

УДК: 619:616.98:636.8

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЗБУДНИКА КАЛІЦИВІРОЗУ КОТІВ**КОЗЛЕНКО Т.Г., аспірант***Національний університет біоресурсів і
природокористування України
м. Київ
tatiana188981@gmail.com

Наведені результати вивчення культуральних властивостей збудника каліцивірозу. Показні оптимальні схеми репродукції каліцивірусу та визначені параметри культивування. Встановлено, що перещеплювані культури клітин CrFK (нирки кошеня) і FS (селезінки kota), в рівній мірі чутливі до каліцивірусу кішок, де він реплікується з проявом вираженого ЦПД ($8,2 \pm 1,0$ lg ЦПД $50/\text{см}^3$, середній показник). Вивчення імунотипових властивостей каліцивірусу кішок для лабораторних тварин показало, що каліцивірус не патогенний для лабораторних тварин, але володіє імунотиповими властивостями – введення лабораторним тваринам ізолятів каліцивірусу кішок викликало у них вироблення гуморальних антитіл в титрах $5,3 - 6,6 \log_2$

Каліцивіроз, інфекція, вірус, культура клітин, ізолят, ЦПД

Постановка проблеми. Каліцивірусна інфекція кішок – *feline calicivirus infection*, (каліцивіроз, *calicivirosis*) висококонтагіозна хвороба тварин родини котячих (*Felidae*) [1, 2]. Паразитуючи в організмі тварин, каліцивірус викликає широкий спектр клінічних проявів, зокрема, кон'юнктивіт, виразковий стоматит, риніт, трахеобронхіт, пневмонію. Часто це захворювання супроводжується летальністю [3, 4, 5].

В останні десятиріччя каліцивірозу котів приділяється досить значна увага серед науковців ветеринарної медицини, проте, окремі аспекти цього захворювання і до сьогодні залишаються не з'ясованими [4, 5]. Нажаль практично не вивчені залишаються питання поширення каліцивірозу котів, циркуляція збудника каліцивірозу, різноманіття форм прояву захворювання у тварин та імунобіологічні властивості циркулюючих ізолятів.

У системі проведення ветеринарно-санітарних заходів, що стосуються своєчасної специфічної профілактики, а також лікування каліцивірозу важливе значення має своєчасна, достовірна лабораторна діагностика [1, 3]. Лабораторні методи досліджень каліцивірозу дають можливість виявити каліцивірус в патологічному матеріалі, але за допомогою їх немож-

ливо оцінити такі біологічні властивості вірусу, як рівень накопичення в чутливій системі, патогенність та вірулентність. Найбільш достовірним та специфічним в цьому плані є виділення каліцивірусу на різних лабораторних моделях. [2, 4]

Найбільш перспективними моделями для культивування каліцивірусу є перещеплювані культури клітин, такі як: CrFK, FS, CC-81, Fc/Tg, A-72, Vero, MDCK, MDBK, ПСГК [1, 2].

Таким чином, виходячи з необхідності вивчення біологічних властивостей збудника каліцивірозу котів, з метою проведення моніторингу та розробки засобів діагностики, та враховуючи вище сказане, **метою** наших досліджень було виділити ізоляти каліцивірусу кішок, вивчити культуральні та імунобіологічні властивості збудника каліцивірозу котів.

Матеріал і методи досліджень. Матеріалом для лабораторного дослідження слугували назальні, кон'юнктивальні і ротоглоткові змиви, зіскоби з виразкових ділянок слизових оболонок ротової порожнини, кров від хворих тварин.

Отримані проби використовували для зараження культур клітин CrFK (нирки кошеня) і FS (селезінки kota). Використовували стаціонарний метод культивування – клітинну су-

* Науковий керівник—д.вет. н., професор Недосєков В.В.

спензію вносили в культуральні матраци об'ємом 100 – 1500 см³ і вирощували без перемішування.

Використовували метод зараження на моношар: вірус вносили у складі ростового середовища на повністю сформований клітинний моношар 3-4-добових – перещеплюваних культур клітин.

Інфекційну активність одержаних проб та вірусного сировини визначали шляхом титрування його в культурах клітин нирки кошеня (СгФК). При цьому використовували 96-лункові культуральні мікропанелі (мікрометод).

Для титрування вірусу готували десятикратні його розведення (від 10⁻¹ до 10⁻¹²) на підтримуючому середовищі. Кожним розведенням заражали культуру клітин в 4 лунках - по 0,2 см³. В якості контролю використовували культуру клітин в 4 лунках з підтримуючим середовищем. мікропанелі витримували в СО₂-інкубаторі при 37 °С і 5 % СО₂. Результати враховували щодня по 7 добу включно. Інфекційну активність вірусу оцінювали при світловій мікроскопії за проявом характерної цитопатичної дії.

Результати досліджень. У період з 2012 по 2014 р були отримані і досліджені понад 60 ізолятів каліцивірусу. В результаті аналізу даних про джерела отримання матеріалу, його кількості, можливостях культивування були відібрані 5 ізолятів КВК. Всі вони були отримані

мані в різні роки від кішок, які мали вікові та породні відмінності, а також специфічні особливості перебігу та клінічного прояву хвороби.

Походження ізолятів каліцивірусу кішок, відібраних нами для подальших досліджень, представлено в таблиці 1.

В дослідках по вивченню чутливості культур клітин до каліцивірусу кішок використовували перещеплювані культури клітин: СгФК (нирки кошеня), FS (селезінки kota). Перераховані культури клітин заражали 5-ма вище названими ізолятами каліцивірусу. Використовували стаціонарний метод культивування, зараження проводили на моношар. Результати досліджень представлені в таблиці 2.

Встановлено, що репродукція вірусу в культурах клітин “котячого” походження (СгФК, FS,) носила закономірний характер для всіх досліджених ізолятів вірусу. Статистично достовірних відмінностей, що стосуються більшої чутливості якійсь із перелічених культур клітин котячого походження до досліджуваних нами ізолятів КВК, також не зазначено: при однакових умовах культивування і зараження відмінність за цим показником не перевищило 1,0 lg ЦПД₅₀/см³.

Репродукція каліцивірусу супроводжувалася проявом ЦПД. Вона спостерігалася з першого пасажу вірусу і була однотипною в чутливих культурах клітин у всіх 5-ти ізолятів КВК.

Перші ознаки ЦПД відзначали через 7-12

Таблиця 1. Походження ізолятів каліцивірусу кішок

Номер ізоляту КВК (№)	Дані про тварину (стать, порода, вік)	Перебіг захворювання	Клінічні ознаки хвороби
К-1	кішка, безпородна, 6 міс.	Підгострий	кон'юнктивіт, риніт, артрит.
К-2	кішка, персидська, 4 міс.	Гострий	кон'юнктивіт, риніт, виразковий стоматит
К-3	кіт, сфінкс, 2 роки	Хронічний	кон'юнктивіт, риніт, сечокам'яна хвороба
К-4	кішка, безпородна, 3 роки	Гострий	ларинготрахеїт, плеврит
К-5	кіт, безпородний, 1,5 міс.	Гострий	гнійний кон'юнктивіт і риніт, бронхопневмонія

Таблиця 2. Накопичення каліцивірусу кішок у культурах клітин

Культура клітин	Накопичення каліцивірусу кішок в культурах клітин (lg ЦПД ₅₀ /см ³)				
	К-1	К-2	К-3	К-4	К-5
СгФК	8,2±1,0	8,5±1,0	8,0±0	8,0±0,8	8,0±0,8
FS	8,2±0,5	8,2±0,5	7,7±1,0	8,2±0,5	8,2±0,5

годин після зараження. Вона виражалася в набуханні і округленні клітин. Далі, протягом 10 - 48 годин, відбувалася швидко прогресуюча деструкція моношару, що супроводжувалася поступовим відторгненням клітин і утворенням пустот. Клітини ще збереженого моношару виглядали на цій стадії набряклими і світлопереломлюваними. Через 48-72 годин після зараження майже всі вони відторгалися від скла.

Для вивчення динаміки накопичення вірусу в культурах клітин “котячого походження” визначали титр культуральної рідини відразу після внесення вірусу і далі з інтервалом 12 годин протягом 3 - 7 діб.

Результати досліджень показали, що максимальне накопичення КВК реєстрували в період 60 ± 12 годин після зараження.

Вивчення впливу множинності зараження показало, що оптимальна вихідна активність культуральної рідини після внесення вірусу повинна складати 2,0 lg ЦПД₅₀/см³.

При великих інфікуючих дозах ЦПД проявлялася вже через 12-24 години, менших - через 96 годин і пізніше, накопичення вірусу в обох випадках не перевищувало 5 lg ЦПД₅₀/см³.

Важливим аспектом при культивуванні каліцивірусу кішок є збереження його репродуктивних властивостей на високих рівнях пасажів. З ціллю вивчення цих параметрів нами було проведено 10 послідовних пасажів ізоля-

ту К-2 в культурі клітин СгФК, яку заражали на моношар в умовах стаціонарного культивування.

У таблиці 3 показані результати цього дослідження, що не виявляють очевидних змін активності вірусу у процесі проведення 10 пасажів.

Таким чином, встановлено, що каліцивіруси в межах 10 пасажів в культурі клітин СгФК не втрачає репродуктивних властивостей.

Для вивчення імуногенних властивостей каліцивірусу кішок для лабораторних тварин проводили експериментальне зараження морських свинок. Для зараження використовували перераховані ізоляти каліцивірусу. Морським свинкам підшкірно вводили культуральну суспензію вірусу, активністю 8,5 lg ЦПД₅₀/см³, в дозі 1,0 см³. Титр антитіл визначали на 21 день після введення вірусної суспензії. Результати показані в таблиці 4.

У процесі дослідження було встановлено, що морські свинки не сприйнятливі до захворювання каліцивірозом: у жодного з заражених тваринах не зареєстровано будь-яких клінічних ознак хвороби. Проте, введення лабораторним тваринам ізолятів каліцивірусу кішок викликало у них вироблення гуморальних антитіл в титрах 5,3 – 6,6 log₂ (РН, середні показники).

Встановлено, що максимальною антигенною активністю для всіх видів лабораторних тварин володів ізолят К-2. При введенні якого

Таблиця 3. Накопичення каліцивірусу кішок у культурах клітин

Культура клітин	Накопичення каліцивірусу кішок (lg ЦПД ₅₀ /см ³)				
	1 пасаж	3 пасаж	5 пасаж	7 пасаж	10 пасаж
СгФК	8,0±0,8	8,2±0,6	8,5±0,5	8,2±0,5	8,2±0,6

Таблиця 4. Титр антитіл у лабораторних тварин

Ізолят	Титр антитіл у лаб. тварин (\log_2)	
	До ін'єкції	На 21 день після ін'єкції
К-1	≤ 2	$5,6 \pm 0,6$
К-2	≤ 2	$6,6 \pm 0,6$
К-3	≤ 2	$5,5 \pm 0,5$
К-4	≤ 2	$6,3 \pm 0,6$
К-5	≤ 2	$5,3 \pm 0,6$
Контроль	≤ 2	≤ 2

рівень антитіл у лабораторних тварин склав (РН): $6,6 \pm 0,6 \log_2$

Таким чином, встановлено, що каліцивірус не патогенний для лабораторних тварин, але володіє імуногенними властивостями.

Для подальшої роботи нами було обрано ізолят К-2, який за результатами досліджень показав найкращі імуногенні та репродуктивні властивості. Ізолят пройшов 10 пасажів в культурі клітин CrFK та накопичувався в титрах $8,0 - 8,5 \text{ lg ЦПД}_{50/\text{cm}^3}$.

Висновки:

1. Усі виділені ізоляти каліцивірусу кішок проявляли аналогічні культуральні властивості: максимальне накопичення вірусу вдалося досягти при культивуванні ізоляту FS, що становило $8,5 \pm 0,5 \text{ ЦПД}_{50/\text{cm}^3}$;

2. З'ясовано, що каліцивіруси в межах 10 пасажів у культурі клітин CrFK (нирки кошечки) не втрачають своїх репродуктивних властивостей.

3. Введення лабораторним тваринам ізолятів каліцивірусу кішок викликало у них синтез гуморальних антитіл у титрах $5,3 - 6,6 \log_2$ (РН, середні показники).

4. Встановлено, що максимальною антигенною активністю для усіх видів лабораторних тварин володіє ізолят К-2, при введенні якого, рівень антитіл у лабораторних тварин склав (РН): $6,6 \pm 0,6 \log_2$. Ізолят пройшов 10 пасажів в культурі клітин CrFK та накопичувався в титрах $8,0 - 8,5 \text{ lg ЦПД}_{50/\text{cm}^3}$.

ЛІТЕРАТУРА

- Gillespie J. H. Feline viral infections / J. H. Gillespie, F.W. Scott // *Advanced Veterinary Science*. – 1973. – Vol. 17. – P. 163–200.
- Poulet H. Comparison between acute oral (respiratory) and chronic stomatitis (gingivitis) isolates of feline calicivirus: pathogenicity, antigenic profile and cross-neutralization studies / H. Poulet, S. Brunet, M. Soulier // *Arch Virol*. – 2000. – Vol. 145(2). – P. 243–261.
- Rice C. C. Genetic characterization of 2 novel feline caliciviruses isolated from cats with idiopathic lower urinary tract disease / C. C. Rice, J. M. Kruger, P. J. Venta // *Veterinari Internal Medicine*. – 2002. – Vol. 16. – P. 293–302.
- Крылов А. Н. Биологические свойства возбудителя калицивирусной инфекции кошек и разработка метода диагностики болезни: автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.06 «Вирусология» / А.Н. Крылов. – Москва, 2000. – 115 с.
- Рахманина М. М. Противоэпизоотические мероприятия в питомниках кошек, неблагополучных по калицивирусу / М. М. Рахманина, В. И. Уласов // *Ветеринарная практика*. – 2001. – №2. – С. 32–40.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЯ КАЛИЦИВИРОЗА КОШЕК

Козленко Т. Г.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

Приведены результаты изучения культуральных свойств возбудителя калицивируса. Показаны оптимальные схемы репродукции калицивируса и определены параметры его культивирования. Установлено, что перевиваемые культуры клеток CrFK (почки котенка) и FS (селезенки ко-та), в равной степени чувствительны к калицивирусу кошек, где он реплицируется с проявлением выраженного ЦПД ($8,2 \pm 1,0 \lg \text{ЦПД}_{50}/\text{см}^3$, средний показатель). Изучение иммуногенных свойств калицивируса кошек для лабораторных животных показало, что калицивирус не патогенный для лабораторных животных, но обладает иммуногенными свойствами – введение лабораторным животным изолятов калицивируса кошек вызвало у них выработку гуморальных антител в титрах $5,3 - 6,6 \log_2$

Калицивироз, инфекция, вирус, культура клеток, изолят, ЦПД

STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF AGENT OF FELINE CALICIVIRUS INFECTION

T. Kozlenko

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

*The **purpose** of our research was to identify isolates of feline calicivirus infection, explore cultural and immunological properties of the agent of Calicivirus Infection in cats.*

Results and conclusions:

In the period from 2012 to 2014 were received and investigated more than 60 isolates of Calicivirus. Five of these isolates, which were received over the years from cats, were selected. Cats had age and breed differences and specific features of clinical manifestations of the disease. These 5 isolates of Calicivirus were used to infect cell cultures CrFK (kidney of kitten) and FS (cat's spleen). As a result of the experiment reproduction of Calicivirus was accompanied by cytopathic effect. It was observed uniform in cell cultures in all 5 isolates of Calicivirus from the first passage of virus. The most reproductive properties showed isolate K-2 in cell culture of kitten's kidneys (CrFK), its titer was $8,5 \pm 1,0 \lg \text{CPE}_{50}/\text{см}^3$.

For the study of immunogenic properties of feline calicivirus infection like lab animals were experimentally infected guinea pigs. For infection were used listed isolates of Calicivirus. Guinea pigs were injected subcutaneously by cultural suspension of virus with activity $8,5 \lg \text{CPE}_{50}/\text{см}^3$, in a dose of 1.0 см^3 . Antibody titers were determined on the 21st day after the injection of virus suspension. During the experiment, it was found that guinea pigs are not susceptible to the feline calicivirus infection: none of the infected animals have not got any clinical signs of disease. However, the injection of isolates of feline calicivirus infection to laboratory animals caused development a humoral antibody titres $5,3 - 6,6 \log_2$ (pH, average). Determined that the maximum antigenic activity for all kinds of laboratory animals had the isolate K-2, which caused level of antibodies in laboratory animals (PH): $6,6 \pm 0,6 \log_2$. For the further work we elected isolate K-2, that showed the best reproductive and immunogenic properties in the results of research. Isolate passed 10 passages in cell culture CrFK and accumulated titer $8,0 - 8,5 \lg \text{CPE}_{50}/\text{см}^3$

Feline calicivirus infection, virus, cell culture, isolate, CPE
