

УДК 619:616.98:636.8

© 2016

*Недосєков В. В., доктор ветеринарних наук,  
Козленко Т. Г., аспірант*

*(науковий керівник – доктор ветеринарних наук В. В. Недосєков)*

Національний університет біоресурсів і природокористування України

## ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ОЧИСТКИ ТА ІНАКТИВАЦІЇ ЗБУДНИКА КАЛІЦИВІРОЗУ КОТІВ

*Рецензент – кандидат ветеринарних наук В. В. Мельник*

*Встановлено, що оптимальним методом одержання очищеного препарату каліцивірусу є осадження сульфатом амонію з подальшою очисткою антигенного матеріалу з використанням градієнтів концентрації сахарози, що дає можливість одержати очищений препарат збудника каліцивірозу котів, придатний для виготовлення антигену. Порівняльне вивчення режимів інактивації формаліну показало, що оптимальним для інактивації вірусу є вплив формаліну в кількості 0,2 % при температурі 37 °С і експозиції 72 години.*

**Ключові слова:** вірус, очищення, осадження, інактивація, формалін, буфер, антиген.

**Постановка проблеми.** Враховуючи важливість використання високоефективних засобів діагностики каліцивірозу, науковий і практичний інтерес представляє розробка способу отримання високоактивного та специфічного антигену каліцивірусу для імунізації тварин з метою одержання гіперімунних протикаліцивірусних сироваток і використання останніх для виготовлення діагностичних препаратів для серологічних реакцій.

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Інфекційна патологія займає провідне місце серед захворювань домашніх м'ясоїдних [1, 11, 12]. Основними засобами контролю захворювань є своєчасна діагностика на підставі розроблених діагностикумів на основі науково обґрунтованих підходів отримання компонентів. Одну з основних ролей відіграє підбір інактиваторів і систем очищення вірусів.

Закордонні дослідники свідчать про стійкість вірусу до ефіру, хлороформу, рН 4,0, а також до нагрівання. Інактивація вірусу відбувається при 50 °С за 30 хв, при 60 °С – за 10 хвилин [6].

Каліцивірус котів стійкий до ліофілізації, що дає змогу використовувати цей метод зберігання штамів [2]. За високої температури 1 М розчини MgCl<sub>2</sub> і MgSO<sub>4</sub> не тільки не стабілізує вірус, але навіть збільшує ступінь теплової інактивації [9]. Проте солі натрію частково стабілізують каліци-

вірус проти термо- і рН інактивації. Більшість ізолятів КВК стійкі до рН 4, але в разі рН 3 і нижче титр вірусу знижується [1, 3, 6, 10].

Doultree J. C. та інші (1999) встановили, що глютаральдегід і йод ефективно інактивували вірус каліцивірозу. Аміак і етиловий спирт не володіли значною віруцидною активністю. Стабільність вірусу в суспензії і у висушеному стані була оцінена тими ж авторами після експозиції при 4 °С, кімнатній температурі (20 °С) і 37 °С. Зі збільшенням температури стабільність каліцивірусу знижувалася і в суспензії, і у висушеному стані. При 37 °С ліофілізований вірус інактивувався протягом доби [4, 11].

Проводячи подібні досліди, Gulati B. R. та інші (2001) показали, що фенольні сполуки за 2–4 обробки повністю інактивували вірус каліцивірозу котів. Комбінація аміаку і соди була ефективною в концентраціях, що у двічі перевищувала загальноприйнятту. Обполіскування чистою водою зменшувало титр вірусу до 2 lg ЦПД 50/см<sup>3</sup> [7].

Kadoi K. (2001) так само використовував вірус каліцивірозу котів в якості моделі для вивчення стійкості в морській воді каліцивірусу людини. Результати досліджень показали, що вірус зберігав інфекційність при 10 °С і нижче протягом 30 днів [8].

Багатьма дослідниками рекомендовано використання в якості дезінфектантів лугів, формальдегіду, фенолу і хлорвмісних препаратів в загальноприйняттих концентраціях [5, 12].

**Метою досліджень** було оптимізувати метод очищення специфічного антигену каліцивірусу і підібрати оптимальний режим інактивації збудника каліцивірозу котів.

**Завдання:** очистити каліцивірусну суспензію від клітинного детриту; підібрати оптимальні умови інактивації збудника.

**Матеріали і методи досліджень.** Для роботи ми використовували ізолят К-2, який пройшов 10 пасажів на культурі клітин CrFK та накопичувався в титрах 8,0–8,5 lg ЦПД 50/см<sup>3</sup>.

Інфекційну активність вірусу встановлювали

методом титрування в культурі клітин на 96-лункових мікропанелях зі сформованим моношаром. Для цього готували десятикратні розведення вірусу ( $10^{-1}$ – $10^{-9}$ ) та кожним розведенням заражали 4 лунки по  $0,2 \text{ см}^3$ . В якості контролю використовували культуру клітин в 4-х лунках з підтримуючим середовищем. Результати враховували протягом 3-х діб. За позитивний результат брали лунки, в яких спостерігали специфічну ЦПД (округлення клітин, відторгнення їх від скла, утворення пустот в моношарі). Водночас в контрольних лунках був незмінений клітинний моношар. Інфекційний титр розраховували за методом Ріда і Менча.

Осадження вірусу проводили сульфатом амонію з подальшою очисткою антигенного матеріалу з використанням градієнтів концентрації сахарози.

В якості інактиватора каліцивірусу використовували формалін (водний розчин 38 % формальдегіду) в кількостях 0,1 %, 0,2 % і 0,5 %. Використовували експозицію від 24 до 120 годин при температурі 37 °С. Повноту інактивації визначали проведенням 3-х послідовних пасажів інактивованого вірусу в культурі клітин CrFK.

**Результати досліджень.** На першому етапі досліджень перед нами було поставлено завдання очистити каліцивірусну суспензію, отриману з культур тканин, яка контамінована клітинними компонентами, зокрема мембранами від клітинного детриту. Для цього проводили низькошвидкісне центрифугування суспензії при 6000 об/хв протягом 30 хвилин.

Після цього проводили осадження вірусу насиченим розчином сульфату амонію. Отриману суспензію центрифугували при 2000 g і 4 °С протягом 1–2 годин. Супернатант обережно зливали, а осад розчиняли в буферному розчині, обсяг якого становив не менше 10 % вихідного, щоб забезпечити достатнє розбавлення сульфату

амонію. При цьому нам вдалося сконцентрувати вірус в 10 разів. Вихід вірусу становив 96 %.

Концентрований вірус очищали з використанням градієнтів концентрації сахарози. Для цього готували два розчини сахарози в буфері, що містить 10 мМтрис-НСІ (рН 7,4) і 50 мМNaCl. Перший розчин містить 15 г, а другий – 45 г сахарози в 100 мл буфера. Використовуючи по 15 мл кожного з цих розчинів, готували лінійні градієнти концентрації сахарози (15–45 %) об'ємом 30 мл в пробірках об'ємом 35 мл. Готували 10 % розчин NP-40 у фізрозчині, який додавали до вірусу. Під час струшування вірусу з детергентом розчин ставав прозорим. Вірус обережно нашаровували на отриманий раніше градієнт. Пробірки врівноважували і центрифугували при 80 000 g і 4 °С протягом 4 годин. Градієнт фракціонували. У фракціях визначали вміст вірусу.

Наступним нашим завданням було підібрати оптимальні умови інактивації збудника каліцивірусу. Основним критерієм оцінки досліджень було збереження активності антигену каліцивірусу.

В якості інактиватора каліцивірусу використовували формалін. Для відпрацювання параметрів інактивації вивчали вплив концентрації інактиватора, температурного режиму і тривалості дії. Для інактивації каліцивірусу до вірусомісної рідини з вихідною інфекційною активністю  $8,5 \text{ lg ЦПД } 50/\text{см}^3$  додавали формалін в кількостях 0,1 %, 0,2 % і 0,5 %. Використовували експозицію від 24 до 120 годин при температурі 37 °С. Повноту інактивації визначали проведенням 3-х послідовних пасажів інактивованого вірусу в культурі клітин CrFK.

Ефективність інактивації вірусу оцінювали за показниками втрати інфекційності і збереження високої антигенної активності інактивованого препарату.

Зміни антигенності вірусу, інактивованої в різних режимах, представлені в таблиці.

*Антигенність вірусу після інактивації в різних режимах*

| Ізолят | Режим інактивації |                    |                   | Титр антитіл у сироватках крові морських свинок (рН, log <sub>2</sub> ) |                             |
|--------|-------------------|--------------------|-------------------|---|-----------------------------|
|        | Температура, °С   | Вміст формаліну, % | Експозиція, годин | До введення вірусу  | На 21-й день після ін'єкції |
| К-2    | 37 °С             | 0,1                | 108               | ≤2  | 8,0±0,5                     |
|        |                   | 0,2                | 72                | ≤2  | 8,3±0,6                     |
|        |                   | 0,5                | 48                | ≤2  | 8,5±0,5                     |
|        | Не інактивованій  |                    |                   | ≤2  | 8,6±0,5                     |

Результати досліджу свідчать про те, що у всіх варіантах проведення інактивації вірусу, він зберігав антигенність, що незначно відрізнялася від початкової.

Інактивація вірусу в разі додавання формаліну в концентрації 0,1 % була тривалішою (108 годин) і призводила до незначного зниження активності антигену. Водночас антигенність вірусних зразків, інактивованих під час додавання формаліну в кількості 0,5 % і 0,2 % (48 і 72 години відповідно), відрізнялася незначно.

Беручи до уваги той факт, що кращим є мінімальний вміст формаліну в препараті за практично однакових показників антигенності отриманої сировини, можна резюмувати, що оптимальним

режимом інактивації вірусу є вплив формаліну в кількості 0,2 % при температурі 37 °С і експозиції 72 години.

**Висновок.** Тож, оптимальним методом одержання очищеного препарату каліцивірусу для виготовлення антигену є осадження сульфатом амонію з подальшою очисткою антигенного матеріалу в градієнті концентрації сахарози. За данною схемою був отриманий матеріал зі ступенем очистки 96 % та концентрований у 10 разів препарат збудника каліцивірозу.

Показано, що оптимальним режимом інактивації вірусу є 0,2 % формаліну при температурі 37 °С і експозиції 72 години.

### БІБЛІОГРАФІЯ

1. *Козленко Т. Г.* Вивчення біологічних властивостей збудника каліцивірозу котів / Т. Г. Козленко // Науково-технічний бюлетень Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК : наук. електрон. вид. – Дніпропетров. держ. аграрно-екон. ун-т, Н.-д. центр біобезпеки та екол. контролю ресурсів АПК. – 2015. – Т. 3, №2. – С. 52–57.

2. *Кузнецова С. В.* Диагностикумы на основе очищенных и концентрированных вирусных антигенов : автореф. дисс. на соиск. уч. степени д.б.н. : спец. 03.00.06. «Вирусология» / С. В. Кузнецова. – М., 1991. – 46 с.

3. *Burki F.* Virologik and immunologic aspects of feline picornaviruses / F. Burki // J.A.V.M.A. – 1971. – 158. – 6. – P. 916–919.

4. Inactivation of feline calicivirus. A Norwalk virus surrogate [Doultree J. C., Druce J. D., Birch C. J. et al] // J. Hosp. Inf. – 1999. – 41. – 1. – P. 51–57.

5. *Eleraky N. Z.* Virucidal efficacy of four new disinfectants / N. Z. Eleraky, L. N. D. Potgieter, M. A. Kennedy // J. Amer. Animal Hosp. Assoc. – 2002. – 38. – 3. – P. 231–234.

6. *Gillespie J. N., Scott F. W.* Feline viral infections / J. N. Gillespie, F. W. Scott // Adv. Vet. Sci. – 1973. – №17. – P. 163–200.

7. Efficacy of commonly used disinfectants for

the inactivation of calicivirus on strawberry, lettuce, and a food-contact surface / [Gulati B. R., Allwood P. B., Hedberg C. W. et al] // J. Food Prot. – 2001. – 64 (9). – P. 1430–1434.

8. *Kadoi K., Kadoi B. K.* Stability of feline caliciviruses in marine water maintained at different temperatures / K. Kadoi, B. K. Kadoi // New Microbiol. – 2001. – 24 (1). – P. 17–21.

9. *Kahn D. E., Gillespie J. H.* Feline viruses: pathogenesis of picornavirus infection in the cat / D. E. Kahn, J. H. Gillespie // Am. J. Vet. Res. – 1971. – №32. – P. 521–531.

10. Serologic classification of feline caliciviruses by plaque-reduction neutralization and immunodiffusion / [Kalunda M., Lee K. M., Holmes D. F. et al] // Am. J. Vet. Res. – 1975. – 36. – 7. – P. 353–356.

11. Synanthropization of animals in megapolis / [Makarov V., Nedosekov V., Buchatskiy L., Polischyuk S.] // International scientific electronic journal Earth Bioresources and Quality of Life. – 2012. – №2. – Режим доступу : <http://gchera-ejournal.nubip.edu.ua/index.php/ebql/article/view/70>.

12. *Stetsiura L.* Evaluation of manufacturing specification of antifungal vaccines / L. Stetsiura, V. Nedosekov, O. Martyniuk // «Edukacja – Technika – Informatyka». – 2016. – №1.