

**МІНІСТЕРСТВО НАУКИ І ОСВІТИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**КОЗЛЕНКО ТЕТЯНА ГРИГОРІВНА**

УДК 619:616.98-07/084:636.7/8

**КАЛЦИВІРОЗ КОТІВ:  
ПОШИРЕННЯ, ДІАГНОСТИКА ТА ЛІКУВАННЯ**

16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,  
інфекційні хвороби та імунологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник** доктор ветеринарних наук, доцент  
**Недосєков Віталій Володимирович**,  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України,  
завідувач кафедри епізоотології  
та організації ветеринарної справи

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор  
**Корнієнко Леонід Євгенович**,  
Білоцерківський національний  
аграрний університет,  
завідувач кафедри епізоотології  
та інфекційних хвороб

доктор ветеринарних наук, професор  
**Бойко Петро Костянтинович**,  
Східноєвропейський національний  
університет імені Лесі Українки,  
професор кафедри загальної мікробіології,  
вірусології та ґрунтової мікробіології

Захист відбудеться «19» квітня 2018 року о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «    » березня 2018 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Грушанська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Каліцивіроз котів (*Feline Calicivirus Infection, FCV*) – це висококонтagioзне захворювання, широко поширене по всьому світу в популяції котів і оцінюється як етіологічна причина захворювання верхніх дихальних шляхів котів у 10–50 % випадків (Radford A. D., 2003; Helps C. R., 2005; Coyne K. P., 2006; Sykes J. E., 2014).

Вірус каліцивірозу котів (каліцивірус) відноситься до родини *Caliciviridae*, що включає в себе важливі збудники, які уражають людей (*Norwalk virus* – одна з найпоширеніших причин інфекційного гастроентериту в людей) та тварин (вірус геморагічної хвороби кролів) (Green K. Y., 2009).

Вірус має високу частоту мутацій, що призводить до появи численних варіантів із широким спектром вірулентності, антигенних та імуногенних особливостей (Coyne K. P., 2007; Maria M. Afonso, 2017). Мутаційна мінливість характерна для каліцивірусної інфекції, пояснює клінічну різноманітність форм хвороби: від субклінічної з безсимптомним перебігом, уражень слизової оболонки ротової порожнини і очей, верхніх відділів респіраторних органів з різним ступенем тяжкості, до системної інфекції з летальністю до 20 % (Driscoll C. A., 2009).

Поширення каліцивірусної інфекції котів в Україні не досліджувалось. У ветеринарних клініках України діагноз на каліцивіроз котів ставлять переважно на основі клінічних ознак захворювання. Специфічні методи лабораторної діагностики не застосовуються, окрім деяких приватних лабораторій, де діагностують каліцивіроз лише методом полімеразної ланцюгової реакції. Серологічна діагностика досить дорогої та малодостовірної (67 %) метод, у зв'язку з чим його практично не застосовують у практиці ветеринарних лабораторій (Belsham G. J, Sonenberg N., 2016). Одним із методів діагностики каліцивірозу є реакція нейтралізації, але діагностичних сироваток для її проведення в Україні немає. Тому важливим є розроблення способу одержання специфічної сироватки, яку можна було б використовувати для діагностичних та лікувальних цілей.

Лікування котів за каліцивірозу проводять лише симптоматичне. Вакцинація проти каліцивірозу може знизити інтенсивність прояву клінічної форми хвороби, але не зменшує поширення вірусу серед популяції котів, тому необхідно шукати ефективні засоби специфічного лікування та профілактики каліцивірозу (Нou J., 2016).

Таким чином, дослідження особливостей поширення каліцивірусної інфекції у котів, імунобіологічних властивостей збудника каліцивірозу, отримання ізолятів вірусу, розроблення способу одержання специфічної сироватки та глобуліну проти каліцивірусу, а також удосконалення схеми лікування котів є актуальним та має важливе значення для вирішення проблеми каліцивірусної інфекції котів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація є складовою частиною наукових досліджень, виконаних згідно тематичного плану кафедри епізоотології та організації ветеринарної справи

Національного університету біоресурсів і природокористування України «Розробка методів діагностики, лікування та профілактики вірусних хвороб собак і котів» (номер державної реєстрації 0112U005601, 2012–2017 рр.).

**Мета та завдання дослідження.** Мета роботи – дослідити поширення та особливості епізоотичного процесу каліцивірозу котів, імунобіологічні властивості збудника каліцивірозу, розробити спосіб одержання специфічної сироватки та глобуліну проти каліцивірусу, а також удосконалити схему лікування котів за каліцивірозу.

Для досягнення зазначеної мети було поставлено наступні завдання:

- визначити нозологічний профіль і поширення каліцивірозу в заразній патології котів;
- дослідити особливості епізоотичного процесу (вікові, породні, сезонні та ін. особливості) каліцивірозу котів;
- провести аналіз результативності лабораторної діагностики каліцивірусної інфекції котів;
- виділити ізоляти каліцивірусу і дослідити їх імунобіологічні властивості (культуральні та імуногенні);
- розробити технологію одержання високоімуногенного антигену каліцивірусу, гіперімуноної сироватки та глобуліну;
- удосконалити схему лікування котів за каліцивірозу з використанням одержаного глобуліну.

*Об'єкт дослідження* – поширення та діагностика каліцивірозу котів, лікування хворих котів за каліцивірозу.

*Предмет дослідження* – поширення каліцивірозу котів, антигенні та імуногенні властивості ізолятів вірусу, спосіб отримання антигену каліцивірусу, технологія виготовлення гіперімуноної сироватки та глобуліну проти вірусу каліцивірозу.

**Методи дослідження:** епізоотологічні (епізоотологічний аналіз); клінічні (загальний огляд тварин); серологічні (дослідження рівня антитіл у сироватках); вірусологічні (розмноження вірусу, дослідження інфекційної активності вірусу); молекулярно-генетичні (проведення полімеразної ланцюгової реакції); статистичні (математична обробка результатів досліджень).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше досліджено особливості епізоотичного процесу за каліцивірозу котів в м. Києві. Встановлено, що у 63,2 % хвороба перебігає у гострій формі, в навколишнє середовище каліцивірус виділяється із секретами з очей та носа, і виділеннями з ротової порожнини ( $6,4 \pm 1,9 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ). Найбільш схильні до каліцивірозу коти віком 1–6 місяців (48,8 %), хворіють безпородні коти (36,2 %) коти британської (16 %), перської (8 %) порід та російський сфінкс (20 %), каліцивіроз частіше реєструється в осінній та весняний періоди (36,8 і 29,3 %).

Вперше виділено п'ять ізолятів (К1–К5) каліцивірусу котів і вивчено їх культуральні ( $8,5 \pm 0,5 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ) та імуногенні властивості ( $6,6 \pm 0,6 \text{ log}_2$ ), що дозволяє використання їх для розроблення специфічної сироватки проти каліцивірозу.

Вперше експериментально обґрунтовано та розроблено технологію одержання сироватки та імуноглобуліну проти каліцивірозу котів, яка включала отримання антигену ( $8,2 \pm 0,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ), імунізацію кролів (шляхом комбінованого введення антигену каліцивірозу котів у об'ємі по  $0,5 \text{ см}^3$  в/м та в/ш у 1 та 21 добу) та отримання глобуліну, що забезпечило отримання специфічних антитіл у титрі  $9,5 \log_2$ .

Показано ефективність застосування глобуліну проти каліцивірусної інфекції котів із лікувальною і профілактичною метою, що відрізняється високим терапевтичним рівнем (88 %) у порівнянні із практично застосованими схемами лікування (75 %).

Наукова новизна захищена патентом на корисну модель «Спосіб лікування каліцивірозу котів».

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати досліджень доповнюють знання про каліцивіроз, як інфекційну хворобу котів.

Відпрацьовано методики адаптації каліцивірусу до культури клітин CrFK, що може бути використано у біологічній промисловості для отримання антигену та подальшого виробництва гіперімунної сироватки.

Запропоновано схему комплексного лікування котів за каліцивірусної інфекції із застосуванням специфічного глобуліну проти каліцивірусу, препаратів фоспреніл і тилозин. Одержано позитивні результати випробовування специфічного глобуліну в лікуванні котів, хворих на каліцивіроз. На практиці доведено, що імуноглобулін підвищує ефективність терапії на 25 % у порівнянні з використанням схеми, яка включала тільки антибіотик та імуномодулятор.

Результати досліджень увійшли до методичних рекомендацій «Каліцивірусна інфекція котів» (затверджено вченою радою факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 5 від 18 грудня 2017 року).

Розроблено методичні рекомендації «Технологічний регламент виготовлення лікувально-діагностичних сироваток проти каліцивірусу котів» (затверджено науково-технічною радою Науково-дослідного інституту здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 20 від 13 грудня 2017 року), яка може бути застосована як з діагностичною, так і лікувальною метою.

Одержані результати досліджень впроваджено в навчальний процес та використовуються у науковій і навчальній роботі під час викладання дисциплін на кафедрі епізоотології та організації ветеринарної справи Національного університету біоресурсів і природокористування України.

**Особистий внесок здобувача** полягає у проведенні пошуку та аналізі даних наукової літератури, підборі й обґрунтуванні методів наукових досліджень. Здобувачем самостійно проведено експериментальні дослідження, здійснено первинний аналіз отриманих даних, сформульовано попередні висновки. Спільно з науковим керівником визначено мету та завдання роботи, сплановано експериментальні дослідження, проаналізовано та узагальнено результати та сформульовано висновки.

З наукових праць, опублікованих у співавторстві, в дисертації використано лише ті ідеї та положення, які є результатом особистої роботи здобувача.

Щиру вдячність висловлюємо за допомогу під час виконання ряду експериментальних досліджень: кандидату ветеринарних наук Л. М. Музикіній (Науково-дослідницький навчальний центр діагностики хвороб тварин, м. Київ), І. П. Гавриловії (Ветеринарна лабораторія «Бальд», м. Київ), кандидату ветеринарних наук І. М. Полупан (Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ), А. О. Лященко (Ветеринарна лабораторія «Біософт», м. Київ), доктору ветеринарних наук М. М. Рахманіній (Всесоюзний державний науково-контрольний інститут ветеринарних препаратів, м. Москва).

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації було обговорено на: XVI Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (м. Київ, 2017 р.); II Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи» (м. Дніпро, 2017 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної ветеринарної медицини та тваринництва» (м. Одеса, 2017 р.); науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2017 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Епізоотологія, здоров'я та добробут тварин. Виклики сучасності» (м. Київ, 2017 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць, з яких 4 статті у наукових фахових виданнях України, 2 статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, патент України на корисну модель, 2 науково-методичні рекомендації, 6 тез наукових доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається із анотацій, вступу, 4 розділів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Основний зміст дисертації викладено на 145 сторінках комп'ютерного тексту. Дисертаційну роботу ілюстровано 11 рисунками та 14 таблицями. Список використаної літератури налічує 150 джерел, у тому числі 114 латиницею.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Дисертаційну роботу виконано упродовж 2012–2017 рр. на базі кафедри епізоотології та організації ветеринарної справи Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Дослідження імунобіологічних властивостей ізолятів каліцивірусу проводили в Інституті ветеринарної медицини НААН, аналіз журналів реєстрації хворих тварин здійснювали у приватних клініках ветеринарної медицини м. Києва («Клініка Снежневських», «Рудий Кіт», «Локал Вет»,

«Алден Вет», ЦСВМ), постановку полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу – в лабораторіях «Бальд» та «Біософт».

Під час роботи з дослідними тваринами керувалися вимогами Конвенції Ради Європи, щодо захисту тварин (м. Страсбург, 1986 р.), вимогами Міжнародного комітету по науці та згідно вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Матеріалом для дослідження були коти (n=2085), мурчаки (n=15), кролі (n=12) та перещеплювані клітинні культури (CrFK, FS).

Експериментальні дослідження проводили в чотири етапи.

На *першому етапі* досліджень проводили аналіз епізоотичної ситуації та оцінку прояву епізоотичного процесу за каліцивірозу котів. Для цього використовували амбулаторні журнали прийому тварин у п'яти клініках ветеринарної медицини м. Києва. Враховували результати власних вірусологічних та серологічних досліджень проб одержаного матеріалу від котів, хворих та підозрюваних на каліцивіроз, а також результати досліджень «Центру діагностики хвороб тварин» ТОВ «Бальд» та ветеринарної лабораторії «Біософт».

Під час епізоотологічного аналізу досліджено 2085 котів. З них виявлено 649 тварин із різними клінічними проявами ураження очей, слизових ротової порожнини та язика, респіраторних органів. Від цих тварин відбирали проби біоматеріалу (назальні, кон'юнктивальні і ротоглоткові змиви, зіскріби з виразкових ділянок слизових оболонок ротової порожнини), заморожували їх за температури мінус 20 °С і надсилали в лабораторію «Бальд» для проведення полімеразної ланцюгової реакції.

На *другому етапі* досліджували імунобіологічні властивості (культуральні та імуногенні) каліцивірусу на прикладі п'яти ізолятів каліцивірусу, якими інфікували перещеплювані культури клітин нирки кошеняти (CrFK) і селезінки kota (FS). Культуру клітин вирощували у скляних та пластикових матрацах об'ємом 1,5 дм<sup>3</sup>, 250 см<sup>3</sup> та 50 см<sup>3</sup> стаціонарним методом, а також у лунках полістеролових плашок із посівною концентрацією 150–350 тис. клітин/см<sup>3</sup>. Щодня переглядали моношар на наявність цитопатичних змін: зміни форми клітин та ступінь їх відшарування від скла.

Інфекційну активність отриманих проб і вірусної сировини визначали шляхом титрування в культурах клітин нирок кошеняти (CrFK). Для цього використовували 96-лункові культуральні мікропанелі (мікрометод).

Для титрування вірусу готували десятикратні розведення (від 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-10</sup>) на підтримуючому середовищі. Кожним розведенням заражали культуру клітин в чотирьох лунках – по 0,2 см<sup>3</sup>. Як контроль використовували культуру клітин у чотирьох лунках із підтримуючим середовищем. Мікропанелі витримували в CO<sub>2</sub>-інкубаторі за температури 37 °С і 5 % CO<sub>2</sub>. Результати враховували щодня по 7 добу включно. Інфекційну активність вірусу оцінювали за світлової мікроскопії за проявом характерної цитопатичної дії. Ступінь інтенсивності цитопатогенної дії позначали умовно у хрестах: «+» – округлення клітин і поява окремих вогнищ клітинної дегенерації; «++» – до 50 %; «+++» – до 75 %; «++++» – до 100 % клітинної дегенерації.

Постановку реакції нейтралізації для виявлення вірусу каліцивірозу здійснювали за загальноприйнятою методикою (Карпищенко А. І., 2013) із постійною дозою вірусу ( $100 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ) і дворазовими розведеннями сироватки. Облік результатів здійснювали на 2–3 добу після зараження культур клітин. Ідентифікацію каліцивірусу, виділеного від котів, проводили за індексом нейтралізації. Як позитивну сироватку використовували комерційну сироватку «Serocat» виробництва «Merial» (Франція), сер. H400402 /16 (титр антитіл у реакції нейтралізації  $6,5 \log_2$ ), а також гіперімунну сироватку, отриману від кролів. У якості контролю використовували сироватки до вірусу панлейкопенії котів «Імуновет-1Ін» виробництва «Ветзвероцентр» (Російська Федерація) та сироватки крові клінічно здорових кошенят (із лабораторії «Біософт»). Індекс нейтралізації визначали як різницю титрів вірусу (в логарифмічному вираженні) в суміші з нормальною сироваткою (Т1) і вірусу в суміші з імунною сироваткою (Т2). Тобто  $ІН = Т1 - Т2$ . Позитивним результатом вважали реакцію з індексом нейтралізації 2,0 і більше (метод Кербера).

Для вивчення імуногенних властивостей каліцивірусу котів для лабораторних тварин проводили експериментальне зараження мурчаків. Для зараження використовували п'ять ізолятів каліцивірусу. Мурчакам підшкірно вводили культуральну суспензію вірусу, активністю  $8,5 \lg \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , у дозі  $1,0 \text{ см}^3$ . Титр антитіл визначали на 21 добу після введення вірусної суспензії.

На *третьому етапі* одержували антиген каліцивірусу інфікуванням культури клітин СгФК із подальшою очисткою та концентруванням антигена шляхом центрифугування за 6000 об/хв. упродовж 30 хв. Осадження вірусу проводили насиченим розчином амонію сульфату, а очищення з використанням градієнтів концентрації сахарози (15–45 %) за 8000 g і температури  $4^\circ\text{C}$  упродовж 4 год. Для інактивації антигена підбирали оптимальну концентрацію розчину формаліну.

Для розроблення технології одержання сироваток проти каліцивірусу використовували тварин-донорів (кролів) із віварію Інституту ветеринарної медицини НААН і Національного наукового центру «Інститут кардіології імені академіка М. Д. Стражеска».

У схемі гіперімунізації використовували 12 дорослих кролів, масою 2,4–2,8 кг, з яких було сформовано 4 групи по 3 тварини у кожній. Кров від тварин брали на 14 та 21 добу. Серологічну оцінку ефективності гіперімунізації проводили у реакції нейтралізації, яку ставили за загальноприйнятою методикою проти  $100 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  каліцивірусу котів.

На *четвертому етапі* проводили дослідження з доцільності використання глобуліну проти каліцивірусу у складі комплексного лікування котів, хворих на каліцивіроз.

На основі аналізу існуючих схем лікування було запропоновано схему лікування котів за каліцивірозу, яка включає імунотерапію (фоспреніл по  $0,2 \text{ см}^3$  на 1 кг маси тіла), антибіотикотерапію (розчин тилозину 5 % по  $0,2 \text{ см}^3$  на 1 кг маси тіла) та специфічну терапію, що полягала в застосуванні специфічного імуноглобуліну проти каліцивірусу.



Перед застосуванням імуноглобуліну ставили біопробу. Спершу глобулін вводили внутрішньошкірно, і лише через 30 хвилин, за відсутності алергічної реакції у місці введення, котам вводили препарат у терапевтичній дозі. Контроль ефективності проводили у полімеразній ланцюговій реакції через чотири тижні після закінчення лікування.

Для аналізу та узагальнення результатів досліджень використовували методи статистичної обробки, загальноприйняті в біології. Обчислення середніх показників титрів антитіл і антигенів, стандартні відхилення цих показників проводили з використанням комп'ютерної програми MS Excel. В якості довірчого інтервалу було обрано рівень імовірності  $P=0,95$  (рівень значущості  $p=0,05$ ). Розраховували наступні показники статистики: середнє арифметичне число ( $M$ ), середнє квадратичне відхилення ( $m$ ), показник істотності різниці ( $t$ ) і достовірність різниці ( $p$ ).

Статистичну обробку результатів титрування інфекційної активності вірусу проводили за методом Reed і Mench (1938), виражаючи титр вірусу в  $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

## **РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ВИЗНАЧЕННЯ НОЗОЛОГІЧНОГО ПРОФІЛЮ І ПОШИРЕННЯ КАЛІЦИВІРОЗУ В ЗАРАЗНІЙ ПАТОЛОГІЇ КОТІВ**

Упродовж 2012–2017 рр. клінічно було обстежено 2085 котів, серед яких виявлено 649 тварин із проявом клінічних ознак, характерних для каліцивірозу. Встановлено, що частка звернень власників тварин до клінік ветеринарної медицини у м. Києві із симптомами, притаманними каліцивірозу, становила 31,1 % від загальної кількості випадків. У лабораторних умовах методом полімеразної ланцюгової реакції діагноз на каліцивіроз було підтверджено лише у 174 випадках, що становить 26,8 % від числа досліджених, що підтверджує провідну роль каліцивірусної інфекції у тварин з ураженням очей (кон'юнктивіти, кератокон'юнктивіти), слизових ротової порожнини та язика (ерозії, виразки), респіраторних органів (риніти, трахеїти, бронхіти, пневмонії).

Встановлено, що у котів нозологічний профіль заразних хвороб формувався із 13 нозоодиниць, найбільша частка припадала на наступні: мікроспорія – 16,3 %; трихофітія – 14,7 %; отодектоз – 13,8 %; ринотрахеїт – 12,5 %; хламідіоз – 9,1 %; токсокароз – 7,9 %; каліцивіроз – 6,2 %; коронавірус – 5,4 %; мікоплазмоз – 3,0 %; панлейкопенія – 2,6 %. Крім цього, реєструється токсоплазмоз, лямбліоз, імунодефіцит котів, які складають разом 8,5 %.

Таким чином, встановлено, що у нозологічному профілі інфекційної патології котів в умовах м. Києва частка каліцивірозу становила 6,2 та 26,8 % серед хвороб інфекційного респіраторного синдрому котів, що свідчить про значне поширення цього захворювання.

## **ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЕПІЗООТИЧНОГО ПРОЦЕСУ КАЛІЦИВІРОЗУ КОТІВ**

**Аналіз вікових та породних особливостей** анамнезу 174 котів м. Києва показав, що коти різних порід мають різну чутливість до зараження вірусом.

Породний розподіл хворих тварин був наступний: коти російської голубої (5,7 %), перської (7,5 %), британської (16,1 %), сіамської породи (3,4 %), а також мейн кун (1,1 %), російський сфінкс (20,1 %), скотіш фолд (5,2 %), корніш рекс (2,9 %), курильські бобтейли (1,7 %), безпородні тварини (36,2 %). Найбільшу частку склали безпородні тварини, російський сфінкс, коти британської та перської порід. За дослідженнями безпородні коти сприйнятливі до каліцивірозу саме через відсутню специфічну профілактику в їх популяції та аж ніяк через породну схильність, а дослідження титрів специфічних антитіл у їх сироватках крові є наслідком перехворювання в минулому, або вказує на присутність вірусу, що може призвести до захворювання в майбутньому.

Аналіз вікового аспекту хворих на каліцивіроз котів, показав високу чутливість до хвороби молодих тварин: захворюваність кошенят 1–6-місячного віку склала 48,8 %. Даний факт може бути пов'язаний із неповноцінним колостральним імунітетом (проблеми надходження молозива у перші дні життя кошенят та їх імунологічним станом), або відсутність антитіл в організмі матері. Також цьому сприяє недотримання схем вакцинації або взагалі їх невиконання.

**Аналіз сезонності захворювання** показав, що піки реєстрації каліцивірозу припадали на осінній та весняний періоди (відповідно 64 і 51 хворих тварин). Це може бути зумовлено сезонним зниженням імунного статусу тварин, а також статевою зацікавленістю котів у весняний період.

Крім того, осінні спалахи каліцивірозу можуть бути пов'язані зі зниженням температури, що забезпечує тривале збереження вірусу у зовнішньому середовищі. Тим не менш, хвороба не характеризувалась сезонністю.

**Аналіз динаміки захворюваності гострою і хронічною формами каліцивірозу котів.** Показники зареєстрованих форм перебігу каліцивірозу котів у місті Києві за період з 2012 по 2017 роки представлено на рисунку 1.

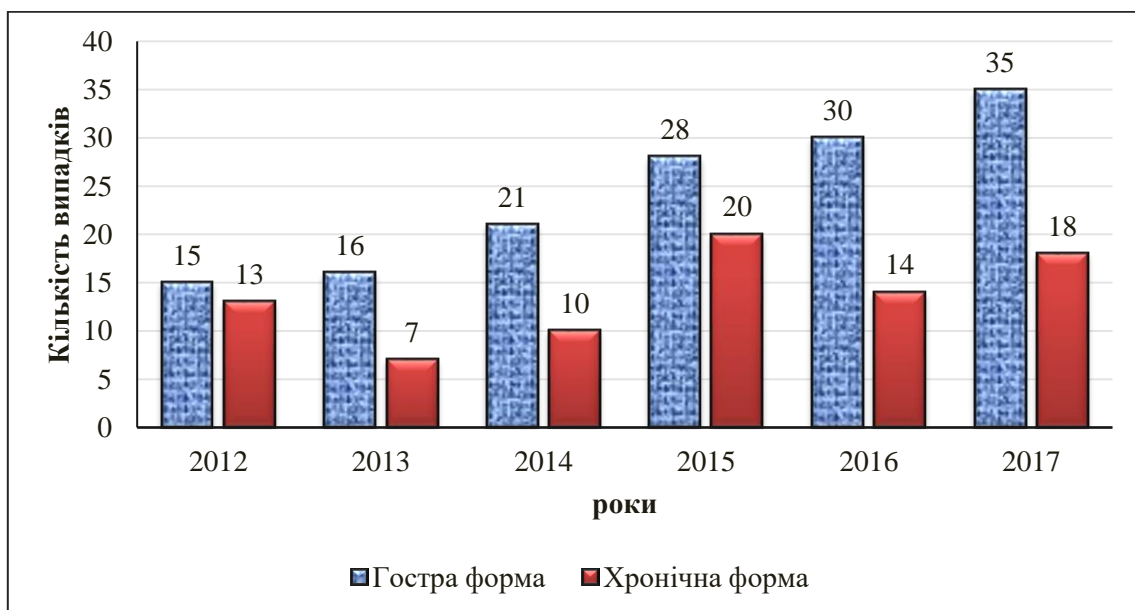


Рис. 1 Динаміка показників захворюваності гострою та хронічною формами каліцивірозу котів у місті Києві за період з 2012 по 2017 роки

Спостерігали тенденцію до зростання гострою формою каліцивірозу котів. Динаміка захворюваності хронічною формою каліцивірозу котів носила хвилеподібний характер. Спостерігали зниження показників на початку періоду спостереження (2013–2014 роки), значне зростання в 2015 році і зниження високих показників у заключні роки – з 20 випадків (2015 рік) до 14 (2016 рік) та 18 (2017 рік).

У той же час, помірне зростання захворюваності гострою формою каліцивірозу котів вказує на повільне ускладнення епізоотичної ситуації.

**Аналіз клінічних проявів каліцивірусної інфекції за гострого та хронічного перебігу** дозволив встановити, що гострий перебіг хвороби супроводжувало підвищення температури (52,8 %), кон'юнктивіт (60 %) і супутній йому риніт (62,3 %). Хронічний перебіг каліцивірозу супроводжував катаральний трахеїт (20 %), пневмонія (12 %). А в одиничних випадках діагностували ураження нервової системи (3,3 %), артрити (5,3 %). Виразковий стоматит реєстрували як за гострого (30 %), так і хронічного (23,3 %) перебігу.

Було встановлено основні шляхи виділення каліцивірусу в навколишнє середовище через кон'юнктивальні і назальні секрети за гострого перебігу інфекції. Для підтвердження цього було відібрано екскрети від 11 спонтанно захворілих котів і було проведено титрування їх у культурі клітин CrFK. Встановлено, що середній титр вірусу в них за гострого перебігу хвороби склав  $6,3 \pm 1,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . За хронічного перебігу захворювання ці показники знижувалися в середньому на  $2,3 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  і склали  $4,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . Уміст каліцивірусу в ротоглоткових змивах за гострого перебігу хвороби становив  $6,1 \pm 1,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , а за хронічного –  $6,0 \pm 1,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

#### АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТИВНОСТІ МЕТОДІВ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ КАЛІЦИВІРОЗУ КОТІВ

Проаналізовано результати лабораторних досліджень, які проводились у приватній діагностичній лабораторії «Бальд» упродовж 2012–2016 рр. з використанням полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу. За вказаний період було досліджено 727 проб від котів різного віку й статі, історії вакцинації та типу вакцин (табл. 1).

Таблиця 1

#### Результати полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу за каліцивірозу котів

Група тварин	Результати полімеразної ланцюгової реакції			Результати імуноферментного аналізу		
	Кількість	Позитивні	Негативні	Кількість	Позитивні	Негативні
Вакциновані	183	43 (23,5 %)	140 (76,5 %)	59	44 (74,5 %)	15 (25,2 %)
Невакциновані	392	116 (29,6 %)	276 (70,4 %)	93	61 (65,6 %)	32 (34,4 %)
Всього	575	159 (27,6 %)	416 (72,4 %)	152	105 (69,0 %)	47 (31,0 %)

За результатами досліджень у полімеразній ланцюговій реакції частка хворих котів більша серед невакцинованих котів – 29,6 %. Результати, отримані в імуноферментному аналізі, свідчать, що позитивно реагували саме вакциновані тварини – 74,5 %, на нашу думку, за рахунок присутності поствакцинальних антитіл. Проте, не вдалося встановити межю між рівнем поствакцинальних та постінфекційних імуноглобулінів.

### ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КАЛІЦІВІРУСУ

З метою дослідження культуральних властивостей каліцивірусу котів було отримано п'ять ізолятів від котів, які мали вікові та породні відмінності, а також специфічні особливості перебігу та клінічного прояву хвороби.

Для вивчення чутливості культур клітин до каліцивірусу котів використовували клітини CrFK (нирки кошеняти) та FS (селезінки kota), які заражали п'ятьма ізолятами каліцивірусу (табл. 2).

Таблиця 2

#### Динаміка накопичення каліцивірусу в культурах клітин ( $M \pm m$ )

Культура клітин	Накопичення каліцивірусу котів в культурах клітин ( $\lg$ ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )				
	К-1	К-2	К-3	К-4	К-5
CrFK	8,2±1,0*	8,5±1,0*	8,0±0*	8,0±0,8*	8,0±0,8*
FS	8,2±0,5*	8,2±0,5*	7,7±1,0*	8,2±0,5*	8,2±0,5*

Примітка. \* $p < 0,05$

Встановлено, що репродукція вірусу в культурах клітин нирки і селезінки kota (CrFK, FS,) носила закономірний характер для всіх досліджених ізолятів вірусу, а відмінність чутливості культур клітин не перевищило 1,0  $\lg$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Репродукція каліцивірусу супроводжувалася проявом цитопатогенної дії, яка спостерігалася з першого пасажу вірусу і була однотипною у чутливих культурах клітин у всіх п'яти ізолятів каліцивірусу котів. Найкращі репродуктивні властивості показав ізолят К-2 на клітинах CrFK (8,5±1,0  $\lg$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>).

**Вивчення імунобіологічних властивостей каліцивірусу котів для лабораторних тварин** проводили з метою пошуку біологічної моделі, здатної відповідати на введення антигена індукцією специфічних гуморальних антитіл.

Для підшкірного зараження мурчаків використовували п'ять ізолятів каліцивірусу з активністю 8,5  $\lg$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, у дозі 1,0 см<sup>3</sup>. Титр антитіл визначали на 21 добу після введення вірусної суспензії (табл. 3).

Встановлено, що мурчаки не сприйнятливі до захворювання каліцивірозом: у жодної із заражених тварин не зареєстровано будь-яких клінічних ознак хвороби. Проте введення лабораторним тваринам ізолятів каліцивірусу котів викликало у них вироблення гуморальних антитіл у титрах 5,3–6,6  $\log_2$  (реакція нейтралізації, середні показники).

Максимальну імуногенну активністю для лабораторних тварин мав ізолят К-2, за введення якого рівень антитіл склав 6,6±0,6  $\log_2$ .

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

Таблиця 3

**Показники титру специфічних антитіл у лабораторних тварин (M±m, n=3)**

Ізолят	Титр антитіл у мурчаків (log <sub>2</sub> )	
	До ін'єкції	На 21 добу після ін'єкції
К-1	≤2	5,6±0,6*
К-2	≤2	6,6±0,6*
К-3	≤2	5,5±0,5*
К-4	≤2	6,3±0,6*
К-5	≤2	5,3±0,6*
Контроль	≤2	≤2

Примітка. \*p<0,001

**Вивчення динаміки накопичення каліцивірусу в культурі клітин.**

Відпрацювання технологічних параметрів отримання вірусної маси каліцивірусу проводили в культурі клітин CrFK.

Важливим аспектом за культивування каліцивірусу котів є збереження його репродуктивних властивостей на високих рівнях пасажів. Для вивчення цих параметрів було проведено 10 послідовних пасажів ізоляту К-2 в культурі клітин CrFK, яку заражали на моношар в умовах стаціонарного культивування. Встановлено стабільний рівень накопичення каліцивірусу котів (8,0–8,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) у процесі проведення 10 пасажів.

**РОЗРОБКА СПОСОБУ ОДЕРЖАННЯ АНТИГЕНУ КАЛІЦИВІРУСУ**

Спосіб отримання антигену каліцивірусу включав такі етапи: очищення каліцивірусної суспензії від клітинного детриту шляхом низькошвидкісного центрифугування суспензії (6000 об/хв упродовж 30 хв); осадження і концентрування очищеної суспензії амонію сульфатом; очищення вірусу з використанням градієнтів концентрації сахарози. У цьому разі вдалося сконцентрувати вірус у 10 разів. Вихід вірусу становив 96 %.

Наступним етапом був підбір оптимальних умов інактивації збудника каліцивірозу. Основним критерієм оцінки досліджень було збереження активності антигену каліцивірусу. У якості інактиватора каліцивірусу використовували розчин формаліну в концентрації 0,1 %, 0,2, 0,5 %. Для відпрацювання параметрів інактивації вивчали вплив концентрації інактиватора, температурного режиму і тривалості дії (табл. 4).

Повноту інактивації визначали проведенням трьох послідовних пасажів інактивованого вірусу в культурі клітин CrFK. Ефективність інактивації вірусу оцінювали за показниками зниження інфекційності та збереження високої антигенної активності інактивованого препарату.

Результати, представлені в таблиці 4, свідчать про те, що у всіх варіантах проведення інактивації вірусу, він зберігав антигенність, що незначно відрізнялася від початкової.

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

Таблиця 4

**Антигенність вірусу після інактивації в різних режимах (M±m)**

Ізолят	Режим інактивації			Титр антитіл в сироватках крові мурчаків (РН, log <sub>2</sub> ) n=3	
	Температура, °С	Вміст формаліну, %	Експозиція, год	До введення вірусу	На 21 добу після ін'єкції
К-2	37	0,1	108	≤2	8,0±0,5*
		0,2	72	≤2	8,3±0,6*
		0,5	48	≤2	8,5±0,5*
	не інактивованій			≤2	8,6±0,5*

Примітка. \*p<0,05; РН – реакція нейтралізації

Таким чином, оптимальним режимом інактивації вірусу є використання формаліну в кількості 0,2 % за температури 37 °С і експозиції 72 години.

Одержаний інактивованій препарат антигену каліцивірусу використовувався для імунізації кролів з метою одержання протикаліцивірусних антитіл.

**РОЗРОБЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ СИРОВАТКИ ТА ГЛОБУЛІНУ ПРОТИ КАЛІЦИВІРУСУ**

Для визначення оптимального способу введення інактивованого антигена з активністю 8,2 Іg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> використовували 12 дорослих кролів, з яких було сформовано 4 групи по 3 тварини у кожній (табл. 5).

Таблиця 5

**Схема імунізації кролів проти вірусу каліцивірозу (n=3)**

Доба	Доза, спосіб і кратність введення			
	I	II	III	IV контроль
1	0,1 см <sup>3</sup> в 5 точок в/ш	0,5 см <sup>3</sup> в/м	0,5 см <sup>3</sup> в/ш + 0,5 см <sup>3</sup> в/м	МНКК
7	0,1 см <sup>3</sup> в 5 точок в/ш	0,5 см <sup>3</sup> в/м	–	МНКК
14	0,1 см <sup>3</sup> в 5 точок в/ш	0,5 см <sup>3</sup> в/м	–	МНКК
21	0,1 см <sup>3</sup> в 5 точок в/ш	0,5 см <sup>3</sup> в/м	0,5 см <sup>3</sup> в/ш + 0,5 см <sup>3</sup> в/м	МНКК

Примітка. в/ш – внутрішньошкірно; в/м – внутрішньом'язово; МНКК – мікрофільтрат незараженої культури клітин

Кров від тварин відбирали на 14 та 28 добу. Серологічна оцінка ефективності імунізації проводилась у реакції нейтралізації.

Антитіла були виявлені вже на 14 добу за внутрішньошкірного введення антигену та у тварин, імунізованих комбіновано внутрішньошкірно та внутрішньом'язово, титр антитіл складав відповідно 6,0 та 7,5 log<sub>2</sub>.

Максимальні титри антитіл виявляли після четвертої імунізації на 28 добу у тварин першої і третьої груп – відповідно 8,9 та 9,5  $\log_2$ .

У тварин другої групи, яким антиген вводили внутрішньом'язово, титр антитіл був найнижчий і складав 5,8–7,6  $\log_2$ . Сироватки крові тварин контрольної групи були негативними.

На основі результатів власних досліджень було розроблено технологію одержання гіперімунної сироватки проти вірусу каліцивірозу, яка полягала у комбінованій імунізації кролів шляхом введення антигену внутрішньошкірно та внутрішньом'язово, що дозволило отримати гіперімунну сироватку з титром антитіл  $9,5 \pm 0,7 \log_2$ .

**Виділення антитіл проти каліцивірусу із гіперімунних сироваток.** З метою одержання очищених імуноглобулінів класу G з одержаних сироваток крові кролів провели виділення глобулінової фракції.

Для цього з одержаних гіперімунних сироваток крові кролів виділяли загальну фракцію глобулінів шляхом висолювання амонію сульфатом за 40 % насиченості та гель-проникаючою хроматографією на ультрагелі AcA-34, зрівноваженням 0,01–0,02 М фосфатнобуферному розчині, рН 7,2–7,4 та одержували фракцію імуноелектрофоретичних чистих імуноглобулінів G.

Встановили, що питома вага імуноглобулінів на 1 мг білкового розчину була вдвічі вищою у порівнянні з вихідною сироваткою, що має важливе значення для вдосконалення технології одержання імуноглобулінів для виробництва діагностичних та лікувальних препаратів.

#### ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКУВАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГЛОБУЛІНУ ПРОТИ КАЛІЦИВІРУСУ КОТІВ

На основі аналізу існуючих схем лікування тварин було запропоновано схему лікування котів за каліцивірозу, яка включає імунотерапію, антибіотикотерапію та специфічну терапію.

Для оцінки лікувальних властивостей протикаліцивірусних глобулінів було застосовано одержаний експериментальний зразок глобулінів як окремо, так і у складі комплексного лікування. Отже, лікування тварин проводили за чотирьох запропонованих схем (табл. 6).

Таблиця 6

Схеми лікування котів за каліцивірозу

№ з/п	Препарат	Доза та спосіб введення	Режим введення
1	Тилозин 5 % Фоспреніл	в/м, 0,2 см <sup>3</sup> на 1 кг м. т. п/ш, 0,2 см <sup>3</sup> на 1 кг м. т.	1 раз на добу 7 діб поспіль 1 раз на добу 7 діб поспіль
2	Тилозин 5 % Фоспреніл Імуноглобулін	в/м, 0,2 см <sup>3</sup> на 1 кг м. т. п/ш, 0,2 см <sup>3</sup> на 1 кг м. т. в/м 2 см <sup>3</sup> для тварини	1 раз на добу 7 діб поспіль 1 раз на добу 7 діб поспіль 5 ін'єкцій раз на 48 год
3	Імуноглобулін	в/м 2 см <sup>3</sup> для тварини	5 ін'єкцій раз на 48 год
4	Ізотонічний розчин NaCl	0,2 см <sup>3</sup> для тварини	1 раз на добу 7 діб поспіль

Примітка. в/м – внутрішньом'язово; п/ш – підшкірно

Контроль ефективності проводили у полімеразній ланцюговій реакції через чотири тижні після закінчення лікування (термін, необхідний для відновлення епітелію та повної елімінації збудника).

За 5-разового введення тваринам глобуліну клінічне одужання спостерігали у 88 % котів. Однак, клінічне одужання не завжди супроводжувалося припиненням виділення вірусу в зовнішнє середовище.

Дослідження проб кон'юнктивальних і ротоглоткових змивів, взятих від всіх тварин, які піддавались лікуванню, дозволяло з великою часткою ймовірності стверджувати про припинення виділення вірусу реконвалесцентами (дослідження проводили шляхом титрування проб на культурі клітин CrFK). Проте результат тестування показав, що вірус виділяли у 17,8 % котів, які піддавалися лікуванню (табл. 7).

Таблиця 7

### Ефективність схем лікування котів за каліцивірозу

Група	Всього тварин підданих лікуванню	Клінічно одужали	Виділяли вірус	Клінічно одужали і не виділяли вірус
1	8	6	2	6 (75 %)
2	9	8	1	8 (88 %)
3	6	2	2	2 (33 %)
4	5	5	0	0

Найвищий терапевтичний ефект було отримано у разі застосування другої схеми, яка передбачала використання протикаліцивірусного глобуліну. У складі комплексної терапії каліцивірусу котів лікувальний ефект був на 25 % вищий, ніж за використання антибіотика та імуномодулятора. Застосування протикаліцивірусного глобуліну як єдиного засобу лікування демонстрував низьку терапевтичну ефективність, яка склала 33 %.

Отже, за результатами досліджень було підібрано оптимальну схему лікування котів за каліцивірозу та доведено доцільність використання протикаліцивірусного глобуліну у комплексній терапії, ефективність якої склала 88 %.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено нові дані щодо поширення каліцивірозу в заразній патології котів, особливостей епізоотичного процесу та клінічних проявів за каліцивірозу котів. Проведено аналіз результативності лабораторної діагностики каліцивірозу котів. Вивчено імунобіологічні властивості збудника каліцивірозу, розроблено технологію одержання високоімуногенного антигену, специфічної сироватки та глобуліну проти каліцивірусу, удосконалено схему лікування котів за каліцивірозу.

1. Нозологічний профіль заразних хвороб котів у м. Києві формується із 13 нозоодиниць. Частка каліцивірусної інфекції у заразній патології складає 6,2 %. Проте з 649 котів, що мали клінічні прояви, притаманні каліцивірусній інфекції, позитивними у полімеразній ланцюговій реакції були 174 коти (26,8 %), що свідчить про високий рівень циркуляції збудника серед котів.



2. Віковий аналіз показав, що коти найбільш схильні до каліцивірозу у віці 1–6 місяців (48,8 %) і мінімально чутливі до хвороби у віці старше 18 місяців (6,9 %). Найчастіше хворіють безпородні коти (36,2 %), коти британської (16 %), перської (8 %) порід та російський сфінкс (20 %). Каліцивіроз частіше реєструється в осінній та весняний періоди (64 і 51 хворих тварин), втім захворювання не характеризується сезонністю.

3. Каліцивіроз перебігає як у гострій (63,2 %), так і хронічній (36,8 %) формі. Клініко-епізоотологічні особливості перебігу захворювання характеризуються симптомокомплексом ураження органів респіраторного тракту (20 %), ротової порожнини (30 %) та очей (60 %).

4. Основними шляхами виділення каліцивірусу в навколишнє середовище є виділення з очей, носової та ротової порожнин ( $6,4 \pm 1,9 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ), в яких він у найбільших кількостях міститься за гострого перебігу інфекції.

5. Порівняльний аналіз методів лабораторної діагностики вказує, що за результатами полімеразної ланцюгової реакції частка хворих котів більша серед невакцинованих – 29,6 %, на відміну від результатів імуноферментного аналізу, де позитивно реагують саме вакциновані тварини – 74,5 %.

6. Результати дослідження імуногенних властивостей п'яти ізолятів показали, що ізоляти каліцивірусу не патогенні для лабораторних тварин (мурчаків), проте проявляють імуногенні властивості на рівні  $5,3\text{--}6,6 \log_2$ , що дозволяє використовувати їх для розроблення діагностичних і лікувальних засобів.

7. Одержання очищеного антигену каліцивірусу шляхом осадження амонію сульфатом із подальшою очисткою антигенного матеріалу з використанням градієнтів концентрації сахарози дає можливість одержати очищений на 96 % та концентрований у 10 разів антиген каліцивірозу. Оптимізовано режим інактивації каліцивірусу формаліном і обґрунтовано, що оптимальним є вплив формаліну в кількості 0,2 % за температури  $37^\circ\text{C}$  і експозиції 72 години.

8. Технологія одержання гіперімунної сироватки та глобуліну полягає у внутрішньошкірному та внутрішньом'язовому введенні антигену одночасно ( $0,5 \text{ см}^3 \text{ в/ш} + 0,5 \text{ см}^3 \text{ в/м}$ ), з інтервалом між імунізаціями 7 діб. Це забезпечує стабільне одержання високоактивних сироваток крові кролів проти вірусу каліцивірозу з активністю в реакції нейтралізації від 6,0 до  $9,5 \log_2$ , які можуть бути застосовані як з діагностичною, так і лікувальною метою.

9. Ефективність схеми комплексного лікування котів за каліцивірусної інфекції із застосуванням специфічного глобуліну, препаратів фоспреніл та тилозин становить 88 %. Доведено, що імуноглобулін підвищує ефективність терапії на 25 % у порівнянні з використанням схеми без його застосування.

## **ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

1. Для біологічної промисловості запропоновано спосіб концентрації та інактивації антигена каліцивірусу, який дає змогу отримати безпечний препарат каліцивірусу зі збереженням антигенних властивостей.

2. Виготовлені за розробленою технологією специфічна сироватка та глобулін можуть бути використані з лікувальною та діагностичною метою.

3. Запропоновано комплексну схему лікування тварин, що передбачає застосування антибіотиків, імуномодулятора та розробленого глобуліну проти каліцивірусу (патент України на корисну модель «Спосіб лікування каліцивірозу котів»)

4. Основні положення дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес і науково-дослідну роботу кафедри епізоотології та організації ветеринарної справи Національного університету біоресурсів і природокористування України.

5. Отримані результати пропонується використовувати під час написання відповідних розділів підручників і навчальних посібників з епізоотології та ветеринарної біотехнології.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Козленко Т. Г. Вивчення біологічних властивостей збудника каліцивірозу котів. Науково-технічний бюлетень Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. 2015. Т 3. № 2. С. 52–57.

2. **Козленко Т. Г.**, Мартинюк О. Г. Дослідження терапевтичної ефективності гіперімунної сироватки проти каліцивірусної інфекції котів. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С.З. Гжицького. 2016. Т. 18. № 3 (70). С. 141–146. *(Здобувач брала участь у лікуванні хворих котів, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*

3. Недосеков В. В., **Козленко Т. Г.** Оптимізація методів очистки та інактивації збудника каліцивірозу котів. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2016. № 4. С. 92–94. *(Здобувач провела інактивацію каліцивірусу, узагальнила отримані дані, підготувала статтю).*

4. **Козленко Т. Г.**, Мартинюк О. Г. Одержання специфічного глобуліну для лікування котів за каліцивірозу. Аграрний вісник Причорномор'я. 2017. № 83. С. 111–116. *(Здобувач брала участь у виділенні глобулінової фракції, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*

### Статті у наукових фахових виданнях України,

#### включених до міжнародних наукометричних баз даних:

5. **Козленко Т. Г.**, Мартинюк О. Г. Особливості клінічного прояву каліцивірусної інфекції котів у м. Києві. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2015. № 6 (55). Режим доступу до статті: [nd.nubip.edu.ua/2015\\_6/21.pdf](http://nd.nubip.edu.ua/2015_6/21.pdf) *(Здобувач брала участь у проведенні аналізу отриманих результатів та написанні статті).*

6. **Козленко Т. Г.**, Недосеков В. В. Поширення каліцивірусної інфекції котів в умовах мегаполісу. Біологія тварин. 2017. Т. 19. № 1. С. 54–58. *(Здобувач провела аналіз поширення каліцивірозу, брала участь в узагальненні отриманих результатів та написанні статті).*

### Патент України на корисну модель

7. Недосєков В. В., **Козленко Т. Г.**, Мартинюк О. Г. Патент України на корисну модель 116255, МПК А61К 39/118. Спосіб лікування каліцивірозу котів; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України; № 201612563; заявлено 09.12.2016; опубліковано 10.05.2017; Бюл. № 9. *(Здобувач брала участь у розробленні принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

### Методичні рекомендації:

8. **Козленко Т. Г.**, Недосєков В. В., Мартинюк О. Г. Каліцивірусна інфекція котів: [методичні рекомендації для студентів факультету ветеринарної медицини]. К., 2017. 13 с. *(Затверджено науково-технічною радою Науково-дослідного інституту здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 5 від 18 грудня 2017 року. Здобувач брала участь у проведенні досліджень, узагальненні результатів і написанні рекомендацій).*

9. **Козленко Т. Г.**, Недосєков В. В., Мартинюк О. Г. Технологічний регламент виготовлення лікувально-діагностичних сироваток проти каліцивірусу котів. К., 2017. 23 с. *(Затверджено вченою радою факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 20 від 13 грудня 2017 року. Здобувач брала участь у виготовленні специфічної сироватки, і написанні рекомендацій).*

### Тези наукових доповідей:

10. **Козленко Т. Г.**, Мартинюк О. Г. Розробка способу одержання глобуліну проти каліцивірозу котів. Актуальні проблеми ветеринарної медицини: XVI Міжнародна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів, м. Київ, 19–20 квітня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 99–100. *(Здобувач брала участь у виділенні глобулінової фракції, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку).*

11. **Козленко Т. Г.**, Мартинюк О. Г. Вивчення біологічних властивостей збудника каліцивірозу котів. Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи: II Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів, м. Дніпро, 1–2 червня 2017 року: тези доповіді. Дніпро, 2017. С. 92–94. *(Здобувач брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку).*

12. **Козленко Т. Г.**, Недосєков В. В. Поширення каліцивірусної інфекції котів в умовах мегаполісу. Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин: науково-практична конференція молодих вчених, м. Київ, 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 42. *(Здобувач провела аналіз поширення каліцивірозу, брала участь в узагальненні отриманих результатів та підготовці тез до друку).*

13. **Kozlenko T. G.**, Martyniuk O. G. The spreading of feline calicivirus infection in megalopolis condition. Епізоотологія, здоров'я та добробут тварин. Виклики сучасності: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 12 вересня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 57. *(Здобувач брала участь в аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку).*

14. **Козленко Т. Г.**, Недосеков В. В. Особливості клінічних проявів каліцивірусної інфекції котів в м. Києві. Епізоотологія, здоров'я та добробут тварин. Виклики сучасності: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 12 вересня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 68. *(Здобувач брала участь у клінічному обстеженні хворих котів, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку).*

15. **Козленко Т. Г.**, Мартинюк О. Г. Культуральні та імуногенні властивості каліцивірусу котів. Епізоотологія, здоров'я та добробут тварин. Виклики сучасності: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 12 вересня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 127. *(Здобувач брала участь у проведенні культуральних досліджень вірусу, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку).*

## АНОТАЦІЯ

**Козленко Т. Г. Каліцивіроз котів: поширення, діагностика та лікування.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2018.

Дисертацію присвячено вивченню поширення каліцивірусної інфекції котів у місті Києві, особливостям епізоотичного процесу каліцивірозу, імунобіологічним властивостям збудника захворювання, розробленні технології одержання специфічного імуноглобуліну проти каліцивірусу, удосконаленню схеми лікування котів, хворих на каліцивіроз.

У дисертації представлено результати проведення епізоотологічного аналізу каліцивірозу котів у м. Києві з 2012 по 2017 рр. Встановлено нозологічний профіль та показано частку каліцивірозу в заразній патології котів м. Києва, що становить 6,2 %. Проте серед хвороб інфекційного респіраторного синдрому у котів частка каліцивірозу становить 26,8 %, що підтверджує провідну роль каліцивірусної інфекції у тварин з ураженням очей (60 %), слизових ротової порожнини та язика (30 %), респіраторних органів (20 %). Підтверджено наявність як гострої (63,2 %), так і хронічної (36,8 %) форм інфекції.

Результати досліджень у полімеразній ланцюговій реакції свідчать, що частка хворих котів більша серед невакцинованих котів (29,6 %), а результати, отримані в імуноферментному аналізі, що позитивно реагували саме вакциновані тварини – 74,5 % за рахунок присутності поствакцинальних антитіл.

Результати дослідження імуногенних властивостей п'яти ізолятів показали, що ізоляти каліцивірусу не патогенні для лабораторних тварин (мурчаків), однак, проявляють імуногенні властивості на рівні  $5,3-6,6 \log_2$ , що дозволяє використовувати їх для розроблення діагностичних і лікувальних засобів. Розроблено спосіб одержання антигена каліцивірусу, що включає його очищення, концентрування, інактивацію. Розроблено ефективну схему імунізації кролів для отримання гіперімунної сироватки проти вірусу каліцивірозу котів. Підбрано оптимальну схему лікування котів за каліцивірозу та доведено доцільність використання протикаліцивірусного глобуліну у комплексній терапії, ефективність якої склала 88 %.

**Ключові слова:** каліцивіроз, епізоотологічний моніторинг, поширення, вірус, коти, збудник, сироватка, глобулін.

## АНОТАЦІЯ

**Козленко Т. Г. Калицивироз котов: распространение, диагностика и лечение.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена изучению распространения калицивирусной инфекции кошек в Киеве, особенностям эпизоотического процесса калицивироза, иммунобиологические свойства возбудителя заболевания, разработке способа получения специфического иммуноглобулина против калицивируса, совершенствованию схемы лечения кошек больных калицивирозом.

Изложены результаты мониторинговых исследований по изучению уровня распространения калицивироза кошек и особенностей его проявления в условиях города Киева за период 2012–2017 гг. Всего было клинически обследовано 2085 кошек, из которых у 174 животных был лабораторно обнаружен вирус калицивироза кошек.

По результатам исследований наиболее подвержены заболеванию беспородные кошки – 36,2 %, животные британской породы – 16,1 %, персидской – 7,5 %, а также российский сфинкс – 20,1 %.

Чаще всего болеют молодые животные в возрасте от 1 до 6 месяцев (48,8 %). Наименьшую долю больных калицивирозом составляют взрослые животные от 2 лет и старше (6,9 %). Течение инфекции во многом зависит от условий содержания животных. Остро, с большим процентом летальности, она протекает у котят 2–6-месячного возраста. У взрослых кошек, особенно при групповом их содержании, острое течение болезни часто переходит в латентное или хроническое.

Калицивироз в Киеве проявляется практически круглый год в виде энзоотий с весенними и осенними подъемами этой болезни. Наибольшее количество больных животных регистрировали в осенний период – 37 % и весной – 29 %.

Основным самым ранним клиническим признаком при остром течении болезни является серозный конъюнктивит (60 %) и ринит. При хроническом – катаральный трахеит и бронхит, а иногда и пневмония (20 % животных).

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

Была разработана рациональная схема гипериммунизации животных, включающая комбинированную схему, которая заключается во внутривенном введении антигена с интервалом между иммунизациями 7 суток, что обеспечивает стабильное получение высокоактивных сывороток крови кроликов против вируса калицивируса с активностью в реакции нейтрализации от  $6,0$  до  $9,5 \log_2$ , которые могут быть применены как с диагностической, так и лечебной целью.

Разработана технология выделения иммуноглобулинов класса G из полученных сывороток путем преципитации сернокислым аммонием и гелепроникающей хроматографией. Установлено, что удельная активность очищенных препаратов в два раза выше удельного веса иммуноглобулинов исходной сыворотки, имеет важное значение для совершенствования технологии получения иммуноглобулинов для производства диагностических и лечебных препаратов.

Представленные экспериментальные данные по изучению различных схем комплексного лечения калицивирусной инфекции кошек с применением препаратов Фоспренил, Тилозин и специфического глобулина против калицивируса. Доказано, что использование специфического глобулина в лечении кошек повышает эффективность терапии на 25 % по сравнению с использованием схемы, которая включала только антибиотик и иммуномодулятор.

**Ключевые слова:** калицивироз, эпизоотологический мониторинг, распространение, вирус, коты, возбудитель, сыворотка, глобулин.

## ANNOTATION

**Kozlenko T. G. Feline calicivirus: spreading, diagnostics and treatment.** – The Manuscript.

Dissertation for a candidate degree in veterinary sciences in specialty 16.00.03 «Veterinary microbiology, epizootology, infectious diseases and immunology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The dissertation is devoted to the study of the spreading infection of feline calicivirus in the city of Kiev. The peculiarities of the epizootic process and the immunobiological properties of caliciviruses have been established. A method for obtaining a specific immunoglobulin against calicivirus and improving the treatment scheme for cats with calicivirus disease has been developed.

The dissertation presents the results of epizootiological monitoring of feline calicivirus in Kyiv from 2012 to 2017. The nosological profile was established and the proportion of calicivirus in the infectious pathology of cats in the city of Kyiv was shown to be 6.2 %.

As a result of clinico-epizootiological and virological methods of research a widespread infection was determined (26.8 %) of calicivirus among cats in the city of Kyiv with individual and group maintenance. The presence of both acute and chronic forms of infection has been confirmed.

Five isolates of the causative agent of calicivirus from diseased animals have been indicated, their cultural and immunogenic properties have been studied: calicivirus is not pathogenic for laboratory (guinea pigs) animals. It was found that the injecting to laboratory animal's isolates of feline calicivirus caused them to produce antibodies in the titres of 5.3–6.6 log<sub>2</sub>.

The method of obtaining antigen of calacivirus, which includes its purification, concentration, inactivation is developed.

An effective scheme of rabbits' immunization has been developed to obtain a hyperimmune serum against feline calicivirus virus. Antigen was injected in combination subcutaneously.

Globulin fraction of proteins was isolated by absorbing sulfuric acid ammonia. The fraction of purified immunoglobulins G was obtained. The optimal scheme of treatment of feline calicivirus was developed and the expediency of use against calicivirus globulin in complex therapy was proved, efficiency of which was 88 %.

**Key words:** calicivirus, cats, epidemiological monitoring, immunogenicity, serum, antibodies, globulin.