

РАХМАНИНА
Маргарита Михайловна

*КАЛИЦИВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ КОШЕК:
БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЯ,
ЭПИЗООТОЛОГИЯ, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ
СРЕДСТВА И МЕТОДЫ ПРОФИЛАКТИКИ*

16.00.03- ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Москва 2005

Работа выполнена в отделе вирусных лекарственных средств
Федерального Государственного учреждения
«Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации ле-
карственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ»)

Научный консультант -доктор ветеринарных наук, профессор,
заслуженный деятель науки Российской Федерации Уласов Валентин Ильич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Доктор биологических наук, профессор
Смоленский Владимир Иванович (ФГУ «ВГНКИ», г. Москва)
Доктор ветеринарных наук, профессор
Белоусовп Раиса Васильевна (МГАВМиБ им. К.И.Скрябина, г. Москва)
Доктор ветеринарных наук, профессор
Орлянкин Борис Григорьевич (НПО «Нарвак», г. Москва)

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: ФГУ Федеральный центр охраны здоровья
животных (ВНИИЗЖ, г. Владимир, пос. Юрьевец).

Защита состоится «16» июня 2005 г. в 13³⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 220.011.01 при 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 « 4 » мая 2005 г.

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


КОЗЫРЕВ Ю.А.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность проблемы. Болезни кошек разной этиологии не являются в большинстве случаев экономически значимыми, однако, косвенный ущерб, вытекающий из моральных потерь, которые испытывают владельцы этих животных в связи с болезнями и гибелью их любимцев практически неоценим. С другой стороны, ни одно домашнее животное не контактирует с человеком, ближе, чем домашняя кошка, а значит, возбудители болезней этих животных, особенно генетически переменчивые, могут потенциально обусловить заболевания человека и бесспорно представляют проблему социального значения.

Калицивирусы являются наиболее частой причиной инфекционных респираторных болезней животных семейства кошачьих.

В нашей стране проблемы инфекционных болезней животных этого семейства, находящихся в зоопарках, цирках, зверосовхозах и личном владении граждан мало изучены. Между тем, опыт работы практических ветеринарных специалистов и наши наблюдения показали, что у кошек распространены массовые респираторные заболевания с характерными для калицивирусной инфекции клиническими признаками.

В последние годы для профилактики панлейкопении, калицивирусной инфекции, инфекционного ринотрахеита и хламидиоза кошек в нашу страну завозится большое количество моно- и ассоциированных вакцин из Франции, Голландии, Канады и др. государств. Отсутствие до недавнего времени в коллекции микроорганизмов института референтных штаммов и специфических сывороток к калицивирусу кошек не позволяло оценить качество этих препаратов по параметру иммуногенности в отношении этого антигена.

Учитывая частоту обращения в нашу лабораторию ветеринарных специалистов различных ведомств по оказанию консультативной помо-

щи по данной проблеме, в плановую научную тематику лаборатории контроля препаратов, применяемых в звероводстве, ВГНКИ была включена работа, касающаяся изучения калицивирусной инфекции кошек. С 1993 г. мы впервые начали исследовательскую работу по выделению, идентификации и изучению биологических свойств изолятов калицивируса кошек, депонированию отечественных штаммов вируса, освоению методов контроля качества вакцин против калицивирусной инфекции, разработке средств диагностики этой болезни, созданию моно- и ассоциированных отечественных вакцин, отработке системы мероприятий по профилактике болезни и ликвидации ее очагов.

1.2. Цели и задачи исследований. Целью исследований явилось изучение распространения и особенностей клинического проявления калицивирусной инфекции, выделение изолятов калицивируса кошек, изучение их биологических свойств, создание средств специфической профилактики и лечения болезни.

Цель работы определяла основные задачи исследований.

1. Установить наличие калицивирусной инфекции кошек в нашей стране, изучить особенности ее эпизоотологии и клинических проявлений.
2. Выделить изоляты калицивируса кошек.
3. Изучить культуральные, патогенные, антигенные свойства изолятов калицивируса кошек.
4. Изучить антигенные взаимоотношения выделенных изолятов калицивируса кошек.
5. Депонировать штамм (штаммы) вируса, отобранные по оптимальным параметрам для получения лечебно-диагностических сывороток, инактивированных моно- и ассоциированных вакцин, контроля качества сертифицируемых биопрепаратов, содержащих калицивирусный компонент.

6. Отработать технологические параметры изготовления и контроля инактивированных вакцин и сывороточных препаратов против калицивирусной инфекции кошек.
7. Определить оптимальные сроки вакцинации животных в благополучных и неблагополучных по калицивирусной инфекции кошек пунктах.
8. Изучить возможности применения специфических средств лечения и Профилактики болезни для оздоровления неблагополучных по калицивирусной инфекции питомников кошек.

1.3. Научная новизна. Впервые в отечественной ветеринарной практике изучены клинические и эпизоотологические аспекты калицивирусной инфекции кошек, выделены изоляты калицивируса кошек и изучены их культуральные, патогенные, антигенные свойства. Определена степень антигенного родства и генетических отличий изолятов вируса, выделенных в разные годы от кошек и тигров с различной формой течения болезни и особенностями клинических, проявлений.

Впервые в Российской Федерации паспортизированы и депонированы во Всероссийской Государственной коллекции штаммов микроорганизмов ВГНКИ штаммы калицивируса кошек, предназначенные для контроля иммуногенной активности вакцин, изготовления специфических лечебно - профилактических и диагностических биопрепаратов. Обосновано одновременное использование двух штаммов калицивируса кошек при изготовлении моно- и ассоциированных вакцин. Установлено, что гипериммунизация овец и кроликов культуральными антигенами калицивируса кошек вызывает образование специфических антител, обладающих активностью *in vivo* и *in vitro*. Предложена схема получения высокоактивных специфических сывороток при длительном использовании доноров. Отработаны поэтапные технологические параметры изготовления и контроля инактивированных вакцин против калицивирусной

инфекции кошек. Показана эффективность применения инактивированных вакцин и гипериммунных сывороток с лечебной и профилактической целью. Установлены оптимальные сроки и кратность использования биопрепаратов для профилактики и лечения кошек в зависимости от благополучия питомников (местности) по калицивирусной инфекции кошек.

Научная новизна работы подкрепляется двумя патентами Российской Федерации на изобретение (№2184567 от 10 июля 2002 г. и №221503 1 от 27 октября 2003 г.), выданных Федеральным Центром промышленной собственности Роспатент, касающихся использования двух депонированных штаммов вирусов для контроля иммуногенной активности вакцин, изготовления специфических и лечебно - профилактических биопрепаратов.

1.4. Практическая значимость. Полученные результаты явились основой для разработки нормативной документации на семь биопрепаратов: моно- и ассоциированных вакцин, сывороточных и глобулиновых препаратов, набора для диагностики калицивирусной инфекции кошек в ПЦР. Нормативные документы согласованы и утверждены в установленном порядке, четыре препарата зарегистрированы в РФ, сертифицированы и производятся двумя биопредприятиями.

Практическая значимость работы определяется введением в биопромышленное производство и ветеринарную практику четырех из семи биопрепаратов против калицивирусной инфекции кошек и двух диагностических систем (ПЦР и РНГА). Результаты исследований, изложенные в диссертации, использованы при разработке «Правил по профилактике и ликвидации респираторных инфекций кошек».

1.5. Апробация работы. Основные положения диссертационной работы обсуждались и одобрены на заседаниях ученого совета и проблемных методических комиссиях ВГНКИ (1994-2005 гг.).

Сделаны сообщения на конгрессах и конференциях: Научно-практич. конф. НПБЦ «Чин» «Патогенез, диагностика и лечение вирусных заболеваний мелких домашних животных» (С-Петербург. 1995); Всеросс. научно-практич. конф. «Вирусные болезни с/х животных» (Владимир. 1995); Всеросс. конф. по актуальным проблемам болезней мелких домашних животных (Москва. 26.03.1996); V Всеросс. конф. «Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных препаратов» (Щелково. 14-17.05.1996); Науч. практич. конф., посв. 50-летию Краснодарской НИВС «Состояние и перспективы исследований по профилактике и лечению болезней с/х животных и птиц» (Краснодар. 10-11.07.1996); XXI Междунар. симпоз. по болезням животных (Иерусалим. 21-25.10.1996); II Междунар. конф., МГУ прикл. биотехнологии. «Актуальные вопросы ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции» (Москва. 25-27.06.1997); Научн. конф. «75 лет ВНИИОЗ им. Жидкова» (Киров. 27-28.05.1997); VI Междунар. конф. вет. мед. мелких домашних животных. (Москва. 28-30.01.1997); II Междунар. симпоз. «Физиологические основы повышения продуктивности хищных пушных зверей» (Петрозаводск. 16-17.09.1998); Научн. конф. по инфекционным болезням животных, ВИЭВ (Москва. 1999); Науч. практич. конф. «Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями ж-х», ВНИИВВиМ (Покров. 1998); VI Междунар. конф. вет. мед. (Москва. 28-30.01.1998); VII Междунар. конф. по пробл. вет. мед. мелких домашних животных (Москва. 3-5.03.1999); Научно-практич. конф., посв. 80-летию МВА «Проблемы инфекционных и инвазионных болезней в животноводстве на современном этапе» (Москва. 1999); VIII Междунар. Конгр. по проблемам вет. мед. мелких дом. животных (Москва. 6-8.04.2000); Междунар. науч. конфер. «Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов»

(Казань. 30-31.05.2000); IV регион. конф. «Золотое кольцо России»: «Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России» (Владимир. 11.1999); Междунар. науч. конф., посв. 45-летию ВНИИЗЖ «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных» (Владимир. 30-31.10.2003); XII Междунар. Московский конгресс по болезням мелких домашних животных. (Москва. 22-24.04.2004); V Всеросс. науч. практ. конф. «Генодиагностика инфекционных болезней» (Москва. 21.10.2004); Междунар. научно-практич. конф., посв. 80-летию ФГУП «Щелковский биокомбинат» «Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее» (Щелково. 20-23.09.2004).

Разработки демонстрировались на ВДНХ (ВВЦ) и удостоены 3 золотых медалей в 1995, 1997 и 2000 гг.

1.6. Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту.

-клинико-эпизоотологические особенности калицивирусной инфекции кошек;

-культуральные, патогенные, антигенные свойства возбудителя болезни;

-антигенные взаимоотношения выделенных изолятов калицивируса кошек.

-разработка специфических биопрепаратов для лечения и профилактики калицивирусной инфекции кошек.

-использование специфических средств для профилактики и лечения калицивирусной инфекции кошек у животных группового и индивидуального содержания в благополучных и неблагополучных по калицивирусной инфекции пунктах.

1.7. Публикации научных исследований. Основные результаты диссертации опубликованы в 50 научных работах, в том числе изложены в заключительном отчете ВГНКИ за 1995 - 2000 г. (№ Гос. Регистрации

01.960.006557). Патентом на изобретение № 2184567 от 10 июля 2002 г. определен приоритет на «Штамм Feline calicivirus», используемый для контроля иммуногенной активности вакцин, изготовления специфических лечебно-профилактических и диагностических препаратов». Патент на изобретение № 221503 I от 27 октября 2003 г. подтверждает приоритет на «Штамм Feline herpesvirus-1», а справка о депонировании штамма вируса панлейкопении кошек «Мяу» авторство в его выделении. Эти штаммы использованы при разработке ассоциированных вакцин против инфекционного ринотрахеита, калицивирусной инфекции и панлейкопении «Мультифел 4», «Витафелвак», а также поливалентных глобулиновых и сывороточных препаратов.

1.8. Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 298 листах машинописного текста и содержит разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, практические предложения, список литературы и приложения.

Разделы обзор литературы и результаты исследований иллюстрированы 33 таблицами, 25 рисунками, 24 фотографиями. Список литературы включает 318 источников: 46 работ отечественных и 272 - зарубежных авторов.

Выражаем искреннюю признательность всем сотрудникам отдела ветеринарных вирусных препаратов, сектору бактериальных сред и лаборатории молекулярной диагностики ФГУ ВГНКИ за практическую помощь в выполнении отдельных этапов работы и консультативную помощь. Благодарим руководство НПО «Нарвак», АО «Линия Альба», ООО «Биоцентр», Горветлаборатории (Москва), АО «Бионит» (Владимир), НПО «ЧИН» (С-Петербург), руководителей и ветеринарных специалистов клиник «Витус», «Центр», «Мовет» (Москва), «Артемид»,

«Бионит», Центр животных «Валента» (Владимир), за практическую и организационную помощь в проведении экспериментов и испытаний биопрепаратов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальная часть работы выполнена в период с 1993 по 2004 г.г. в отделе вирусных лекарственных средств ФГУ «ВГНКИ».

Для выделения изолятов калицивируса в культурах клеток нами было использовано более 600 проб клинического и секционного материала, полученного от больных и павших кошек различных городов (Москвы, Санкт - Петербурга, Владимира, Калуги, Тулы и др.) и областей РФ, а также проб клинического материала от 4 амурских тигров 2-4 месячного возраста (Московский зоопарк). Идентификацию калицивируса кошек проводили серологическими, электронно - микроскопическими методами и постановкой биопробы. Анализ эпизоотологических наблюдений осуществляли согласно методическим указаниям «Методы эпизоотологических исследований» (Сосов Р.Ф., Глушков А.А.- МВА.- 1974). Испытания биопрепаратов проводили на базе ОПХ «Манихино», а также в приютах и питомниках кошек.

Животные. В опытах использовали 10 овец романовской породы 1-2 -летнего возраста; 550 кроликов породы шиншилла массой 2,5- 3 кг; более 1000 котят, преимущественно до 3 месячного возраста; шестьдесят морских свинок массой 250 ± 50 г и 160 белых мышей массой 15 ± 5 г.

Штаммы микроорганизмов.

Штамм калицивируса кошек «Ларс» выделен М.М. Рахманиной, Э.И. Элизбарашвили и В.И. Уласовым и депонирован в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГУ «ВГНКИ» (регр. № 30 от 30.08.1994 г.). Инфекционная активность вируса в культуре клеток CrFK - $5,0-9,0 \lg$ ТЦД $50/\text{см}^3$. Уровень пассажей 1 - 15-й.

Штамм калицивируса кошек «Пулю» выделен М.М. Рахманиной, Э.И. Элизбарашвили и В.И. Уласовым и депонирован в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГУ «ВГНКИ» (регистр, ссылка «Пума ДЕП» от 15.01.2002 г.). Инфекционная активность в культуре клеток CrFK - 5,0-9,0 Ig ТЦД 50/см³. Уровень пассажей 1 - 15-й.

Штамм вируса панлейкопении кошек «Мяу» выделен М.М. Рахманиной, Э.И. Элизбарашвили, В.И. Уласовым и депонирован в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГУ «ВГНКИ» (регистр. № 16 от 10.05. 1993 г.). Гемагглютинирующая активность - 10,0 log₂. Уровень пассажа в культуре клеток CrFK - 5-й.

Штамм вируса инфекционного ринотрахеита кошек «Гранд» выделен Э.И. Элизбарашвили, М.М. Рахманиной и В.И. Уласовым и депонирован в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГУ «ВГНКИ» (№ 31 от 15.02.1995 г.). Инфекционная активность в культуре клеток CrFK — 5,0 -7,0 lg ТЦД 50/см³. Уровень пассажей 3 - 5-й.

Штамм вируса инфекционного перитонита кошек «Багира» выделен М.М. Рахманиной, Э.И. Элизбарашвили, Н.А. Рахманиной и В.И. Уласовым и депонирован в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГУ «ВГНКИ» (регистр. ссылка «Багира-ДЕП» 28.02.2003 г.). Инфекционная активность — 5,0 lg ЛД 50/см³.

Перечисленные штаммы вирусов КВК, ПЛК и ИРТ использованы при контроле специфичности диагностических сывороток и для создания ассоциированных биопрепаратов. Штамм вируса ИПК использован для исключения неспецифичности гипериммунных сывороток.

Chlamydia psittaci (штамм «№7») предоставлен соразработчиком ассоциированной вакцины, включающей данный штамм микроорганизма, НПО «Нарвак». Инфекционная активность 6,0 lg ЭЛД 50/см³.

Методы культуральных исследований. При изучении культуральных свойств изолятов калицивируса кошек использовали первичные и субкультуры клеток почек: ПК, ПЩ, ПКр, ПЭС, ПЭК, ФЭК, ФЭП, ТБ и перевиваемые линии культур клеток: CrFK, FS, A-72, CC-81, Vero, MDCK, Fc/Tg, MDBK, ПСГК.

В качестве ростовых сред для первичных и субкультур клеток использовали общепринятые в вирусологии питательные среды в соотношениях, оптимальных для каждой из культур клеток.

Применяли два метода культивирования. 1) Роллерный - культивирование осуществляли на роллерной установке Weaton (USA) в 2-литровых бутылках (Rollerbottle Cellmaster Cat.№680060) фирмы Greiner bio-one (Germany). Скорость вращения бутылей- 10-12 об./час.

2) Стационарный - клеточную суспензию вносили в культуральные матрасы объемом 100 — 1500 см³.

Использовали два метода заражения культур клеток.

1) Заражение монослойной культуры клеток: вирус вносили в составе ростовой среды на полностью сформированный клеточный монослой 5-7-суточных первичных и 3-4-суточных - перевиваемых культур клеток. 2) Заражение суспензии клеток - вирус вносили в суспензию клеток при их посадке.

При стационарном культивировании посадочная концентрация первично-трипсинизированных культур клеток составляла 250 ± 100 тыс. кл./см³, а перевиваемых — 150 ± 50 тыс. кл./см³, при роллерном - 700 ± 200 тыс. кл./см³ и 500 ± 100 тыс. кл./см³ соответственно.

Инфекционную активность полученных проб и вирусного сырья определяли путем титрования его в культурах клеток почек котенка, CrFK или FS.

Электронно-микроскопические исследования.

Морфологические свойства выделенных изолятов калицивируса кошек изучали совместно со старшим научным сотрудником лаборатории инструментальных методов исследования Могильным Ю.И. (ФГУ «ВГНКИ») и старшим научным сотрудником Лотте В.Д. (Институт вирусных препаратов им. О.Г. Анджпаридзе). Просмотр препаратов осуществляли в электронных микроскопах JEM-100 СХП и JEM-100 СХ (Япония) с ускоряющим напряжением 80 кВ. Использовали метод негативного контрастирования. В качестве контрастирующего вещества применяли 2% водный раствор фосфорновольфрамовой кислоты (рН 6,0-7,0).

Наличие специфических антител в сыворотках крови кошек и животных-доноров определяли в РН и РНГА.

РН. Постановку РН проводили по общепринятой методике с постоянной дозой вируса (100 ТЦД 50/см³) и двукратными разведениями сыворотки. Учет результатов проводили на 2-3 сутки после заражения культур клеток.

РНГА. Набор для определения титра антител в сыворотках крови в РИГА был изготовлен согласно «Методическим рекомендациям по постановке реакции непрямой гемагглютинации для обнаружения специфических антител к калицивирусной инфекции кошек», разработанным Крыловым А.Н., Рахманиной М.М., Уласовым В.И. и утвержденным директором ВГНКИ ветпрепаратов Паниным А.Н. 1.06.1999 г.

Лиофильную сушку вирусных суспензий проводили совместно со старшими научными сотрудниками отдела инструментальных методов контроля и лиофилизации Кремлевым Н.П. и Опариним Ю.Г. Использовали однокамерный аппарат системы GT-2. Вирусный антиген смешивали с защитной средой ВГНКИ № 3 в соотношении 1:1.

Сыворотки крови лиофилизировали без добавления защитных сред.

Анализ молекулярно-генетического родства штаммов калицивируса "Ларс" и "Пума" осуществляли в лаборатории молекулярной диагностики ФГУ «ВГНКИ» совместно со ст.н.с. Ю.Ю. Тягиной и зав. лаб., профессором И.Л. Обуховым. Используются штаммы КВК «Ларс» и «Пума», репродуцированные в культуре клеток почки котенка (3-й пассаж вируса) и имевшие активность $9,0 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$. В качестве объекта сравнения был выбран штамм F9 (M86379), как один из основных вакцинных штаммов КВК (данные о нем представлены, в частности, GenBank).

ПЦР проводили по следующей программе: $95^\circ\text{C} - 40 \text{ сек}$, $48^\circ\text{C} - 40 \text{ сек}$, $72^\circ\text{C} - 40 \text{ сек}$, количество циклов - 42, предварительная денатурация $95^\circ\text{C} - 5 \text{ мин}$ и заключительная элонгация $72^\circ\text{C} - 10 \text{ мин}$.

Для получения специфических сывороток использовали культуральные антигены калицивируса кошек активностью $8,0 \pm 0,5 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$ (очищенные хлороформным методом или микрофильтрацией с использованием фильтров «Миллипор» с диаметром пор **45 и 22 мкм**).

Получение гипериммунных сывороток производили на кроликах и овцах двумя методами. *Первый метод*: антиген вводили (в объеме $1,0 \text{ см}^3$ кроликам и $5,0 \text{ см}^3$ овцам) еженедельно, внутримышечно в течение четырех недель и еще через неделю - внутривенно. Сущность *второго метода* иммунизации заключалась в использовании «эффекта иммунной памяти». При первичной иммунизации (грунт-иммунизации) в область подколенного лимфоузла животным вводили антиген (в тех же объемах) в смеси с полным адьювантом Фрейнда (1:1). Следующую иммунизацию проводили через 2-3 месяца путем внутривенного введения антигена в объемах $0,25 \text{ см}^3$ кроликам и $1,0 \text{ см}^3$ овцам.

Кроликов по окончании цикла гипериммунизации тотально обескровливали. При гипериммунизации овец кровь от них в количестве 150 см³ получали па 14-е и 21-е сутки после ежемесячных внутривенных инъекций антигена.

Полученные препараты контролировали на отсутствие контаминации, активность, специфичность и содержание белка.

Для получения лабораторных серий вакцины против КВК расплодки калицивируса кошек, вируса инфекционного ринотрахеита кошек и вируса панлейкопении кошек получали в культуре клеток СтФК. Антигены после отдельного культивирования инактивировали формалином. Подбор адьювантов проводили совместно с сотрудником НПО «Нарвак», профессором Сергеевым В.А.

Контроль вакцин включал: оценку внешнего вида, исключение бактериальной и грибковой контаминации, проверку полноты инактивации, безвредности, антигенной и иммуногенной активности.

При анализе и обобщении результатов исследований использовали методы статистической обработки, общепринятые в биологии, используя компьютерную программу Excel. В качестве доверительного интервала был выбран уровень вероятности $P = 0,95$ (уровень значимости $p = 0,05$).

Статистическую обработку результатов титрования инфекционной активности вируса проводили по методу Reed и Mench (1938), выражая титр вируса в lg ТЦД 50/см³.

Определение степени антигенного родства штаммов калицивируса кошек проводили по формуле Archetti и Horsfall (1950). Различия между штаммами вирусов определяли по формуле, предложенной Прискока В.А. (1983). Доминантность вирусов рассчитывали по формуле, предложенной Morea (1971).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

3.1. Клинико - энизоотологическая характеристика калицивирусной инфекции кошек.

Для определения *этиологической роли калицивируса* при респираторных болезнях нами (совместно с ведущим научным сотрудником Элизбарашвили Э.И. и научным сотрудником Кокориной Е.Г.) был исследован клинический материал (смывы из глаз, ротоглотки и истечения из носа) от 37 кошек индивидуального и 42 - группового содержания, с признаками поражения респираторного тракта. В ходе этого исследования проводили дифференциальную диагностику калицивирусной инфекции от герпесвирусной путем постановки РН в культуре клеток CrFK со специфическими калици- и герпесвирусу сыворотками.

Результат исследований показал преимущественное распространение КВИ: калицивирус *был* выделен в 24 (30,4%) случаях, герпесвирус — в 19 (24,0%); в 29 (36,7%) - эти инфекции протекали как смешанные, в 7 (8,9%) случаях оба вируса обнаружены не были. При анализе полученных данных установлено, что у животных индивидуального содержания реже регистрировалась смешанная инфекция (18,9%), при групповом - этот показатель значительно возрастал (52,4%). Независимо от условий содержания наиболее подвержены болезни были котята до 6-месячного возраста.

Установлено, что основными *путями выделения* калицивируса явились конъюнктивальные и назальные истечения. Средний титр вируса в них при остром и подостром течении болезни в смывах из глаз и носа составил $6,4 \pm 1,9 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$. При хроническом течении болезни эти показатели снижались в среднем на $2,5 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$.

Содержание калицивируса в ротоглоточных смывах при остром и

подостром течении болезни составляло $6,1 \pm 1,2 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$, при хроническом - $6,0 \pm 1,2 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$. При обследовании 12 животных-реконвалесцентов, проведенном через 1,5-2 месяца после их клинического выздоровления, калицивирус был обнаружен у 10 из них в ротоглоточных смывах ($3,4 \pm 1,2 \lg \text{ТЦД } 50 \text{ см}^3$) и у 7 — в смывах с конъюнктивы ($2,3 \pm 1,0 \lg \text{ТЦД } 50 \text{ см}^3$). В сыворотке крови, фекалиях и моче переболевших котят вирус обнаружен не был.

На основании количества обращений в нашу лабораторию за консультативно-диагностической помощью в период с 1999 по 2003 год был проведен анализ *сезонности заболевания*. Он показал, что пики регистрации калицивироза (а также периоды его рецидивов) у 185 кошек *индивидуального содержания* приходились на осенний и весенний периоды (64 и 55 больных особей соответственно). В зимний и, особенно, летний период времени у этой категории кошек зафиксировано почти в 2 раза меньше случаев болезни (37 и 29 соответственно). В то же время у 244 животных *группового содержания* перепады этих показателей были менее значительны (42- летом, 63- зимой, 69-осенью и 70-весной). Тем не менее, болезнь и в том, и в другом случае не являлась сезонной: коэффициент сезонности составил 40-60% (при показателе сезонности 30% и ниже по данным Р.Ф.Сосова, А.А.Глушкова (1974 г.).

3.2. Изучение биологических свойств калицивируса кошек.

В период с 1993 по 2004 г. были получены и исследованы более 120 изолятов калицивируса. В связи с вариабельностью некоторых его биологических свойств для сравнительного изучения мы отобрали 6 изолятов КВК, выделенных в разные годы от кошек из разных городов, имевших возрастные и породные отличия, а также специфические особенности течения и клинического проявления болезни.

Изучение культуральных свойств калицивируса кошек.

Установлено, что репродукция вируса на культурах клеток «кошачьего» происхождения (ПК, СПК, CrFK, FS, CC-81, FC/Tg) независимо от способа заражения и культивирования носило закономерный характер для всех исследованных изолятов вируса. Статистически достоверных отличий, касающихся большей чувствительности какой-либо из перечисленных культур клеток кошачьего происхождения к изучаемым нами изолятам КВК, также не отмечено: при одинаковых условиях культивирования и заражения различие по этому показателю не превысило $1,0 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$.

Накопление вируса было максимальным при заражении монослойных культур клеток. В частности, в клеточной линии CrFK при роллерном культивировании различных изолятов вируса оно составило - $8,0 \pm 0,5$ - $9,2 \pm 1 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$, в стационарных условиях - $7,5 \pm 1$ - $9,0 \pm 0 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$. Заражение суспензии клеток при посадке не позволило получить сборов вируса с титром, превышающим названные показатели: он составил в той же линии клеток при роллерном культивировании - $5,7 \pm 0,5$ - $6,9 \pm 0,8 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$, а стационарном - $4,9 \pm 0,8$ - $6,4 \pm 0,6 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$. Максимальное накопление КВК при всех использованных способах заражения культур клеток регистрировали в период 60 ± 12 часов при инфицирующей дозе $2,0 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$.

Репродукция калицивируса сопровождалась проявлением ЦПД, специфичность которого подтверждалась в РН. Оно наблюдалось уже в первом пассаже и было однотипным во всех чувствительных культурах клеток у всех выделенных изолятов КВК.

Первые признаки ЦПД отмечали через 7-12 часов после заражения. Оно выражалось в набухании и округлении клеток. Далее, в течение 10 — 48 часов, происходила быстро прогрессирующая деструкция монослоя,

сопровождавшаяся постепенным отторжением клеток с образованием пустот. Клетки еще сохранившегося монослоя выглядели на этой стадии набухшими, объемными и светопреломляющими. Через 48-72 часа после заражения почти все они отторгались от стекла.

При проведении трех «слепых» последовательных пассажей изолятов КВК в культурах клеток не кошачьего происхождения (первичных и субкультур - ПЩ, ПКр, ПЭС, ПЭК, ФЭК, ФЭП, ТБ и перевиваемых - А-72, Vero, MDCK, MDBK, ПСГК) ни в одном случае не наблюдали проявления ЦПД и накопления вируса.

Для изучения структуры и морфологии некоторых изолятов калицивируса, полученных в 1-2 пассажах культур клеток почки котенка, CrFK, FS проводили электронную микроскопию. При исследовании обнаруживали не имеющие суперкапсидной оболочки вирионы кубического типа симметрии, диаметром -35-40 нм, расположенные в виде "шнура" или "нити бус", что характерно для калицивирусов и отличает их от других морфологически подобных вирусов.

Экспериментальное воспроизведение инфекции проводили с целью изучения этиологических, клинических и патогенетических аспектов калицивирусной инфекции. Выделенными нами изолятами КВК заражали 102 котят 1,5-6-месячного возраста с различным иммунным статусом. Вирус вводили интраназально, используя культуральные расплодки изолятов КВК активностью $8,5 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$ в объеме 1 см^3 . Наблюдение за животными продолжали в течение 8 месяцев (Табл. 1).

Из 102 котят, подвергнутых заражению, заболели с проявлением признаков, характерных для калицивирусной инфекции, 60 животных.

Таблица 1.
Клинические проявления и исход калицивирусной инфекции
у экспериментально зараженных кошек.

| Показатели | | Номера изолятов калицивируса кошек | | | | | | Частота признака | |
|---|--------------------------------------|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------|------|
| | | №1 | №2 | №3 | №4 | №5 | №6 | кол-во | (%) |
| | | | | | | | | | |
| Количество зараженных котят | | 24 | 15 | 15 | 13 | 12 | 23 | 102 | - |
| Количество заболевших котят | | 17 | 8 | 10 | 6 | 5 | 14 | 60 | 100 |
| Титр антител у заболевших котят до заражения (ПИ, \log_2)* | | ≤ 5 | ≤ 4 | ≤ 4 | ≤ 3 | ≤ 3 | ≤ 6 | - | - |
| Клинические признаки | Лихорадка | 16 | 6 | 8 | 5 | 4 | 14 | 53 | 88,3 |
| | Угнетение | 17 | 6 | 7 | 4 | 4 | 14 | 52 | 86,7 |
| | Анорексия | 17 | 4 | 5 | 4 | 2 | 14 | 46 | 76,7 |
| | Конъюнктивит | 17 | 7 | 8 | 4 | 2 | 14 | 52 | 86,7 |
| | Ринит | 15 | 6 | 9 | 6 | 2 | 14 | 52 | 86,7 |
| | Язвенный стоматит | 6 | 0 | 4 | 3 | 0 | 3 | 16 | 26,7 |
| | Трахеит, бронхит | 5 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 13 | 21,7 |
| | Пневмония | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 10 | 14 | 23,3 |
| Поражение ЖКТ | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 5,0 | |
| Исход | Выздоровление | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 5 | 8,3 |
| | Хроническое течение, вирусовыделение | 5 | 5 | 6 | 3 | 4 | 0 | 23 | 38,3 |
| | Летальный исход | 12 | 1 | 2 | 2 | 1 | 14 | 32 | 53,3 |

Примечание: Титр антител у 42 не заболевших котят превышал указанные показатели.

При введении кошкам изолятов вируса № 4 и № 5 воспроизвести клиническую картину болезни удалось только у животных с исходным уровнем нейтрализующих антител $\leq 3,0 \log_2$; изолятов вируса № 2 и № 3 $\leq 4,0 \log_2$. При использовании для заражения кошек изолята вируса № 1 слабо выраженные признаки болезни и вирусовыделение наблюдали в 3 случаях из 5 при наличии титра гуморальных нейтрализующих антител до введения вируса - $5,0 \log_2$, а изолята КВК № 6 - у 3 из 5 котят, имевших до заражения титр антител $6,0 \log_2$.

Инкубационный период болезни составлял 4-7 суток.

Независимо от использованного для заражения изолята вируса клинические симптомы у котят, имея некоторые особенности, проявлялись преимущественно одинаково. Почти у всех животных регистрировали лихорадку, угнетение и анорексию (88,3%; 86,7% и 76,7% котят соответственно). Конъюнктивит и ринит являлись наиболее частыми признаками болезни (86,7% по тому и другому показателю). Язвенный стоматит отмечали у 26,7%, поражение бронхов и трахеи - у 21,7% , легких - у 23,3%. Другие клинические проявления выявлены реже. Пневмония зарегистрирована у 14 котят, причем 10 из них были заражены изолятом КВК № 6. Клиническое выздоровление с прекращением элиминации вируса отмечено только у 5 котят, но ни у одного из зараженных изолятами вируса №№: 1, 5 и 6. У 38,3% котят болезнь приняла хроническое течение, 53,3% котят пали, при этом из 32 павших 12 были инфицированы изолятом вируса № 1 и 14— № 6.

Несмотря на схожесть клинических проявлений в целом, прослеживалась некоторая зависимость тех или иных признаков болезни от использованного для заражения изолята вируса. Так, единичные случаи проявления диареи отмечены при заражении котят изолятами № 1 и № 4. Язвенный стоматит отмечали у животных, зараженных изолятами КВК № 1, № 3, № 4, № 6. При использовании для заражения изолятов вируса № 2 и № 3 ни разу не зафиксировали развития бронхопневмонии.

Но, в целом, симптомы болезни всегда были связаны с поражением конъюнктивы, слизистой оболочки ротовой полости и респираторного тракта различной степени тяжести.

Патологоанатомические изменения у павших и эутаназированных в конце опыта кошек соответствовали характеру клинических проявлений

болезни. Они, как правило, сосредотачивались в респираторных путях животного.

Уровень содержания калицивируса в экскретах больных животных, различных органах и тканях определяли путем титрования в культуре клеток СгФК проб клинического и секционного материала, отобранных в период с 14 по 28 сутки после заражения от 32 заболевших и впоследствии павших котят. Как при спонтанном, так и при экспериментальном заражении котят, основными путями выделения вируса являлись конъюнктивальные и носовые истечения (титр вируса в клиническом материале составил $7,0-9,0 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$). Большое количество вируса было обнаружено в ротоглоточных смывах ($6,0-8,5 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$), содержанием трахеи ($3,0-7,5 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$) и легких ($3,0-8,0 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$). Отмечено присутствие вируса в селезенке ($2,0-3,0 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$). Наличие его в крови, фекалиях и моче было нерегулярным, незначительным и зарегистрировано при заражении не всеми изолятами вируса.

Изучение патогенности и антигенности калицивируса кошек для лабораторных животных и овец.

Экспериментальное заражение овец, кроликов, морских свинок и белых мышей проводили с целью поиска биологической модели для воспроизведения болезни или способной отвечать на воздействие возбудителя выработкой специфических гуморальных антител.

Установлено, что овцы и лабораторные животные (кролики, морские свинки и белые мыши) не восприимчивы к заболеванию калицивирозом: ни у одного из зараженных животных не зарегистрировано каких-либо клинических признаков болезни или вирусовыделения. Тем не менее, введение изолятов калицивируса кошек перечисленным животным вызывало у них образование гуморальных антител. Их уровень при подкожном введении изолятов вируса №№ 2, 3, 4, 5 на 21 сутки был равен

(Р_Н, log₂): у кроликов - $3,6 \pm 0,6$ - $5,5 \pm 0,5$; морских свинок - $4,5 \pm 0,5$ - $6,3 \pm 0,6$; белых мышей - $3,0 \pm 0$ - $4,5 \pm 0,5$. При введении изолята КВК № 1 эти показатели соответственно составили: $6,6 \pm 0,6$ - $8,3 \pm 0,6$; $5,6 \pm 0,6$ - $6,6 \pm 0,6$; $4,0 \pm 0$ - $5,3 \pm 0,6$; а при введении изолята КВК № 6 - $6,3 \pm 0,6$ - $8,0 \pm 0$; $5,3 \pm 0,6$ - $7,0 \pm 0$; $4,0 \pm 0$ - $5,0 \pm 0$ соответственно. То есть изоляты КВК № 1 и № 6 обладали максимальной антигенной активностью для лабораторных животных.

Подкожное введение этих, наиболее антигенных, изолятов овцам в объеме $5,0 \text{ см}^3$ вызвало у животных образование антител в титре $6,5 \pm 0,5$ - $6,75 \pm 0,25$ (Р_Н, log₂).

Изучение антигенных взаимоотношений изолятов калицивируса кошек.

Степени антигенного родства шести изолятов калицивируса были изучены в перекрестно поставленной РН и определены по формуле Archetti и Horsfall (Табл. №2).

Таблица 2.

Антигенное родство изолятов калицивируса кошек (%).

| | | | | | | |
|---|------|------|------|------|------|-----|
| | 1 | | | | | |
| 1 | 100 | 2 | | | | |
| 2 | 89,4 | 100 | 3 | | | |
| 3 | 63,9 | 68,1 | 100 | 4 | | |
| 4 | 86,1 | 89,4 | 61,7 | 100 | 5 | |
| 5 | 71,5 | 80,5 | 90,4 | 61,4 | 100 | 6 |
| 6 | 42,0 | 45,0 | 37,3 | 43,8 | 46,3 | 100 |

Примечание: 1,2,3,4,5,6, - номера изолятов калицивируса и полученных на них сывороток.

Установлено, что изоляты калицивируса, полученные в разное время от кошек с различными симптомами и характером течения болезни, были антигенно родственны. Степень антигенного родства варьировала в диапазоне 37,3% - 90,4%. При этом показатель, превышающий 50% относительно друг друга, обнаружили все изоляты вируса, за исключением № 6, который демонстрировал отличие от других: его родство с ними составляло 37,3% - 46,3%.

По формуле Мореа вычисляли показатель доминирования изолятов вируса. Установили, что этот параметр не был высоким и варьировал в диапазоне 100,6% - 110,7% (при отсутствии доминирования он равен 100%). На рисунке №1 показано отношение изолятов № 1 и № 6 к другим изолятам калицивируса.

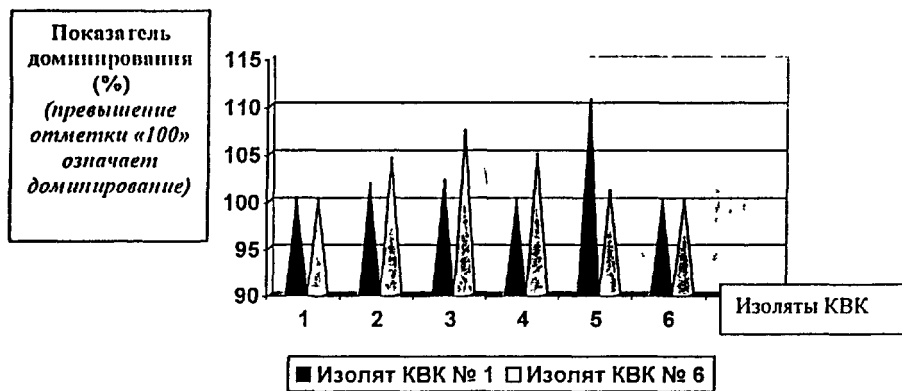


Рисунок 1.

Антигенные взаимоотношения изолятов калицивируса кошек № 1 и № 6 между собой и другими изолятами KBK.

Изолят КВК № 1 доминировал над изолятами № 2, 3, 5 и был паритетен с изолятами № 4 и № 6. Изолят КВК № 6 проявил доминирование со всеми изолятами КВК, кроме № 1.

Анализируя полученные данные, можно прийти к выводу, что изоляты калицивируса кошек № 1 и № 6 обладали наибольшей доминантностью по отношению к другим исследованным изолятам вируса. В то же время, они имели очевидное антигенное отличие, что делало обоснованным использование обоих изолятов вируса при разработке лечебно-профилактических средств.

Для определения спектра антигенного перекреста с циркулирующими биотипами калицивируса нами были исследованы 42 пробы сывороток крови кошек: от 12 больных; 14 подозрительных по заболеванию, 7 клинически здоровых вакцинированных и 9 невакцинированных.

При постановке РИ с использованием в качестве антигенов шести изолятов КВК мы получили 100% совпадение результатов относительно позитивности и негативности всех тестируемых сывороток. Максимальные титры сывороток были выявлены при использовании в качестве антигенов изолятов КВК № 1 (5,73 - 8,49 \log_2) и № 6 и (5,7 - 8,42 \log_2). Тем не менее, корреляция вариационных рядов показателей с этими антигенами, просчитанная относительно изолята КВК №. 1 (коэффициент корреляции его выборки (k) =1), обнаружила здесь отрицательную зависимость (от - 0,18 до - 0,44). Незначительная отрицательная корреляция выявлена также при исследовании сывороток от больных кошек с антигеном № 5 (- 0,09). В остальных случаях она была положительной и показала колебание k в пределах 0,16 - 0,87.

Полученные результаты свидетельствуют о различной авидности выявленных в РИ антител по отношению к использованным изолятам КВК и подтверждают наличие антигенных отличий у изучаемых нами

изолятов вируса. Обнаружение обратной корреляции результатов исследований, проведенных с использованием изолятов № 1 и № 6 (при 100% совпадении обнаружения положительных и отрицательных образцов), подтверждает их наибольшие антигенные отличия.

Молекулярно-генетическое типирование проводили в отношении изолятов КВК № 1 и № 6, обладавших наиболее высокой патогенностью, антигенностью и доминантностью. Целью исследований явилось выявление степени генетических различий этих изолятов калицивируса.

Были сконструированы праймеры и изучена их специфичность с помощью компьютерных программ FASTA и BLASTA on line. Длина амплифицированной ДНК после проведения ПЦР составляла 670 н.п.

При проведении филогенетического анализа установлено, что изоляты № 1 и № 6 отличаются от штамма F9 (данные о нем представлены GenBank) по своему аминокислотному составу на 14,3% и 16,7%, по нуклеотидному составу на 22,4% и 23,5%, соответственно. Различия между изолятами № 1 и № 6 составляет по нуклеотидному составу 22,1%, по аминокислотному составу 14,3%, что подтверждало обоснованность одновременного использования этих изолятов вируса при разработке специфических биопрепаратов.

Установлено, что область, содержащая делецию по сравнению с вакцинным штаммом F9, может быть выбрана в качестве мишени при создании молекулярно-генетических паспортов изучавшихся изолятов вируса.

Дальнейшая отработка метода диагностики калицивирусной инфекции кошек методом ПЦР была успешно завершена в лаборатории молекулярных методов диагностики ВГНКИ. Разработаны нормативно-технические документы на опытно-промышленную партию набора.

Обобщая вышеизложенные сведения об иммунобиологических свойствах изолятов калицивируса кошек, можно резюмировать, что при использовании изолятов КВК № 1 и № 6 существовала большая вероятность заболевания серопозитивных котят, то есть эти изоляты вируса были наиболее патогенны. Те же изоляты КВК обладали максимальной антигенностью для лабораторных животных. Они же имели отдаленное антигенное родство, обладая при этом высокой доминантностью по отношению к другим изолятам. При молекулярном исследовании показана их генетическая неидентичность и обоснована правомерность включения обоих изолятов в состав биопрепаратов.

Перечисленные аргументы служили основанием для паспортизации и депонирования двух штаммов калицивируса кошек «Ларс» (изолят КВК № 1) и «Пума» (изолят КВК № 6) во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве ФГУ «ВГНКИ». Дальнейшие исследования были направлены на изучение возможностей использования указанных штаммов вируса для изготовления биопрепаратов.

3.3. Создание и испытание препаратов для профилактики и лечения калицивирусной инфекции кошек.

При отработке технологических параметров производства вакцин против калицивирусной инфекции кошек нами была использована перевиваемая клеточная линия СrFK.

Установлено, что в течение 15 пассажей (предел опыта) на этой культуре клеток калицивирус не утрачивал репродуктивных и антигенных свойств: показатели накопления вируса в культуре клеток и антигенный ответ кроликов на введение вируса первого и последующих пассажей достоверно не изменялись.

При изучении длительности хранения производственных расплодок КВК установили, что снижение титра штаммов калицивируса «Ларс» и «Пума» (с исходной активностью $8,5 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$) при сушке на среде ВГНКИ №3 составило $0,25 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$ и $0,2 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$ соответственно. Последующее снижение титра вируса при хранении в условиях низкотемпературных холодильников (-18°C) как в лиофилизированном, так и нативном замороженном состоянии в течение двух лет не превысило $1,5 \lg \text{ТЦД } 50 /\text{см}^3$, что позволяло использовать расплодки КВК в качестве производственных в течение этого периода времени.

Для инаktivации калицивируса использовали формалин. Эффективность инаktivации вируса оценивали по показателям потери инфекционности и сохранения высокой антигенной активности инаktivированного препарата. Результаты исследований показали, что калицивирус кошек, активностью $5,0-10,0 \lg \text{ТЦД}50/\text{см}^3$ полностью инаktivируется в течение 72 часов при 37°C и содержании формалина 0,2%, снижая антигенность не более чем на $0,5 \log_2 (\text{РН})$.

В качестве адьюванта при изготовлении лабораторных серий инаktivированной вакцины против калицивирусной инфекции кошек использовали 3% эмульсию гидроокиси алюминия (12% к объему антигена). Установлено, что адьювант был безвреден для кошек и повышал антигенность вакцин по калицивирусному компоненту на $1,0 \pm 0,5 \log_2 (\text{РН})$.

Для проведения испытаний по определению сроков сохранения биологической активности препаратов лабораторные серии вакцин расфасовывали в ампулы по 1 дозе (1см^3), ампулы запаивали, этикетировали и помещали на хранение при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Через 12, 18 и 24 месяца хранения проверяли изменение антигенной активности вакцины на кроликах, а иммуногенной - на кошках.

Сыворотки крови кроликов, исследованные в РН до и через 21 сутки после введения препаратов, показали статистически недостоверное снижение (не более $1,0 \log_2$, по сравнению с исходным) антигенной активности вакцин, хранившихся в течение 18 месяцев при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Однако хранение вакцин в течение 2 лет снижало этот показатель значительно - на $2,0 \log_2$ и более.

Для окончательного решения вопроса о правильности подбора штаммов для создания лечебно-профилактических препаратов и подтверждения обоснованности включения в состав инактивированной вакцины двух штаммов КВК нами был проведен завершающий этап работы, связанный с испытанием экспериментальных серий вакцин. По отработанной технологии было изготовлено 4 серии препаратов: 2- содержащих оба штамма КВК ("Ларс" и "Пума" в соотношении 1:1) и по одной серии - моновалентных вариантов вакцины. Эффективность иммунизации котят препаратом каждой серии оценивалась проведением их заражения штаммами и изолятами вируса. Для опыта формировали 5 групп интактных кошек 2,5-3 месячного возраста. Кошек четырех опытных групп вакцинировали введением 1 дозы (1см^3) одной из серий испытуемых вакцин. Кошек контрольной группы не вакцинировали. Через 3 недели проводили назальное заражение животных с использованием всех изучавшихся штаммов и изолятов КВК с активностью $8,5 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в объеме 1 см^3 . Наблюдение продолжали еще 4 недели. До заражения и трехкратно (с интервалом 7 дней) после заражения от всех котят брали конъюнктивальные и ротоглоточные смывы для исследования на наличие в них калицивируса путем заражения культур клеток СгФК.

Иммунизация моновалентным вариантом вакцины, включавшим только штамм «Ларс», показала защиту 75 % котят от заболевания при заражении их изолятом вируса № 3 и штаммом «Пума», но 100% защиту при инфицировании другими изолятами вируса. Иммунизация котят вакциной, изготовленной на основе штамма КВК «Пума» на 75% защитила их от заболевания после заражения изолятом вируса № 5 и на 100% после заражения другими штаммами и изолятами калицивируса.

Все кошки, вакцинированные препаратами, включающими два штамма КВК, не только оставались клинически здоровыми и не выделяли вирус с ротоглоточными и конъюнктивальными экскретатами в течение периода наблюдения. То есть обе серии бивалентной вакцины показали 100% защиту животных от заражения любым из шести изолятов КВК. Все невакцинированные кошки (контроль) на 4-7 сутки заболели с проявлением признаков поражения респираторного тракта (диагноз подтвержден лабораторно).

Данный опыт подтвердил обоснованность создания двухштаммового варианта вакцины: испытуемый вариант опытной партии бивалентной вакцины был более иммуногенен, чем моноварианты.

Результаты исследований легли в основу технической документации на вакцину инактивированную против калицивирусной инфекции кошек, приготовление которой предусматривает использование в ее составе штаммов "Ларс" и "Пума" калицивируса кошек.

Кроме калицивирусной инфекции опасными и значительно распространенными болезнями кошек являются: инфекционный ринотрахеит, вызываемый герпесвирусом кошек 1 серотипа, панлейкопения, возбудителем которой является парвовирус кошек, и хламидиоз. В связи с этим возникает вопрос одновременной вакцинации животных против назван-

ных инфекций, а следовательно, необходимость создания ассоциированной вакцины.

В рамках излагаемой тематики наши исследования касались определения количественного содержания калицивирусного антигена в разрабатываемой вакцине.

При изучении антигенной и иммуногенной активности калицивируса в составе инактивированных вакцин определяли иммуногенность трех серий, изготовленных нами инактивированных препаратов против этих инфекций с различным содержанием калицивирусного антигена (0,2- 0,4 см³/прививную дозу), и 1 серию, содержащую только калицивирус (0,9 см³/прививную дозу). Во всех вариантах вакцин использованы оба штамма КВК: титр до инактивации 8,0 ТЦД 50/см³, соотношение 1:1.

В опыте использовали 4 группы по 16 серонегативных кошек 2-3 месячного возраста и одну контрольную — 4 животных. Испытуемые серии вакцин вводили котяткам подкожно в дозе 1,0 см³. Используя РН для исследования сывороток, определяли антигенный ответ животных на 14 и 21 сутки после иммунизации. Половину каждой группы животных заражали штаммами вируса «Ларс» или «Пума» на 14-е сутки после вакцинации, половину - на 21-е. Вирус (8,5 ТЦД 50/см³) вводили животным назально в объеме 1,0 см³. В те же сроки по 2 кошки контрольной группы также подвергали заражению тем или другим штаммом вируса.

Результаты показали, что подкожное введение моно- и ассоциированных вакцин, содержащих калицивирусный антиген в объеме 0,2 - 0,9 см³, вызывало образование нейтрализующих гуморальных антител у котят. Уже на 14 сутки титр антител животных составил (РН) - $4,0 \pm 0,6 - 5,5 \pm 0,5 \log_2$ к штамму КВК «Ларс» и $4,0 \pm 0,5 - 5,7 \pm 0,9 \log_2$ к штамму КВК «Пума», обнаружив прямую зависимость от количества

антигена в вакцинах. Заражение котят в этот период показало, что содержание в препарате калицивируса в дозе $0,4 \text{ см}^3$ и выше защищало котят от заболевания уже через две недели после вакцинации. На 21-е сутки титры антител составили (РН): $8,0 \pm 0,8 - 8,7 \pm 0,9 \log_2$ к штамму «Ларс» КВК и $8,0 \pm 0,8 - 8,9 \pm 0,4 \log_2$ к штамму «Пума». Заражение котят на 21-е сутки не вызвало заболевания или вирусовыделения ни у одного животного. Заболевание невакцинированных кошек контрольной группы подтверждено лабораторно.

Результат этого опыта продемонстрировал, что введение в состав ассоциированной вакцины антигена КВК в количестве $0,2 \text{ см}^3$ /прививную дозу (при активности вируса до инактивации не менее $8 \lg$ ТЦД $50/\text{см}^3$) обеспечивает ее иммуногенность.

Анализ результатов изучения динамики образования антител при вакцинации котят моно- и ассоциированными препаратами показал наиболее стремительное образование антител при использовании моновакцины: уже через 7 суток титр антител здесь был выше в 1,5 -2,5 раза по сравнению с ассоциированными препаратами, однако расхождение итоговых показателей на 21 сутки после вакцинации различались в пользу моновакцины не более чем на $1,0 \log_2$ (РН).

Проведенные исследования были положены в основу нормативно-технической документации на вакцины ассоциированные «Мультифел» и «Витафелвак», отличающиеся по некоторым технологическим параметрам. Вакцина «Мультифел-4» удостоена золотой медали ВВЦ в 1997 году, «Витафелвак» — золотой медали ВВЦ в 2000 году. Препараты производятся двумя биопредприятиями.

3.3.2. Изучение оптимальных способов получения и хранения лечебно-диагностических сывороток на калицивирус кошек.

В качестве продуцентов сывороток крови мы использовали кроликов и овец. Антигенами при проведении гипериммунизации служили штаммы КВК "Ларс" и "Пума", накопленные в культуре клеток CrFK и имевшие активность $8,5 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$. Оценка эффективности результатов гипериммунизации проводилась в РН и РНГА. Все полученные сыворотки были проверены на стерильность, активность, специфичность и содержание белка.

При иммунизации кроликов методами, описанными выше (стр.12), получили активные в РН и РНГА сыворотки крови. Сыворотки крови кроликов, которым производили еженедельное введение антигена, в итоге опыта имели активность в РН $4-6 \log_2$ и РНГА - $6-8 \log_2$ в отношении обоих штаммов вируса. Более высокую активность как в одной, так и в другой реакции проявили сыворотки крови, полученные от кроликов, иммунизированных с использованием «эффекта иммунной памяти»: РН — $7,5-9,5 \log_2$, РНГА - $9-10 \log_2$. У кроликов контрольной группы этот показатель был $\leq 2 \log_2$.

Для получения гипериммунных сывороток на овцах использовали те же способы, что и при иммунизации кроликов. Результат показал аналогичную зависимость активности полученных сывороток от способа иммунизации: активность сывороток при еженедельном введении антигена составила $6-7 \log_2(\text{РН})$ и $7-8 \log_2(\text{РНГА})$; при иммунизации с использованием «эффекта иммунной памяти» эти показатели возрастали в среднем на $2 \log_2$ в той и другой реакции. Использование второго метода гипериммунизации позволяло использовать доноров не менее года (срок наблюдения) и получать от них сыворотки, активностью $8-10 \log_2(\text{РН})$ или $9-12 \log_2(\text{РНГА})$.

Все полученные сыворотки были стерильны в отношении бактериальных и микозных контаминант. Содержание белка в пробах сывороток составляло 10-12 мг% мл.

Специфичность полученного сырья была проверена в РН с антигенами вирусов инфекционного ринотрахеита кошек (штамм «Гранд»), панлейкопении (штамм. «Мяу»), вируса инфекционного перитонита кошек (штамм «Багира») и шестью штаммами и изолятами КВК и показала, что все серии овечьих и кроличьих сывороток реагировали только с антигенами КВК и не проявляли активности с другими вирусами.

Хранение нативных и лиофилизированных сывороток осуществляли при температуре +5°C и -19°C. Установлено, что снижение титра антител при хранении сывороток в течение 2 лет было статистически недостоверным ($p > 0,05$) и не превышало $2 \log_2$ (РН) по тому и другому антигену.

Проведенные исследования были положены в основу нормативной документации на сывороточные и глобулиновые препараты. Сыворотка «Витафел С» и глобулин «Витафел» и удостоены золотой медали ВВЦ в 1995 году. Производятся НПБЦ «Линия Альба». Рекламаций на препараты не поступало.

3.4. Применение вакцинных и сывороточных препаратов для профилактики и лечения калицивирусной инфекции кошек.

Исследование динамики снижения уровня коллоидальных антител в сыворотках 58 новорожденных котят показало, что их исходный показатель зависим от благополучия питомника (местности) по КВИ.

Так титры сывороток 32 котят индивидуального содержания и питомников, благополучных по КВИ, при условии своевременной вакцинации кошек против калицивирусной инфекции, были наиболее высоки и достигали $8 \log_2$ (РН) в течение первой недели после рождения.

Снижение титра антител таких котят до нулевого показателя происходило приблизительно к 10 - 11- недельному возрасту. Иначе дело обстояло в неблагополучных по КВИ питомниках. Несмотря на постоянную циркуляцию калицивируса в месте нахождения таких животных, титр антител у 26 обследованных нами котят недельного возраста не превышал $5,0 \log_2$ (РН). Нулевого уровня он достигал приблизительно к 6-8 - недельному (1,5-2 мес.) возрасту, причем только в случае изоляции приплода от остальных животных и при отсутствии вирусовыделения у кошки.

Вышеописанные наблюдения диктовали необходимость дифференцированного подхода к программе вакцинации в тех или иных условиях, которая была оптимизирована нами в процессе более чем 10-летней практики использования вакцинных и сывороточных препаратов у кошек индивидуального и группового содержания в благополучных и неблагополучных по КВИ местностях.

Снижение титра антител у котят из благополучных питомников до нулевого показателя к 10-недельному (2,5 мес.) возрасту давало возможность вакцинировать их, в том числе и ассоциированными вакцинами, начиная с этого периода. Последующие ревакцинации делали в 3-3,5-месяцев (после продажи и адаптации котенка к новым условиям содержания), затем в 6-8 месяцев и далее ежегодно. Целесообразной являлась также иммунизация кошек за 1 месяц до вязки, что позволяло не только обеспечить приплоду высокий уровень коллострального иммунитета, но и надежнее защитить кошку от заражения при вязке.

Уровень коллострального иммунитета у котят из неблагополучных по калицивирусной инфекции питомников, несмотря на серопозитивность окотившихся кошек, был недостаточным для противодействия заражению: как показывала практика, они часто заболели еще в доутробный период. Из этого следует, что приплоды, полученные в таких

условиях, требуют проведения пассивной или активной иммунизации в более раннем возрасте, чем в благополучных по КВИ местностях. Мы использовали несколько вариантов проведения профилактических мероприятий в таких питомниках.

Первый вариант. Вакцинацию котят осуществляли раньше, чем в благополучных пунктах - не в 2-х, а в 1-1,5-месячном возрасте с последующей ревакцинацией в 2-2,5; 3-3,5 и в 6-8 месяцев. Взрослых животных прививали ежегодно. Этот метод профилактики КВИ длительное время обеспечивал уровень антител не ниже $7,0 \log_2 (PH)$ и являлся особенно успешным при возможности изолировать помет от источника заражения.

Вторым, и, пожалуй, оптимальным вариантом являлась пассивная иммунизация котят в течение первой недели после рождения, которая осуществлялась введением специфической сыворотки или глобулина. Такая тактика вела к быстрому нарастанию титра антител, обеспечивающих защиту в первые недели жизни. Аналогичные результаты были получены нами при пассивной иммунизации кошек сразу после окота: введение сывороточных или глобулиновых препаратов в этот период способствовало усилению пассивной иммунизации котят в подсосный период. Последующая иммунизация приплода в 4-6- недельном возрасте позволяла обеспечить высокий уровень антител на протяжении нескольких последующих месяцев.

Практика проведения симультанной вакцинации не дала положительных результатов. Иммунный ответ был менее интенсивным: максимальный титр нейтрализующих антител на протяжении двух месяцев после таких прививок превышал исходные показатели не более чем на $1,0 \log_2$, в то время как при использовании вакцины согласно наставле-

нию, этот показатель возрастал в 4 и более раз и достигал среднего значения $7,2 \log_2$.

Все изложенные моменты учтены при разработке наставлений по применению антикалицивирусных препаратов и представлены в них.

На протяжении нескольких лет мы изучали эффективность использования разработанных, нами вакцинных и сывороточных препаратов в пунктах неблагополучия по калицивирусной инфекции кошек. Анализировали эпизоотические ситуации, сложившиеся в 14 неблагополучных по КВИ питомниках, с численностью от 10 до 40 кошек различных пород и возраста. Оценивали клиническое состояние животных. Используя РН и ПЦР для исследования конъюнктивальных, назальных и ротоглоточных смывов, определяли наличие у них вирусовыделения и регистрировали его прекращение в ходе проведения специфических лечебно-профилактических мероприятий с использованием разработанных нами препаратов.

Установлено, что клиническое выздоровление с прекращением выделения вируса при симптоматической терапии 57 кошек группового содержания и 19 - индивидуального, проводившейся без использования сывороточных препаратов, составляло 5,3% (групповое содержание) и 62,5 (индивидуальное содержание). При 2-3 кратном (в зависимости от тяжести клинического состояния) подкожном введении специфической сыворотки или глобулина в дозе 1 см^3 78 кошкам группового содержания и 22 - индивидуального, клиническое выздоровление прекращением элиминации вируса во внешнюю среду наблюдали в 50% и 81,8% соответственно. Тем не менее, использование специфических серопрепаратов в подавляющем большинстве случаев позволяло ликвидировать острые клинические проявления болезни, значительно улучшало общее состояние животных, иногда прекращало вирусоносительство, а потому, явля-

лось необходимым этапом для улучшения и стабилизации эпизоотической ситуации в питомниках.

Недостаточно эффективные результаты, полученные нами при проведении оздоровления питомников с использованием специфических сывороточных и глобулиновых препаратов, привели к необходимости поиска более радикальных мер специфической терапии. Нами была изучена возможность использования вакцинотерапии животных. Исследования показали, что при однократном введении инактивированной вакцины против калицивирусной инфекции 78 кошкам группового содержания и 24 — индивидуального, их полное выздоровление при индивидуальном содержании составило 100% , а при групповом - 91%. Ни у одного животного (даже при наличии клинических симптомов болезни до иммунизации) не наблюдали ухудшения клинического состояния.

Практика показала, что оптимальным вариантом борьбы с КВИ явилось сочетание серо- и вакцинотерапии (на фоне применения симптоматических средств), объединяющее положительные стороны этих способов лечения.

Оздоровленные нами питомники сохраняли эпизоотическое благополучие в течение 2 —2,5 лет (срок наблюдения) при условии дальнейшей вакцинации кошек инактивированными вакцинами согласно наставлениям по применению этих препаратов. Необходимо отметить, что немаловажную роль в успешности результатов лечения играло улучшение санитарного состояния мест содержания животных.

В настоящее время нами разработаны и находятся на утверждении в Департаменте ветеринарии МСХ РФ «Правила по профилактике и ликвидации респираторных инфекций кошек», созданные, в частности, на основании изложенного выше научно-практического опыта проведения мероприятий по профилактике и лечению больных кошек.

4. ВЫВОДЫ.

1. Установлено широкое распространение ранее не зарегистрированной в России респираторной болезни животных семейства кошачьих - калицивирусной инфекции. Болезнь не имеет выраженной сезонности. Диагностирована у кошек различных пород и содержащихся в зоопарке амурских тигров.

2. Источником инфекции являются больные животные и реконвалесценты. Основные пути выделения калицивируса при остром и подостром течении болезни - носовые и глазные истечения, содержащие вирус в количестве $4,5 - 8,5 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$. При хроническом течении болезни эти показатели снижаются на $2,5 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$. В ротоглоточных смывах обнаруживают значительное количество вируса ($5,0-7,0 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$) независимо от остроты клинических проявлений инфекции.

3. Инкубационный период болезни длится 4 - 7 суток. Основные симптомы калицивирусной инфекции при спонтанном и экспериментальном заражении кошек идентичны. У 60 котят, заболевших при заражении шестью изолятами калицивируса, конъюнктивит и ринит наблюдали у 86,7% животных, язвенный стоматит — у 26,7%, трахеит и бронхит - у 21,7%, пневмонию - у 23,3%.

4. Первичные или субкультуры клеток почек котят и перевиваемые линии: CrFK, FS, CC-81, FC/Tg в равной степени чувствительны к калицивирусу кошек и могут быть использованы для его выделения, лабораторного и промышленного культивирования. Вирус обладает цитопатогенным действием. Максимальное его накопление происходит при заражении монослойных культур клеток при роллерном (до $10,5 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$) и стационарном (до $9,5 \lg \text{ТЦД } 50/\text{см}^3$) культивировании. Калицивирус кошек сохраняет репродуктивные и антигенные свойства при проведении не менее 15 пассажей в культуре клеток CrFK.

5. Калицивирус кошек не патогенен для овец и лабораторных животных (кроликов, морских свинок и белых мышей), но обладает антигенной активностью при подкожном, назальном и внутривенном введении. Гипериммунизация овец и кроликов позволяет получить специфические сыворотки активностью до $10,0 \log_2$ (РН). Хранение специфических сывороток при температуре от 4°C до 19°C в течение 2 лет снижает их титр не более чем на $2 \log_2$ (РН).

6. Антигенное родство депонированных нами штаммов калицивируса кошек «Ларс» и «Пума» составляет 42%, различия по нуклеотидному составу - 22,1%, аминокислотному - 14,3%. Эти штаммы доминируют над другими изученными изолятами вируса и обладают наиболее широким спектром активности с циркулирующими биотипами калицивируса кошек. Инактивированная вакцина, изготовленная из штаммов калицивируса «Ларс» и «Пума», обеспечила 100% защиту животных от заболевания при заражении каждым из шести изолятов вируса. Эффективность вакцин, содержащих только один из этих штаммов, составила 75 - 100% (в зависимости от штамма или изолята, вируса, использованного для заражения кошек).

7. Штаммы калицивируса «Ларс» и «Пума» обладают высокой иммуногенной активностью в составе ассоциированных вакцин против калицивирусной инфекции, инфекционного ринотрахеита, панлейкопении и хламидиоза кошек. Минимальное содержание калицивируса в прививной дозе ассоциированного препарата - $0,2 \text{ см}^3$ (при активности вируса до инактивации не менее $8 \lg$ ТЦД $50/\text{см}^3$).

8. Вакцинацию котят против калицивирусной инфекции в пунктах, благополучных по этой болезни, осуществляют в 2-2,5- месячном возрасте, а ревакцинацию — в возрасте 3-3,5 и в 6-8 месяцев. В пунктах, неблагополучных по калицивирусной инфекции, целесообразно начинать

иммунизацию котят с 1-1,5 -месячного возраста, а ревакцинацию проводить в 2-2,5; 3-3,5 и 6-8 месяцев. Взрослых кошек следует прививать ежегодно.

9. Специфические сыворотки, глобулины и инактивированные вакцины могут быть использованы для лечения больных калицивирусной инфекцией кошек. Исследования, проведенные на 156 кошках группового и 46 - индивидуального содержания, показали, что эффективность лечения (при групповом / индивидуальном содержании животных) составила: симптоматического 5,3% / 62,5%; серотерапии - 50% / 81,8%; вакцинотерапии - 91% / 100%. Оптимальным вариантом борьбы с калицивирусной инфекцией кошек является сочетанное применение специфических и симптоматических препаратов.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.

Результаты исследований послужили основой для разработки нормативной документации на изготовление, контроль и применение биопрепаратов для специфического лечения и профилактики калицивирусной инфекции кошек.

1. ТУ па «Вакцины против инфекционного ринотрахеита, калицивирусной инфекции кошек «Мультифел 2»; панлейкопении, ринотрахеита и калицивирусной инфекции кошек «Мультифел 3»; панлейкопении, ринотрахеита, калицивирусной инфекции кошек и хламидиоза кошек «Мультифел 4». ТУ 9384-0036-00008064-96 утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10.07.1996г.

2. Наставления по применению перечисленных вакцин. Утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10.07.1996г.

3. ТУ на опытную партию «Сыворотки против панлейкопении, инфекционного ринотрахеита, калицивирусной инфекции и хламидиоза

кошек «Гисфел». ТУ 9388-132-00494185-97 утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 19.11.1997г.

4. Временное наставление по применению «Сыворотки против панлейкопении, инфекционного ринотрахеита, калицивирусной инфекции и хламидиоза кошек «Гисфел». Утверждено Департаментом ветеринарии МСХ РФ 19.11.1997 г. .

5. ТУ па «Глобулин против панлейкопении, инфекционного ринотрахеита, калицивирусной инфекции и хламидиоза кошек «Глобфел». ТУ 9388-119-00494185-97 утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 19.11.1997 г.

6. Временное наставление по применению «Глобулина против панлейкопении, инфекционного ринотрахеита, калицивирусной инфекции и хламидиоза кошек «Глобфел». Утверждено Департаментом ветеринарии МСХ РФ 19.11.1997 г.

7. ТУ на «Вакцину Витафелвак». ТУ 9389-003-18342698-99 утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 15.04.1999 г.

8. Наставление по применению «Вакцины Витафелвак». Утверждено Департаментом ветеринарии МСХ РФ 15.04.1999 г.

9. ТУ па опытную партию «Вакцины против калицивирусной инфекции кошек инактивированной». ТУ 9384-051-00494189-02 утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 17.06.2002 г.

10. Временное наставление по применению «Вакцины против калицивирусной инфекции кошек инактивированной», утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 11.06.2002 г.

11.ТУ на «Препараты Витафел» ТУ 9388-001-18342698-99 утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 15.06.1999г.

12. Наставление по применению «Препаратов Витафел». Утверждено Департаментом ветеринарии МСХ РФ 15.06.1999г.

13. ТУ на опытную партию «Тест-системы для диагностики возбудителя калицивируса кошек методом полимеразной цепной реакции «Калицивир». ТУ 9388-082-00494189-02 утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 25.06.2003г.

14. Временное наставление по применению «Тест-системы для диагностики возбудителя калицивируса кошек методом полимеразной цепной реакции «Калицивир». Утверждено Департаментом ветеринарии МСХ РФ 25.06.2003 г.

15. «Методические указания по постановке реакции непрямой гемагглютинации для обнаружения специфических антител к калицивирусу кошек», утвержденные Директором ВГНКИ ветпрепаратов А.Н.Паниным 1.06.1999 г.

16. «Правила по профилактике и ликвидации респираторных инфекций кошек». Находятся на утверждении в Департаменте ветеринарии МСХ РФ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И., Могильный Ю.И. Калицивироз кошек // *ж. Ветеринария*. - Москва. - 1994. - 9. - С. 51-53.
2. Элизбарашвили Э.И., Рахманина М.М., Уласов В.И., Могильный Ю.И. Ринотрахеит кошек // *ж. Ветеринария*. - Москва. - 1995. - 8. - С. 50-52.
3. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И. Вирусные респираторные болезни кошек // "Патогенез, диагностика и лечение вирусных заболеваний мелких домашних животных" Сб. докл. НПБЦ «Чин».- С-Петербург. - 1995. - Вып. 1. - С.44-51.

4. Сулимов А.А., Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Вирусные болезни кошек // «Вирусные болезни с/х животных». Тез. докл. Всеросс. н/п конф. - Владимир.- 1995. - С. 223.
5. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И., Могильный Ю.И. Выделение и идентификация возбудителей калицивируса и инфекционного ринотрахеита кошек// Сб. науч. тр. ВГНКИ. - Москва. - 1995 (1996).-57.-С. 12-20.
6. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Распространенные вирусные болезни кошек. Диагностика и профилактика // Всеросс. конф. по актуальным проблемам болезней мелк. дом. жив. - Москва. - 26.03.1990.-С. 12-14.
7. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Усовершенствование способов культивирования парвовирусов плотоядных // «Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных препаратов» Тез. докл. V Всеросс. конф. Щелково. - 14-17.05.1996. - С.60-61.
8. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Лечебно- профилактический глобулин для кошек // «Состояние и перспективы исследований по профилактике и лечению болезней с/х животных и птиц». Н/п конф., посв. 50- летию Краснодарской НИВС. - 10-11. 07. 1996. - ч.2. -С.167.
9. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Выделение герпес и калицивирусов от кошек с респираторными болезнями // «Состояние и перспективы исследований по профилактике и лечению болезней с/х животных и птиц». Н/п конф., посв. 50- летию Краснодарской НИВС. - 10-11.07.1996.-С. 93.
10. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Чувствительность перевиваемой культуры клеток почки кошки к парвовирусам пло-

тоядных // «Состояние и перспективы исследований по профилактике и лечению болезней с/х ж-х и птиц». Н/п конф., посв. 50- летию Краснодарской НИВС. - 10-11.07. 1996.-С. 121.

11. Уласов В.И., Селиванов А.В., Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Сулимов А.А., Гельман Б.Г. The research of feline viral infections // XXI Междунар. симпоз. по болезням животных. - Иерусалим. - 21-25.10.1996.-С. 23-24.

12. Кокорина Е.Г., Элизбарашвили Э.И., Рахманина М.М., Уласов В.И. Репродукция вируса ринотрахеита кошек в культуре клеток// Сб. науч. трудов ВГНКИ,- Москва. - 1996. - Т.59. - С. 49-52.

13. Элизбарашвили Э.И., Рахманина М.М., Уласов В.И. Системы для культивирования вируса инфекционного ринотрахеита кошек// "Актуал. пробл. ветер. - санит. контроля с.-х. продукции". II Междунар. конф. - Москва, МГУ прикл. биотехнологии. - 25-27.06. - 1997. - Тез. докл. - 4.2.-С. 114.

14. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Крылов А.Н., Уласов В.И. Чувствительность культур клеток к возбудителю калицивируса кошек // «Актуальные вопросы вет.-сан. контроля сельскохозяйственной продукции». Москва.- МГУ.- Тез. II Междунар. н/п конф. прикл. Биотехнологии. - 25 -27.06.1997. - С. 116.

15. Сулимов А.А., Селиванов А.В., Уласов В.И., Рахманина М.М., Сазонкин В.Н., Элизбарашвили Э.И. Изучение вирусных инфекций диких животных // «75 лет ВНИИОЗ им. Жидкова».- Научн. конф.- Киров. - 27-28.05.1997.-С. 332-333.

16. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И. Патогенез и клинические проявления респираторных вирусных болезней кошек // VI Междунар. конф. ветеринарной медицины мелких дом. жив. - Москва. - 28-30.01.1997.-С. 13.

17. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И., Могильный Ю.И. Калицивирусная инфекция тигров // II Междунар. симп. "Физиологич. основы повышения продуктивности хищных пушных зверей" - Петрозаводск. 16-17. 09. 1998. - С. 47-48.
18. Элизбарашвили Э.И., Рахманина М.М., Уласов В.И. Реактогенность и антигенность инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита кошек // «Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями ж-х». - Покров. -Тез. конф.- ВНИИВВиМ. - 1998. - С. 269-270.
19. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Патогенез и клинические проявления распространенных вирусных болезней кошек // VI Междунар. коиф. вет. мед. - Москва. - 28-30.01.1998. - С. 47-48.
20. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Сазонкин В.Н., Уласов В.И. Применение гомологичных сывороточных препаратов «Витафел» для лечения панлейкопении, Инфекционного ринотрахеита и калицивироза кошек // «Актуальные проблемы вет. медицины мелких дом. жив-х на Северном Кавказе». I Рег. конф. - 27.05.1998.- п. Персиановский, Донской СХИ. - С. 23-24.
21. Элизбарашвили Э.И., Рахманина М.М., Уласов В.И. Роллерное культивирование вируса инфекционного ринотрахеита кошек // Науч. конф. по инфекционным болезням животных. - ВИЭВ. - Москва. - 1999. - 2. - С. 297-298.
22. Уласов В.И., Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Сазонкин В.Н. Отбор проб патматериала для проведения лабораторных диагностических исследований // VII Междунар. конф. по проблемам ветеринарной медицины мелк. дом. жив. - Москва. - 3-5.03.1999. - С. 249-251.
23. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Сазонкин В.Н., Уласов В.И. Средства специфического лечения и профилактики панлейкопении, ин-

фекционного ринотрахеита, калицивируса и хламидиоза кошек // II Регион, конф. «Актуальные проблемы вет. мед. мелк. дом. жив. на Сев. Кавказе».- г. Персияновский. Донская ассоц. ветвр. - 27.05.1999. - С. 39-40.

24. Сулимов А.А., Уласов В.И., Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И. Диагностика, профилактика и лечение наиболее распространенных болезней кошек // Проблемы инфекционных и инвазионных болезней в животноводстве на современном этапе. - Москва. - МВА 80 лет. - Тез. докл.- 1999.-С. 207-209.

25. Крылов А.Н., Рахманина М.М., Уласов В.И. Определение уровня антител к калицивирусной инфекции в РНГА // Сб. науч. тр. ВГНКИ. - Москва. - 1999. - 61. - С: 44-47.

26. Рахманина М.М, Уласов В.И. Изучение антигенного родства изолятов калицивируса кошек // «Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России».- IV рег. конф. «Золотое кольцо России», посв. проблемам профилактики и лечения домашних животных и птицы».- Владимир. - 1999. - 2. - С. 299.

27. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Противоэпизоотические мероприятия в питомниках кошек // VIII Междунар. Конгр. по пробл. ветеринарной медицины мелких дом. жив. - Москва. - 6-8.04.2000. - С. 207-208.

28. Сулимов А.А., Уласов В.И., Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И. Мониторинг инфекционных болезней кошек // Междунар. науч. конф. - Казань.-30-31.05. 2000.-С. 210-211.

29. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Изучение безвредности инактивированной вакцины против калицивируса и инфекционного ринотрахеита кошек // «Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов» Тез. докл. Всеросс. науч. конф. ВГНКИ 14-15.02. 2001. - С. 137-138.

30. Элизбарашвили Э.И., Рахманина М.М., Уласов В.И. Активность инактивированной вакцины против калицивируса и инфекционного ринотрахеита кошек // «Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации вет. преп.» Тез. докл. Всеросс. науч. конф. ВГНКИ.- 14-15.02.2001.-С. 138-139.

31. Рахманина М.М., Уласов В.И. Клинико - эпизоотологические особенности калицивируса кошек//ж. «Ветеринарная практика». — С-Петербург. - 2001.- 11. - С. 9-17.

32. Рахманина М.М., Уласов В.И. Противоэпизоотические мероприятия в питомниках кошек, неблагополучных по калицивирусу // ж. «Ветеринарная практика». - С-Петербург. - (2)13. - 2001. - С. 12-14.

33. Рахмаина М.М., Элизбарашвили Э.И. Разработать методы контроля и изготовления препаратов, применяемых для диагностики, лечения и профилактики калицивируса и инфекционного ринотрахеита кошек // Закл. Отчет о НИР 2000г. УДК 619:616.98: 578. 825. 15 № госрегистрации 01.960.006557.

34. Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Штамм *Feline calicivirus*, используемый для контроля иммуногенной активности вакцин, изготовления специфических лечебно - профилактических и диагностических биопрепаратов // Патент РФ № 2184567 от 10.07.2002 г.

35. Элизбарашвили Э.И., Рахманина М.М., Уласов В.И. Штамм *Feline herpesvirus 1*, используемый для контроля иммуногенной активности вакцин, изготовления специфических лечебно-профилактических и диагностических биопрепаратов // Патент РФ № 2215031 от 27.10.2003г.

36. Рахманина М.М., Уласов В.И. Клинические проявления калицивирусной инфекции кошек // Сб. науч. тр. ВГНКИ. - Москва. - 2003. - Т.64. - С. 78-84.

37. Рахманина М.М., Уласов В.И. Отбор штаммов калицивируса для производства инактивированных вакцин // Сб. науч. тр. ВГНКИ. - Москва.- 2003. - Т.64. - С. 91-100.

38. Тялина Ю.Ю., Рахманина М.М., Обухов И.Л., Уласов В.И. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов калицивируса кошек // Сб. науч. тр. ВГНКИ. - Москва. - 2003. - Т. 64. - С. 101-108.

39. Рахманина М.М., Уласов В.И. Эпизоотологические аспекты калицивирусной инфекции кошек//«Актуальные проблемы инфекц. патологии ж-х».- Междунар. науч. конф., посв. 45-летию ВНИИЗЖ. - Владимир. - 30-31.10.2003. - С. 137-141.

40. Яцентюк С.П., Обухов И.Л., Давыдова Е.Е., Рахманина М.М. Типирование молекулярно - генетическими методами вакцинных штаммов калицивируса кошек // Сб. научн. тр. ВГНКИ. - Москва. - 2005. - т.65. - С. 52-60.

41. Яцышина С.Б., Обухов И.Л., Клименкова О.В., Чулкова В.Г., Рахманина М.М., Сазонкин В.Н., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И., Панин А.Н. Экспресс - диагностика вирусных болезней кошек и собак // ж. Ветеринария. - Москва.-2004. - 5. - С. 25-28.

42. Рахманина М.М., Уласов В.И. Калицивирусная инфекция кошек. Эпизоотические данные, методы специфического лечения и профилактики // XII Междунар. конгр. по болезням мелких дом. жив. - Москва. - 22-24.04.2004. - С. 13-14.

43. Яцентюк С.П., Обухов И.Л., Давыдова Е.Е., Рахманина М.М., Уласов В.И. Разработка молекулярно - генетических паспортов на производственные штаммы «Feline calicivirus» // V Всеросс. н/п конф. «Генодиагностика и инфекц. бол.». - Сб. тр. под ред. акад. РАМН Покровского В.И.- Москва.- 19-21.10. 2004. - С 256-258.

44. Яралова Е.А., Яцентюк С.П., Давыдова Е.Е., Обухов И.Л., Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Молекулярно - генетическое типирование производственных штаммов парвовирусов // V Всероссий. н/п конф. «Генодиагностика инфекционных болезней». Сб. тр. под ред. акад. РАМП Покровского В.И.- Москва. - 19-21.10.2004.- С. 250-253.
45. Рахманина М.М., Уласов В.И. Восприимчивость котят к заражению различными штаммами калицивируса кошек//«Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее». Междунар. н/пр. конф., посвящ. 80-летию ФГУП «Щелковский биокомбинат».- Сб. науч. тр. - Щелково. - 20-23.09.2004.-С. 119-123.
46. Рахманина М.М., Уласов В.И. Клинические признаки калицивирусной инфекции кошек // ж. Ветеринария. - Москва. - 2004. - 12. - С. 24-26.
47. Яралова Е.А., Яцентюк С.П., Давыдова Е.Е., Обухов И.Л., Рахманина М.М., Элизбарашвили Э.И., Уласов В.И. Молекулярно - генетическое типирование производственных штаммов парвовирусов // Сб. науч. тр. ВГНКИ. - Москва. - 2005.-Т. 65.,- С. 65-72.
48. Рахманина М.М., Уласов В.И. Культуральные свойства калицивируса кошек // Сб. науч. тр. ВГНКИ. - Москва. - 2005. - 65. - С. 45-52.
49. Рахманина М.М., Уласов В.И. Диагностика калицивирусной инфекции кошек // Сб. науч. тр. ВГНКИ. - Москва. - 2005. - 65. - С. 36-45.
50. Рахманина М.М., Уласов В.И. Патогенность для кошек эпизоотических штаммов калицивируса // Сб. науч. тр. ВГНКИ. - Москва. - 2005. - 65.-С. 29-36.

Список сокращений.

КВК - калицивирус кошек; КВИ - калицивирусная инфекция

ИРТ - инфекционный ринотрахеит кошек

ПЛК - панлейкопения кошек

ИПК - инфекционный перитонит кошек

ЦПД - цитопатогенное действие

РГА - реакция гемагглютинации

РНГА - реакция непрямой гемагглютинации

РН - реакция нейтрализации

Сокращения, обозначающие первичные культуры клеток:

ПК - почка котенка

СПК - субкультура клеток почки котенка

ПЩ - почка щенка

ПКр - почка крольчонка

ПЭС - почка эмбрионов свиньи

ПЭК - почка эмбрионов коров

ФЭК - фибробластов эмбрионов кур

ФЭП - фибробластов эмбрионов японских перепелов

ТБ - тестикулы быка

Перевиваемые культуры клеток:

CrFK - почка котят

FS - селезенка котенка

A-72 - подкожной опухоли собаки

СС-81- эмбриона кошки

Vero - почка зеленой мартышки

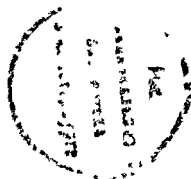
MDCK - почка собаки

Fc/Tg - эпителий языка котенка

MDVK - клеток почки крупного рогатого скота

PSGK - почки сибирского горного козерога

ВНИИВСГЭ, 2005 г.
123022, Москва,
Звенигородское ш., 5.
Заказ № 97/1, тираж 100 экз.



07 МАИ 2005

1037