаны две схемы иммунизации животных с целью сравнительной оценки эффективности схемы для получения сывороток крови с наиболее высоким титром в РН. Были сформированы три группы животных по 10 голов в каждой: две экспериментальные и контрольная. Антиген штамма «Рич» CCoV с титром до инактивации $5,92 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ вводили животным в объеме $0,25 \text{ см}^3$ с добавлением равного объема полного адьюванта Фрейнда (ПАФ), традиционно используемого для получения гипериммунных сывороток от животных или с добавлением неполного адьюванта Фрейнда (НАФ), рекомендованного производителем для бустерной иммунизации. Схемы иммунизации представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Характеристика схем иммунизации морских свинок для получения гипериммунных сывороток

Этап иммунизации	Объем антигена, см^3	Схема № 1	Схема № 2
1	2	3	4
1	0,25	Введение антигена с добавлением ПАФ в соотношении 1:1 подкожно паравертебрально в несколько точек	Введение антигена с добавлением ПАФ в соотношении 1:1 подкожно паравертебрально в несколько точек
2	0,25	Через 14 суток введение антигена с добавлением НАФ в соотношении 1:1 подкожно паравертебрально в несколько точек	Через 10 суток введение антигена с добавлением НАФ в соотношении 1:1 подкожно паравертебрально в несколько т

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4
3	0,25	Через 14 суток введение антигена с добавлением НАФ в соотношении 1:1 подкожно паравертебрально в несколько точек	Через 10 суток введение антигена с добавлением ПАФ в соотношении 1:1 подкожно паравертебрально в несколько точек
4	0,25	Интервал 14 суток	Через 10 суток введение антигена с добавлением НАФ в соотношении 1:1 подкожно паравертебрально в несколько точек
5	-	Обескровливание	Интервал 10 суток
6	-	-	Обескровливание

Полученные сыворотки исследовали в реакции нейтрализации (РН). Результаты применения обеих схем представлены в таблице 13.

Таблица 13– Титр антител в сыворотках крови морских свинок при различных схемах иммунизации

(n=3, p < 0,05)

№ схемы	Средний по группе титр антител до иммунизации (по данным РН), $\log_2 SN_{50}$ ($M \pm \sigma$)	Средний по группе титр антител после иммунизации (по данным РН), $\log_2 SN_{50}$ ($M \pm \sigma$)
1	<1,00	9,08±0,29
2	<1,00	8,17±0,14
Контроль (0,9% физиологический раствор)	<1,00	<1,00

Как видно из таблицы, титр ВНА в сыворотках крови морских свинок, иммунизированных с применением схемы № 1 был выше, чем в сыворотках крови морских свинок, иммунизированных по схеме № 2 (p < 0,05). Также следует отметить, что т.н. «адьювантная болезнь», характерная для использования крайне

реактогенного полного адъюванта Фрейнда (образование асептических абсцессов в местах введения, токсичность), была менее выражена у группы № 1. Однако, средний по группе титр антител у морских свинок был относительно невысоким при применении обеих схем иммунизации. Полученные сыворотки могут быть использованы внутри лаборатории в качестве контрольных положительных в серологических реакциях, что соответствует цели исследования, но не пригодны для конструирования средств пассивной иммунизации.

Сравнение с исследованиями других авторов, показало, что титр антител в сыворотках крови морских свинок в настоящем исследовании был несколько выше, чем в опытах Ольшанской А.А. [21]. Относительно слабая иммунная реактивность в ответ на введение антигена CCoV может быть связана с низкой видовой восприимчивостью лабораторных животных к данному вирусу. Данным автором был отмечен более высокий уровень ВНА при иммунизации щенков собак. Однако, в силу юридических и этических сложностей собаки являются неудачной моделью для получения гипериммунных сывороток, поэтому в качестве компромиссного варианта могут быть использованы козы. При иммунизации коз концентрированным материалом вируса коронавирусного энтерита собак штамма «Карат» Ольшанской А.А. были получены удовлетворительные результаты ($8,0-9,0 \log_2$ по данным РН), а большой объем сыворотки, который можно получить от данного вида животных, позволяет использовать ее для изготовления средств пассивной иммунизации [24].

Таким образом, в результате проведенных исследований были оптимизированы условия концентрирования и очистки штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак. Полученный очищенный и концентрированный материал CCoV был использован для получения гипериммунных сывороток крови морских свинок, пригодных для использования в качестве контрольных положительных в реакции нейтрализации.

3.13. Антигенные свойства ассоциированной вакцины против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак «Карникан-4»

На основании проведенных исследований иммунобиологических свойств штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак был включен в состав ассоциированной вакцины против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак («Карникан-4»). Вакцина состоит из лиофилизированного (сухого) и жидкого компонентов. Сухой компонент изготовлен из культуральной суспензии, полученной при репродукции вируса чумы плотоядных (CDV) в перевиваемой культуре клеток почки зеленой мартышки (КК Vero V), лиофильно высушенной с добавлением в качестве стабилизаторов желатина, сахарозы и гидролизата лактальбумина (ГЛА). Жидкий компонент изготовлен из культуральной суспензии перевиваемой линии клеток MDCK (почка собаки), инфицированной вирусом аденовируса собак 1 серотипа (CAV-1), и культуральной суспензии перевиваемой линии клеток CRFK (почка кошки), инфицированной вирусами парвовирусного (CPV-2) и коронавирусного энтерита собак, инактивированной 1-(2-аминоэтил) азиридином (15% димер этиленимина) с добавлением гидроокиси алюминия (ГОА) в качестве адъюванта.

Клинические исследования данной вакцины проходили на беспородных щенках в возрасте 2 месяцев в количестве 113 голов ($n=113$), из разных пометов, принадлежащих частным владельцам или содержащихся в приютах для животных. Щенков вакцинировали двукратно с интервалом 21 сутки внутримышечно в дозе 1,0 см³. Кровь для исследования у животных отбирали перед первой иммунизацией и через 14, 21, 28, 35 и 42 суток после нее. После вакцинации за животными устанавливали наблюдение в течение 10 суток для выявления возможных поствакцинальных реакций.

На рисунке 29 представлена динамика формирования гуморального иммунного ответа у щенков в ответ на иммунизацию вакциной «Карникан-4».

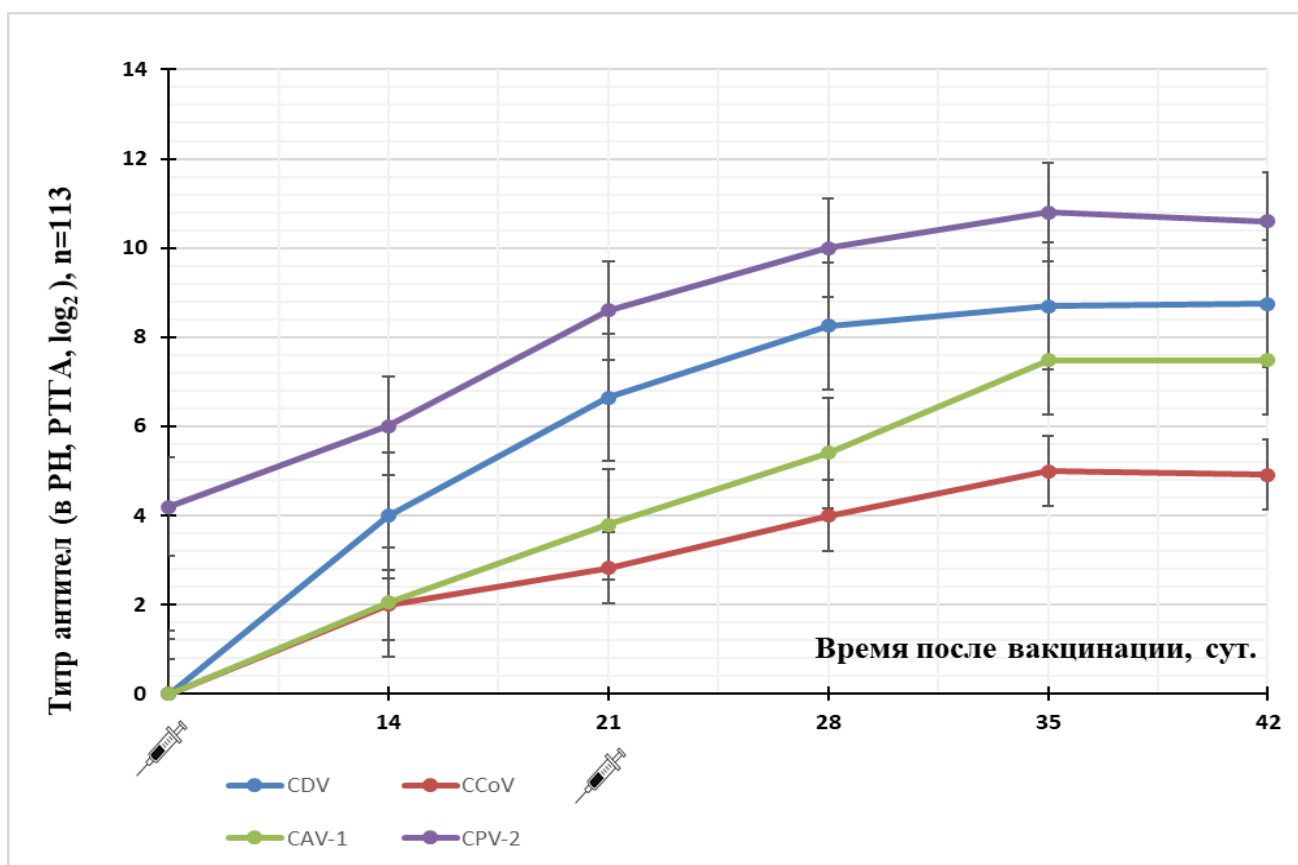


Рисунок 29 – Динамика формирования гуморального иммунного ответа у щенков на введение вакцины «Карникан-4»

Следует отметить, что до вакцинации все щенки были серонегативными к вирусам чумы плотоядных, аденовирусу 1 серотипа и коронавирусного энтерита по данным РН. К парвовирусу собак средние по группе значения вирусспецифических антител по данным РТГА определялись на уровне $4,2 \pm 0,23 \log_2$. После однократного введения вакцины наблюдался прирост титра гуморальных антител к вирусам чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовируса 1 серотипа на $2,0 \log_2$ и более уже на 14 сутки после иммунизации. В течение 7 суток до следующей иммунизации титры антител продолжали нарастать, и перед второй иммунизацией определялись на уровне $6,65 \pm 0,58 \log_2 \text{ SN}_{50}$ к вирусу чумы плотоядных, $2,83 \pm 0,12 \log_2 \text{ SN}_{50}$ к вирусу коронавирусного энтерита, $3,80 \pm 0,23 \log_2 \text{ SN}_{50}$ к аденовирусу 1 серотипа и $8,6 \pm 0,44 \log_2$ к вирусу парвовирусного энтерита. Титры антител ко всем четырем вирусам-компонентам вакцины также продолжали нарастать после бустерной вакцинации через 21 сутки. Установлено, что максимальных значений титры

антител достигали через 14 суток после повторной вакцинации. Значения титров антител на 35 и 42 сутки статистически значимых различий не имели ($p > 0,05$), что свидетельствовало о фазе стабилизации гуморального иммунного ответа в период с 35 по 42 сутки.

В течение 10 суток наблюдения температура тела у щенков оставалась в пределах физиологической нормы, не отмечалось уменьшения двигательной активности или снижения аппетита, клинических симптомов инфекций, из чего следует, что применяемая вакцина «Карникан-4» являлась безопасной для щенков.

Уровень антител после иммунизации к вирусу чумы плотоядных, парвовирусному энтериту, аденовирусу 1 серотипа был выше предполагаемого некоторыми исследователями титра антител, необходимого для защиты собак от данных инфекций. Так для вируса чумы плотоядных защитным титром является 1:16 ($4,0 \log_2$), для парвовирусного энтерита 1:80 ($6,3 \log_2$), для аденовируса 1 серотипа титр выше 1:4 ($2,0 \log_2$) [48, 75, 80]. Значения титров антител, полученные при вакцинации собак вакциной «Карникан-4», превышали данные показатели через 14 дней после бустерной вакцинации, что свидетельствует о высокой антигенной активности вакцины.

Уровень гуморальных антител к вирусу коронавирусного энтерита собак после вакцинации также был выше, чем предполагаемый в исследованиях некоторых авторов протективный уровень 1:4 ($2,0 \log_2$) [95]. Несмотря на то, что по другим литературным данным для защиты животного от заражения решающую роль играет секреторный иммуноглобулин (IgA) слизистой кишечника, а высокий уровень гуморальных антител в крови, определенный в РН, не всегда коррелирует с защитой при контрольном заражении, установлено, что сероконверсия позволяет избежать клинических проявлений болезни и существенно сократить время выделения возбудителя с фекалиями [1, 95, 100].

Наблюдение за животными продолжалось до следующей плановой вакцинации через 12 месяцев. Каждый месяц у щенков отбирали кровь и определяли уровень антител к вирусу чумы плотоядных, коронавирусному и

парвовирусному энтериту, аденовирусу 1 серотипа описанными выше методами. Результаты исследования отображены на рисунке 30.

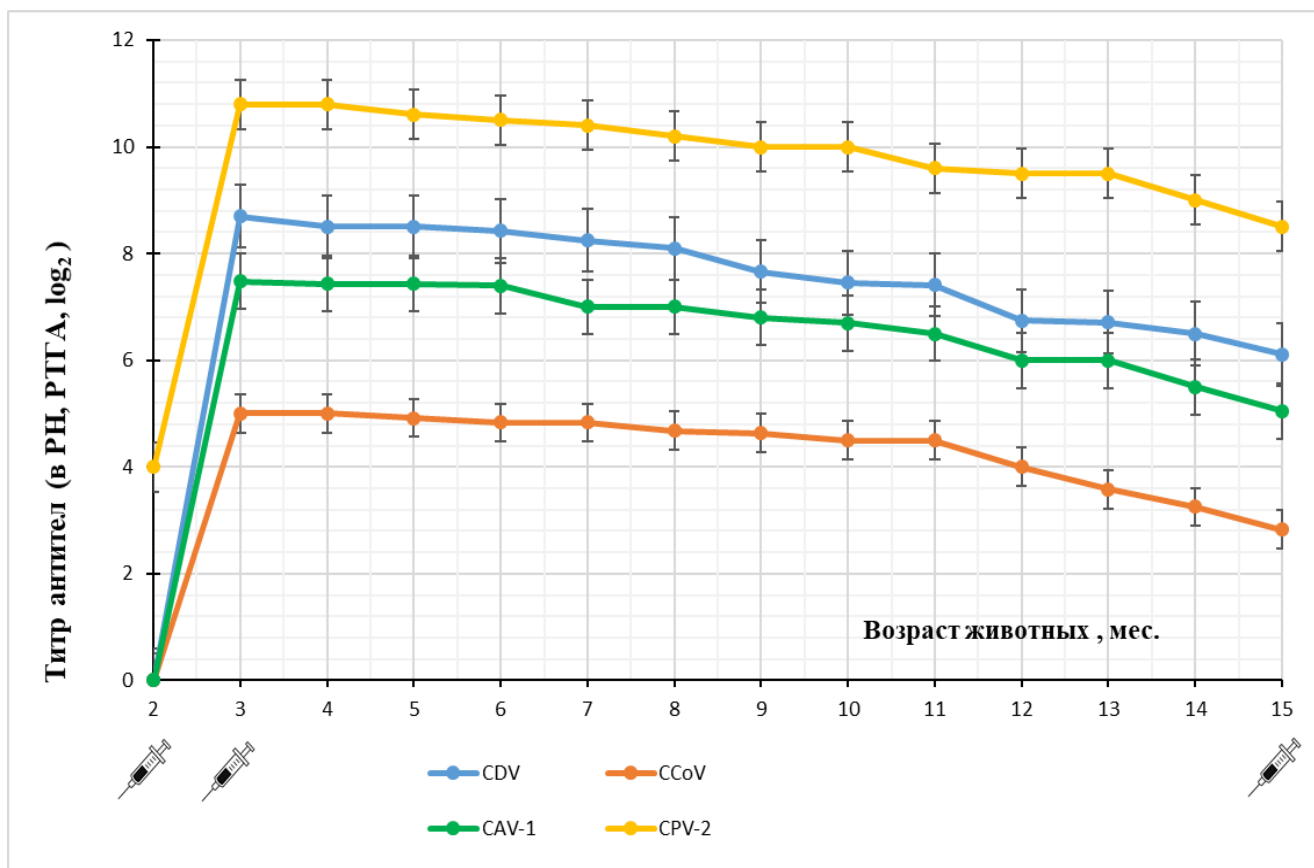


Рисунок 30 – Продолжительность иммунного ответа у собак на введение вакцины «Карникан-4»

Показано, что в течение 12 месяцев наблюдалось постепенное снижение уровня гуморальных антител к антигенам, входящим в состав вакцины. Через 12 месяцев средний по группе титр антител к вирусу чумы плотоядных составил $6,11 \pm 0,24 \log_2 \text{SN}_{50}$, к вирусу парвовирусного энтерита $8,5 \pm 0,54 \log_2$, к вирусу коронавирусного энтерита $2,83 \pm 0,11 \log_2 \text{SN}_{50}$, к аденовирусу 1 серотипа $5,05 \pm 0,22 \log_2 \text{SN}_{50}$. Однако, несмотря на снижение титров антител через 12 месяцев после вакцинации, он был выше предполагаемого исследователями титра антител, необходимого для защиты собак от данных инфекций.

Всемирная ветеринарная ассоциация мелких животных (WSAVA) не относит вакцинацию против коронавирусного энтерита к обязательным, но учитывая широкое распространение коронавируса собак в приютах и питомниках, а также

его генетическую пластичность и изменение вирулентности в сторону повышения, иммунизация вакцинами, содержащими в своем составе коронавирус собак, оказывает положительный эффект, предотвращая тяжелое течение инфекции, снижая распространение вируса, и показана щенкам, находящимся в группе риска [42, 93, 100, 146].

Таким образом, результаты проведенных исследований доказали, что вакцина против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак («Карникан-4») обладает выраженной антигенной активностью и вызывает формирование у щенков гуморального иммунного ответа через 14 суток после бустерной вакцинации, а продолжительность сероконверсии составляет 12 месяцев.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных диссертационных исследований позволили сделать следующие выводы.

4.1. Выводы

1. Выделенный из проб патологического материала изолят «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак был адаптирован к перевиваемым культурам клеток почки кошки (CRFK) и селезенки кошки (FS), при репродукции в которых его титр достигал значений $4,00 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $3,25 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно.

2. Определены оптимальные параметры культивирования изолята «Рич»: заражение конфлюэнтного монослоя культур клеток CRFK и FS дозой заражения (MOI) 0,01 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ и культивирование в течение 72 ч, а также добавление в поддерживающую питательную среду 10 мкг/мл трипсина и обогащение глутамином в концентрации 1-2% позволило получить вирусосодержащий материал с максимальным титром $4,92 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

3. Установлено, что при подкожном, интраперитонеальном и внутримышечном введении вирусосодержащего материала кроликам, хорькам и морским свинкам, штамм «Рич» коронавируса собак являлся апатогенным и индуцировал прирост вируснейтрализующих антител, определяемых в РН, через 14 суток после иммунизации, уровень которых достигал максимальных значений у всех трех видов животных на 21 сутки, и оставался на прежнем уровне на 28 - 35 сутки.

4. Изучена кинетика инаktivации вируса коронавирусного энтерита собак АЭЭИ и БПЛ. Установлено, что экспозиция с АЭЭИ в конечной концентрации 0,01% в течение 48 ч при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и экспозиция с БПЛ в конечной концентрации 0,01% в течение 7 ч при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$ обеспечивают инаktivацию вируса и сохранение его антигенных свойств.

5. Установлено, что штамм «Рич» обладает выраженными антигенными свойствами и вызывает у щенков собак и песцов прирост вируснейтрализующих антител, средний по группе титр которых на 21 сутки составил $4,02 \pm 0,25 \log_2 \text{SN}_{50}$ и $4,22 \pm 0,25 \log_2 \text{SN}_{50}$ соответственно.

6. Доказано, что штамм «Рич» патогенен для щенков собак. При воспроизведении инфекционного процесса у 100% зараженных животных регистрировали клинические признаки, характерные для коронавирусного энтерита собак.

7. На основании результатов экспериментального заражения и сравнительной оценки клинических профилей щенков, иммунизированных инаktivированным препаратом штамма «Рич» коронавируса собак, и щенков контрольной группы установлено, что данный штамм обладает выраженной иммуногенной активностью и может быть использован для разработки средств специфической профилактики.

8. Гипериммунизация морских свинок с использованием препаратов очищенного концентрированного антигена штамма «Рич» коронавируса собак, эмульгированного с полным и неполным адьювантами Фрейнда, обеспечивает получение сывороток с титром антител $9,08 \pm 0,29 \log_2 \text{SN}_{50}$, пригодных для использования в качестве контрольных положительных в реакции нейтрализации.

9. Двукратная иммунизация разработанной ассоциированной вакциной «Карникан-4», содержащей в своем составе штамм «Рич», индуцировала у щенков сероконверсию к вирусам чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусу 1 серотипа, продолжительность которой после бустерной вакцинации составляла 12 месяцев.

4.2. Практические предложения

В результате проведенных исследований охарактеризован и депонирован во Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ» под регистрационным номером

376 - деп / 22-10 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» новый производственно-контрольный штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак.

В соавторстве разработаны, одобрены Ученым советом и утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» следующие методические рекомендации: «Методические рекомендации по титрованию вируса коронавирусного энтерита собак микрометодом», «Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу коронавирусного энтерита собак в реакции нейтрализации микрометодом», «Методические рекомендации по выделению вируса коронавирусного энтерита собак в культуре клеток», «Методические рекомендации по получению гипериммунных сывороток к вирусу коронавирусного энтерита собак для использования в диагностических целях», «Методические рекомендации по очистке и концентрированию вируса коронавирусного энтерита собак», в настоящее время применяемые в лабораторной практике.

По результатам исследований разработаны два стандарта ФГБУ «ВНИИЗЖ»: СТО 00495527-0410 «Штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак производственный и контрольный»; СТО 00495527-0413 «Вакцина против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак «Карникан-4».

Штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак вошел в состав вакцины против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтерита, аденовирусной инфекции собак «Карникан-4» (регистрационное удостоверение 12-1-14.23-4993№ПВР-1-14.23/03815 от 10.11.23 г.).

4.3. Перспективы дальнейших исследований

Широкое распространение вируса коронавирусного энтерита собак, его быстрая эволюция, появление новых высоковирулентных штаммов требует дальнейших исследований по изучению их биологических свойств, а основным направлением практического применения полученной информации является

разработка актуальных средств диагностики и специфической профилактики данной инфекции. Так как инаktivированные вакцины против коронавирусного энтерита собак обладают определенными недостатками, перспективным является аттенуация штаммов классическим методом или с применением методов генной инженерии и разработка на их основе «живых» вакцин, способных защитить животных от инфицирования коронавирусом собак.

Другим перспективным направлением является конструирование диагностических тест-систем, позволяющих дифференцировать возбудителя коронавируса от других инфекций собак со схожим симптомокомплексом гастроэнтерита, например, иммуноферментных тест-систем на основе рекомбинантных белков-аналогов структурных белков коронавируса собак, а также разработка мультиплексной ПЦР для одновременного выявления нескольких распространенных в популяции собак инфекций.

5. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЭЭИ – аминоэтилэтиленимин

БПЛ – бета-пропиолактон

ВНА – вируснейтрализующие антитела

ВСМ – вируссодержащий материал

ГАЕ – гемагглютинирующие единицы

ГОА – гидроокись алюминия

ДСН – додецилсульфат натрия

ИФА – иммуноферментный анализ

ИХА – иммунохроматографический анализ

КК – культура клеток

МФА – метод флуоресцирующих антител

НАФ – неполный адъювант Фрейнда

ПААГ – полиакриамидный гель

ПАФ – полный адъювант Фрейнда

ПК – субкультура клеток почки котенка

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЩ – субкультура клеток почки щенка

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РНК – рибонуклеиновая кислота

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

СК – субкультура клеток селезенки котенка

СЩ – субкультура клеток селезенки щенка

ЭМ – электронная микроскопия

ВЕИ – бинарный этиленимин

ССоV – Canine coronavirus – вирус коронавируса энтерита собак

ICTV – Международный комитет по таксономии вирусов

МОИ – множественность заражения

SN – нейтрализация сыворотки

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антигенная активность усовершенствованной вакцины против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтерита, лептоспироза и бешенства собак Мультикан-8 / А. Н. Мухин, О. В. Остапчук, М. А. Лосич [и др.] // Ветеринария. – 2021. – № 3. – С. 8-13. – DOI: 10.30896/0042-4846.2021.24.3.08-14.
2. Биологические особенности коронавирусов сельскохозяйственных, домашних животных и птиц: сравнительная оценка характера вызываемых ими патологических процессов (обзор) / Х. З. Гаффаров, А. И. Яруллин, В. Г. Гумеров, И. Г. Каримуллина // Ветеринария сегодня. – 2022. – Т. 11, № 2. – С. 176-185. – DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-176-185.
3. Вангард Плюс 5 L4 CV инструкция по применению // АО «Видадь Рус»: [сайт]. – Москва, 2020. – URL: <https://www.vidal.ru/veterinar/vangard-plyus-5-l4-cv-30428> (дата обращения 21.09.2025). – Текст: электронный.
4. ВетЭксперт: [сайт]. – Москва, 2009. – URL: <https://vetexpert-rf.ru/> (дата обращения 21.09.2025.). – Текст: электронный.
5. Влияние некоторых физико-химических факторов на структуру и свойства вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней / А. П. Пономарев, О. С. Пузанкова, О. П. Бядовская [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2005. – Т. 3. – С. 261-272.
6. Всемирная ассоциация ветеринарии мелких животных: [сайт]. – Toronto, Канада, 2023. – URL: <https://wsava.org> (дата обращения 21.09.2025 г.). – Текст: электронный.
7. Диагностика и профилактика инфекционных болезней собак и кошек: руководство для практикующих ветеринарных врачей / Т. И. Алипер, Е. А. Непоклонов, А. Н. Мухин [и др.]; под ред. Т. И. Алипера. – Москва : ЗооВетКнига, 2017. – 300 с. – ISBN 978-5-9500581-0-3.
8. Епанчинцева, О. В. Оценка специфической профилактики при коронавирусном энтерите собак / О. В. Епанчинцева // Зыкинские чтения :

Материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина, Саратов, 28 апреля 2021 года. – Саратов : ООО «ЦеСАин», 2021. – С. 83-87.

9. Им Леап. Адаптация и культивирование коронавируса крупного рогатого скота : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук : 16.00.03 / Им Леап. – Киев, 1994. – 20 с. : ил.

10. Инструкция по применению тест-системы "КОРОНАВИР" для выявления и идентификации коронавирусов кошек и собак методом полимеразной цепной реакции [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.amplisens.ru/upload/iblock/60e/1fxekm869lryk2r9j2x6zfwk3bojvv5x/KORONAVIR.pdf> (дата обращения 18.06.2025).

11. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) / М. Ю. Щелканов, А. Ю. Попова, В. Г. Дедков [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10, № 2. – С. 221-246. DOI: 10.15789/2220-7619-NOI-1412.

12. Колесников, П. В. Сравнительные патоморфологические изменения при вирусных энтеритах у собак / П. В. Колесников, Т. М. Давудова // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса : Наука и высшее профессиональное образование. – 2017. – № 1(45). – С. 126-131.

13. Комарова, А. А. Сочетанные кишечные инфекции собак вирусной этиологии / А. А. Комарова, Т. С. Галкина // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2022. – Т. 18. – С. 284-297. – DOI 10.29326/9785907612136_2022_18_284.

14. Комиссарова, В. С. Коронавирусная инфекция собак / В. С. Комиссарова // Научный журнал молодых ученых. – 2021. – № 3(24). – С. 21-27.

15. Коронавирусные инфекции животных: вакцины и вакцинация / Б. Г. Орлянкин, А. Н. Власова, А. Н. Мухин, Т. И. Алипер // Ветеринария. – 2022. – № 6. – С. 3-7. – DOI: 10.30896/0042-4846.2022.25.6.03-07.

16. Лизвинский, Ю. Сочетанная корона и парвовирусная инфекция у щенков – потенциальная опасность для питомников / Ю. Лизвинский, Н. Гусева //

Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. – 2015. – № 6. – С. 49-51.

17. Международный комитет по таксономии вирусов: [сайт]. – URL: <https://ictv.global/taxonomy> (дата обращения 07.09.2026). – Текст: электронный.

18. Метод иммуноблоттинга для выявления антител к коронавирусу при диагностике инфекционного перитонита кошек / Ю. О. Терехова, В. В. Цибезов, Н. А. Рахманина, О. А. Верховский // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. – 2012. – № 4. – С. 26-28.

19. Методы лабораторной диагностики и профилактика коронавирусной инфекции / Ш. Ф. Бекмуродова, С. Ю. Жбанова, Д. М. Мирзоев, К. А. Одинаев // Доклады Таджикской академии сельскохозяйственных наук. – 2021. – № 4(70). – С. 58-63.

20. Михайлова-Кузьмина, А. В. Особенности ассоциативного течения корона и парвовирусного энтеритов у щенков кинологического центра пограничной службы Республики Беларусь / А. В. Михайлова-Кузьмина, А. А. Антонов // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. – 2011. – Т. 47, № 1. – С. 97-100.

21. Ольшанская, А. А. Биологические свойства и диагностика коронавирусного энтерита собак : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук : 03.00.06 / Ольшанская Алиса Алексеевна. – Москва, 1997. – 28 с. : ил.

22. Ольшанская, А. А. Диагностика и профилактика коронавирусной инфекции собак / А. А. Ольшанская // Ветеринарная патология. – 2006. – № 3(18). – С. 26-31.

23. Опыт масштабирования и интенсификации промышленного производства векторной аденовирусной вакцины Гам-КОВИД-Вак в лимитирующих условиях пандемии / А.Н. Морозов, И.Р. Яхин, Н.В. Стратонова [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2022. – Т. 22, №4. – С. 382-391. – DOI: 10.30895/2221-996X-2022-22-4-382-391.

24. Патент № 2100433 Российская Федерация, МПК C12N 7/00, A61K 39/215, A61K 39/42. Штамм Coronavirus Canine, используемый для контроля иммуногенной активности вакцин и получения сывороток для лечения и диагностики коронавирусной инфекции собак : № 96108623/13 : заявл. 29.04.1996 : опубл. 27.12.1997 / Ольшанская А. А., Уласов В. И., Захарова Е. Д.; заявитель Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. – 6 с.

25. Патент № 2211705 C1 Российская Федерация, МПК A61K 39/215, C12N 7/00. Вакцина против коронавирусного энтерита собак : № 2001134539/13 : заявл. 21.12.2001 : опубл. 10.09.2003 / Ольшанская А. А., Уласов В. И., Сазонкин В. Н.; заявитель Федеральное государственное учреждение Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов - центр качества ветеринарных препаратов и кормов. – 7 с.

26. Патент № 2535153 C1 Российская Федерация, МПК A61K 39/145 (2006.01), A61P 31/16 (2006.01), C12N 7/02 (2006.01). Способ получения высокоочищенных вирионных концентратов : № 2013140659 /15 : заявл. 04.09.2013 : опубл. 10.12.2014 / Трухин В.П., Петровский С.В., Иванова Н.Е., Лобзин Ю.В.; заявитель Федеральное государственное унитарное предприятие "Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов" Федерального медико-биологического агентства России (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России). – 10 с.

27. Петрова, И. Д. Концентрирование вирусов и электронная микроскопия / И. Д. Петрова, Б. Н. Зайцев, О. С. Таранов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24, № 3. – С. 276-283. – DOI 10.18699/VJ20.620.

28. Получение концентрированного очищенного препарата вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней и изучение его антигенных свойств / В. А. Сергеев, Г. Г. Рухадзе, Т. И. Алипер [и др.] // Вопросы Вирусологии. – 1987. – Т. 32, № 6. – С. 718-724.

29. Попова, В. М. Усовершенствование технологии изготовления и изучение свойств трипсина сухого для вирусологических целей : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук : 03.00.23 / Попова Вера Михайловна. – Москва, 1999. – 24 с.

30. Радзиховский, Н. Л. Гематологические и биохимические показатели крови собак, больных коронавирусом энтеритом / Н. Л. Радзиховский // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. – 2017. – Т. 19, № 77. – С. 170-173.

31. Радзиховский, Н. Л. Эпизоотологические особенности болезней собак, вызванных энтеровирусами / Н. Л. Радзиховский, О. В. Дышкант // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. – 2018. – Т. 54, № 2. – С. 51-55.

32. Разработка тест-системы для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотках крови восприимчивых животных / М. А. Волкова, Н. Г. Зиняков, П. С. Ярославцева [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2021. – № 2(37). – С. 97-102. – DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-97-102.

33. Сравнительная оценка компонентов иммунохроматографических тест-систем, используемых для их разработки / Д. Н. Смирнова, К. А. Крупина, Н. В. Богачева, И. В. Дармов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – №1. – С. 32-36.

34. Статистика: В РФ стало на 12 млн. больше домашних питомцев // Некоммерческая организация Союз предприятий зообизнеса: [сайт]. – Москва, 2021. – URL: <https://www.spzoo.ru/cntnt/default/n6702.html> (дата обращения 15.06.2025). – Текст: электронный.

35. Суханова, С. М. Трипсин. Свойства и применение в производстве биологических лекарственных препаратов / С. М. Суханова, Е. М. Петручук, А. А. Генералов // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – № 2.

36. Хайтович, А. Б. Коронавирусы (таксономия, структура вируса) / А. Б. Хайтович // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. –

2020. – Т. 10, № 3. – С. 69-81. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/koronavirusy-taksonomiya-struktura-virusa> (дата обращения: 10.02.2025).

37. Хастед, Д. Клиническая релевантность коронавируса у собак / Д. Хастед (David R. Hustead) // Ветеринарная клиника. – 2008. – № 11(78). – С. 25-26.

38. Чадаева, Анна Александровна. Получение и характеристика субкультур криобанка первично-трипсинизированных клеток, используемых в вирусологических целях : автореферат диссертации кандидата биологических наук : 1.5.6. / Чадаева Анна Александровна. – Лосино-Петровский, 2022. – 22 с.

39. Численность домашних питомцев в России за три года выросла на 11% // Федеральное государственное унитарное предприятие «Информационное телеграфное агентство России (ИТАР-ТАСС): [сайт]. – Москва, 2024. – URL: <https://tass.ru/novosti-partnerov/20499757> (дата обращения 15.06.2025). – Текст: электронный.

40. A comprehensive molecular survey of viral pathogens associated with canine gastroenteritis / A. Dema, M. R. Tallapally, V. K. Ganji [et al.] // Archives of Virology. – 2023. – Vol. 168, № 2. – P. 36. – DOI: 10.1007/s00705-022-05674-6.

41. A fast and simple one-step duplex PCR assay for canine distemper virus (CDV) and canine coronavirus (CCoV) detection / J. Wang, Y. Luo, L. Liang [et al.] // Archives of Virology. – 2018. – Vol. 163, № 12. – P. 3345-3349. – DOI: 10.1007/s00705-018-3982-8.

42. A one health perspective on canine coronavirus: A wolf in sheep's clothing? / A. Buonavoglia, F. Pellegrini, N. Decaro [et al.] // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11, № 4. – P. 921. – DOI: 10.3390/microorganisms11040921.

43. A pantropic canine coronavirus genetically related to the prototype isolate CB/05 / N. Decaro, V. Mari, M. von Reitzenstein [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2012. – Vol. 159, № 1-2. – P. 239-244. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.03.039.

44. Abdelgadir, A. Susceptibility of different cell lines to the novel canine coronavirus CCoV-HuPn-2018 / A. Abdelgadir, A. N. Vlasova, G. C. Gray // Influenza Other Respir Viruses. – 2021. – Vol. 15, № 6. – P. 824-825. – DOI: 10.1111/irv.12882.

45. Adaptive evolution of the fox coronavirus based on genome-wide sequence analysis / C. Feng, Y. Liu, G. Lyu [et al.] // *BioMed Research International*. – 2022. – Vol. 2022, № 1. – P. e9627961. – DOI: 10.1155/2022/9627961.
46. Aetiological role of viruses in puppies with diarrhoea / K. Yeşilbağ, Z. Yilmaz, A. Ozkul, A. Pratelli // *Veterinary Record*. – 2007. – Vol. 161, № 5. – P. 169-170. – DOI: 10.1136/vr.161.5.169.
47. An outbreak of canine coronavirus in puppies in a Greek kennel / V. Ntafis, V. Mari, S. Danika [et al.] // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2010. – Vol. 22, № 2. – P. 320-323. – DOI: 10.1177/104063871002200231.
48. Antibody Response to Canine Adenovirus-2 Virus Vaccination in Healthy Adult Dogs / M. Bergmann, M. Freisl, Y. Zablotzki [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 10. – P. 1198. – DOI:10.3390/v12101198.
49. Appel, M. J. Forty years of canine vaccination / M. J. Appel // *Advances in Veterinary Medicine*. – 1999. – Vol. 41. – P. 309-324. – DOI: 10.1016/s0065-3519(99)80023-8.
50. Appel, M. J. Virus infections of Carnivores; edited by M. J. Appel. – Amsterdam, The Netherlands : Elsevier Science Publishers, 1987. – 400 pp. – ISBN: 0-444-42709-0.
51. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs / C. Buonavoglia, N. Decaro, V. Martella [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 12, № 3. – P. 492-494. – DOI: 10.3201/eid1203.050839.
52. Canine coronavirus induces apoptosis in cultured cells / A. Ruggieri, L. Di Trani, I. Gatto [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2007. – Vol. 121, № 1-2. – P. 64-72. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.12.016.
53. Canine coronavirus infection in dogs in Turkey: Virological and serological evidence / O. Avci, O. Bulut, O. Yapici [et al.] // *Indian Journal of Animal Research*. – 2016. – Vol. 50, № 4. – P. 565-568. – DOI:10.18805/ijar.11173.
54. Canine coronavirus infection in Turkish dog population / K. Yeşilbağ, Z. Yilmaz, S. Torun, A. Pratelli // *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious*

Diseases and Veterinary Public Health. – 2004. – Vol. 51, № 7. – P. 353-355. – DOI: 10.1111/j.1439-0450.2004.00773.x.

55. Canine coronavirus infections in Japan: virological and epidemiological aspects / C. Bandai, S. Ishiguro, N. Masuya [et al.] // Journal of Veterinary Medical Science. – 1999. – Vol. 61, № 7. – P. 731-736. – DOI: 10.1292/jvms.61.731.

56. Canine coronavirus subtype 2a associated with outbreaks of fatal diarrhea in bush dog (*Speothos venaticus*) groups / H. Rowland, E. Holding, P. M. Falces [et al.] // Schweizer Archiv für Tierheilkunde. – 2021. – Vol. 164, № 10. – P. 661-671. – DOI: 10.17236/sat00320.

57. Characterisation of the canine faecal virome in healthy dogs and dogs with acute diarrhoea using shotgun metagenomics / P. S. Moreno, J. Wagner, C. S. Mansfield [et al.] // PLOS One. – 2017. – Vol. 12, № 6. – P. e0178433. – DOI: 10.1371/journal.pone.0178433.

58. Characterization of canine coronavirus spread among domestic dogs in Vietnam / D. Dung van Nguyen, Y. Terada, S. Minami [et al.] // Journal of Veterinary Medical Science. – 2017. – Vol. 79, № 2. – P. 343-349. – DOI: 10.1292/jvms.16-0538.

59. Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil / L. D. Pinto, I. N. Barros, R. F. Budaszewski [et al.] // Veterinary Journal. – 2014. – Vol. 202, № 3. – P. 659-662. – DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.09.006.

60. 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. – DOI: 10.1111/tbed.13542.

61. Clinical and molecular aspects of veterinary coronaviruses / S. E. Colina, M. S. Serena, M. G. Echeverría, G. E. Metz // Virus Research. – 2021. – Vol. 297. – P. e 198382.

62. Clinical, hematological, and biochemical findings in puppies with coronavirus and parvovirus enteritis / T.X. Castro, R. C. Cubel Garcia, L. P. Gonçalves [et al.] // Canadian Veterinary Journal. – 2013. – Vol. 54, № 9. – P. 885-888. – PMID: 24155496.

63. Cloning and expression of two fragments of the S gene of canine coronavirus type I / A. Pratelli, G. Elia, N. Decaro [et al.] // The Journal of Virological Methods. – 2004. – Vol. 117, № 1. – P. 61-65. – DOI: 10.1016/j.jviromet.2003.12.003.

64. Co-Circulation of canine coronavirus I and IIa/b with high prevalence and genetic diversity in heilongjiang province, Northeast China / X. Wang, C. Li, D. Guo [et al.] // PLOS One. – 2016. – Vol. 11, № 1. – P. e0146975. – DOI: 10.1371/journal.pone.0146975.
65. Comparative sensitivity of cell cultures to canine coronavirus clinical isolates / M. Radzyhovskyi, O. Dyshkant, I. Sokulskyi [et al.] // Scientific and Technical Bulletin of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives and Institute of Animal Biology. – 2024. – Vol. 25, № 2. – P. 112-119. – DOI:10.36359/scivp.2024-25-2.14.
66. Comparative survey of canine parvovirus, canine distemper virus and canine enteric coronavirus infection in free-ranging wolves of central Italy and south-eastern France / B. Molnar, C. Duchamp, K. Möstl [et al.] // European Journal of Wildlife Research. – 2014. – Vol. 60, № 4. – P. 613-624. – DOI: 10.1007/s10344-014-0825-0.
67. Comparison of the prevalence of enteric viruses in healthy dogs and those with acute haemorrhagic diarrhoea by electron microscopy / B. S. Schulz, C. Strauch, R. S. Mueller [et al.] // Journal of Small Animal Practice. – 2008. – Vol. 49, № 2. – P. 84-88. – DOI: 10.1111/j.1748-5827.2007.00470.x.
68. Compatibility between a rabies vaccine and two canine combined vaccines against canine distemper, adenovirolosis, parvovirolosis, parainfluenza virus disease and leptospirosis, with or without canine coronavirus / J. C. Thibault, J. Bouvet, L. Cupillard [et al.] // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 2022. – Vol. 86. – P. e101803. DOI: 10.1016/j.cimid.2022.101803.
69. Coronavirus infections in companion animals: virology, epidemiology, clinical and pathologic features / C. Haake, S. Cook, N. Pusterla, B. Murphy // Viruses. – 2020. – Vol. 12, № 9. – P. 1023. – DOI: 10.3390/v12091023.
70. Coronavirus infections of animals: future risks to humans / I. M. Donnik, I. V. Popov, S. V. Sereda [et al.] // Biology Bulletin. – 2021. – Vol. 48, № 1. – P. 26-37. – DOI: 10.1134/S1062359021010052.

71. Coronaviruses: Troubling Crown of the Animal Kingdom / A. S. Gozalo, T. S. Clark, D. M. Kurtz // *Computers in Medicine*. – 2023. – Vol. 73, № 1. – P. 6-44. – DOI: 10.30802/AALAS-CM-21-000092.

72. Cross sectional and longitudinal surveys of canine enteric coronavirus infection in kennelled dogs: a molecular marker for biosecurity / J. Stavisky, G. L. Pinchbeck, A. J. German [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2012. – Vol. 12, № 7. – P. 1419-1426. – DOI: 10.1016/j.meegid.2012.04.010.

73. Decaro, N. An update on canine coronaviruses: Viral evolution and pathobiology / N. Decaro, C. Buonavoglia // *Veterinary Microbiology*. – 2008. – Vol. 132, № 3-4. – P. 221-234. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.06.007.

74. Decaro, N. Canine coronavirus: not only an enteric pathogen / N. Decaro, C. Buonavoglia // *Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practic.* – 2011. – Vol. 41, № 6. – P. 1121-1132. – DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.07.005.

75. Decaro, N. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? / N. Decaro, C. Buonavoglia, V.R. Barrs // *Veterinary Microbiology*. – 2020. – Vol. 247. – P. 108760. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2020.108760.

76. Detection and genetic characterization of canine parvoviruses and coronaviruses in southern Ireland. / S. McElligott, P. J. Collins, R. D. Sleator [et al.] // *Archives of Virology*. – 2011. – Vol. 156, № 3. – P. 495-503. – DOI: 10.1007/s00705-010-0861-3.

77. Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrheic dogs in Japan / T. Soma, T. Ohinata, H. Ishii, [et al.] // *Research in Veterinary Science*. – 2011. – Vol. 90, № 2. – P. 205-207. – DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.05.027.

78. Detection of canine coronaviruses genotype I and II in raised Canidae animals in China / Y. Wang, G. Ma, C. Lu, H. Wen // *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*. – 2006. – Vol. 119, № 1-2. – P. 35-39. – PMID: 16450706.

79. Diagnosis of canine coronavirus infection using nested-PCR / A. Pratelli, D. Buonavoglia, V. Martella [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2000. – Vol. 84, № 1. – P. 91-94. – DOI: 10.1016/s0166-0934(99)00134-2.

80. Duration of antibodies elicited by canine distemper virus vaccinations in dogs / P. Olson, H. Finnsdóttir, B. Klingeborn, A. Hedhammar // *The Veterinary record*. – 1997. – Vol. 141, № 25. – P. 654-655. – PMID:9466386.
81. Efficacy of an inactivated canine coronavirus vaccine in pups / A. Pratelli, A. Tinelli, N. Decaro [et al.] // *New Microbiologica*. – 2003. – Vol. 26, № 2. – P. 151-155. – PMID: 12737196.
82. Efficacy of an inactivated vaccine against clinical disease caused by canine coronavirus / R. Fulker, T. Wasmoen, R. Atchison [et al.] // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 1995. – Vol. 380. – P. 229-234. – DOI:10.1007/978-1-4615-1899-0_37.
83. Enterite da coronavirus del cane: caratterizzazione del virus isolato / F. Marsilio, A. Pratelli, G. Elia, L. Ricci // *Veterinaria*. – 2002. – Vol. 16, № 2. – P. 59-62.
84. Enteropathogen infections in canine puppies: (Co-) occurrence, clinical relevance and risk factors / M. Duijvestijn, L. Mughini-Gras, N. Schuurman [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2016. – Vol. 195. – P. 115-122. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.09.006.
85. Enteropathogens identified in dogs entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea / T. Tupler, J. K. Levy, S. J. Sabshin [et al.] // *Journal of the American Veterinary Medical Association*. – 2012. – Vol. 241, № 3. – P. 338-343. – DOI: 10.2460/javma.241.3.338. PMID: 22812470.
86. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine coronavirus and its antibody in dogs / K. Tuchiya, T. Horimoto, M. Azetaka [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 1991. – Vol. 26, № 1-2. – P. 41-51. – DOI: 10.1016/0378-1135(91)90040-m.
87. Epidemiological investigation of canine coronavirus infection in Chinese domestic dogs: A systematic review and data synthesis / B. Dong, X. Zhang, J. Bai [et al.] // *Preventive Veterinary Medicine*. – 2022. – Vol. 209. – P. e105792. – DOI: 10.1016/j.prevetmed.2022.105792.
88. Epidemiology and molecular diagnosis of canine coronavirus in Egypt: evaluation of different tests used for its diagnosis / R. A. Awad, S. Ali Hassan, A. G.

Attallah, W. K. B. Khalil // *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. – 2019. – Vol. 23, № 4. – DOI: 10.15547/bjvm.2019-0024.

89. Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA PetAid hospitals / S. A. Godsall, S. R. Clegg, J. H. Stavisky [et al.] // *Veterinary Record*. – 2010. – Vol. 167, № 6. – P. 196-201. – DOI: 10.1136/vr.c3095.

90. Erles, K. Sequence analysis of divergent canine coronavirus strains present in a UK dog population / K. Erles, J. Brownlie // *Virus Research*. – 2009. – Vol. 141, № 1. – P. 21-25. – DOI: 10.1016/j.virusres.2008.12.009.

91. Establishment of a quadruplex RT-qPCR for the detection of canine coronavirus, canine respiratory coronavirus, canine adenovirus type 2, and canine norovirus / K. Shi, Y. Shi, Y. Shi [et al.] // *Pathogens*. – 2024. – Vol. 13, № 12. – P. 1054. – DOI: 10.3390/pathogens13121054.

92. Establishment of an indirect ELISA-based method involving the use of a multiepitope recombinant S protein to detect antibodies against canine coronavirus / Y. F. Hao, S. H. Li, G. Z. Zhang [et al.] // *Archives of Virology*. – 2021. – Vol. 166, № 7. – P. 1877-1883. – DOI: 10.1007/s00705-021-05072-4.

93. Etiology and genetic evolution of canine coronavirus circulating in five provinces of China, during 2018-2019 / H. J. He, W. Zhang, J. Liang [et al.] // *Microbial Pathogenesis*. – 2020. – Vol. 145. – P. e104209. – DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104209.

94. European surveillance for pantropic canine coronavirus / N. Decaro, N. Cordonnier, Z. Demeter [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2013. – Vol. 51, № 1. – P. 83-88. – DOI: 10.1128/JCM.02466-12.

95. Evaluating a canine coronavirus vaccine through antigen extinction and challenge studies / B. G. Edwards, R. H. Fulker; W. M. Acree; H. J. Koonse // *Veterinary Medicine*. – 1985. – Vol. 80, № 11. – P. 28-33.

96. Evermann, J. F. Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection / J. F. Evermann, J. R. Abbott, S. Han // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2005. – Vol. 17, № 6. – P. 610-614. – DOI: 10.1177/104063870501700618.

97. Experimental infection of dogs with a novel strain of canine coronavirus causing systemic disease and lymphopenia / N. Decaro, M. Campolo, A. Lorusso [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2008. – Vol. 128, № 3-4. – P. 253-260. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.10.008
98. Experimental study of tropism in cultivated canine coronavirus in the small intestine of puppies / L. Goralskii, N. Radzikhovsky, O. Dyshkant [et al.] // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. – 2019. – Vol. 10, № 4. – P. 489-496. – DOI: 10.15421/021972.
99. Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium / A. Zicola, S. Jolly, E. Mathijs [et al.] // *Journal of Small Animal Practice*. – 2012. – Vol. 53, № 5. – P. 297-300. – DOI: 10.1111/j.1748-5827.2011.01178.x.
100. Fecal immunoglobulin A antibodies in dogs infected or vaccinated with canine coronavirus / N. Decaro, A. Pratelli, A. Tinelli [et al.] // *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. – 2004. – Vol. 11, № 1. – P. 102-105. – DOI: 10.1128/cdli.11.1.102-105.2004.
101. Full-length genome analysis of canine coronavirus type I / N. Decaro, V. Mari, G. Elia [et al.] // *Virus Research*. – 2015. – Vol. 210. – DOI: 10.1016/j.virusres.2015.07.018.
102. Genotypic characterization of canine coronaviruses associated with fatal canine neonatal enteritis in the United States / B.N. Licitra, G.R. Whittaker, E.J. Dubovi, G.E. Duhamel // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2014. – Vol. 52, № 12. – P. 4230-4238. – DOI: 10.1128/JCM.02158-14.
103. Gulersoy, E. Clinical manifestation of canine Coronavirus enteritis and intestinal intussusception as its complication / E. Gulersoy, U. Yavuz, K. Yener // *Exploratory Animal and Medical Research*. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 111-116. – DOI:10.52635/eamr/13.1.111-116.
104. Gür, S. A Serologic investigation for canine corona virus infection in individually reared dogs in central anatolia / S. Gür, A. Gencay, N. Dogan // *Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University*. – 2008. – Vol. 5, № 2. – P. 67-71.

105. Identification and phylogenetic analysis of two canine coronavirus strains / J. Gan, Y. Tang, H. Lv [et al.] // *Animal Diseases*. – 2021. – Vol. 1, № 1. – P. 10. – DOI: 10.1186/s44149-021-00013-9.
106. Identification of a canine coronavirus in Australian racing Greyhounds / C. S. Smith, M. F. Lenz, K. Caldwell, J. Oakey // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2022. – Vol. 34, № 1. – P. 77-81. – DOI: 10.1177/10406387211054819.
107. Identification of enteric viruses circulating in a dog population with low vaccine coverage / C. D. B. T. Alves, O. F. O. Granados, R. D. F. Budaszewski [et al.] // *Journal of Basic Microbiology*. – 2018. – Vol. 49, № 4. – P. 790-794. – DOI: 10.1016/j.bjm.2018.02.006.
108. Identification of pantropic canine coronavirus in a wolf (*Canis lupus italicus*) in Italy / F. Alfano, G. Dowgier, M. P. Valentino [et al.] // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2019. – Vol. 55, № 2. – P. 504-508. – DOI: 10.7589/2018-07-182.
109. Immunogenicity and protective efficacy in dogs of an MF59™-adjuvanted vaccine against recombinant canine/porcine coronavirus / N. Decaro, V. Mari, R. Sciarretta [et al.] // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29, № 11. – P. 2018-2023. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.028.
110. Isolation and identification of a canine coronavirus strain from giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) / F. S. Gao, G. X. Hu, X. Z. Xia [et al.] // *Journal of Veterinary Science*. – 2009. – Vol. 10, № 3. – P. 261-263. – DOI: 10.4142/jvs.2009.10.3.261.
111. Isolation of a novel recombinant canine coronavirus from a visitor to haiti: further evidence of transmission of coronaviruses of zoonotic origin to humans / J. A. Lednicky, M. S. Tagliamonte, S. K. White [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2022. – Vol. 75, № 1. – P. 1184-1187. – DOI: 10.1093/cid/ciab924.
112. Isolation, tissue distribution and molecular characterization of two recombinant canine coronavirus strains / V. Ntafis, V. Mari, N. Decaro [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2011. – Vol. 151, № 3-4. – P. 238-244. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.03.008.

113. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – VOL. 227. – P. 680-685. – DOI:10.1038/227680a0.
114. Le Poder, S. Feline and canine coronaviruses: common genetic and pathobiological features / S. Le Poder // *Advances in Virology*. – 2011. – Vol. 2011, № 11. – P. e609465. – DOI: 10.1155/2011/609465.
115. Licitra, B. N. Canine enteric coronaviruses: emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins / B. N. Licitra, G. E. Duhamel, G. R. Whittaker // *Viruses*. – 2014. – Vol. 6, № 8. – P. 3363-3376. – DOI: 10.3390/v6083363.
116. M gene analysis of canine coronavirus strains detected in Korea / S. Y. Jeoung, S. Y. Ann, H. T. Kim, D. Kim // *Journal of Veterinary Science*. – 2014. – Vol. 15, № 4. – P. 495-502. – DOI: 10.4142/jvs.2014.15.4.495.
117. Ma, G. Two genotypes of Canine coronavirus simultaneously detected in the fecal samples of healthy foxes and raccoon dogs / G. Ma, C. Lu // *Acta Microbiologica Sinica*. – 2005. – Vol. 45, № 2. – P. 305-308.
118. Maclachlan, N. J. Fenner's veterinary virology (5th edition) / N. J. Maclachlan, E. J. Dubovi, 2017. – [S. I.] : Elsevier Science. – 528 pp. – ISBN 978-0-12-800946-8.
119. Martin, M. L. Canine coronavirus enteritis and a recent outbreak following modified live virus vaccination / M. L. Martin // *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. – 1985. – Vol. 7, № 12. – P. 1012-1017.
120. Mochizuki, M. An enzyme-linked immunosorbent assay using canine coronavirus-infected CRFK cells as antigen for detection of anti-coronavirus antibody in cat / M. Mochizuki, H. Furukawa // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. – 1989. – Vol. 12, № 4. – P. 139-146. – DOI: 10.1016/0147-9571(89)90062-3.
121. Molecular and serological surveillance of canine enteric viruses in stray dogs from Vila do Maio, Cape Verde / P. Castanheira, A. Duarte, S. Gil [et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 91. – DOI: 10.1186/1746-6148-10-91.

122. Molecular characterisation of the virulent canine coronavirus CB/05 strain / N. Decaro, V. Martella, G. Elia [et al.] // *Virus Research*. – 2007. – Vol. 125, № 1. – P. 54-60. – DOI: 10.1016/j.virusres.2006.12.006.

123. Molecular characterization confirms the presence of a divergent strain of canine coronavirus (UWSMN-1) in Australia. / M. J. Naylor, C. S. Walia, S. McOrist [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002. – Vol. 40, № 9. – P. 3518-3522. – DOI: 10.1128/JCM.40.9.3518-3522.2002.

124. Molecular characterization of a canine coronavirus NA/09 strain detected in a dog's organs / V. Ntafis, E. Xylouri, V. Mari [et al.] // *Archives of Virology*. – 2012. – Vol. 157, № 1. – P. 171-175. – DOI: 10.1007/s00705-011-1141-6.

125. Molecular characterization of canine coronaviruses: an enteric and pantropic approach / M. O. Timurkan, H. Aydin, E. Dincer, N. Coskun // *Archives of Virology*. – 2021. – Vol. 166, № 1. – P. 35-42. – DOI: 10.1007/s00705-020-04826-w.

126. Molecular characterization of the FCoV-like canine coronavirus HLJ-071 in China / Z. Tian, Q. Pan, M. Zheng [et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2021. – Vol. 17, № 1. – P. 364. – DOI: 10.1186/s12917-021-03073-8.

127. Molecular diversity of Alphacoronavirus 1 in dogs and cats in Colombia / N. F. Santana-Clavijo, D. P. Reyes Romero, D. F. Arango Fajardo [et al.] // *Heliyon*. – 2020. – Vol. 6, № 7. – P. e04381. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04381.

128. Molecular survey of parvovirus, astrovirus, coronavirus, and calicivirus in symptomatic dogs / R. Zobba, S. Visco, F. Sotgiu [et al.] // *Veterinary Research Communications*. – 2021. – Vol. 45, № 1. – P. 31-40. – DOI: 10.1007/s11259-020-09785-w.

129. Multiplex PCR methods for detection of several viruses associated with canine respiratory and enteric diseases / X. Hao, R. Liu, Y. He [et al.] // *PLOS One*. – 2019. – Vol. 14, № 3. – P. e0213295. – DOI: 10.1371/journal.pone.0213295.

130. Novel canine coronavirus isolated from a hospitalized patient with pneumonia in East Malaysia / A. N. Vlasova, A. Diaz, D. Damtie [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2022. – Vol. 74, № 3. – P. 446-454. – DOI: 10.1093/cid/ciab456.

131. Outbreak of severe vomiting in dogs associated with a canine enteric coronavirus, United Kingdom / A. D. Radford, D. A. Singleton, C. Jewell [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 27, № 2. – P. 517-528. – DOI: 10.3201/eid2702.202452.

132. Parkhe, P. Evolution, interspecies transmission, and zoonotic significance of animal coronaviruses / P. Parkhe, S. Verma // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2021. – Vol. 8. – P. e719834. – DOI: 10.3389/fvets.2021.719834.

133. Pathology of coronavirus infections: A review of lesions in animals in the one-health perspective / V. Zappulli, S. Ferro, F. Bonsembiante [et al.] // *Animals*. – 2020. – Vol. 10, № 12. – P. 2377. – DOI: 10.3390/ani10122377.

134. Patent № 4,567,043 United States, Int. Cl. A61K 39/12 Canine coronavirus vaccine : № 504,434 : register 15.06.1983 : published 28.01.1986 / Acree W. M., May Edwards B., Black J. W. ; assignee American Home Products Corporation (Del.), New York – 12 pp..

135. Patent № 4,904,468 United States, Int. Cl. A61K 39/12, C12N 7/00 Canine coronavirus vaccine : № 59,437 : register 08.06.1987 : published 27.02.1990 / Gill M. A., May S. W. ; assignee Norden Laboratories, Inc., Lincoln Nebr. – 8 pp..

136. PCR assay for the detection and the identification of atypical canine coronavirus in dogs / A. Pratelli, A. Tinelli, N. Decaro [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2002. – Vol. 106, № 2. – P. 209-213. – DOI: 10.1016/s0166-0934(02)00165-9.

137. Phylogeny, Evolution, and Transmission Dynamics of Canine and Feline Coronaviruses: A Retro-Pro prospective Study / H. Yang, Q. Peng, Y. Lang [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. e850516. – DOI: 10.3389/fmicb.2022.850516.

138. Pratelli, A. Canine coronavirus inactivation with physical and chemical agents / A. Pratelli // *Veterinary Journal*. – 2008. – Vol. 177, № 1. – P. 71-79. – DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.03.019.

139. Pratelli, A. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis / A. Pratelli // *Veterinary Research*. – 2006. – Vol. 37, № 2. – P. 191-200. – DOI: 10.1051/vetres:2005053.

140. Pratelli, A. High-cell-passage canine coronavirus vaccine providing sterilising immunity / A. Pratelli // *Journal of Small Animal Practice*. – 2007. – Vol. 48, № 10. – P. 574-578. – DOI: 10.1111/j.1748-5827.2007.00416.x.

141. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel / A. B. Gizzi, S. T. Oliveira, C. M. Leutenegger [et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2014. – Vol. 10. – P. 23. – DOI: 10.1186/1746-6148-10-23.

142. Prevalence and genetic diversity of canine coronavirus in northeastern China during 2019-2021. / N. Li, Y. Bai, R. Liu [et al.] // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 94. – P. e101956. – DOI: 10.1016/j.cimid.2023.101956.

143. Prevalence of canine coronavirus (CCoV) in dog in Japan: detection of CCoV RNA and retrospective serological analysis / T. Takano, S. Yamashita, M. Murata-Ohkubo [et al.] // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2016. – Vol. 78, № 2. – P. 341-345. – DOI: 10.1292/jvms.15-0347.

144. Prevalence of canine coronavirus and canine parvovirus infection in diarrheic puppies / R. Iemura, R. Tsukatani, J. Nonaka [et al.] // *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*. – 2013. – Vol. 66, № 1. – P. 61-64. – DOI:10.12935/jvma.66.61.

145. Prevalence of canine coronavirus antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay in dogs in the south of Italy / A. Pratelli, G. Elia, V. Martella [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2002. – Vol. 102, № 1-2. – P. 67-71. – DOI: 10.1016/s0166-0934(01)00450-5.

146. Prevalence of canine enteric coronavirus in a cross-sectional survey of dogs presenting at veterinary practices / J. Stavisky, G. L. Pinchbeck, A. J. German [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2010. – Vol. 140, № 1-2. – P. 18-24. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.07.012.

147. Prolonged depletion of circulating CD4⁺ T lymphocytes and acute monocytosis after pantropic canine coronavirus infection in dogs / M. Marinaro, V. Mari, A. L. Bellacicco [et al.] // *Virus Research*. – 2010. – Vol. 152, № 1-2. – P. 73-78. – DOI: 10.1016/j.virusres.2010.06.006.

148. Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR / N. Decaro, A. Pratelli, M. Campolo [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2004. – Vol. 119, № 2. – P. 145-150. – DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.03.012.

149. Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe / N. Decaro, V. Mari, G. Elia [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 16, № 1. – P. 41-47. – DOI: 10.3201/eid1601.090726.

150. Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of Swine are circulating in dogs / N. Decaro, V. Mari, M. Campolo [et al.] // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83, № 3. – P. 1532-1537. – DOI: 10.1128/JVI.01937-08.

151. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea / L. N. Binn, E. C. Lazar, K. P. Keenan [et al.] // *Proceedings, Annual Meeting of the United States Animal Health Association*. – 1974. – Vol. 78. – P. 359-366. – PMID: 4377955.

152. Reddy, G. S. Development of canine coronavirus vaccine / G. S. Reddy, V. A. Srinivasan // *Indian veterinary journal*. – 2001. – Vol. 78, № 2. – P. 98-100.

153. Risk factors of weaning diarrhea in puppies housed in breeding kennels / A. Grellet, S. Chastant-Maillard, C. Robin [et al.] // *Preventive Veterinary Medicine*. – 2014. – Vol. 117, № 1. – P. 260-265. – DOI: 10.1016/j.prevetmed.2014.07.016.

154. Safety and efficacy of a modified-live canine coronavirus vaccine in dogs / A. Pratelli, A. Tinelli, N. Decaro [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2004. – Vol. 99, № 1. – P. 43-49. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.07.009.

155. Sanchez-Morgado, J. M. Molecular characterization of a virulent canine coronavirus BGF strain / J. M. Sanchez-Morgado, S. Poynter, T. H. Morris // *Virus Research*. – 2004. – Vol. 104, № 1. – P. 27-31. – DOI: 10.1016/j.virusres.2004.02.038.

156. Serologic response of captive coyotes (*Canis latrans* Say) to canine parvovirus and accompanying profiles of canine coronavirus titers / J. S. Green, M. L. Bruss, J. F. Evermann, P. K. Bergstrom // *Journal of Wildlife Diseases*. – 1984. – Vol. 20, № 1. – P. 6-11. – DOI: 10.7589/0090-3558-20.1.6.

157. Serologic survey for canine coronavirus in adult dogs / S. J. Ahn, S.-Y. Jeoung, S.-I. Pak, D. Kim // *Journal of Veterinary Clinics*. – 2007. – Vol. 24, № 4. – P. 493–498.

158. Serologic survey for canine coronavirus in wolves from Alaska / R. L. Zarnke, J. Evermann, J. M. Ver Hoef [et al.] // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2001. – Vol. 37. – P. 740-745. – DOI: 10.7589/0090-3558-37.4.740.

159. Serological prevalence of canine respiratory coronavirus in southern Italy and epidemiological relationship with canine enteric coronavirus / S. L. Priestnall, A. Pratelli, J. Brownlie, K. Erles // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2007. – Vol. 19, № 2. – P. 176-180. – DOI: 10.1177/104063870701900206.

160. Serological survey on canine coronavirus antibodies in giant pandas by virus neutralization test / Q. Jun, X. Xian-Zhu, Y. Song-Tao [et al.] // *Journal for Research*. – 2004. – Vol. 15, № 4. – P. 295-297. – DOI: 10.1007/BF02844956.

161. Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infections by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus / A. Pratelli, V. Martella, G. Elia [et al.] // *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. – 2001. – Vol. 48, № 5. – P. 385-392. – DOI: 10.1046/j.1439-0450.2001.00466.x.

162. Stevenson-Leggett, P. Treatment with exogenous trypsin expands in vitro cellular tropism of the avian coronavirus infectious bronchitis virus / P. Stevenson-Leggett, S. Keep, E. Bickerton // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 10. – P. 1102. – DOI: 10.3390/v12101102.

163. Tekelioglu, B. K. Seroepidemiological and clinicopathological investigation of canine coronavirus infection in dogs, in Türkiye / B. K. Tekelioglu // *Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology*. – 2022. – Vol. 10, № 10. – P. 1884-1892. – DOI:10.24925/turjaf.v10i10.1884-1892.5375.

164. The effect of protected areas on pathogen exposure in endangered African wild dog (*Lycaon pictus*) populations / K. C. Prager, J. A. K. Mazet, L. Munson [et al.] // *Biological Conservation*. – 2012. – Vol. 150, № 1. – P. 15-22. – DOI: 10.1016/j.biocon.2012.03.005.

165. The knotty biology of canine coronavirus: A worrying model of coronaviruses' danger / A. Pratelli, M. Tempesta, G. Elia [et al.] // *Research in Veterinary Science*. – 2022. – Vol. 144. – P. 190-195. – DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.11.014.

166. The use of enzyme-linked immunosorbent assay systems for serology and antigen detection in parvovirus, coronavirus and rotavirus infections in dogs in The Netherlands / G. F. Rimmelzwaan, J. Groen, H. Egberink [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 1991. – Vol. 26, № 1-2. – P. 25-40. – DOI: 10.1016/0378-1135(91)90039-i.

167. Tizard, I. R. Vaccination against coronaviruses in domestic animals / I. R. Tizard // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 38, № 33. – P. 5123-5130. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.06.026.

168. Trypsin enhances SARS-CoV-2 infection by facilitating viral entry / Y. Kim, G. Jang, D. Lee [et al.] // *Archives of Virology*. – 2022. – Vol. 167, № 2. – P. 441-458. – DOI: 10.1007/s00705-021-05343-0.

169. Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in the fecal samples of dogs with diarrhea / A. Pratelli, N. Decaro, A. Tinelli [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – Vol. 42, № 4. – P. 1797-1799. – DOI: 10.1128/JCM.42.4.1797-1799.2004.

170. Wang, L. Animal coronaviruses; edited by L. Wang. – New York, USA : Springer, 2016. – 218 pp. – ISBN 9781493934126.

171. Wesley, R. D. The S gene of canine coronavirus, strain UCD-1, is more closely related to the S gene of transmissible gastroenteritis virus than to that of feline infectious peritonitis virus / R. D. Wesley // *Virus Research*. – 1999. – Vol. 61, № 2. – P. 145-152. – DOI: 10.1016/s0168-1702(99)00032-5.

172. Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs / N. Decaro, C. Desario, M. Billi [et al.] // *Veterinary Journal*. – 2011. – Vol. 187, № 2. – P. 195-199. – DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.10.027.

173. Wilson, R. B. A neurologic syndrome associated with use of a canine coronavirus-parvovirus vaccine in dogs / R. B. Wilson, J. A. Holladay, J. S. Cave //

Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. – 1986. – Vol. 8, № 2. – P. 117-123.

174. Woods, R. D. Cultivation techniques for animal coronaviruses: emphasis on feline infectious peritonitis virus, canine coronavirus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine hemagglutinating encephalomyelitis / R. D. Woods, R. D. Wesley // Journal of Tissue Culture Methods. – 1988. – Vol. 11, № 2. – P. 95-100. – DOI: 10.1007/BF01404139.

175. Woods, R. D. Studies of enteric coronaviruses in a feline cell line / R. D. Woods // Veterinary Microbiology. – 1982. – Vol. 7, № 5. – P. 427-435. – DOI: 10.1016/0378-1135(82)90059-1.

176. Zhou, Z. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order / Z. Zhou, Y. Qiu, X. Ge // Animal Diseases. – 2021. – Vol. 1, № 1. – P. 5. – DOI: 10.1186/s44149-021-00005-9.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А (обязательное)

Справка о депонировании штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак для целей патентной процедуры





Россельхознадзор

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья.
Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы,
Центральной Азии и Закавказья. Референтная лаборатория МЭБ по высокопатогенному гриппу птиц, низкопатогенному
гриппу птиц и болезни Ньюкасла. Референтный центр ФАО по ящуру.

600901, Россия, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец,
т.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arrish@fsps.gov.ru, сайт: www.arrish.ru
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

« 30 » 08 20 22 г.

СПРАВКА №376 - деп / 22-10
о депонировании штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак
для целей патентной процедуры

Форма депонирования: «Национальное патентное депонирование».

Авторы штамма: Т.С. Галкина, А.А. Комарова, О.Г. Яшина.

Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вирус коронавирусного энтерита собак выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из проб патологического материала (тонкий отдел кишечника), полученного от щенка собаки центра животных ВООО ЦЖ «Валента» г. Владимира Владимирской области РФ в 2021 г.

Штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак получен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2021 г. при проведении научно-исследовательской работы путем пассирования выделенного вируса в перевиваемой культуре клеток почки кошки (КК CrFk) методом предельных разведений.

Штамм предложен в качестве производственно-контрольного.

Таксономия вируса: сфера *Riboviria*, царство *Orthornavirae*, тип *Pisuviricota*, класс *Pisoniviricetes*, отряд *Nidovirales*, подотряд *Cornidovirineae*, семейство *Coronaviridae*, подсемейство *Orthocoronavirinae*, род *Alphacoronavirus*, подрод *Tegacovirus*, вид *Alphacoronavirus 1*.

Депозитарий: Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрьевец).

Регистрационный номер: № 376 - деп / 22-10 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Дата депонирования штамма: 02 августа 2021 г.

Срок хранения штамма в депозитарии: до 01.2032 г.

Заместитель директора ФГБУ «ВНИИЗЖ» _____

Руководитель Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ» _____

П.И. Косырев

С.А. Похвальный

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТЛОВА Л.В.

Приложение Б (обязательное)

Паспорт на штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак

	Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР) Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру. Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья. Референтный центр ФАО по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии																			
Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ»																				
ПАСПОРТ № 492																				
исходного посевного коллекционного материала производственно-контрольного штамма «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак (пассаж № 2 в перевиваемой культуре клеток почки кошки (KK CrFk) от 30.06.2021 г.; лиофилизат от 07.07.2021 г.)																				
Информация о штамме																				
1.	Данные депозитария	Депозитарий: Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ». Форма депонирования: «Национальное патентное депонирование». Регистрационный номер: № 376 - деп / 22-10 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ». Дата депонирования штамма: 02.08.2021 г. Срок хранения штамма в депозитарии: до 01.2032 г.																		
2.	Таксономия вируса	<table style="width: 100%;"> <tr><td>сфера</td><td><i>Riboviria</i></td></tr> <tr><td>царство</td><td><i>Orthornavirae</i></td></tr> <tr><td>тип</td><td><i>Pisuviricota</i></td></tr> <tr><td>класс</td><td><i>Pisoniviricetes</i></td></tr> <tr><td>отряд</td><td><i>Nidovirales</i></td></tr> <tr><td>семейство</td><td><i>Coronaviridae</i></td></tr> <tr><td>подсемейство</td><td><i>Orthocoronavirinae</i></td></tr> <tr><td>род</td><td><i>Alphacoronavirus</i></td></tr> <tr><td>вид</td><td><i>Alphacoronavirus 1</i></td></tr> </table>	сфера	<i>Riboviria</i>	царство	<i>Orthornavirae</i>	тип	<i>Pisuviricota</i>	класс	<i>Pisoniviricetes</i>	отряд	<i>Nidovirales</i>	семейство	<i>Coronaviridae</i>	подсемейство	<i>Orthocoronavirinae</i>	род	<i>Alphacoronavirus</i>	вид	<i>Alphacoronavirus 1</i>
сфера	<i>Riboviria</i>																			
царство	<i>Orthornavirae</i>																			
тип	<i>Pisuviricota</i>																			
класс	<i>Pisoniviricetes</i>																			
отряд	<i>Nidovirales</i>																			
семейство	<i>Coronaviridae</i>																			
подсемейство	<i>Orthocoronavirinae</i>																			
род	<i>Alphacoronavirus</i>																			
вид	<i>Alphacoronavirus 1</i>																			
3.	Область использования штамма	штамм предложен в качестве производственно-контрольного.																		
4.	Источник, метод, дата и место выделения	Вирус коронавирусного энтерита собак выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из проб патологического материала (тонкий отдел кишечника), полученного от щенка собаки центра животных ВООО ЦЖ «Валента» г. Владимира Владимирской области РФ в 2021 г. Штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак получен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2021 г. при проведении научно-исследовательской работы путем пассирования выделенного вируса в перевиваемой культуре клеток почки кошки (KK CrFk) методом предельных разведений.																		
5.	Авторы штамма	Т.С. Галкина, А.А. Комарова, О.Г. Яшина																		
6.	Депозитор	ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец).																		
Информация о посевном материале штамма																				
1.	Пассажный уровень	Пассаж № 2 в KK CrFk от 30.06.2021 г. Предшествующие пассажи: 1 пассаж в KK CrFk от 23.06.2021 г.																		
2.	Форма материала	лиофилизат																		
3.	Объем фасовки	1,0 см ³ во флаконе																		
4.	Объем серии	100 флаконов																		
5.	Количество первичных упаковок, передаваемых на хранение в ГКШМ	10 флаконов																		

КОПИЯ ПЕРВИЧНОЙ

УЧЕНЫМ СЕКРЕТАРЬ

ПРОХВАТИЛ

П. П. Б.



600901, Россия, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец

тел.: (4922) 26-06-14, тел./факс: (4922) 26-38-77

E-mail: mail@arriah.ru

6.	Маркировка первичной упаковки	ФГБУ «ВНИИЗЖ» Вирус коронавирального энтерита собак, шт. «Рич» пассаж № 2 в КК CrFk от 30.06.2021 г. лиофилизат от 07.07.2021 г., объем фасовки 1 см ³
7.	Способ и условия для длительного хранения материала	Температура хранения материала не выше минус (45±5)°С. Контроль технологических показателей проводят при закладке на хранение и далее с периодичностью один раз в пять лет. Срок хранения исходного вирусного материала – не ограничен. Допускается однократное вскрытие флакона. В случае, если инфекционная активность (при соблюдении всех остальных нормативов) будет ниже 3,0 lg ТЦД ₅₀ /см ³ , то проводят возобновление штамма (его пассирование на КК почки кошки «CRFK») с последующей проверкой на соответствие нормативам технологических показателей и повторной закладкой на хранение согласно требованиям СТО 00495527-0410.
8.	Требования при транспортировке	Материал транспортируют в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08. Продолжительность транспортировки не более 8 ч при температуре не выше минус (20±2)°С.
9.	Средства дезинфекции, %, экспозиция	Хлорамин Б 3% - 30 мин.; перекись водорода 3%-30 мин.; этиловый спирт 75% - 1 мин.; дезэфект 0,8%-60 мин.; микроцид – 5 мин.; мирадез 0,2% - 60 мин.

**Показатели качества исходного посевного коллекционного материала
производственно-контрольного штамма «Рич» вируса коронавирального энтерита собак
(пассаж № 2 в перевиваемой культуре клеток почки кошки (КК CrFk) от 30.06.2021 г.;
лиофилизат от 07.07.2021 г.) согласно требованиям СТО 00495527-0410-2021**

Внешний вид	нарушение целостности емкости	отсутствует
	структура и цвет материала	сухая однородная пористая масса светло-бежевого цвета
	механические примеси, изменение структуры или цвета материала	отсутствует
Наличие вакуума во флаконах при проверке аппаратом типа Д'Арсонваль		фиолетово-синее свечение (вакуум во флаконах в наличии)
Растворимость, мин. не более		3
Массовая доля влаги, %, не более		4
Контаминация бактериями (в т.ч. микоплазмами) и грибами		отсутствует
Контаминация вирусами		отсутствует
Генетическая идентификация и филогенетическое родство штамма		Выявление СCoV с помощью ОТ-ПЦР-РВ
Инфекционная активность		3,0 lg ТЦД ₅₀ /см ³

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходный посевной коллекционный материал производственно-контрольного штамма «Рич» вируса коронавирального энтерита собак (пассаж № 2 в перевиваемой культуре клеток почки кошки (КК CrFk) от 30.06.2021 г.; лиофилизат от 07.07.2021 г.) соответствует требованиям СТО 00495527-0410-2021.

Дата следующего контроля посевного материала штамма: 08.2026 г.

Заместитель директора по НИР и развитию

А.В. Кононов
02.08.2021 г.

Руководитель ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.А. Похвальный
02.08.2021 г.

Заведующий лабораторией профилактики болезней мелких домашних животных

Т.С. Галкина
02.08.2021 г.

600901, Россия, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевск

КОПИЯ ВЕРНА 2022-08-08 14:35 факс: (4922) 26-38-77

учёный секретарь
ПРОХВАТИЛОВА Л. В.



Приложение В
(обязательное)

Патент на штамм «Рич» вируса коронавирусного энтерита собак

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2796988

**Штамм "Рич" вируса коронавирусного энтерита собак
для изготовления биопрепаратов для диагностики и
специфической профилактики коронавирусного
энтерита собак**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Федеральный центр охраны здоровья
животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ") (RU)*

Авторы: *Галкина Татьяна Сергеевна (RU), Комарова Анна
Александровна (RU), Доронин Максим Игоревич (RU)*

Заявка № 2022121294
Приоритет изобретения **03 августа 2022 г.**
Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **30 мая 2023 г.**
Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **03 августа 2042 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕБНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



Приложение Г
(обязательное)

**Патент на ассоциированную вакцину против чумы плотоядных,
парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции
собак**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2806164

**Ассоциированная вакцина против чумы плотоядных,
парвовирусного и коронавирусного энтеритов,
аденовирусной инфекции собак**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Федеральный центр охраны здоровья
животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ") (RU)*

Авторы: *Галкина Татьяна Сергеевна (RU), Комарова Анна
Александровна (RU), Климова Анастасия Антоновна (RU),
Доронин Максим Игоревич (RU), Ручнова Ольга Ивановна
(RU)*

Заявка № 2022131183
Приоритет изобретения 29 ноября 2022 г.
Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 26 октября 2023 г.
Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 29 ноября 2042 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности
Ю.С. Зубов

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕБНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОБАКИНОВА



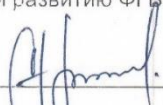
Приложение Д
(обязательное)

СТО 00495527-0410-2021 «Штаммы вируса коронавирусного энтерита собак
производственные и контрольные»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора
по НИР и развитию ФГБУ «ВНИИЗЖ»


« 22 » _____ 2021 г.

А.В. Кононов

УТВЕРЖДАЮ

Начальник службы качества
ФГБУ «ВНИИЗЖ»



В. Константинов

« _____ » _____ 2021 г.

СТАНДАРТ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

ШТАММЫ ВИРУСА КОРОНАВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК
ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ И КОНТРОЛЬНЫЕ.

МЕТОДЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И КОНТРОЛЯ ПОСЕВНЫХ
МАТЕРИАЛОВ

СТО 00495527-0410-2021

Технические условия

Владимир
2021

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. В.



СТО-00495527-0410-2021

ОКС 11.220

ОКПД 2 21.10.60.197

Ключевые слова: Образцы штаммов ССoV в виде ГПМ или РПМ, вирусодержащая суспензия КК, отсутствие контаминации, генетическая идентификация, титр инфекционной активности штаммов ССoV

Руководитель разработки:

Заведующий лабораторией профилактики болезней мелких домашних животных


 подпись

Т.С. Галкина

Исполнители:

Ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных


 подпись

А.А. Комарова

Ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней мелких домашних животных


 подпись

А.М. Киселев

В.н.с. лаборатории профилактики ящура


 подпись

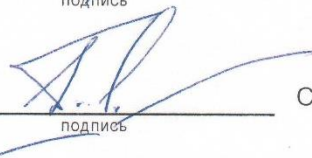
М.И. Доронин

Согласовано:
Начальник ОБТК (ИЛ)


 подпись

Е.А. Яснева

Руководитель Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных


 подпись

С.А. Похвальный

Начальник ОУК


 подпись

М.П. Чепурная

Заведующий лабораторией профилактики ящура


 подпись

Д.В. Михалишин

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



Приложение Е
(обязательное)

СТО 00495527-0413-2023 Вакцина против чумы плотоядных, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, аденовирусной инфекции собак «Карникан-4»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО
Заместитель Руководителя
Федеральной службы по
ветеринарному и фитосанитарному
надзору



К.А. САВЕНКОВ

25 МАЙ 2023

УТВЕРЖДАЮ
Начальник отдела управления
качеством ФГБУ «ВНИИЗЖ»



М.П. Чепурная

«01» сентября 2023 г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

СТАНДАРТ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

**ВАКЦИНА ПРОТИВ ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ, ПАРВОВИРУСНОГО
И КОРОНАВИРУСНОГО ЭНТЕРИТОВ, АДЕНОВИРУСНОЙ
ИНФЕКЦИИ СОБАК**

«КАРНИКАН-4»

СТО 00495527-0413-2023

Технические условия

Владимир
2023

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



СТО 00495527-0413-2023

ОКС 11.220

ОКПД2 21.2021.139

Ключевые слова: вакцина, чума плотоядных, парвовирусный энтерит, коронавирусный энтерит, аденовирусная инфекция 1 серотипа, иммунизация, собаки, живая, лиофилизированная, сорбированная, инактивированная, стерильность, безвредность, антигенная активность.

**Руководитель
разработки:**

Заведующий лабораторией профилактики
болезней мелких домашних животных

 Т.С. Галкина

**Ответственные
исполнители:**

Ведущий ветеринарный врач лаборатории
профилактики болезней мелких домашних животных

 А.А. Комарова

Исполнители:

Аспирант лаборатории профилактики
болезней мелких домашних животных

 А.А. Климова

Согласованно:

Начальник отдела
управления качеством

 М.П. Чепурная

Руководитель испытательной
лаборатории ветпрепаратов

 Е.А. Яснева

Заместитель начальника отдела
управления качеством

 М.Г. Суровцева



Приложение Ж
(обязательное)

**Методические рекомендации по титрованию вируса коронавирусного
энтерита собак микрометодом**

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора по НИР
ФГБУ «ВНИИЗЖ»
И.А. Чвала
2022 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ТИТРОВАНИЮ ВИРУСА КОРОНАВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК
МИКРОМЕТОДОМ

Авторы: Комарова А.А.
Галкина Т.С.
Киселев А.М.
Климова А.А.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 03
от «31» мая 2022 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 05
от «14» июня 2022 г.

Владимир 2022

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л.Б.



Приложение И
(обязательное)

**Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу
коронавирусного энтерита собак в реакции нейтрализации микрометодом**

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр
охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора

М.А. Чвала

2022 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ВЫЯВЛЕНИЮ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КОРОНАВИРУСНОГО
ЭНТЕРИТА СОБАК В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ МИКРОМЕТОДОМ

Авторы: Комарова А.А.
Галкина Т.С.
Климова А.А.
Киселев А.М.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 04
от «16» сентября 2022

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 06
от «18» октября 2022

Владимир 2022

КОПИЯ ВЕРНА
учёный секретарь
ПРОХВАТЛОВА Л.Б.



Приложение К
(обязательное)

**Методические рекомендации по выделению вируса коронавирусного
энтерита собак в культуре клеток**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И
ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора по НИР
И.А. Чвала
«11» сентября 2024 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ВЫДЕЛЕНИЮ ВИРУСА КОРОНАВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА
СОБАК В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Авторы: Комарова А.А.
Галкина Т.С.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 05
от «30» августа 2024 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 05
от «11» сентября 2024 г.

Владимир 2024

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Д.Б.



Приложение Л (обязательное)

Методические рекомендации по получению гипериммунных сывороток к вирусу коронавирального энтерита собак для использования в диагностических целях

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И
ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по НИР

ФГБУ «ВНИИЗЖ»

_____/ А. Чвала

« 29 » _____ 2024 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОЛУЧЕНИЮ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК К ВИРУСУ КОРОНАВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

Авторы: Комарова А.А.
Галкина Т.С.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 07
от «28» ноября 2024 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 07
от «29» ноября 2024 г.

Владимир 2024



Приложение М
(обязательное)

**Методические рекомендации по очистке и концентрированию вируса
коронавирусного энтерита собак**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ
НАДЗОРУ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)



Заместитель директора по НИР
И.А. Чвала
2024 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ОЧИСТКЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЮ ВИРУСА
КОРОНАВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК

Авторы: Комарова А.А.
Галкина Т.С.
Оковытая Т.В.
Харитоновна А.А.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 08
от «20» декабря 2024 г.

Рассмотрено учёным советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 08
от «25» декабря 2024 г.

КОПИЯ ВЕРН
учёный секретарь
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



Владимир 2024