

На правах рукописи

РАХМАНИНА Надежда Алексеевна

**КЛИНИКО-ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
И ДИАГНОСТИКА
ИНФЕКЦИОННОГО ПЕРИТОНИТА КОШЕК**

**16.00.03- ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксенкологией
и иммунология**



АВТОРЕФЕРАТ

**диссертация на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**



Москва - 2007

**Работа выполнена в лаборатории контроля и стандартизации
лекарственных средств против вирусных болезней
мелких домашних животных и пушных зверей
Федерального Государственного учреждения
«Всероссийский государственный Центр качества и стандар-
тизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ
«ВГНКИ»)**

**Научный руководитель – доктор ветеринарных наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ Уласов Валентин Ильич**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОПОНЕНТЫ:

Доктор биологических наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ
Гуленков Виктор Всеволодович (ФГУ «ВГНКИ», г Москва)
Кандидат ветеринарных наук
Литенкова Ирина Юрьевна (ФГУП «Щелковский биокомбинат»
Московская обл , п Биокомбината)

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

**ГНУ Всероссийский НИИ охотничьего хозяйства и звероводства
им. проф. Б.М. Житкова РАСХН (ВНИИОЗ, г.Киров)**

Защита состоится «24» мая 2007г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 220.011.01 в Федеральном Государственном учреждении «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

Адрес: Россия, 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5, ФГУ «ВГНКИ».

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «ВГНКИ».

Автореферат разослан «20» апреля 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат ветеринарных наук, доцент
заслуженный ветеринарный врач РФ


КОЗЫРЕВ Ю.А.

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы В последние годы в России возрос интерес к разведению высокопородных кошек. Как и следовало ожидать, возникла необходимость в получении новых сведений о заболеваниях этих животных. Среди вирусных инфекций представителей семейства Felidae инфекционный перитонит занимает особое место. Болезнь вызывается коронавирусом, относится к категории «медленных» и имеет степень летальности, близкую к 100%. Зарегистрирована во всех странах мира. Существует множество споров относительно механизма передачи вируса от одного животного к другому, а так же патогенеза и причин спорадического возникновения этой болезни. Гуморальный иммунитет при ИПК не является защитным, и даже наоборот - усугубляет тяжесть клинического состояния.

До недавнего времени в нашей стране не существовало лабораторных методов выявления инфекционного перитонита кошек и диагноз ставили на основании характерных клинических и патологоанатомических признаков, описанных в иностранной литературе. Выявление вирусоносительства и латентного течения инфекции в связи с этим было невозможным.

Наибольшую угрозу инфекционный перитонит представляет для питомников со скученным содержанием животных, распространенность инфекции повышается из года в год (Сулимов А.А., 2004 г.)

Учитывая частоту обращения практикующих ветеринарных специалистов по оказанию консультативной помощи по данной проблеме, в плановую тематику лаборатории контроля и стандартизации лекарственных средств против вирусных болезней мелких домашних животных и пушных зверей ФГУ «ВГНКИ» была включена работа по выполнению задания «Выделение, идентификация и изучение биологических свойств коронавируса кошек» № гос. задания 02 09 01 на 2001-2005г г. Работа предусматривала решение актуальных задач по выделению, депонированию отечественного штамма вируса ИПК, изучению некоторых его биологических свойств, освоению методов диагностики болезни.

Цели и задачи исследования. Целью настоящих исследований явилось изучение особенностей клинического проявления инфекционного перитонита кошек, выделение изолятов вируса инфекционного перитонита кошек, изучение некоторых их биологических свойств, освоение методов диагностики болезни, проведение анализа полученных эпизоотических данных

Цель работы определяла основные задачи исследований

- 1 Выделить изоляты вируса инфекционного перитонита кошек, изучить их биологические свойства Деponировать штамм вируса для получения диагностических сывороток.
- 2 Изучить изменение уровня антител у кошек на разных стадиях болезни и определить диагностический титр в РИГА
- 3 Изучить возможность использования МФА для обнаружения вируса инфекционного перитонита кошек в клиническом материале от больных кошек и секционном – от павших
- 4 Изучить возможность использования йодно-агглютинационного теста (ЙАТ) и теста Ривалта как экспресс-методов диагностики ИПК
- 5 Изучить особенности клинического проявления и патоморфологических изменений при ИПК Изучить заболеваемость инфекционным перитонитом кошек разных пород и возраста, проанализировать сезонность при этой инфекции.

Научная новизна. Впервые в отечественной ветеринарной практике изучены клинические и эпизоотологические аспекты инфекционного перитонита кошек, выделены изоляты вируса ИПК Впервые в РФ паспортизирован и депонирован во Всероссийской Государственной коллекции штаммов микроорганизмов ФГУ «ВГНКИ» штамм вируса инфекционного перитонита кошек, предназначенный для получения диагностических сывороток Приоритетность разработки подтверждена патентом № 2250260 от 26.9 2003 г, выданным Федеральным Центром промышленной собственности Роспатент

Дана биологическая характеристика штамму вируса ИПК «Багира» Получены данные о его морфологии, культуральных, патогенных и антигенных свойствах

Определен оптимальный способ конъюгации эритроцитов вирусом ИПК. Оптимизированы условия постановки и учета результатов РНГА и МФА, предложенных для прижизненной и посмертной диагностики инфекционного перитонита кошек. Для экспресс-диагностики болезни рекомендовано использование неспецифических, но достоверных методов йодно-агглютинационного теста и проба Ривалта.

Практическая значимость. Практическая ценность работы определяется введением в лабораторную практику методов диагностики инфекционного перитонита кошек РНГА и МФА. Практикующим ветврачам рекомендовано использование теста йодной агглютинации и пробы Ривалта для диагностики ИПК уже при клиническом обследовании подозрительных по заболеванию животных.

Полученные результаты легли в основу нормативной документации на «Набор для выявления антител к коронавирусу плотоядных в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)». Разработаны «Методические рекомендации по диагностике инфекционного перитонита кошек МФА» и «Методические рекомендации по диагностике инфекционного перитонита кошек в реакции йодной агглютинации», утвержденные в установленном порядке.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы обсуждались и одобрены на заседаниях Ученого совета, методических комиссиях, конференциях молодых ученых ФГУ «ВГНКИ» (2002-2006гг.)

Сделаны сообщения на конгрессах и конференциях: II Междунар междуз НПК аспирантов и соискателей «Предпосылки и эксперимент в науке» (С-Петербург, 2004), XII Междунар Московском конгрессе по мелким домашним животным (Москва, 2004), Конференция молодых ученых, посвященная 75-летию ФГУ «ВГНКИ» «Лекарственные средства для животных и корма. Современное состояние и перспективы» (Москва, 2006), Междунар НПК «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных» посвященная 100-летию Я.Р. Коваленко (Москва, 2006), Научная Конференция ФГУ «ВГНКИ» «Лекарственные средства для животных. Современное состояние и перспективы» (Москва, 2007).

Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту.

- Результаты изучения биологических свойств вируса инфекционного перитонита кошек его патогенные, антигенные и культуральные свойства
- Применение методов РНГА, МФА, ЙАТ и пробы Ривалта для диагностики инфекционного перитонита кошек
- Результаты изучения клинических и эпизоотологических особенностей инфекционного перитонита кошек

Публикации научных исследований. Основные результаты диссертации опубликованы в 10 научных работах, в том числе изложены в заключительном отчете ФГУ «ВГНКИ» за 2000-2005 г. (№ Гос Регистрации 01 200 112122) Патентом на изобретение № 2250260 от 26 сент. 2003 г определен приоритет на «Штамм *Feline coronavirus*», используемый для контроля иммуногенной активности вакцин и изготовления биопрепаратов для диагностики инфекционного перитонита кошек»

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 212 листах машинописного текста и содержит разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, список литературы, практические предложения и приложения Работа иллюстрирована 22 таблицами, 8 рисунками, 24 фотографиями Список литературы включает 253 источника, в том числе 232 - зарубежных авторов

Приносим искреннюю благодарность сотрудникам ФГУ «ВГНКИ» к б н Ольшанской А А , д в н Рахманиной М М , к б н Элизбарашвили Э И , д б н , проф Обухову И Л , Ярловой Е А , Яковлевой Л А за помощь в проведении исследований, сотрудникам ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии» им Н Ф Гамалеи РАМН д б н Наровлянскому А Н , к б н Березиной Л К за организационную помощь в проведении экспериментов Благодарим руководителей и ветеринарных специалистов Горветлаборатории, Центральной лаборатории клиники «Мовет» и ветврачей клиник «Витус», «Центр» (Москва), «Доктора Тиханина»(С -Петербург)

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы.

Работа проведена в период с 2001г по 2007г на базе лаборатории контроля и стандартизации лекарственных средств против болезней мелких домашних животных и пушных зверей, лаборатории молекулярных методов диагностики ФГУ «ВГНКИ», виварии при ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» им Н Ф Гамалеи РАМН и ОПХ «Манихино». Материал для исследования получали из питомников и ветеринарных клиник г.г Москвы и Санкт-Петербурга, зоопарков г Москвы и г Новосибирска

Животные. Для выделения изолятов вируса использовали асцитные жидкости и селезенки 14 котят 3-12 мес возраста, подозрительных по заболеванию ИПК. Для постановки биопробы – 16 беспородных котят 2-6 месячного возраста. В опыте по применению различных методов диагностики ИПК на разных сроках после инфицирования использовались 12 беспородных интактных котенка 2-х месячного возраста. Для определения чувствительности к возбудителю болезни и изучения антигенных свойств изолятов вируса ИПК были использованы 20 кроликов породы шиншилла массой 2,5- 3 кг, 20 морских свинок массой 250-300 г и 80 белых мышей массой 14-16г. Получение гипериммунных сыворонок к вирусу инфекционного перитонита кошек проводили на 30 кроликах массой 2,5-3 кг.

Клинический и секционный материал от 812 подозрительных по заболеванию кошек и 3-х манулов был исследован методами РНГА, МФА, ЙАТ и пробой Ривалта. Результаты исследований легли в основу анализа клинико-эпизоотологических особенностей инфекционного перитонита.

Штаммы микроорганизмов и биопрепараты. Для изготовления диагностических препаратов использовали (в скобках – инфекционная активность вируса) выделенный нами штамм вируса инфекционного перитонита кошек «Багира» ($5,0 \lg \text{ИД}_{50}/\text{см}^3$). Для контроля специфичности диагностических

препаратов производственные штаммы: коронавируса собак «Карат» (6,5 lg ТЦД 50/см³), калицивируса кошек «Ларс» (8,0 lg ТЦД 50/см³), панлейкопении кошек «Мяу» (10,0 log₂ (РГА), инфекционного ринотрахеита кошек «Гранд» (7,0 lg ТЦД 50/см³)

Для исключения сопутствующих заболеваний подопыгных кошек и проверки специфичности и отсутствия контаминации полученных нами сывороток использовали зарегистрированные в РФ диагностические наборы производства НПО «Нарвак» «Набор для выявления антигена парвовирусного энтерита собак, панлейкопении кошек и вирусного энтерита пороков (парво-тест)», «Набор для выявления антител к вирусу иммунодефицита кошек (вид-тест)», «Набор для выявления вируса лейкемии кошек (лейко-тест)»

Для идентификации изолятов коронавируса кошек была использована специфическая гипериммунная сыворотка, полученная от доктора J Chappius (Франция)

Культуры клеток. При поиске чувствительных тест-систем для репродукции вируса и определения его инфекционности использовали первичные и субкультуры клеток почек котенка и перевиваемые культуры клеток CrFK и FS, полученные из музея клеточных культур нашего Центра

Питательные среды и растворы. В качестве ростовых сред для первичных и субкультур клеток применяли общепринятые в вирусологии питательные среды в соотношениях, оптимальных для каждой из них

Оборудование: гомогенизатор Universal laboratory AID type MPW-309, ламинарный бокс ISO – 9002 фирмы PMV, термостаты электрические, CO₂ - инкубатор D-6450 фирмы Heraeus, электронный микроскоп JEM-100 CX (Япония); инвертированный микроскоп «Биолам П-1, люминесцентный микроскоп «Люам И-1», «Олимпус CX31», 96-луночные микропанели и многоканальные микропипетки фирмы «Costar», «Titratek», низкотемпературные и бытовые холодильники; центрифуги лабораторные низко и высокоскоростные, шуттель аппарат типа SKILO UNION

Методы.

Для выделения изолятов вируса инфекционного перитонита кошек использовали асцитную жидкость от 14 спонтанно заболевших котят и 12 селезенок от этих животных, которые пали или были эвтаназированы

Принадлежность изолятов к коронавирусу кошек подтверждали путем электронно-микроскопических исследований, постановкой биопробы на котятах, а также исследованиями в РНГА с использованием специфической сыворотки к инфекционному перитониту кошек (Франция)

Подготовка клинического и патматериала к исследованиям селезенки от подозрительных по заболеванию животных гомогенизировали, разводили раствором Хенкса в соотношении 1:10 и осветляли центрифугированием при 1500 об/мин в течение 15 минут. Супернатант подвергали микрофильтрации с использованием фильтров Миллипор ($\bar{\phi}$ 0,45 и 0,22 мкм)

Морфологические свойства изолятов вируса ИПК изучали путем электронной микроскопии, проведенной совместно с с.н.с. Лотте В.Д. (Институт вирусных препаратов им. О.Г. Анджапаридзе АМН РФ)

Препараты для просмотра в электронном микроскопе готовили из осадка, полученного при ультрацентрифугировании (при 40000 об/мин в течение 2 часов) микрофильтрата селезенки, ресуспендированного в фосфатном буфере (рН 7,0). В качестве контрастирующего вещества применяли 2% водный раствор фосфорновольфрамовой кислоты (рН 6,0-7,0)

Для постановки биопробы формировали 4 группы по 4 котенка 2-6 месячного возраста. Двум котят из каждой группы вводили внутрибрюшинно, и двум - орально по одному из 3-х изолятов вируса в объеме 3,0 см³. Одна группа котят служила контрольной. Животным теми же способами инъецировали микрофильтрат гомогената селезенки здорового котенка. За клиническим состоянием животных наблюдали 8 недель.

При изучении патогенных и антигенных свойств вируса ИПК на лабораторных животных его тканевые изоляты активностью 5,0 lg ИД/50/см³ вводили кроликам, морским свинкам и белым мышам внутрибрюшинно

или подкожно в объемах 2,0, 1,0 и 0,5см³ соответственно. Ежедневно получаемые сыворотки крови исследовали в РНГА, мазки-отпечатки крови и фекалий - МФА.

Изучение культуральных свойств вируса. Первично - трипсинизированные культуры клеток и перевиваемые клеточные линии готовили и поддерживали в лаборатории.

Использовали стационарный метод культивирования и заражение монослойных культур клеток, выращенных на покровных стеклах, помещенных в пенициллиновые флаконы. Посадочная концентрация первично - трипсинизированных культур клеток - 250±100 тыс кл/см³, а перевиваемых - 150±50 тыс кл/см³. Результаты накопления вируса оценивали, используя МФА. Для этого покровные стекла с монослоем клеток извлекали из пенициллиновых флаконов на разных сроках после инфицирования, фиксировали монослой ацетоном, окрашивали его полученной нами люминесцентной сывороткой в течение 30 мин при температуре 37⁰С, отмывали от красителя ФСБ рН 7,2 и просматривали в люминесцентном микроскопе. Контролем служили аналогичные препараты с незараженным монослоем клеток.

Гипериммунизация кроликов выполнялась по двум схемам. При первой - тканевой очищенный микрофилтратом вирус ИПК (5,0 lg ИД 50/см³) вводили животным четырехкратно еженедельно внутримышечно в объеме 1,0см³, а затем, однократно в той же дозе внутривенно. Во втором варианте вирус инъецировали в объеме 1,0 см³ с таким же количеством неполного адьюванта Фрейнда в область подколенных лимфоузлов, а через 2 месяца - без адьюванта внутривенно в объеме 0,25см³. Всех кроликов тотально обескровливали через 2 недели после заключительной инъекции антигена. Полученные сыворотки исследовали на стерильность, специфичность, активность (РНГА) и отсутствие неспецифических реакций с вирусами ПЛК, ИРТ, КВК.

Изготовление набора для диагностики инфекционного перитонита кошек в РНГА. Формалинизацию и танизацию эритроцитов барана проводили по стандартной методике. Экспериментально подбирали оптимальные ус-

ловия для сенсibilизации эритроцитов К их суспензиям 2, 5, 10% концентрации добавляли антиген (5,0 Ig ИД 50/см³) в соотношении 1 5 Смесь инкубировали 30 минут в термостате при температурных режимах 37⁰С и 22⁰С, после чего трижды отмывали ФБР с рН 7,2 Титр антител в сыворотках крови определяли по их максимальному разведению, вызывавшему торможение геммагглютинации

Для изготовления набора для диагностики инфекционного перитонита кошек МФА использовали глобулин, полученный методом высаливания насыщенным раствором сульфата аммония из гипериммунной сыворотки кроликов, обладающей специфической активностью 1 256 (РНГА) к вирусу ИПК Конъюгация аггител ФИТЦ проводилась в профильной лаборатории ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии» им Н Ф Гамалеи Полученные конъюгаты имели показатели белок -15 мг/мл, метка - 3 мг/ мл О наличии вируса в тестируемых образцах судили по обнаружению светящейся цитоплазмы клеток в исследуемых пробах при отсутствии свечения в контроле

Тест йодной агглютинации (ЙАТ). На чистое, обезжиренное спирт-эфиром предметное стекло наносили каплю сыворотки или экссудата и добавляли каплю йодного реактива Сразу после перемешивания компонентов проводили учет результатов реакции При положительном - в капле образуются темно-коричневые хлопья, а при отрицательном - капля остается прозрачной (без хлопьев и осадка) и имеет цвет йодного реактива Сомнительными считали пробы с выпадением мелкокрошковатого осадка

Тест Ривалта. Для выполнения теста использовали 2,0% раствор уксусной кислоты, в пробирку с которой вносили каплю исследуемого экссудата Отрицательная проба характеризовалась растворением капли При положительном тесте капля экссудата сохраняет очертания и некоторое время может держаться вверху пробирки или медленно опускаться вниз в форме медузы, оставляя за собой линейный след

Статистическая обработка результатов исследований.

При анализе и обобщении результатов исследований использовали методы статистической обработки, общепринятые в биологии. Вычисление среднегеометрических показателей титров антител и антигенов (x), стандартные отклонения (m) этих показателей производили с использованием компьютерной программы Excel. В качестве доверительного интервала был выбран уровень вероятности $P=0,95$ (уровень значимости $p=0,05$).

2.2. Результаты собственных исследований

Выделение и идентификация изолятов инфекционного перитонита кошек. Из 26 образцов асцитной жидкости и гомогенатов селезенки, полученных от больных и павших кошек с подозрением на заболевание ИПК, в результате электронной микроскопии в трех были обнаружены вирусные частицы диаметром приблизительно 100 нм, морфологически сходные с коронавирусом. Эти изоляты вируса были обозначены, как №№ 1, 2 и 3 и использованы в дальнейших исследованиях.

Постановка биопробы с использованием трех изолятов вируса ИПК показала, что их внутрибрюшинное введение всегда вызывало развитие клинических проявлений болезни: увеличение объема живота, угнетение, дегидратацию, ремитирующую лихорадку (до $40,5^{\circ}\text{C}$). У одного животного наблюдали симптомы поражения нервной системы: ригидность конечностей, опистотонус, гиперестезию. Наименьший инкубационный период (14-28 суток) и падеж в ранние сроки (22 - 31-е сутки) отмечен у котят, зараженных изолятом вируса №3. При пероральном введении изолятов вируса №1 и №2 в течение 8 недель (срок наблюдения) не выявили каких-либо клинических признаков болезни. У одного котенка, зараженного тем же способом изолятом вируса №3, отмечали угнетение, истощение, лихорадку. У всех павших или эвтаназированных по окончании опыта котят, обнаружены типичные для ИПК патологические изменения органов разной степени выраженности. Котята кон-

контрольной группы остались клинически здоровыми, после их эвтаназии патологических изменений внутренних органов не выявлено

Приготовление эритроцитарного диагностикума. Изолят вируса № 3 был использован нами для конъюгации эритроцитов, проведенной с суспензиями эритроцитов 2-10% концентраций, при разных температурных режимах и экспозициях. Установлено, что оптимальные условия конъюгирования эритроцитов антигеном вируса ИПК следующие: смешивание 5%-ной суспензии танализованных эритроцитов с микрофилтратом тканевого вируса ИПК в соотношении 1:5, инкубирование смеси в течение 30 минут в термостате при температуре 37°C.

Контроль приготовленного диагностикума проводили на отсутствие самоагглютинации. Его специфичность подтверждали с полученной из Франции стандартной сывороткой, титр с которой в РНГА составил 1:512. РНГА с сыворотками, содержащими антитела к вирусам ПЛК, КВК и ИРТ показали отрицательный результат.

Для изучения патогенности и антигенности изолятов вируса ИПК для лабораторных животных их вводили интактным кроликам, морским свинкам и белым мышам внутрибрюшинно или подкожно. Тем же видам животных контрольной группы инъецировали микрофилтрат гомогената селезенки здорового котенка.

Результаты опыта показали, что однократное введение вируса ИПК не вызывало каких-либо клинических признаков болезни у этих животных. При исследовании мазков крови и фекалий МФА вирусовыделения у них не обнаружено. Как подкожное, так и внутрибрюшинное введение изолятов вируса вызвало накопление антител, которое было максимальным на 21 сутки и составило, в частности, при инъекции изолята № 3 у кроликов - $6,9 \log_2$ (РНГА), у морских свинок - $6,6 \log_2$ и белых мышей - $6,3 \log_2$.

Таким образом, установлено, что изолят №3 вируса инфекционного перитонита кошек обладал наибольшей патогенностью для котят и антигенностью для лабораторных животных. Этот изолят был типирован в лаборатории

молекулярных методов диагностики ФГУ «ВГНКИ» как вирус инфекционного перитонита кошек

При изучении условий хранения, обеспечивающих стабильность инфекционности вируса установлено, что при температуре минус 70°C, снижение его титра за каждый год хранения составляло в лиофилизированных образцах приблизительно 1,0 lg ИД 50/см³, в замороженных - 1,0-1,5 lg ИД 50/см³. При температурном режиме минус 19°C инфекционная активность вируса снижалась на 1,5-2,0 lg ИД 50/см³ ежегодно

Проведенные исследования дали основание для паспортизации и депонирования в коллекцию микроорганизмов ФГУ «ВГНКИ» штамма вируса ИПК (изолят №3), получившим название «Багира»

Для получения гипериммунных сывороток использовали тканевой, очищенный микрофилтрацией штамм вируса ИПК Багира активностью 5,0 lg ИД 50/см³, который вводили двум группам по 15 интактных кроликов по двум выше описанным схемам

Более высокую - 7,0 -10,0 log₂ активность в РНГА показали сыворотки крови, полученные от кроликов, иммунизированных способом с использованием эффекта "иммунной памяти" Полученные сыворотки прошли контроль стерильности и отсутствия неспецифической активности с антигенами вирусов ПЛК, ИРТ и КВК и были использованы при постановке РНГА как позитивные контрольные, а так же для изготовления диагностикума МФА Установлено что, хранение специфических сывороток в лиофилизированном состоянии при температуре от 4°C до -19°C и в замороженном при -19°C в течение 2 лет снижает их титр не более, чем на 2,0 log₂ (РНГА)

Диагностика инфекционного перитонита кошек в РНГА. При исследовании в РНГА проб сывороток крови и асцитных жидкостей от 812 кошек в 319 образцах клинического материала титр составил 1 256 и выше (табл 1)

Таблица 1

Результаты диагностики инфекционного перитонита кошек в РНГА

Количество животных	Титр в РНГА		Диагноз на ИПК	
	При первом исследовании	При повторном исследовании	Первичный	Окончательный
319	1 256 – 1 4096	н/и	Положительный	
118	1 32-1 128	1 4 - 1 32	Сомнительный	Отрицательный
22	1 32-1 128	1 256 – 1 1024	Сомнительный	Положительный
353	≤1 16	≤1 16	Отрицательный	Отрицательный

Этот показатель всегда подтверждался дальнейшим развитием болезни, иногда - гибелью животного и был определен как диагностический. Величина титра антител больных ИП кошек достигала максимального показателя 1 4096 и прямо коррелировала с тяжестью их клинического состояния.

В 140 пробах титр гуморальных антител был 1 128 и ниже. Повторное исследование сывороток крови от этих кошек, полученных с интервалом 2-4 недели, показало его увеличение, достигшее диагностической величины у 22 животных - заболевание ИПК подтверждено. Сохранение первоначального результата при повторном исследовании у 118 кошек или снижение титров в РНГА могло указывать на латентную форму болезни или носительство, а также, на возможную инфицированность энтеральным или ксеногенными коронавирусами - диагноз на ИПК в этом случае условно считали отрицательным, но рекомендовали проведение систематических обследований.

Метод флуоресцирующих антигел был использован нами для обнаружения коронавируса в тканях и органах кошек и изучения его накопления в культуре клеток.

При изучении культуральных свойств вируса инфекционного перитонита кошек использовали первичные и субкультуры клеток почек котенка и перевиваемые культуры клеток CrFK и FS. Ни на одной из них при 3-х кратном пассажировании вируса не наблюдали проявлений ЦПД.

Для изучения динамики накопления вируса ИПК (штамм Багира) мы использовали МФА. Через 24 часа после инфицирования в пораженных клетках наблюдалось яркое свечение отдельных мелких гранул локализованных в цитоплазме вблизи ядра. Через 48 часов после заражения вся цитоплазма ярко флуоресцировала, клеточное ядро было темным и хорошо просматривалось. В незараженных культурах клеток мы наблюдали очень слабое равномерное свечение всей поверхности образцов. Накопление вируса ИПК культуре клеток CrFK в первом пассаже достигало $5,0 \text{ Ig ИД50/см}^3$ (МФА).

Диагностика инфекционного перитонита кошек МФА. Для исследования этим методом использовали тонкие мазки-отпечатки клинического материала (крови, асцитной жидкости, фекалий) и секционных проб (селезенки, печени, лимфоузлов, мочевого пузыря, кишечника).

Проведенные исследования показали, что в образцах, полученных от больных кошек, специфическое свечение было особенно выражено в мазках крови и асцитных жидкостей.

В мазках-отпечатках паренхиматозных органов от тех же животных селезенки, печени, почек, также наблюдалось диффузное свечение цитоплазмы клеток различной интенсивности. Особо яркое диффузное свечение цитоплазмы эпителиальных клеток, с хорошо заметными темными ядрами мы наблюдали в пробах мочевого пузыря, тонкого и толстого отделов кишечника.

В материале от некоторых клинически здоровых или павших по иным причинам (травмы, мочекаменная болезнь и др.) кошек мы отмечали флуоресценцию в образцах кишечника и фекалий при ее отсутствии у тех же животных в мазках крови или паренхиматозных органов. Все эти случаи не сопровождалось клиническими или патанатомическими изменениями, характерными для ИПК. Учитывая тропизм вируса инфекционного перитонита к макрофагам, а других коронавирусов - к эпителию кишечника, считали, что диагноз на ИПК может быть поставлен только при обнаружении специфического свечения в мазках крови и паренхиматозных органов независимо от результатов исследования кишечника и фекалий (табл. 2).

Таблица 2

Результаты исследований клинического и секционного материала МФА

Клинический и секционный материал	Кошки, подозрительные по ИПК (выпотная форма)	Кошки, подозрительные по ИПК (сухая форма)	Кошки без признаков ИПК или павшие по другим причинам	Частота выявления вируса у кошек
	Количество проб			
	25	15	32	(%)
кровь	25/0**	15/0	0/32	100
асцитная жидкость	23/2	-	-	92
фекалии	25/0	15/0	5/32	100*
селезенка	23/2	15/0	0/32	95
мезентериальные лимфоузлы	25/0	15/0	0/32	100
толстый отдел кишечника	25/0	15/0	3/32	100*
тонкий отдел кишечника	25/0	13/2	3/32	95*
мочевой пузырь	25/0	15/0	0/32	100
печень	25/0	14/1	0/32	97,5

Примечание **числитель- количество положительных результатов, знаменатель - количество отрицательных результатов
*обнаружение вируса в фекалиях и кишечнике у кошек, не имевших признаков ИПК считали неспецифичным

Таким образом, установлено, что МФА может быть использован для прижизненной и посмертной диагностики инфекционного перитонита кошек

Биохимические исследования крови и асцитной жидкости были проведены нами у 35 больных ИПК животных. Единственным стабильно выявляемым показателем являлось повышение содержания глобулинов от 45г/л и снижение показателя альбумина в сыворотке крови (норма 23-39г/л). Коэффициент альбумин-глобулинового соотношения при этом в сыворотках крови у 32 из 35 больных животных был менее 0,8 и составлял около 0,4-0,6. Гиперпротеинемия (более 80 г/л) выявлялась нами только у 26 больных кошек

Асцитная и плевральная жидкость от кошек с экспансивным ИПК также характеризовалась высоким содержанием белка (более 35 г/л), особенно гамма-глобулина и фибрина У 4 кошек с желтушностью слизистых оболочек и кожи выявлено повышение содержания билирубина до 1 -2 мг%

В связи с тем, что наиболее характерные для ИПК отклонения биохимических показателей могут быть обнаружены с помощью теста йодной агглютинации, выявляющей повышение уровней гамма-глобулина в сыворотке и эффузионной жидкости, и пробы Ривалта, показывающей увеличение содержания белка и фибрина в выпотах, мы использовали эти тесты для экспресс-диагностики ИПК

Тест йодной агглютинации (ЙАТ). Данные, полученные при исследовании методом ЙАТ сывороток крови и (или) асцитных (плевральных) жидкостей подозрительных по заболеванию кошек, в каждом случае сопоставлялись со сведениями о клиническом состоянии животного и диагнозом, поставленным в РНГА Исследования 120 проб клинического материала от здоровых и подозрительных по заболеванию ИПК кошек показали, что йодная проба была всегда положительной при титре антител в сыворотке крови 1 256 и выше (диагностический титр) При титре 1 8-1 128 (РНГА) йодная проба давала, в большинстве случаев, отрицательный результат Если он был положительным или сомнительным это всегда сопровождалось нарастанием титра антител в РНГА при повторных исследованиях через 2-4 недели и находило клиническое подтверждение диагноза Результаты исследования клинического материала, полученные методом йодной агглютинации (ЙАТ) показали степень соответствия результатам РНГА - 96,8%

Установлено, что гипергаммаглобулинемия при инфекционном перитоните имеет определенную степень специфичности для этой болезни и не возникает у животных в ответ на любое антигенное раздражение, что подтверждалось исследованием ЙАТ сывороток от кошек с другими инфекционными болезнями, а также проверке гипериммунных сывороток, полученных на кро-

ликах на штамм ИПК и ксеногенные коронавирусы Во всех пробах сывороток от этих животных йодная проба была отрицательной

Тест Ривалта очень широко используется за рубежом при диагностике выпотной формы инфекционного перитонита кошек Мы исследовали 14 проб асцитных жидкостей, в каждом случае параллельно определяя титр антител РНГА Тест Ривалта показал положительные результаты с эффузионными жидкостями, полученными от больных и подозрительных по заболеванию кошек с титрами антител в сыворотке крови 1 256 и выше, а в одном случае - 1 128 Исследование сывороток крови больных животных, даже с активностью в РНГА 1 4096 ни в одном случае не дало положительного ответа Таким образом, установлено, что проба Ривалта может быть использована для экспресс-анализа асцитной жидкости подозрительных по заболеванию кошек и постановке предварительного диагноза на ИПК Сыворотка крови для этого непригодна

Диагностика инфекционного перитонита кошек на разных сроках после экспериментального заражения.

Для изучения возможностей выявления инфицированных животных всеми предложенными методами диагностики на разных сроках их инфицирования использовали 12 котят 1,5-2-х месячного возраста Шесть из них были заражены путем внутрибрюшинного введения штамма вируса ИПК «Багира» ($5,0 \text{ lg ИД } 50/\text{см}^3$ в объеме $3,0 \text{ см}^3$) На седьмые сутки после заражения мы выявляли их инфицированность МФА, РНГА, ЙАТ, несмотря на отсутствие клинических симптомов болезни Через 2 недели, при появлении первых клинических признаков болезни и регистрации вирусовыделения, к ним попарно посадили 4-х интактных котят Уже через неделю у этих котят инфицированность выявлялась всеми указанными методами. При внутрибрюшинном способе заражения инкубационный период составлял минимум 2 недели, при контактном – от 2 до 6 месяцев Клинические признаки эффузионной формы ИПК наблюдались у 7 котят и выражались увеличением объема живота, угнетением, желтушностью слизистых оболочек, лихорадкой У одного ко-

тенка выявлены признаки поражения респираторного тракта: кашель, одышка. Титр антител в РНГА на разных стадиях болезни достигал 4,0-10,0 \log_2 и прямо коррелировал с тяжестью клинического состояния животных. В течение 16 месяцев они пали или были эвтаназированы. При патологоанатомическом вскрытии наблюдали признаки, характерные для ИПК: пиогранулематозные поражения серозной поверхности брюшной полости, увеличение селезенки и брыжеечных лимфоузлов, наличие эффузионной жидкости, при сухой форме - плеврит, увеличение селезенки и лимфоузлов, поражения почек.

Два животных - кот и кошка, зараженные внутривнутрибрюшинно, через 6 месяцев и далее не проявляли клинических симптомов болезни. Титр их сывороток крови, достигавший в первый месяц после инфицирования 5-7 \log_2 в РНГА снизился до 3,0-4,0 \log_2 . Методами МФА и ПЦР коронавирус в крови не обнаруживался, но выявлялся в пробах фекалий. Тест йодной агглютинации был отрицателен. Тем не менее, родившийся у этой пары единственный котенок пал менее чем через 4 недели после рождения с признаками ИПК (диагноз подтвержден МФА и ПЦР), что свидетельствует о небезопасности вирусосоноительства.

Для сравнительной оценки диагностических методов: РНГА, МФА, ИАТ и теста Ривалта мы сделали выборку из 56 тех лабораторных исследований, при которых тестирование проводилось с одновременным использованием всех четырех реакций (таблица 3).

Совпадение результатов МФА и однократного исследования РНГА составило 94,4%. Сыворотки крови от 3 сомнительно прореагировавших кошек были исследованы повторно и получены от них через 2-3 недели после первого анализа. Второй результат показал возрастание титра антител у 2 кошек до 1 256, а у одной, с прежним результатом 1 32, стал равен 1 8. Таким образом, установлено, что исследование парных проб сывороток в РНГА повышает диагностическую ценность этой реакции, а совпадение результатов МФА и РНГА в этом случае возросло до 100%.

Таблица 3

Сопоставление результатов исследования кошек, подозрительных по заболеванию инфекционным перитонитом методами РНГА, МФА и ЙАТ

Метод исследования	Наименование клинического материала	Исследовано кошек	Результат исследований (количество кошек)		
			положительный	сомнительный	отрицательный
МФА	мазки крови	56	36	нет	20
	мазки фекалий	56	38*	2	16
	ИТОГ: выявлено 38 инфицированных коронавирусом кошек и 36 больных ИПК				
РНГА - первое исследование	сыворотки крови или асцитные жидкости	56	34	3	19
повторное исследование сомнительно прореагировавших кошек	сыворотки крови	3	2	нет	1
ИТОГ: при первичном исследовании 56 кошек выявлено 34 больных ИПК, повторном – 36 больных ИПК кошек					
ЙАТ	сыворотки крови	56	34	3	19
	асцитные жидкости от тех же кошек	24	22	1	1
ИТОГ: при исследовании 56 сывороток крови выявлено 34 положительных пробы при исследовании 24 асцитных жидкостей выявлено 22 положительных пробы					
Тест Ривалта	асцитные жидкости	24	23	нет	1
ИТОГ: при исследовании 24 асцитных жидкостей выявлено 23 положительных пробы					
Совпадение результатов исследований разными методами	МФА и однократного исследования в РНГА		94,4 %		
	МФА и исследования в РНГА парных проб сывороток		100 %		
	МФА и ЙАТ		94,4 %		
	ЙАТ и исследования в РНГА парных проб сывороток		94,4 %		
	ЙАТ и пробы Ривалта		95,7 %		

Метод йодной агглютинации позволил выявить инфекционный перитонит у 34 из 56 кошек, что составило 94,4% совпадения с результатами МФА и РНГА при парном тестировании сывороток

Совпадение результатов исследований методом Ривалта и ЙАТ составило 95,7 % И в той и в другой реакции выявлены по одному отрицательно-

му результату, подтвержденному в дальнейшем асцидирующий перитонит у этой кошки был вызван прободением кишечника

Подводя итоги сравнительной оценки результатов диагностики методами МФА, РНГА и ЙАТ установили высокую степень совпадения результатов диагностических исследований, выполненных с использованием РНГА, МФА, ЙАТ и теста Ривалта, составившую не менее 94,4 %

Клиническая и патологоанатомическая диагностика. Эпизоотологический анализ полученных результатов. С целью изучения эпизоотологических и клинических аспектов инфекционного перитонита кошек с использованием предложенных нами методов диагностики исследовали 812 проб от подозрительных по заболеванию домашних и диких кошек. В результате комплексных диагностических исследований инфекционный перитонит был подтвержден у 341 из этих животных, в том числе 3 манулов. Анализ возрастной предрасположенности проводился на том количестве животных, сведения о которых по этим показателям имелись

Инфекционный перитонит установлен у 195 котят (57%) и 146 кошек (43%). Возраст 295 животных был следующим: от 1мес. до 6мес – у 84 животных (28,5%), от 6мес до 1года – у 56 (19%), от 1года до 3лет – у 62 (21%), от 3лет до 7лет – у 55 (18,5%) и старше 7лет – у 38 (13%)

Соотношение породистых и беспородных животных при анализе данных на 286 животных составляло соответственно 194 (68%) на 92(32%) Большая часть всех больных чистопородных животных представлена кошками британской породы – 78 (40% от общего числа больных ИПК породистых животных), персидской породы 32 (16,5%), шотландской вислоухой - 13 (6,7%), по 10 (5%) кошек представляли породы русская голубая, сиамская, сфинкс, по 8 (4%) - мейн-куны и экзоты, 6 (3%) - курильские бобтейлы. Породы корниш рекс, сибирская, тибетская, норвежская лесная, тайская, бурма болели в единичных случаях, и на каждую из них приходится не более 2%

Наиболее часто животные имели голубой и серый окрас – 61 кошка (40%) из 151 больной, 20 кошек (13%) были рыжими, 18 (12%) – черными, 11

(7%) – природного серого окраса, 8 (5%) – белые, реже - иных окрасов

Согласно результатам наших исследований, частота регистрации инфекционного перитонита у молодых чистокровных кошек более чем в 3 раза выше, чем у беспородных, но с увеличением возраста, у беспородных животных он выявляется чаще

Анализ клинических проявлений ИПК проведен у 303 больных животных. Увеличение объема живота встречался у 149 (60%) кошек. Причем, у трети животных он является единственным клиническим признаком. Эффузионная форма ИПК выявлена в 60% случаев, неэффузионная – в 40%. Эти показатели, по нашим данным, были относительно так как «сухая» форма ИПК в ходе развития инфекционного процесса часто предшествовала «влажной». Общими клиническими признаками для эффузионной и неэффузионной формы болезни являлись угнетение, вялость, анорексия, истощение и т.д. наблюдались у 161 кошки (53%), при этом в 43 случаях как единственные симптомы болезни. Респираторные симптомы (в т.ч. хрипы, кашель, отдышка, пневмония и т.д.) отмечены у 14 животных (5%). Желтушность слизистых оболочек наблюдались у 20 животных (7%). Рвота и диарея - у 29 животных (9,5%). Лихорадка, как правило, ремитирующего типа с повышением температуры тела до 39,5°C и выше отмечалось у 32 животных (11%). В единичных случаях наблюдали признаки поражения ЦНС (парезы, судороги, манежные движения), анемию, нефриты и нефрозы, обезвоживание, заболевание глаз (конъюнктивиты, кератиты, иридоциклиты). Клиническая картина болезни у манулов и домашних кошек была идентична.

У 54 (18%) кошек, которым был поставлен положительный диагноз, на момент обследования были клинически здоровы. Все они содержались в благополучных по ИПК питомниках или имели контакт с больным или павшими от данной болезни животными. У 5 (1,5%) из них рождался мертвый приплод или наблюдалась гибель потомства в первые недели жизни.

Установлено отсутствие сезонности проявления ИПК.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведения комплексных исследований доказано распространение в России инфекционного перитонита у домашних кошек и манулов. Установлены горизонтальный и вертикальный пути передачи вируса и отсутствие сезонности болезни.

2. Инфекционный перитонит кошек может клинически проявляться эффузионной (сухой) или неэффузионной (влажной) формами, а также протекать латентно. Основные симптомы инфекционного перитонита при спонтанном и экспериментальном заражении кошек идентичны. Влажная форма болезни проявляется, чаще всего, увеличением объема живота, сухая – признаками общего недомогания. При той и другой форме могут наблюдаться желтушность слизистых оболочек и кожи, симптомы поражения нервной системы и глаз. При патологоанатомическом исследовании наиболее характерны асцидирующий перитонит, увеличение селезенки и брыжеечных лимфоузлов, пиогрануломатоз, нефроз.

3. Штамм вируса инфекционного перитонита кошек Багира патогенен для кошек при внутрибрюшинном и пероральном заражении, не вызывает болезни или вирусывыделения у кроликов, морских свинок и белых мышей, но антигенен для них. Размножается в субкультуре клеток почек котенка, перевиваемых линиях клеток CrFK и Fs без проявления цитопатического эффекта, может быть использован для получения специфических диагностических сывороток активностью до $9,0 \log_2$ (РНГА).

4. Метод флуоресцирующих антител может применяться для прижизненной и посмертной диагностики инфекционного перитонита кошек и для обнаружения вируса в культурах клеток. Положительный диагноз на ИПК ставят при обнаружении специфического свечения в мазках и мазках-отпечатках крови, асцитной жидкости, паренхиматозных органов, лимфоузлов. Обнаружение свечения только в мазках фекалий или мазках-отпечатках кишечника подтверждает наличие коронавирусной инфекции, но не дает основания для постановки диагноза «инфекционный перитонит кошек».

5 Реакция непрямой гемагглютинации может быть рекомендована для диагностики инфекционного перитонита кошек Для постановки РНГА используют сыворотки крови кошек или асцитную жидкость Диагностический титр антител составляет 1 256 и выше Для уточнения диагноза при его величине 1 128 и ниже требуется проведение повторных исследований с 2-4-х недельным интервалом Титр антител может достигать 1.4096 и прямо коррелирует с тяжестью состояния животного

6 Для неспецифической экспресс-диагностики инфекционного перитонита кошек могут быть использованы йодно-агглютинационный тест и проба Ривалта, обладающие высокой достоверностью

Практические предложения:

На основании представленных результатов исследований разработаны

1 ТУ на «Набор для выявления антител к коронавирусу плотоядных в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)» ТУ 9388-025-00494189-01, согласованные с Зам рук Департамента ветеринарии Е А Непоклоновым 29 01 2002г и утвержденных Директором ФГУ «ВГНКИ» А Н Паниным

2 «Наставление по применению набора для выявления антител к коронавирусу плотоядных в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)» утвержденное Зам рук Департамента ветеринарии Е А Непоклоновым 29 01 2002 г

3. «Методические рекомендации по диагностике инфекционного перитонита кошек МФА», утвержденные директором ФГУ «ВГНКИ» Паниным А Н 6 04 2007 г

4 «Методические рекомендации по диагностике инфекционного перитонита кошек в реакции йодной агглютинации», утвержденные директором ФГУ «ВГНКИ» Паниным А Н 10 03 2004 г.

5 Штамм вируса инфекционного перитонита кошек «Багира» депонирован во Всероссийской государственной коллекции культур микроорганизмов ФГУ «ВГНКИ», для контроля иммуногенной активности вакцин и изготовления биопрепаратов для диагностики инфекционного перитонита кошек Справка о депонировании от 28 02 2003 г , патент № 2250260 от 26 9 2003 г

Список работ опубликованных по теме диссертации:

- 1 Рахманина Н А Диагностика инфекционного перитонита кошек методом йодной агглютинации / Рахманина Н А , Рахманина М М , Элизбарашвили Э И , Ольшанская А А , Уласов В И // Москва - Сб науч. тр ФГУ «ВГНКИ» - 2003 -Т. 64 -С 85-91
- 2 Рахманина Н А , Уласов В И Клинико-эпизоотические особенности инфекционного перитонита кошек // Междун науч конф , посв 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» Владимир - 2003. - С 132-137
3. Рахманина Н А. Что-то Барсик занедужил // Ж Дворовая живность и хозяйство - 2003 - № 11/12 - С 39-41
- 4 Рахманина Н А., Уласов В И Инфекционный перитонит кошек // Москва Матер XII Междун конгр. по бол мелк дом. жив -22-24 04 2004 - С 14-16
- 5 Рахманина Н А , Уласов В И Клинические проявления инфекционного перитонита кошек // Ж Ветеринария -2005 -1.- С.85-91
6. Рахманина Н А , Уласов В И Клинические наблюдения и лабораторное подтверждение диагноза при инфекционном перитоните кошек// Междун НПК, посв 85-летию акад Урбана В П , С -Петербург - 23-24 03 2004.- С 95
- 7 Идентификация и дифференциация коронавируса кошек и собак методом полимеразной цепной реакции / Яралова Е А , Обухов И Л , Яцьшина С Б , Рахманина Н А , Ольшанская А А , Элизбарашвили Э И , Уласов В И // Москва - Сб. науч. тр. ФГУ ВГНКИ 2005.-Т 66 -С 142-146
- 8 Рахманина Н.А , Ольшанская А А , Уласов В И. Некоторые эпизоотологические особенности инфекционного перитонита кошек // Москва Междун НПК, посв. 100- летию Я Р Коваленко. 16-17 мая 2006 - С 350-351
- 9 Рахманина Н А Отчет о НИР «Биологические свойства коронавируса кошек и разработка лабораторной диагностики болезни» / Рахманина Н А , Рахманина М М , Элизбарашвили Э И , Ольшанская А А , Уласов В И // Закл отчет лаб качества и стандартизации лекарственных средств против вирусных болезней домашних животных и пушных зверей ФГУ ВГНКИ за 2000-2005 г (№ Гос. Рег 01 200 112122)

10 Рахманина Н А , Рахманина М М , Элизбарашвили Э.И , Уласов В И
«Штамм *Feline coagulans*, используемый для контроля иммуногенной актив-
ности вакцин и изготовления биопрепаратов для диагностики инфекционного
перитонита кошек» Патент № 2250260 от 26 сент 2003г

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИПК - инфекционный перитонит кошек

ПЛК - панлейкопения кошек

КВК - калицивирус кошек

ИРТ - инфекционный ринотрахеит кошек

ВИП - вирус инфекционного перитонита кошек

РНГА - реакция непрямо́й гемагглютинации

ПЦР - полимеразно-цепная реакция

МФА - метод флюоресцирующих антител

ЙАТ - метод йодной агглютинации

СгФК - перевиваемая культура клеток почек котят

FS - перевиваемая культура клеток селезенки котенка

ЦПД - цитопатогенное действие

ФГУ ВНИИВСГЭ, 2007г
123022, Москва,
Звенигородское ш , д 5
Заказ № 239/7, тираж 100 экз