

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСА SARS-COV-2, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ СОБАКИ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Садикалиева С.О., Шаяхметов Е.А., Абай Ж.С., Нурпейсова А.С., Шораева К.А. Омуртай А.Д., Копеев С.К., Наханов А.К., Терейбай А.А., Мырзахметова Б.Ш., Кожабергенов Н.С., Абдураимов Е.О.

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (НИИПББ)

*Eraly.Shax@gmail.com

АННОТАЦИЯ

В данной статье представлены результаты исследований биологических проб (смывов в количестве 28 проб), взятые от собак на территории Алматинской области Республики Казахстан в рамках мониторинговых исследований вируса SARS-COV-2 среди домашних животных.

Полученные пробы были проанализированы с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени, где семь проб детектировались в пределах циклов 25-37. Далее данные пробы были культивированы в культуру клеток Vero для выделения вируса.

В результате репродукции на культуре клеток Vero, была получена вирусная суспензия одного изолята с биологической активностью $5,83 \pm 0,08 \text{ IgTЦД}_{50} / \text{см}^3$. Электронная микроскопия подтвердила морфологию вирионов, схожие с семейством *Coronaviridae*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что домашние питомцы также могут болеть коронавирусной инфекцией COVID-19 и являться переносчиками данного заболевания.

Ключевые слова: биологические пробы, вирус SARS-COV-2, ПЦР анализ, РНК, домашние животные, культура клеток Vero, электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Информация о путях распространения SARS-CoV-2 среди животных ограничена. Однако, как и в случае других респираторных вирусов, по-видимому, он передается животным и между животными при прямом контакте (например, воздушно-капельным путем). SARS-CoV-2 обнаруживали в секретах из респираторного тракта и в фекалиях [1-5].

Коронавирус представляют собой группу родственных РНК-вирусов, вызывающих заболевания среди людей, животных и птиц. Пандемия COVID-19 в последнее время стала одной из самых тревожащих и обсуждаемых тем. Один из самых острых вопросов COVID-19 с самого начала распространения инфекции заключался в том, болеют ли животные этой разновидностью коронавируса [6].

Первый случай заражения домашнего животного вирусом SARS-CoV-2, как и первый случай с человеком, обнаружился в Китае. Вскоре в Гонконге ещё одна собака и кошка дали положительный результат в тестировании на SARS-CoV-2. Первый прецедент в Европе зарегистрирован в Бельгии: в конце марта коронавирусом заразилась домашняя кошка. Симптомы появились спустя неделю после возвращения хозяина из Италии [7, 8]. Согласно данным Всемирной организации по охране здоровья животных в мае 2021 года более 280 животных из 25 стран дали положительный результат на SARS-CoV-2. Виды животных восприимчивых на вирус SARS-CoV-2 включают: кошек, собак, хорьков, горилл, львов, норку, снежных барсов, пум, выдр и тигров [8- 10].

Для того, чтобы изучить распространение вируса SARS-CoV-2 среди животных и установить эволюционную связь от человека к контактному животному и наоборот, необходимо проводить ряд исследований таких как:

выделение вируса и культивирование, изучение биологических и физико-химических свойств новых вирусов, выделенных от животных.

В этой связи казахстанскими учеными были исследованы чувствительность различных клеточных линий к вирусу SARS-Cov-2. В исследованиях были использованы 11 различных клеточных линий первичного и перевиваемого происхождения. В результате исследований установлено, что из 11 испытанных культур клеток наиболее чувствительным к вирусу SARS-CoV-2 оказалась культура клеток Vero [11].

Поэтому, оптимизация культивирования вируса на культуре клеток Vero требует внимания и дальнейшего продолжения дополнительных исследовательских работ по этому направлению.

Таким образом, целью настоящей работы является изучение **биологических** свойств выделенного вируса SARS-Cov-2 из биологических проб, выделенных от собак с подтверждением наличия вируса SARS-CoV-2 методом электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ*Отбор проб и транспортировка.*

Отбор проб от собак с клиническими признаками коронавирусного энтерита собак осуществлялось однократно и в соответствии с требованиями нормативных правовых актов, действующих на территории Республики Казахстан, а также специалистами соблюдены порядок и правила биологической безопасности при проведении отбора проб (защитная одежда, очки, перчатки, дезинфицирующие средства, укладка и пр.) [12].

При получении смывов обеспечивалась надёжная фиксация животных. Отбор смывов из полости носа, рото-

глотки, прямой кишки и конъюнктивы осуществлялась сухими стерильными ватными тампонами из слизистой оболочки животного. Во время экспедиции смывы хранились в жидком азоте.

Клинические образцы. В данной работе для выделения вируса были использованы 28 клинических образцов (смывы из рта, из прямой кишки, из носа и из глаз), полученные из 7 больных собак находящиеся в пункте временного содержания животных (ПВС) г. Алматы. Пробы были взяты сотрудниками НИИПББ и были доставлены в лабораторию НИИПББ, соблюдая международные и отечественные требования биобезопасности при транспортировке клинических образцов [13-15].

ПЦР анализ для выявления вируса SARS-Cov-2 из биологических проб животных.

Выделение тотальной РНК проводилось набором «ALPREP» с использованием метода магнитной сорбции согласно протоколу производителя [16].

Качественное выявление SARS-CoV-2 проводилось с использованием набора «ALSENSE-SARS-CoV-2 –RT-qPCR» методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, согласно инструкции производителя [17].

Выделение вируса на культуре клеток. Для получения культуральной биомассы вируса, культуру клеток Vero (ATCC® CRL-1586™) выращенных в культуральных флаконах площадью поверхности 25 см² с полным плотным монослоем, заражают посевным вирусом в объеме 0,5 мл. Перед заражением культуры клеток вирусом, удаляют ростовую питательную среду, промывают монослой клеток трехкратно раствором Хенкса и наносят на него посевной вирус в объеме, указанным выше. Зараженную культуру клеток в матрасах равномерно покачивают, распределяя вирус по всему монослою и выдерживают в течение 60 минут при температуре 37°C±0,5.

По истечении времени, монослой клеток покрывают поддерживающей питательной средой DMEM, (Gibco, США) содержащей 2 % сыворотки крови плода крупного рогатого скота, и культивируют при температуре 37°C±0,5. Монослой культуры клеток ежедневно проверялся микроскопированием. Наличие вируса устанавливается по цитопатогенному действию (ЦПД) сравнительно с контрольной чистой культурой клеток. В случае отсутствия ЦПД в зараженной культуре клеток Vero, проводили «слепое» пассирование в течение не менее трех генера-

ций.

Определение биологической активности вирусодержащего материала методом титрования.

Биологическая активность **вируса** определялась по общепринятой методике путем титрования в культуре клеток Vero. Учет результатов титрования проводили по методу L. Reed & H. Muench и выражали в lg ТЦД₅₀/см³ [18,19].

Электронная микроскопия вирусов

Концентрирование вируса проводят методом ультрацентрифугирования на ультрацентрифуге Himac CS-150FNX (Япония) при ускорении 366 000 g в течение 20 минут. По окончании центрифугирования удаляют надосадочную жидкость, а осадок суспендируют 1X PBS буфером объемом 100 мкл.

Для электронной микроскопии препараты готовят адсорбцией на медные сетки с формаровой подложкой, укрепленной углем. Негативное контрастирование проводят 2%-ным водным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты и исследуют на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100 CX-II JEOL (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ, и различных увеличениях. Снимки получают из проявленных и закрепленных негативов с помощью фотоувеличителя «Азв».

Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием пакета программ «GraphPad Prism 8». Полученные данные подвергали статистическому анализу с использованием критерия Стьюдента, считая их достоверными при $p < 0,05$ [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для работы использованы 28 проб, привезенные в рамках мониторинга коронавирусной инфекции среди домашних видов животных из питомника г. Алматы. Выявление инфекции проводилось методом ПЦР в режиме реального времени. В результате в образцах 7 проб было выявлено наличие вируса SARS-Cov-2 (таблица 1).

Из результатов ПЦР в режиме реального времени установлено, что из 28 исследуемых биологических проб положительные результаты на наличие вируса SARS-Cov-2 показали 7 проб (таблица 1). Проба положительного контроля дала положительный результат на 22 цикле (Ст-22.00), в сравнении с которым наиболее быстрая детекция

Таблица 1. Идентификация вируса SARS-Cov-2 из отобранных проб методом ПЦР в режиме реального времени

№	Вид животного	Место отбора проб	Результаты ПЦР	Цикл, положительный результат
1	Собака №1	прямая кишка	+	34,12
2	Собака №2	ротоглотка	+	26,88
3		носовая полость	+	25,23
4	Собака №4	ротоглотка	+	25,37
5	Собака №5, (за клеткой эвтаназии 1 клетка)	прямая кишка	+	21,88
6		ротоглотка	+	37,27
7	Собака №7	носовая полость	+	33,85
Позитивный контроль: Ст=22,00				

выявлена в пробе под номером 5 на 21 цикле (Ст-21.88). Данная проба была выделена из прямой кишки собаки №5. Остальные пробы детектировались в пределах циклов 25-37 (Ст-25.23 - Ст-37.27).

Далее образцы, показавшие положительный результат в ПЦР анализе (№1-7), были посеяны на культуре клеток Vero. Наблюдение за морфологическими изменениями на образцах культуры клеток проводилось в течение 4 дней. На первом пассажном уровне из всех семи биологических образцов наличие цитопатогенного агента не удалось выявить. Затем культуральную суспензию замораживали при $-50^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Далее проводилось слепое пассирование в течение трех генерации. При следующем пассаже, культуры клеток инфицировались размороженной вирусосодержащей суспензией. На третьем пассажном уровне на третий день наблюдения в пробе №5 были заметны округления и разрушения клеток свидетельствующие об образовании ЦПД. Далее все пробы были отправлены на 4 пассаж. Наблюдение за морфологическими изменениями проводилось в течение 4 дней. На четвертой день наблюдения в пробе №5 были заметны изменения формы клеток в виде набухания, округления или утончения свидетельствующие об образовании ЦПД. В других биологических образцах наличие цитопатогенного агента не удалось выявить, поэтому эти образцы были исключены в дальнейших исследованиях. Пробу №5 пассировали до 8-го пассажа, результаты представлены на рисунке 1.

Из представленных данных на рисунке 2, видно что на четвертом пассажном уровне, биологического образца №5 (смыв прямой кишки) ЦПД вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero проявлялось, начиная с третьего дня после заражения. Как наблюдается на рисунке, в последующих пассажных уровнях количество округлившись клеток увеличивается, на поверхности адгезии (в монослое культуры клеток) уменьшается количество распластанных клеток, формируются очаги пустоты, вследствие открепившихся клеток и увеличение межклеточного пространства при сравнении с контрольной культурой. Из полученных данных (рис. 1) видно, что на 8-ом пассажном уровне произошла полная деструкция монослоя посредством отслоения/десквамации пораженных клеток через 48-72 часов после появления первых признаков цитопатологии.

Далее определялась биологическая активность исследуемых материалов всех пассажей. Результаты сравни-

тельного анализа биологической активности представлены на рисунке 2.

При анализе биологической активности исследуемых

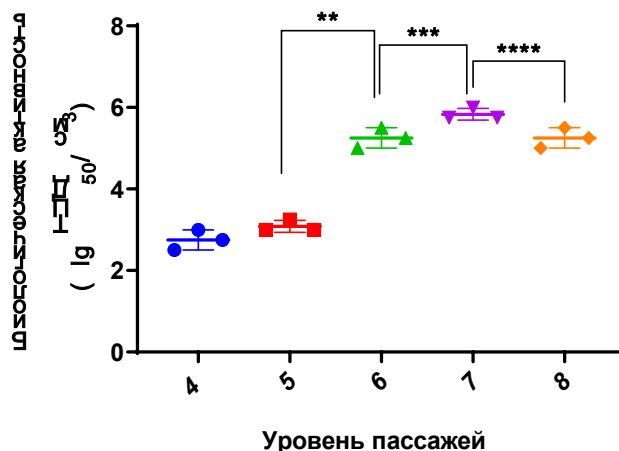


Рисунок 2. Сравнительный анализ биологической активности вируса SARS-Cov-2 на культуре клеток Vero

материалов всех пассажей (с 4 по 8) по методу Holm-Sidak наблюдались статистически значимые различия, между 5 и 6 пассажом ($P=0,000202$) и между 6 и 7 пассажем ($P=0,024896$), а также между 7 и 8 пассажем ($P=0,024896$).

Полученные результаты определения биологической активности свидетельствуют о том, что в исследуемых образцах культуры клеток содержится вирусный материал, средние значения которых увеличивается от пассажа к пассажу и достигает до $5,83 \pm 0,08$ ТЦД₅₀/см³.

Также наличие вируса SARS-CoV-2 дополнительно было подтверждено методом электронной микроскопии (рис. 3).

Как видно из рисунка 3 вирус имеет сфероидную форму диаметром 120–160 нм. Вирионы имеют липидную оболочку с булавовидными пепломерами длиной 5–10 нм, формируемыми тримерами белка S. Наличие этих пепломеров, напоминающих зубцы короны, дало название всему семейству Coronaviridae.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным, SARS-CoV-2 отделился от наиболее близких к нему от коронавирусов летучих мышей. Вирус проникает в клетку посредством

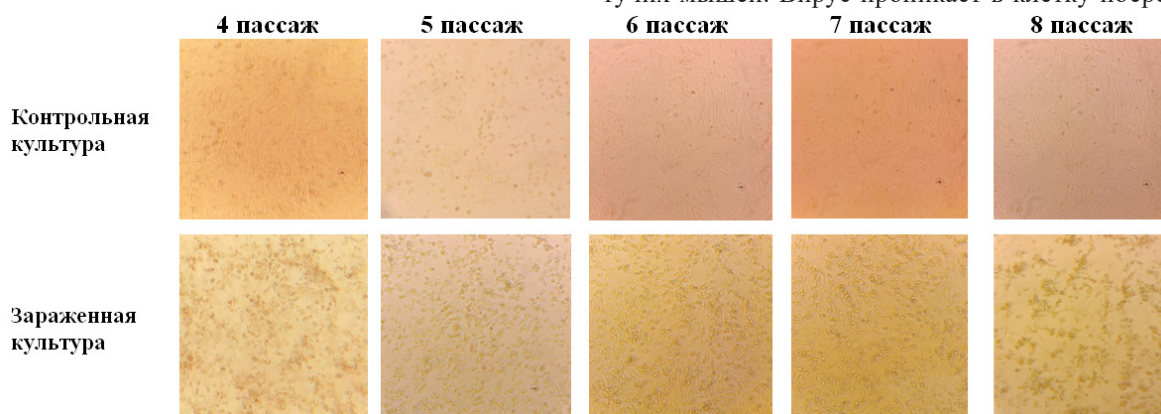


Рисунок 1. Слепое пассирование и образование ЦПД на монослое культуры клеток Vero на 4-е сутки после инфицирования.

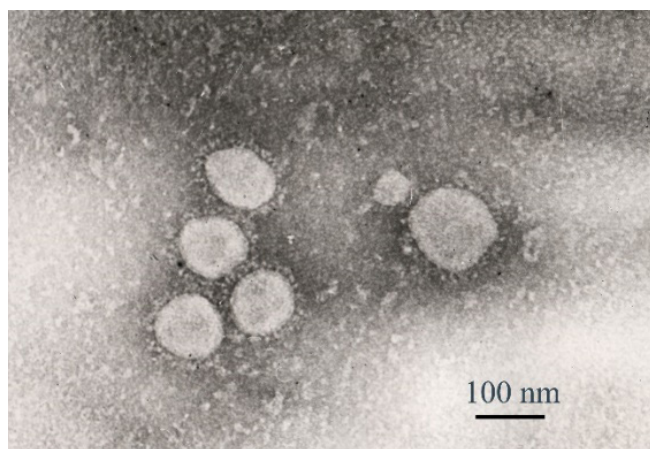


Рисунок 3. Снимок электронной микроскопии вируса SARS-CoV-2. Снимок получен при 100 000 разовом увеличении на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100 CX-II JEOL (Япония)

связывания с рецептором ACE2, аффинитет к которому отличается в зависимости от вида животного. У зараженных домашних животных обнаруживается положительный результат в ПЦР SARS-CoV-2, выявляются антитела к SARS-CoV-2. У многих владельцев этих домашних животных развились респираторные симптомы за 3-6 недель до того, как их питомцы заболели, а также дали положительный результат на COVID-19 [21].

У домашних животных среди возбудителей коронавирусной инфекции можно выделить альфа-, бета- и дельта-коронавирусы. Альфа-коронавирусы поражают собак (кишечная форма), кошек, свиней (трансмиссивный гастроэнтерит), норок и хорьков (кишечная и системная формы). Бета-коронавирусы инициируют заболевание у крупного рогатого скота (BCoV), собак (респираторная форма), лошадей и свиней (гемагглютинирующий энцефало-миелит), а дельта-коронавирус поражает свиней [11,22-25].

У некоторых видов животных обнаружены положительные результаты тестов на SARS-CoV-2 в основном после тесного контакта с людьми, инфицированными SARS-CoV-2. Известны случаи их выявления у различных животных, среди которых есть птицы, различные представители приматов, рептилий, копытных, семейства кошачьих и многих других плотоядных, а также домашние собаки [26].

По результатам проведенных исследований, циркуляция SARS-CoV-2 выявлялась в популяции бродячих собак из пункта временного содержания животных г. Алматы. Знания о клинических проявлениях болезни у животных ограничены. Имеющиеся на настоящий момент данные позволяют предположить, что клинические признаки могут включать, но не ограничиваются кашлем, чиханием, одышкой, выделениями из носа, выделениями из глаз, рвотой или диареей, повышением температуры и вялостью. Как и у людей, может наблюдаться и бессимптомная инфекция [37].

Для исследований были использованы клинические образцы из прямой кишки, из ротоглотки, из носа собак. По результатам постановки ПЦР был выявлен вирус SARS-CoV2, который был идентифицирован методом в режиме реального времени, и изучена морфология с помо-

щью электронной микроскопии, в результате была сделана микрофотография с помощью которой определяли размер, форму и морфологию вируса.

Для выделения и культивирования вируса была использована культура клеток Vero, так как из литературных данных известно, что адаптация вируса в культуре клеток Vero происходила более быстро, чем в других чувствительных клеточных линиях [11].

Выделение вируса необходимо для определения и изучения биологических, молекулярно-генетических и физико-химических свойств вируса, так как получение нового актуального штамма вируса может способствовать предотвращению возможной эпидемической ситуации путем создания актуальных средств профилактики и диагностики.

Как известно на сегодняшний день биологические, молекулярно-генетические, физико-химические свойства коронавируса, выделенных от питомцев и животных изучены недостаточно. Отсутствует полноценная информация о том, какую эволюционную роль играют питомцы и животные при распространении коронавируса в природе [27].

Результаты данного исследования позволяют сделать выводы о том, что для оптимального культивирования изолятов, выделенных от животных необходимы следующие условия: температура инкубации – 35 - 37°C, время инкубации - 48-72 ч., Данные условия культивирования дают возможность полноценно наблюдать за проявлением ЦПД вируса на культуре клеток Vero.

Аналогичные параметры культивирования при температуре 37°C и в течение 48-72 часов для полной деструкции монослоя культуры клеток Vero наблюдали наши соотечественники при выделении вируса от изолятов, выделенных от людей [11].

В литературе встречается работа где авторами было проведено исследование по культивированию вируса SARS-CoV-2 на панели лабораторных клеточных линиях для определения перmissивности и ростовых свойств четырех человеческих штаммов SARS-CoV-2. Результаты исследования показали, что рост вируса наблюдался на 7 клеточных линиях: 6 клеточных линии обезьян: VERO E6, VERO 81, VERO SLAM, MA104, OOO-MK2, BGM и 1 клеточная линия человека Caco-2. Цитопатогенные эффекты вариabельны: от лизиса клеточного монослоя до отсутствия цитопатогенного эффекта проходит 48-72 ч. По их мнению, проникновение коронавирусов в клетки зависит от связывания шиповидного белка (S), который способен заражать не только различные ткани человека, но также и животных [28, 29].

В некоторых литературных источниках описывается что собаки имеют низкую восприимчивость к вирусу SARS-CoV-2 как при экспериментальном, так и при естественном заражении [30; 31]. Имеются сведения о том, что две домашние собаки из Гонконга и одна из Северной Италии были инфицированы SARS-CoV-2 вследствие контакта с людьми инфицированными SARS-CoV-2. У данных зараженных животных клинические проявления заболевания не наблюдались [32-36]. Однако, анализированные нами пробы были отобраны от животных с яв-

ными клиническими проявлениями в виде диареи, слезоточивости и обильного слюноотделения. Так как у собак есть рецепторы ACE2, схожие с человеческими рецепторами ACE2 (hACE2), функционирующие как рецепторы SARS-CoV, повышается вероятность того, что собаки могут быть потенциальными переносчиками инфекции [32]. Однако, сведений о том, что инфицированные собаки могут передавать вирус животным или людям не имеются. Полученные данные будут основой для дальнейших запланированных исследований по определению патогенности казахстанских изолятов коронавируса на различных видах лабораторных и домашних животных, на культуре клеток и РКЭ, а также для секвенирования генома вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были проанализированы 28 смывов от собак, из которых семь (7) проб дали положительный результат на наличие вируса SARS-Cov-2. В результате репродукции в культуре клеток Vero получен изолят вируса SARS-CoV-2 с биологической активностью $5,83 \pm 0,08$ lgТЦД₅₀/см³, выделенный от собаки.

Полученные данные свидетельствуют о возможности заболевания домашних питомцев коронавирусной инфекцией COVID-19 и являться переносчиками данного заболевания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена в рамках проекта ГФ «Мониторинг распространения коронавируса среди домашних видов животных и изучение биофизических и физико-химических свойств изолятов коронавируса, выделенных на территории Республики Казахстан» (ИРН № AP13067641/ГФ-МОН-РК) по грантовому финансированию на 2022–2024 гг. при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения. Доступен на: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (дата обращения: 17.03.2023).
2. Denis M., Vandeweerd V., Verbeeke R., Laudisoit A., Reid T., Hobbs E., Wynants L., van Der Vliet D. (2020). COVIPENDIUM: information available to support the development of medical countermeasures and interventions against COVID-19 (Version 2020-10-06). *Transdisciplinary Insights*. – 2020. <http://doi.org/10.5281/zenodo.4072014>
3. Questions and Answers on COVID-19. Доступен на: <https://www.oie.int/en/scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/questions-and-answers-on-2019novel-coronavirus/> (дата обращения: 17.03.2023).
4. Considerations for sampling, testing, and reporting of SARS-CoV-2 in animals. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/COV-19/ (дата обращения: 17.03.2023).
5. Cohen J. // (2020). From mice to monkeys, animals studied for coronavirus answers. *Science*. – 2020. -№368 (6488). - pp. 221-222.
6. Коронавирус у домашних животных: виды, сим-

птомы, лечение, анализы. Доступен на: <https://dr-hug.vet/articles/koronavirus-u-domashnix-zhivotnyx-vidy-simptomylechenie-analizy/?ysclid=lbyit6cpzu327402660> (дата обращения: 17.03.2023).

7. 2. Питомцы в опасности. Какие домашние животные болеют коронавирусом, и могут ли они заражать людей. Доступен на: <https://life.ru/p/1319890?ysclid=lbyjq2olxq896737660> (Дата обращения: 17.03.2023).
8. 3. Гильмутдинов Р.Я., Галиуллин А.К., Спиридонов Г.Н. // Коронавирусные инфекции диких птиц. Ветеринарный врач. - 2020. - № 6. - С. 57.
9. Cui S., Liu Y., Zhao J., Peng X., Lu G. // An Updated Review on SARS-CoV-2 Infection in Animals. *Viruses*. – 2022. - №14(7). – 1527.
10. Prince T., Smith S. L., Radford A. D., Tom S. // SARS-CoV-2 Infections in Animals: Reservoirs for Reverse Zoonosis and Models for Study. *Viruses*. – 2021. - №13(3). - 494.
11. K. Zhugunissov, A. Kerimbayev, S. Kopeev, B. Myrzakhmetova, M. Tuyskanova, A. Nakhanov, B. Khairullin, M. Orynbayev, Ye. Abduraimov, M. Kassenov, K. Zakarya, L. Kutumbetov. SARS-CoV-2 virus: isolation, growth, thermostability, inactivation and passages// <https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.i1.07>.
12. 7. Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан № 7-1/393. «Об утверждении Правил отбора проб перемещаемых (перевозимых) объектов и биологического материала» от 30 апреля 2015 года.
13. Li L., Li X., Guo Z., Wang Z., Zhang K., Li C., Wang C., Zhang S. // Influence of Storage Conditions on SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection in Throat Swabs. *The Journal of infectious diseases*. – 2020. - №222(2). – P. 203–205.
14. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W. // Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. – 2020. - 22(395). – P. 565-574.
15. Mackenzie J.S., Smith D.W. // COVID-19: a novel zoonotic disease caused by a coronavirus from China: what we know and what we don't. *Microbiology Australia*. – 2020. -MA20013.
16. Nasir A., Rampazzo R.C., Costa A.D., Krieger M.A. // Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International*. – 2017. - 9306564.
17. Wu Y., Xu W., Zhu Z., Xia X. // Laboratory verification of an RT-PCR assay for SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2020. - 34(10). - e23507.
18. Корочкин Р.Б., Вербицкий А.А., Алешкевич В.Н., Сандул А.В. // Культивирование вирусов в культурах клеток. УМКД. Витебск: ВГАВМ. - 2010. – С. 43.
19. Reed L.J., Muench H.A. // Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. – 1938. – №27(3). – P. 493–497.
20. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. //

Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. Ленинград. - 1975.

21. Ferasin L., Fritz M., Ferasin H., Becquart P., Corbet S., Gouilh M.A., Legros V., Leroy E.M. // Infection with SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 detected in a group of dogs and cats with suspected myocarditis. *Vet Rec.* – 2021. - 189(9):e944.

22. 17. Джавадов, Э.Д., Петрова О.Г., Ивашкина Л.Н., Печура Е.В., Плешакова В.И., Н.А. Рахманина, Порываева А.П., Шилова Е.Н. // Коронавирусы у животных и человека / БИО. - 2020. - № 5(236). - С. 16.

23. Нагорных, А.М., Тюменцев А.И., Акимкин В.Г. // SARS, снова SARS и MERS. Обзор животных моделей респираторных синдромов человека, вызываемых коронавирусными инфекциями. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* – 2020. - №97(5).- С. 431.

24. COVID-19 and Animals. Доступен на: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/daily-life-coping/animals.html> (дата обращения: 17.03.2023).

25. COVID-19-An-Update-for-WSAVA-Members-May-29. Доступен на: <https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/06/COVID-19-An-Update-for-WSAVA-Members-May-29-Russian.pdf> (дата обращения: 17.03.2023).

26. Андреева А.В., Николаева О.Н. // Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) у животных. *Ветеринарный врач.* - 2021. - №2. - С. 4-11.

27. Gautam A., Kaphle K., Shrestha B., Phuyal S. // Susceptibility to SARS, MERS, and COVID-19 from animal health perspective. *Open Veterinary Journal* – 2020. - №10(2). – P. 164.

28. Wurtz N., Penant G., Jardot P., Duclos N., Scola B.L. // Culture of SARS-CoV-2 in a panel of laboratory cell lines, permissivity, and differences in growth profile. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* – 2021. - №40. – P. 477-484.

29. Diaz F.J., Jimenez W.A., Alvarez L. F., Valencia G., Donato K. L., Muñoz C. F. // Isolation and characterization of an early strain of SARS-CoV-2 during the 2020 epidemic in Medellín, Colombia. *Biomédica.* - 2020. - №40(2). – P. 148-158.

30. 25. Shi J., Wen Z., Zhong G., Yang H., Wang C. // Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science.* - 2020. - №368. - P.1016-1020.

31. Россельхознадзор // Актуальные данные МЭБ о COVID-19 у животных. - 2020. Доступен на: <https://fsvps.gov.ru/fsvps/news/35884.html> (дата обращения: 07.02.2021)

32. Leroy E.M., Ar Gouilh M., Brugère-Picoux J. // The risk of SARS-CoV-2 transmission to pets and other wild and domestic animals strongly mandates a one-health strategy to control the COVID-19 pandemic. *One Health.* - 2020. - №10. – 100133.

33. Goumenou M., Spandidos D.A., Tsatsakis A. // Possibility of transmission through dogs being a contributing factor to the extreme Covid-19 outbreak in North Italy. *Molecular Medicine Reports.* – 2022. - №21(6). – P. 2293-95.

34. Csiszar A., Jakab F., Valencak T.G., Lanszki Z., Tóth

G.E., Kemenesi G. // Companion animals likely do not spread COVID-19 but may get infected themselves. *GeroScience.* - 2020. - №42. – P.1229-1236.

35. Loeb J. // Pet dog confirmed to have coronavirus. *The Veterinary Record.* – 2020. - №186. – P. 265.

36. Sit Th.H.C., Brackman Ch.J., Ip S.M., Tam K.W.S., Law P.Y.T., To E.M.W., Yu V., Sims L.D., Tsang D. N.C., Chu D.K.W., Perera R.A.P.M., Poon L.L.M., Peiris M. // Canine SARS-CoV-2 infection. *Nature.* - 2020. - №586(7831). – P. 776–778.

REFERENCES

1. Всемирная организация здравоохранения. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (Accessed: 03/17/2023).

2. Denis M., Vandeweerdt V., Verbeeke R., Laudisoit A., Reid T., Hobbs E., Wynants L., van Der Vliet D. (2020). COVIPENDIUM: information available to support the development of medical countermeasures and interventions against COVID-19 (Version 2020-10-06). *Transdisciplinary Insights.* – 2020. <http://doi.org/10.5281/zenodo.4072014>

3. Questions and Answers on COVID-19. Available at: <https://www.oie.int/en/scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/questions-and-answers-on-2019-novel-coronavirus/> (Accessed: 03/17/2023).

4. Considerations for sampling, testing, and reporting of SARS-CoV-2 in animals. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/COVID-19/ (Accessed: 03/17/2023).

5. Cohen J. // (2020). From mice to monkeys, animals studied for coronavirus answers. *Science.* – 2020. -№368 (6488). - pp. 221-222.

6. Coronavirus in pets: types, symptoms, treatment, tests. Available at: <https://dr-hug.vet/articles/koronavirus-u-domashnix-zhivotnyx-vidy-simptomny-lechenie-analizu/?ysclid=lbyit6cpzu327402660> (Accessed: 03/17/2023).

7. Pets are in danger. Which pets are sick with coronavirus, and can they infect people. Available at: <https://life.ru/p/1319890?ysclid=lbyjq2olxq896737660> (Accessed: 03/17/2023).

8. Gilmutdinov R.Ya., Galiullin A.K., Spiridonov G.N. // Coronavirus infections of wild birds. *Veterinarian.* - 2020. - No. 6. - S. 57.

9. Cui S., Liu Y., Zhao J., Peng X., Lu G. // An Updated Review on SARS-CoV-2 Infection in Animals. *Viruses.* – 2022. - №14(7). – 1527.

10. Prince T., Smith S. L., Radford A. D., Tom S. // SARS-CoV-2 Infections in Animals: Reservoirs for Reverse Zoonosis and Models for Study. *Viruses.* – 2021. - №13(3). - 494.

11. K. Zhugunissov, A. Kerimbayev, S. Kopeev, B. Myrzakhmetova, M. Tuyskanova, A. Nakhanov, B. Khairullin, M. Orynbayev, Ye. Abduraimov, M. Kassenov, K. Zakarya, L. Kutumbetov. SARS-CoV-2 virus: isolation, growth, thermostability, inactivation and passages// <https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.i1.07>.

12. Order of the Minister of Agriculture of the Republic

- lic of Kazakhstan No. 7-1/393. "On Approval of the Rules for Sampling Moved (Transported) Objects and Biological Material" dated April 30, 2015.
13. Li L., Li X., Guo Z., Wang Z., Zhang K., Li C., Wang C., Zhang S. // Influence of Storage Conditions on SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection in Throat Swabs. *The Journal of infectious diseases.* – 2020. - №222(2). – P. 203–205.
14. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W. // Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* – 2020. - 22(395). – P. 565-574.
15. Mackenzie J.S., Smith D.W. // COVID-19: a novel zoonotic disease caused by a coronavirus from China: what we know and what we don't. *Microbiology Australia.* – 2020. -MA20013.
16. Nasir A., Rampazzo R.C., Costa A.D., Krieger M.A. // Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International.* – 2017. - 9306564.
17. Wu Y., Xu W., Zhu Z., Xia X. // Laboratory verification of an RT-PCR assay for SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* – 2020. - 34(10). - e23507.
18. Korochkin R.B., Verbitsky A.A., Aleshkevich V.N., Sandul A.V. // Cultivation of viruses in cell cultures. *Vitebsk: VGAVM.* - 2010. - P. 43.
19. Reed L.J., Muench H.A. // Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. – 1938. – №27(3). – P. 493–497.
20. Ashmarin I.P., Vasiliev N.N., Ambrosov V.A. // Fast methods of statistical processing and planning of experiments. *Leningrad.* - 1975.
21. Ferasin L., Fritz M., Ferasin H., Becquart P., Corbet S., Gouilh M.A., Legros V., Leroy E.M. // Infection with SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 detected in a group of dogs and cats with suspected myocarditis. *Vet Rec.* – 2021. - 189(9):e944.
22. Javadov, E.D., Petrova O.G., Ivashkina L.N., Pechura E.V., Pleshakova V.I., N.A. Rakhmanina, Poryvaeva A.P., Shilova E.N. // Coronaviruses in animals and humans / *BIO.* - 2020. - No. 5(236). - P. 16.
18. Nagornykh, A.M., Tyumentsev A.I., Akimkin V.G. // SARS, again SARS and MERS. Review of animal models of human respiratory syndromes caused by coronavirus infections. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* - 2020. - No. 97(5). - P. 431.
19. COVID-19 and Animals. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/daily-life-coping/animals.html> (дата обращения: 17.03.2023).
20. COVID-19-An-Update-for-WSAVA-Members-May-29. Доступен на: <https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/06/COVID-19-An-Update-for-WSAVA-Members-May-29-Russian.pdf> (Accessed: 03/17/2023).
21. Andreeva A.V., Nikolaeva O.N. // Novel coronavirus infection (COVID-19) in animals. *Veterinarian.* - 2021. – No. 2. - P. 4-11.
27. Gautam A., Kaphe K., Shrestha B., Phuyal S. // Susceptibility to SARS, MERS, and COVID-19 from animal health perspective. *Open Veterinary Journal* – 2020. - №10(2). – P. 164.
28. Wurtz N., Penant G., Jardot P., Duclos N., Scola B.L. // Culture of SARS-CoV-2 in a panel of laboratory cell lines, permissivity, and differences in growth profile. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* – 2021. - №40. – P. 477-484.
29. Diaz F.J., Jimenez W.A., Alvarez L. F., Valencia G., Donato K. L., Muñoz C. F. // Isolation and characterization of an early strain of SARS-CoV-2 during the 2020 epidemic in Medellín, Colombia. *Biomédica.* - 2020. - №40(2). – P. 148-158.
30. Shi J., Wen Z., Zhong G., Yang H., Wang C. // Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science.* - 2020. - №368. - P.1016-1020.
31. Russian Agricultural Supervision // OIE Update on

COVID-19 in Animals. - 2020. Available at: <https://fsvps.gov.ru/fsvps/news/35884.html> (Accessed: 02/07/2021).

32. Leroy E.M., Ar Gouilh M., Brugère-Picoux J. // The risk of SARS-CoV-2 transmission to pets and other wild and domestic animals strongly mandates a one-health strategy to control the COVID-19 pandemic. *One Health*. - 2020. - №10. – 100133.

33. Goumenou M., Spandidos D.A., Tsatsakis A. // Possibility of transmission through dogs being a contributing factor to the extreme Covid-19 outbreak in North Italy. *Molecular Medicine Reports*. – 2022. - №21(6). – P. 2293-95.

34. Csiszar A., Jakab F., Valencak T.G., Lanszki Z., Tóth G.E., Kemenesi G., // Companion animals likely do not spread COVID-19 but may get infected themselves. *GeroScience*. - 2020. - №42. – P.1229-1236.

35. Loeb J. // Pet dog confirmed to have coronavirus. *The Veterinary Record*. – 2020. - №186. – P. 265.

36. Sit Th.H.C., Brackman Ch.J., Ip S.M., Tam K.W.S., Law P.Y.T., To E.M.W., Yu V., Sims L.D., Tsang D. N.C., Chu D.K.W., Perera R.A.P.M., Poon L.L.M., Peiris M. // Canine SARS-CoV-2 infection. *Nature*. - 2020. - №586(7831). – P. 776–778.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ АЙМАҒЫНДА ИТТЕН БӨЛІНІП АЛЫНҒАН SARS-COV-2 ВИРУСЫНЫҢ БИОЛОГИЯЛЫҚ ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ

Садикалиева С.О., Шаяхметов Е.А., Абай Ж.С., Нурпейсова А.С., Шораева К.А. Омуртай А.Д., Копеев С.К., Наханов А.К., Теребай А.А., Мырзахметова Б.Ш., Кожаберженов Н.С., Абдураимов Е.О.

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты (БҚПФЗИ)

*Eraly.Shax@gmail.com

Аннотация

Бұл мақалада мониторингтік зерттеу аясында Қазақстан Республикасының аумағындағы иттерден алынған биологиялық сынамалар (28 сынама) зерттелді.

Алынған сынамалар нақты уақыттағы КТ-ПТР көмегімен талданып, 25-37 циклдер аралығында детекцияланған жеті (7) сынама айқындалды. Бұл сынамалар вирустың болуын анықтау үшін Vero жасушалар культурасында өсірілді.

Vero жасушалар культурасында көбею нәтижесінде

$5,83 \pm 0,08 \text{ IgTCID}_{50}/\text{cm}^3$ биологиялық белсенділікпен бір изолятың вирустық суспензиясы алынды. Электрондық микроскопия *Coronaviridae* тұқымдасына ұқсас вириондардың морфологиясын растады.

Алынған деректер үй жануарларының да COVID-19 коронавирусымен ауырып, осы аурудың тасымалдаушысы болуы мүмкін екенін көрсетеді.

Түйінді сөздер: биологиялық сынамалар, SARS-COV-2 вирусы, ПТР талдау, РНҚ, үй жануарлары, vero жасуша культурасы, электрондық микроскопия.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE SARS-COV-2 VIRUS ISOLATED FROM A DOG ON THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

Sadikaliyeva S.O., Shayakhmetov Ye.A., Abay Zh.S., Nurpeisova A.S., Shorayeva K.A. Omurтай A.D., Kopeev S.K., Nakhanov A.K., Terebay A.A., Myrзахmetova B.Sh., Kozhabergenov N.S., Abduraimov Ye.O.

Research Institute for Biological Safety Problems (RIBSP)

*Eraly.Shax@gmail.com

Abstract

This article examined biological samples (28 swabs) taken from dogs in the Almaty region of the Republic of Kazakhstan as part of monitoring studies of the SARS-COV-2 virus among domestic animals.

The resulting samples were analyzed by real-time RT-PCR, where seven (7) samples were detected within cycles 25-37. Further, these samples were cultured in Vero cell culture to determine the presence of the virus.

As a result of reproduction on a Vero cell culture, a viral suspension of one isolate was obtained with the biological activity of $5.83 \pm 0.08 \text{ IgTCID}_{50}/\text{cm}^3$. In addition, Electron microscopy confirmed virion morphology similar to that of the *Coronaviridae* family.

The data obtained indicate that pets can also get infected with COVID-19 coronavirus infection and be carriers of this disease.

Keywords: biological samples, SARS-COV-2 virus, PCR analysis, RNA, domestic animals, Vero cell culture, electron microscopy.