

МІКРОБІОЛОГІЯ, ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 636.8.09:616.988:619

Поширення та діагностика ретровірусних інфекцій котів

Довгенко В.В.¹ , Чекалін І.Ю.¹, Наумчук В.С.²,

Савченко М.О.¹ , Царенко Т.М.¹ 

¹ Білоцерківський національний аграрний університет

² Волинська регіональна державна лабораторія Держпродспоживслужби



✉ Кореспондентний автор Довгенко В.В. dep.epizootology@btsau.edu.ua



Довгенко В.В., Чекалін І.Ю., Наумчук В.С., Савченко М.О., Царенко Т.М. Поширення та діагностика ретровірусних інфекцій котів. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2022. № 1. С. 43–53.

Dovgenko V., Chekalin I., Naumchuk V., Savchenyuk M., Tsarenko T. Prevalence and diagnosis of retroviral infections in cats. *Nauk. visn. vet. med.*, 2022. № 1. PP. 43–53.

Рукопис отримано: 01.04.2022 р.

Прийнято: 20.04.2022 р.

Затверджено до друку: 24.06.2022 р.

Doi: 10.33245/2310-4902-2022-173-1-43-53

Ретровіруси, вірус імунодефіциту та вірус лейкемії котів зумовлюють хвороби, які мають широкий спектр клінічних проявів і форм перебігу інфекцій. Ретроспективний аналіз даних за останні три роки у досліджуваних лікарнях показав, що інфікування котів ретровірусами становить 32,6 % для ВЛК та 13,6 % для ВІК від кількості досліджених тварин. Такі високі показники вказують на те, що у третини котів, яким встановлюють підозру на інфікування ретровірусними інфекціями, інфекційний статус підтверджується ІХА методом. Насамперед це тварини з групи ризику, які мають вільний вигул. Вчасне виявлення таких тварин спеціалістом ветеринарної медицини важливе для ефективного лікування та недопущення розповсюдження інфекції. Нами було проведено адаптацію алгоритму діагностики ретровірусних інфекцій котів до вітчизняних умов та розроблено практичні рекомендації лікарям ветеринарної медицини щодо ефективного вибору лабораторних методів діагностики ретровірусних інфекцій.

Встановлено, що у клініках первинне дослідження зразків цільної крові котів проводили за допомогою комерційних серологічних тест-систем VetExpert FIVAb+FeLVAg. Після отриманих результатів першого ступеня дослідження проводили апробацію протоколу вкладеної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Виділення ДНК проводили за допомогою набору IndiSpin Pathogen Kit. У дослідженні були використані ПЛР мікс OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer та специфічні олігонуклеотиди. У 100 % досліджуваних зразках крові було виявлено провірусне ДНК до відповідних збудників ВІК та ВЛК. У всіх тварин, яким на першому етапі діагностики поставили попередній діагноз інфікування ВІК та ВЛК, було виявлено провірусне ДНК і підтверджено діагноз на другому етапі діагностики. Використання методу вкладеної ПЛР значно збільшує чутливість і специфічність дослідження.

Перший етап діагностики дозволяє спеціалісту ветеринарної медицини визначити інфекційний статус тварини, на основі чого обрати стратегію лікування та недопущення передачі збудника. Другий етап діагностики дозволяє уточнити попередній діагноз і встановити форму перебігу інфекції. Наявність чіткого і зрозумілого алгоритму діагностики необхідно для ефективного контролю ВІК та ВЛК.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, PCR, вірусна лейкемія котів, FeLV, вірус імунодефіциту котів, FIV, молекулярна діагностика, алгоритми діагностики.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. У котів ретровіруси спричинюють вірусну лейкемію (ВЛК, FeLV) та вірус імунodefіциту (ВІК, FIV). Поширеність ВЛК та ВІК у світі є досить варіабельною та становить від 2,3 до 30,4 % для ВЛК та від 2,5 до 31,3 % для ВІК [1, 2].

Відповідно до таксономічної класифікації збудники вірусної лейкемії та вірус імунodefіциту котів належать до родини *Retroviridae*, підродини *Orthoretrovirinae*, роду *Gammaretrovirus*, *Lentivirus* [3, 4]. Як і всі представники родини *Retroviridae*, котячі ретровіруси характеризуються своєрідною реплікацією. РНК-геном позаклітинного ретровірусу спочатку копіюється в ДНК за допомогою зворотної транскриптази, а потім інтегрується в ядерну ДНК клітини-господаря. Інтеграція є дуже стабільною, отже, інфікування клітин статевої лінії може призвести до вертикальної передачі ретровірусів від батьків до потомства. Такі ретровіруси називають ендегенними. Характерною особливістю ретровірусів є наявність провірусу, тобто наявність ДНК копії геному РНК, який вбудований у геном клітини-господаря [4, 5]. Завдяки молекулярним дослідженням на сьогодні відомо такі види вірусної лейкемії котів (ВЛК) як абортивна інфекція, регресивна інфекція, прогресивна інфекція та вогнищева або локалізована. Клінічний прояв будь-якого типу інфекції може бути різноманітним, і проявлятися у початкових стадіях захворювання, залежно від інфекційного навантаження та імунного стану організму інфікованої тварини [6].

Геном ВЛК містить три гени, що кодуєть структурні білки вірусу: ген специфічного антигену (*gag*), включаючи *p27*; ген полімерази (*pol*), що кодує зворотну транскриптазу, протеазу та інтегразу; оболонковий ген (*env*), що кодує глікопротеїн *gp70* і трансмембранний білок *p15E* [7, 8]. Вірусний антиген *P 27* є цільовим у доступних комерційних наборах для лабораторної діагностики ВЛК.

Вірусний імунodefіцит котів (ВІК) здебільшого інфікує CD4+ Т-лімфоцитів. Передача вірусу відбувається переважно через слину, під час укусів інфікованими тваринами сприятливих тварин. Високий рівень інфікування спостерігається у котів, які мають вільний вихід на вулицю, також у котів що можуть проявляти агресію щодо інших представників виду, це зазвичай самці, оскільки у них часто відбувається розподіл територій, водночас високий ризик ураження може бути у котів які живуть скупчено на невеликих територія, на-

приклад у притулках [9]. Діагностика ретровірусних інфекцій котів є досить складною та передбачає кілька ступенів досліджень. Для діагностики потрібно застосовувати комплексний метод, який передбачає клінічну та лабораторну діагностику [10]. Лабораторна діагностика ретровірусних інфекцій має включати: на першому етапі дослідження виявлення антигену ВЛК та антитіл до ВІК методом ІХА, на другому етапі проведення молекулярно-генетичних досліджень на виявлення ДНК провірусу або іншим лабораторним методом. Первинна діагностика, яка передбачає лише ІХА дослідження цільної крові, сироватки або плазми вважається недостатньою. Багато тварин можуть бути прихованими носіями ретровірусних інфекцій і виділяти збудник у навколишнє середовище без видимих клінічних ознак. ІХА діагностика, яка побудована на виявленні антитіл до ВІК, не завжди може показати позитивного результату на ранній стадії захворювання тварини. Для розвитку антигенемії, після інфікування ВЛК, має пройти 30 діб, для появи антитіл до ВІК – 60 діб з моменту можливого зараження. Також можливі хибнонегативні результати ІХА за появи мутацій у штамів ВІК або за неправильного виконання тесту. Тому для постановки достовірного діагнозу обов'язковим є проведення другого етапу діагностики, наприклад постановка полімеразної ланцюгової реакції, яка спрямована на виявлення провірусної ДНК у організмі тварини. Це дозволяє виявити інфекцію навіть на ранніх стадіях захворювання і має важливе значення у постановці остаточного діагнозу [11, 12].

Метою роботи було оцінити поширення ретровірусних інфекцій котів на основі аналізу даних ветеринарних клінік, апробувати діагностику вірусної лейкемії та імунodefіциту котів методом вкладеної полімеразної ланцюгової реакції та проаналізувати протоколи діагностики цих хвороб.

Матеріал та методи досліджень. *Ретроспективний аналіз.* Проводили ретроспективний аналіз даних трьох лікарень Київського регіону щодо діагностики і лікування хворих на вірусну лейкемію та імунodefіцит котів. Були досліджені дані навчально-наукової виробничої міжкафедральної ветеринарної клініки коней, жуйних, свиней, дрібних та екзотичних тварин м. Біла Церква, приватної клініки «Доктор Вет» м. Біла Церква та приватної клініки м. Київ. Було вивчено форми реєстрації пацієнтів, записи про клінічні ознаки, лабораторні дослідження та результати лікування хворих тварин з діагнозом ВЛК і ВІК.

У цих клініках діагноз інфікування ВІК та ВЛК ставили на основі епідеміологічних та клінічних даних і позитивного ІХА тесту. Другий етап діагностики не проводили.

Відбір проб і тестування відбувалось згідно з інструкцією до ІХА набору.

Загалом опрацьовано дані 489 котів, яким було проведено тестування на ВІК та/або ВЛК методом ІХА. Записи пацієнтів, яким ІХА дослідження не проводили, в ретроспективному аналізі не використовували.

Імунохроматографічне дослідження. Комерційна тест-система VetExpert FIVAb+FeLVAg (VetExpert, Польща) призначена для виявлення антитіл до вірусу імунодефіциту котів (FIV Ab) та антигенів вірусної лейкемії котів (FeLV Ag) імунохроматографічним (ІХА) способом в цілісній крові, сироватці або плазмі крові хворої тварини. ІХА прямим сандвіч-методом, заснованим на імунній реакції зв'язування між собою антигенів (Ag) та антитіл (Ab).

Апробація протоколу ПЛР. Для апробації протоколу ПЛР протягом 2021 року було проведено збір зразків для дослідження на вірусну лейкемію та імунодефіцит. Матеріали відбирали у тварин, які надходили на лікування до навчально-науково-виробничої міжкафедральної ветеринарної клініки коней, жуйних, свиней, дрібних та екзотичних тварин, а також безпритульних котів, що надходили до лікарні в межах волонтерської програми.

Відбір проб цільної крові та проведення швидкого ІХА тесту на ВЛК і ВІК виконували на базі навчально-науково-виробничої міжкафедральної ветеринарної клініки коней, жуйних, свиней, дрібних та екзотичних тварин. Попередній діагноз на ВЛК та ВІК встановили на основі анамнезу, клінічних ознак та підтверджений ІХА тестами.

Після підтвердження діагнозу за швидкими ІХА тестами проводили відбір матеріалу для ПЛР дослідження цільної крові. Зразки крові від позитивних на ВЛК та ВІК котів були досліджені молекулярно-генетичним методом за допомогою вкладеної полімеразної ланцюгової реакції з метою виявлення провірусної ДНК.

Полімеразна ланцюгова реакція. Дослідження проводили в декілька етапів:

Відбір проб цільної крові, для цього використовували одноразові стерильні шприци, кров брали із вени, з подальшим переміщенням крові у стерильні пробірки типу Епендорф, з додаванням 4–5 крапель 10 % розчину ЕДТА як антикоагулянта.

Виділення ДНК, проводили за допомогою набору IndiSpin Pathogen Kit (Indical Bioscience, Німеччина), що призначений для виділення

нуклеїнових кислот колоночним методом та є адаптованим для виділення провірусної ДНК з крові. Принцип методу полягає у черговому виконанні етапів ізоляції нуклеїнових кислот, лізисі клітин, абсорбції нуклеїнових кислот з розчину на кремнеземну мембрану колонки, вимивання абсорбованих нуклеїнових кислот буферними розчинами від інгібуючих речовин та на заключному етапі – елюція розчинених нуклеїнових кислот з мембрани у буферний розчин, який використовують в подальшому для внесення у реакційну суміш для виконання ПЛР.

Третім етапом є постановка вкладеної полімеразної ланцюгової реакції, відповідно до протоколу, що побудовано на використанні ПЛР-міксу, з матрицею досліджуваного ДНК та двох олігонуклеотидних праймерів. У дослідженні були використані дві пари праймерів для вкладеної ПЛР, запропоновані Novo S. G. et al. (2016), синтезовані Metabion (Германія), інформація про олігонуклеотиди надана в таблиці 1.

Вкладена полімеразна ланцюгова реакція (Nested PCR) є модифікацією класичної полімеразної ланцюгової реакції. Протокол реакції включає два набори праймерів, зовнішній та внутрішній, що використовують у двох послідовних ампліфікаціях. Зовнішню пару праймерів використовують для пошуку специфічних ділянок ДНК в матеріалі відібраному від тварини. Другий набір праймерів призначений для виявлення вторинної цільової ділянки в продукті першої ампліфікації. Він не взаємодіє з неспецифічним ампліконом, що міг утворитися на першому етапі реакції.

Такий підхід дозволяє значно підвищити чутливість реакції, що є важливим для детекції провірусної ДНК ретровірусів, якої у досліджуваних пробах може бути мало порівняно з геномною ДНК.

Ампліфікацію проводили за допомогою ампліфікатора GeneAmp PCR 2400 (Applied Biosystems, США).

Реакційну суміш готували у стерильних пластикових пробірках об'ємом 0, 2 мл. Реакційна суміш об'ємом 25 мкл складається з 12 мкл ПЛР майстер-міксу M0486S OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB, Велика Британія), який містить розчинені у ПЛР-буфері нуклеотиди, OneTaq-полімераза та барвник зеленого кольору для контролю внесення у гель, до міксу додавали 1 мкл кожного з праймерів, 6 мкл деіонізованої води та 5 мкл розчину ДНК або амплікону першого етапу реакції.

Температурно-часові режими реакції наведені в таблиці 2.

Таблиця 1 – Праймери для фланкування специфічних ділянок ДНК Novo S. G. et al. (2016)

Праймери	Forward	Reverse	Температура плавлення (T _m)	Довжина фрагменту (bp)
Зовнішній (ВІК)	5' GGCATATCCTATTCAAAGA G 3'	5' AAGAGTTGCATTTTATA TCC 3'	50	n/a
Внутрішній (ВІК)	5' CTGCTTGTGTTCTTGAGTT 3'	5' AAGAGTTGCATTTTATA TCC 3'	50	338 п. н.
Зовнішній (ВЛК)	5' AAAATTTAGCCAGCTACTG CAG 3'	5' GAAGGTCGAACTCTGGT CAACT 3'	55	n/a
Внутрішній (ВЛК)	5' TТАСТСАAGTATGTTCCCAТ G 3'	5' CTGGGGAGCCTGGAGAC TGCT 3'	57	166 п. н.

Таблиця 2 – Температурно-часові режими реакції

Праймери	Активация полімерази	Ампліфікація – 40 циклів			Фінальна елонгація
		денатурація	відпал	елонгація	
Зовнішній (ВІК)	94 °C – 1 хв	94 ° – 30 с	52 °C – 30 с	68 °C – 60 с	68 °C – 5 хв
Внутрішній (ВІК)			52 °C – 30 с		
Зовнішній (ВЛК)			55 °C – 30 с		
Внутрішній (ВЛК)			57 °C – 30 с		

Режими ампліфікації розраховували за рекомендаціями виробника майстер-міксу та результати розрахунків температури відпалу – за допомогою доступного на сайті виробника T_m-калькулятора. Кількість циклів була обрана на верхній межі рекомендованої кількості.

Наступним етапом було проведення детекції продуктів ампліфікації, для чого готували агаровий 2 % гель на ТБЕ буфері з додаванням етидію броміду у кількості 50 мкл на 100 мл гелю. Приготований гель заливали у форму камери та вставляли 2 гребені для формування рядів лунок.

У першу та останню лунки вносили маркер молекулярної маси від 100 до 1200 пар нуклеотидів з кроком у 100 пар нуклеотидів, а в лунки між ними вносили продукт ампліфікації другого етапу ПЛР реакції і в одну лунку – негативний контроль, який не містив випробувальної ДНК для контролю контамінації реактивів. Надалі провели електрофорез протягом 40 хв з рекомендованими показниками сили струму.

Останнім етапом було проведення зчитування результатів, для цього використовували транслюмінатор на ультрафіолетовому випромінюванні. Позитивним результатом досліджень вважалось наявність бенду відповідного розміру напроти з лункою, і відсутність напроти лунки з негативним контролем. Негативним результатом вважалось відсутність бенда від-

повідного розміру напроти лунки з досліджуваним зразком.

Розробка алгоритму діагностики. Методом аналізу та синтезу була опрацьована інформація отримана в результаті ретроспективного аналізу, апробації протоколу ПЛР та аналіз рекомендацій Американської асоціації лікарів фелінологів (AAFP) і Ради консультантів хвороб котів (ABCD). На основі цих даних нами були запропоновані алгоритми діагностики ВІК та ВЛК, оптимізовані для умов України.

Результати дослідження. За результатами проведеного дослідження виявлено, що тварини які надходили до ветеринарних лікарень з підозрою на вірусну лейкемію котів були у стані прогресивної інфекції. Інфікування вірусом імунодефіциту котів переважало у тварин без виражених специфічних клінічних проявів. Більшість тварин перебували у стані прихованої інфекції. У процесі досліджень було встановлено, що швидкі ІХА тести на виявлення антигену до ВЛК та антитіл до ВІК можна використовувати за діагностики ретровірусних інфекцій, однак потребують підтвердження проведенням додаткових лабораторних досліджень, зокрема ПЛР-діагностики на наявність провірусів збудників інфекції та встановлення статусу тварин за цими хворобами.

У процесі проведеного ретроспективного аналізу (на базі трьох клінік), були опрацьовані дані записів журналів прийому за 3 роки.

Встановлено, що із 489 досліджених методом ІХА тварин, які надійшли до лікарень ветеринарної медицини виявлено 197–40,3 % (40,6; 41; 38 %) котів, уражених ретровірусними інфекціями. Зокрема 137–28 % (22,4; 22,8; 33,1 %) кішок уражені вірусною лей-

кемією котів та 60–12,3 % (7,5; 18,6; 15,2 %) уражені вірусним імунодефіцитом котів (табл. 3).

Здебільшого хворіють тварини віком від 2 до 11 років та переважно уражуються коти, а не кішки (рис. 1).

Таблиця 3 – Розподіл тварин з позитивним статусом на ВІК та ВЛК

Джерело даних	Загалом досліджених котів	Загалом з підтвердженими ретровірусами	FeLV	FeLV %	FIV	FIV %
Приватна клініка м. Київ	254	103	84	33,1	19	7,5
Приватна клініка «Доктор Вет»	156	64	35	22,4	29	18,6
Клініка БНАУ	79	30	18	22,8	12	15,2
Загалом по всіх клініках	489	197	137	28,0	60	12,3

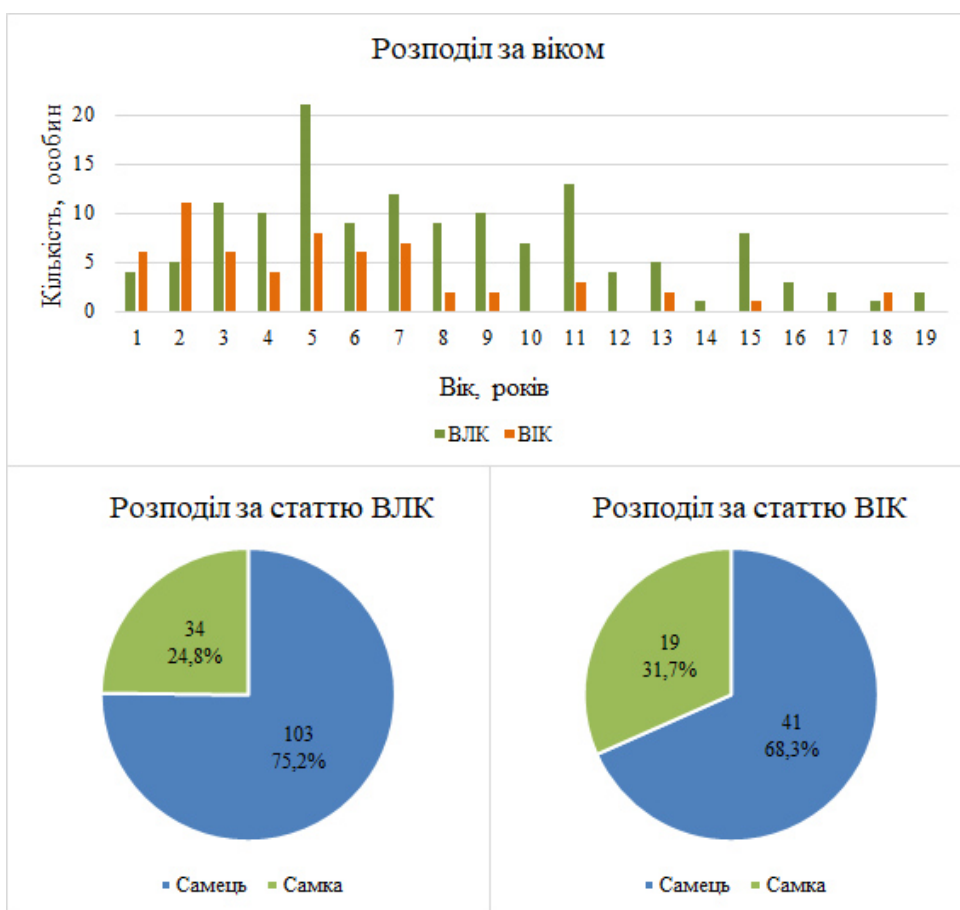


Рис. 1. Розподіл хворих тварин за категоріями вік та стать:

- A. Розподіл за віком: зелений – ВЛК, синій – ВІК.
- B. Розподіл за статтю хворих ВІК.
- C. Розподіл за статтю хворих ВЛК. Синій – самці, помаранчевий – самиці.

Відповідно до вдосконаленого нами алгоритму, за результатами полімеразної ланцюгової реакції можна остаточно підтвердити діагноз на ВЛК та ВІК. За результатами полімеразної ланцюгової реакції було виявлено, що всі 100 % проб цільної крові виявилися позитивними хоча б до одного з досліджуваних збудників. Про це свідчить наявність специфічної смуги на рівні 166 п.н. для ВЛК та 338 п.н. для ВІК [20].

Виявлено специфічні фрагменти ДНК провірусу ВЛК (а) довжиною 166 п.н. та провірусу ВІК (б) довжиною 338 п.н.

Нами був проведений аналіз алгоритмів діагностики ВЛК та ВІК Американської асоціації лікарів фелінологів (AAFP) та Ради консультантів хвороб котів (ABCD). На основі цих даних був оптимізований та розроблений алгоритм діагностики ВЛК та ВІК, який ми рекомендуємо для використання в клініках ветеринарної медицини в Україні (рис. 3).

ВЛК може перебігати у прогресивній, регресивній, абортивній та локальній формах інфекції, тому діагностика має бути багатоступеневою [13].

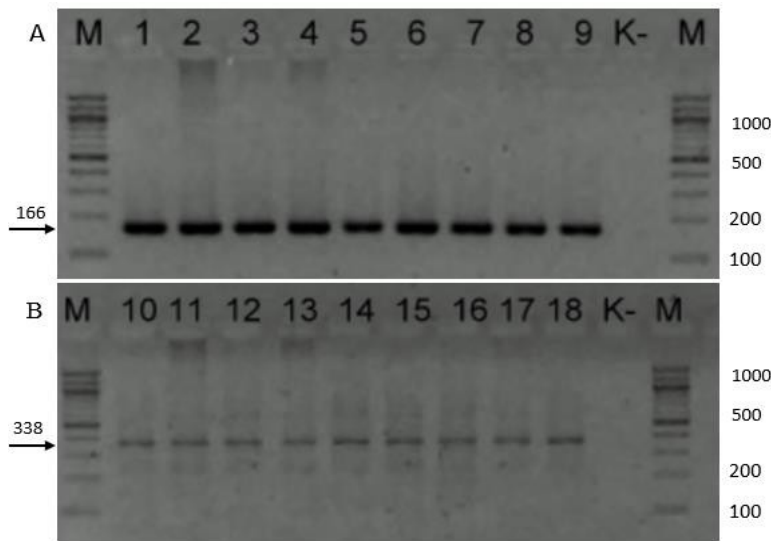


Рис. 2. Результати обліку ПЛР-реакції.

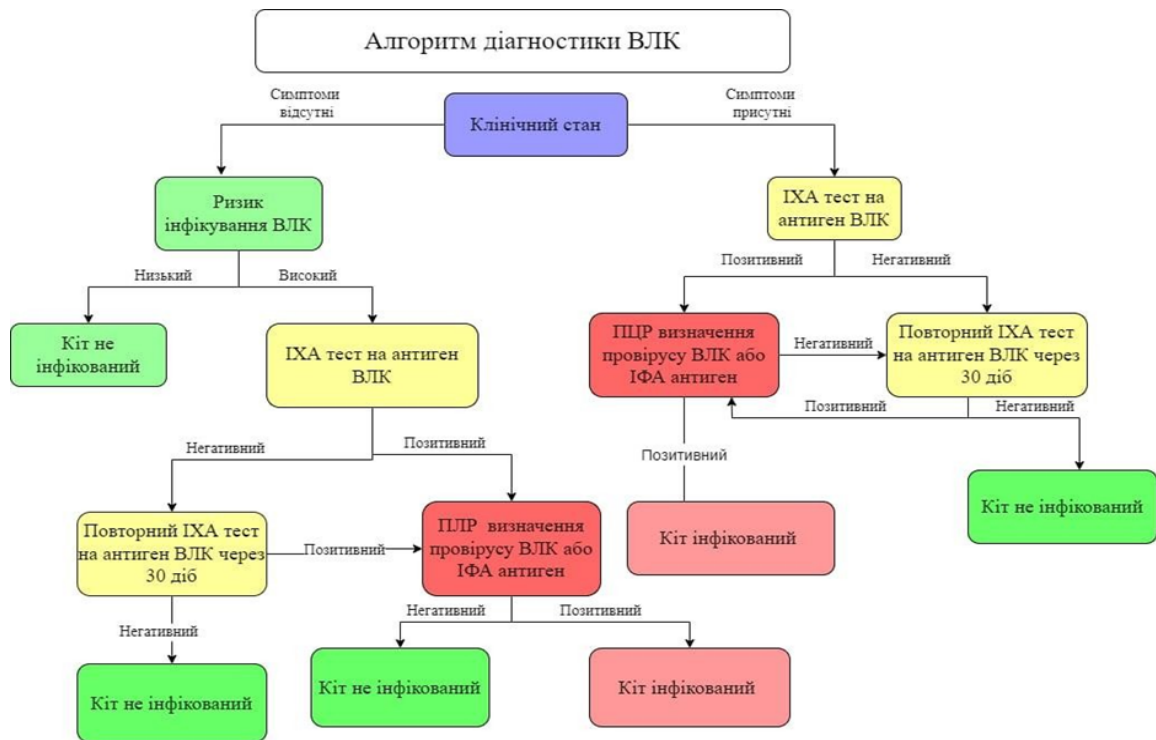


Рис. 3. Оптимізований алгоритм діагностики ВЛК.

У кішок, що знаходяться у стані прогресивної інфекції, уражується кістковий мозок та розвивається вторинна віремія, що характеризується стійкою антигенемією та відсутністю ефективної специфічної імунної відповіді. При цьому проведення ІХА тесту може не дати позитивного результату, тому для визначення котів у прогресивній стадії хвороби необхідне повторне тестування на антиген через 30 діб. Альтернативою може стати виявлення провірусної ДНК у цільній крові, сироватці або плазмі. За регресивної інфекції ВЛК у кішок частково розвинений противірусний імунітет, у цій стадії у котів не уражується кістковий мозок (первинна віремія). Результати ІХА тесту можуть бути негативними, оскільки у стані регресивної інфекції відбувається зниження кількості циркулюючого антигену протягом 1–12 тижнів, і через проміжок часу, коли хвороба проходить у стан прогресуючої інфекції, тварини можуть стати позитивними. При цьому дослідження на провірусну ДНК будуть позитивними, оскільки провірус виявлятимуть у інфікованих лімфоцитах, рідше моноцитах [9, 14].

За абортивної інфекції у котів збудник знищується імунітетом до початку інтеграції в генетичний матеріал господаря. Усі прямі методи виявлення ВЛК будуть неефективними (ІХА тест на антиген, ПЛР на визначення провірусу, ІФА антиген). За цієї інфекції єдиним методом діагностики є виявлення антитіл до ВЛК, це буде свідчити лише про те, що імунна система kota взаємодіяла з інфекційним агентом, інфекційний статус kota на ВЛК при цьому буде негативний [9, 13, 15].

За вогнищевої або локалізованої інфекції антиген може бути наявний у крові, однак виявити провірусну ДНК досить складно. Можливе мінімальне виявлення інфікованих клітин з інтеграцією провірусу (54–56 доба), вірус утримується в певних тканинах (селезінці, печінці, лімфатичних вузлах, тонкому кишечнику, сечовивідних шляхах або молочній залозі), це зумовлено механізмами формування імунної пам'яті [9, 14].

Для визначення регресивної чи прогресуючої інфекції, у котів які спочатку давали позитивний результат необхідно проводити повторні експрес-тести на антиген (регресивно інфіковані кішки зрештою будуть тестувати антиген-негативний (оскільки у котів у стані регресивної інфекції кількість циркулюючого антигену зменшується, і вони будуть негативно реагувати за ІХА тестами, тимчасом прогресивно інфіковані кішки продовжуватимуть тести на антиген-позитивні). З огляду на те, що зазвичай неможливо встановити на якій стадії

знаходиться кішка, інфікована FeLV, визначення провірусного та плазмового навантаження вірусної РНК може бути недостатнім для того щоб встановити, чи є у кішки прогресуюча чи регресивна інфекція. Тому для чіткого визначення перебігу інфекції рекомендується повторне тестування через 1–2 місяці [13].

Найчастіше ВІК виявляється наявністю специфічних антитіл за допомогою швидких ІХА тестів, оскільки інфекція характеризується виробленням значної кількості антитіл. Будь-який результат тесту, як позитивний так і негативний, потребує додаткового підтвердження. Особливо якщо ризик інфікування низький за позитивного результату ІХА тесту і високий за негативного результату тесту. ВІК перебігає у вигляді персистуючої інфекції, та є невиліковним [13].

Другий ступінь діагностики проводять для оцінки інфекційного статусу. За отримання негативного ІХА тесту, проводять ПЛР діагностику на визначення провірусної ДНК. Коти можуть знаходитися на ранньому етапі інфікування і кількість антитіл може бути зниженою.

За негативного ІХА тесту, однак за наявності симптомів подібних із гострою фазою захворювання (лихоманка, анорексія, лімфаденопатія), кішка може знаходитись у термінальній стадії захворювання, за якої в організмі наявна значна концентрація вірусу, який зв'язує антитіла в комплекс антиген-антитіло. Доцільним було б направити кішку на РТ-ПЦР для виявлення РНК вірусу, оскільки провірусна ДНК може ще не виявитися на цій стадії [16].

Обговорення. У процесі проведення ретроспективного аналізу нами було встановлено, що на території м. Біла Церква та м. Київ частка ретровірусних інфекцій в структурі інфекційних хвороб становить 28 % для ВЛК та 12,3 % для ВІК. Це досить значна частка ураження. Як повідомляють інші автори, поширеність ВЛК значно варіює у різних географічних областях та становить у межах від 2,3 до 28,4 %, а ВІК – від 0,9 до 31,3 % в загальній структурі інфекційних захворювань або досліджених хворих тварин [2, 16]. Згідно з нашими даними, на території м. Біла Церква та м. Київ виявлено більшу кількість інфікованих котів ВЛК ніж ВІК.

Відповідно до наших досліджень, ВЛК та ВІК проявляється у тварин у віці від 2 до 11 років. З огляду на дослідження інших науковців можна зробити висновок, що симптоми проявляються в такому віці через те що інфекція довготривало знаходиться в організмі тварини і клінічні ознаки проявляються в той період, коли інфекція переходить з латентної фази у

прогресуючу під впливом несприятливих чинників. На ВЛК та ВІК більше хворіють самці ніж самки, це може бути пов'язано з тим, що самці більше часу проводять на вулиці, отже можливий контакт з інфікованими котами, а також більш схильні до сутічок з іншими представниками виду, що збільшує ризики проникнення збудника через біологічні бар'єри в результаті травм [1].

Поширення ретровірусних інфекцій є наслідком значної кількості безпритульних тварин, або тварин які мають вільний вихід на вулицю. Ще однією причиною є недостатній рівень пропаганди вакцинації від ВЛК. У процесі ретроспективного дослідження ми не виявили тварин в анамнезі, яким було вказане щеплення вакциною від лейкемії котів, хоча на ринку України є доступна рекомбінована вакцина від лейкемії котів Пюревакс ВЛК (Purevax FeLV), яку застосовують для імунізації дорослих тварин, також кошенята які народжені від щеплених самок отримують колостральний імунітет [11]. З аналізу літературних даних бачимо зменшення поширеності ВЛК та ВІК в США та Європі. Це результат активних тестувань котів на ВЛК та ВІК, а також проведення активних щеплень від ВЛК, що значно знижує відсоток захворюваності [17]. На нашу думку потрібно збільшити заходи щодо пропаганди використання цієї вакцини. Згідно з інструкцією, її вводять у ті самі часові проміжки що і базові вакцини, це не потребує додаткових відвідувань лікарні.

Із даних, отриманих у процесі ретроспективного аналізу записів в клініках недостатньо щоб зробити повноцінне епізоотологічне дослідження. Діагностика ретровірусних інфекцій спеціалістами на місцях за допомогою ІХА не передбачає проведення другого етапу дослідження, тобто частина діагнозів можуть бути хибними. Тестування проводили у тварин з групи ризику або за виявлення відповідного сиптомокомплексу. Це обмежує розуміння рівня інфікування ретровірусними інфекціями серед всієї популяції тварин.

Виявлення провірусу ДНК за допомогою ПЛР з цільної крові, сироватки або плазми більш чутливий метод, ніж виявлення вільного антигену ВЛК у інфікованих кішок експрес-методом. ПЛР на визначення провірусного ДНК виявляє всіх носіїв провірусу ВЛК, що включає прогресуюче та регресивно інфікованих котів. Однак не у всіх носіїв провірусу виявляють антиген *p27*, що є цільовим для комерційних серологічних наборів, результати досліджень в цьому випадку будуть хибно негативні. Регресивно інфіковані коти зазвичай є провірус-по-

зитивними та антиген-негативними до FeLV – винятком є будь-яка початкова антигенемічна фаза або у разі реактивації. Як позитивний так і негативний результат експрес-тесту слід обов'язково підтверджувати ПЛР виявленням провірусної ДНК, особливо якщо є ризик інфікування [18–20].

Проведення ПЛР дослідження за ВІК є досить результативним, оскільки виявляє наявність провірусу в організмі і дозволяє визначити інфікування на ранній стадії, до вироблення антитіл у кількості, які може охопити експрес-тест. ВІК довготривало персистує в організмі тварини і вона є джерелом збудника інфекції, а ПЛР дослідження дозволяє виявити інфекцію на ранніх стадіях хвороби для подальшої ізоляції тварини. Ефективних методів профілактики на сьогодні не розроблено, єдине що можливо зробити це мінімізувати контакт інфікованої тварини з тваринами, які є сприятливими до захворювання.

Згідно з наявними рекомендаціями щодо практичних підходів до діагностики ретровірусних інфекцій котів від Американської асоціації ветеринарних лікарів фелінологів (AAFP) та Ради консультантів хвороб котів (ABCD), своєчасне виявлення та ізоляція хворих тварин є умовою для контролю розповсюдження інфекції [9, 14]. Ми оптимізували для нашого регіону та запропонували власний алгоритм діагностики ВЛК та ВІК. На відміну від проаналізованих алгоритмів пропонуємо проводити повторні дослідження на ВЛК та ВІК у разі негативного результату після другого етапу діагностики, для остаточного встановлення інфекційного статусу kota. Американська асоціація лікарів фелінологів, після другого етапу діагностики якщо результати ПЦР або ІФА негативні, залишають статус інфікованого kota невідомим. Ми вважаємо, що повторне дослідження ІХА методом або ПЦР дослідження через 30 діб для ВЛК та 60 для ВІК потрібне для визначення інфекційного статусу kota, що може суттєво вплинути на лікування.

Діагностика інфекційного статусу котів щодо ретровірусів нетривіальне завдання для спеціаліста ветеринарної медицини. Патогенетичний вплив вірусів на клітини імунної системи, РНК-місткість вірусів, мала кількість цільових білків для діагностичних тестів та мінливість клінічних проявів призводять до збільшення ризику постановки хибного діагнозу. Щоб зменшити ці ризики потрібно використовувати комбінації різних методів лабораторних досліджень. На наш погляд найефективнішою стратегією постановки діагнозу є поєднання якісної процедури реєстрації

та збору анамнезу, серологічних та молекулярно-генетичних методів. Використання двоетапного алгоритму діагностики ретровірусних інфекцій котів наділяє спеціаліста ветеринарної медицини широким спектром інструментів щоб працювати індивідуально з твариною або забезпечити здоров'я популяції.

Висновки. Результати ретроспективного аналізу записів про пацієнтів трьох клінік показали, що ретровірусні інфекції в структурі інфекційних хвороб котів становлять частку 40,3 % (28,0 % – ВЛК та 12,3 % – ВІК).

Проведено апробацію другого етапу діагностики ретровірусних інфекцій котів методом вкладеної полімеразної ланцюгової реакції. У 18-ти котів, які на першому етапі діагностики визначені ВЛК- та ВІК-позитивні, було знайдено провірусну ДНК.

Проаналізовано та адаптовано для нашого регіону алгоритми діагностики ВЛК та ВІК. Для успішної лабораторної діагностики ретровірусних інфекцій котів потрібно комбіновати методи досліджень. Згідно із нашим доопрацюванням, після проведення всього алгоритму діагностики власник матиме чітко визначений імунний статус.

Надалі необхідне збільшення пропаганди діагностики та профілактики ретровірусних інфекцій (зокрема вакцинації від ВЛК) в Київському регіоні.

Відомості про дотримання біоетичних норм. Визначення статеві охоти, осіменіння, вагітності, відбір вагінальних мазків проводили неінвазивними методами із дотриманням біоетичних вимог щодо ставлення до тварин і відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006) та Європейської конвенції «Про захист тварин» (1987).

Відомості про конфлікт інтересів. Автори статті стверджують про відсутність конфлікту інтересів. Наведені результати наукових досліджень можуть бути опубліковані.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ludwick K., Clymer J. W. Comparative meta-analysis of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus seroprevalence correlated with GDP per capita around the globe. *Research in Veterinary Science*. 2019. Vol. 125. P. 89–93. DOI:10.1016/j.rvsc.2019.05.013
2. Demkin V. V., Kazakov A. A. Prevalence of hemotropic mycoplasmas and coinfection with feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats in the Moscow region, Russia. *Preventive Veterinary Medicine*. 2021. Vol. 190. 105339 p. DOI:10.1016/j.prevetmed.2021.105339
3. Muz D. The molecular and serological investigation of Feline immunodeficiency virus and Feline leukemia virus in stray cats of Western Turkey. 2021. 9 p.

4. Інфекційні хвороби котів/ О.Є. Галатюк та ін. Житомир, 2016. 132 с. URL: dspace.pdaa.edu.ua:8080/xmlui/handle/123456789/3035

5. Clinical and Molecular Features of Feline Foamy Virus and Feline Leukemia Virus Co-Infection in Naturally-Infected Cats /L. T. F. Cavalcante et al. 2018. 22 p. DOI:10.3390/v10120702

6. Clinical and Hematological Follow-Up of Long-Term Oral Therapy with Type-I Interferon in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus or Feline Immunodeficiency Virus/ E. Gomez-Lucia et al. *Animals*. 2020. Vol. 10, no. 9. 1464 p. DOI:10.3390/ani10091464

7. Зоська П. Б., Лаврінченко І. В. Діагностика та профілактика вірусу імунодефіциту котів (FIV). Збірник матеріалів IV Всеукраїнської науково-практичної Інтернет-конференції «Сучасні аспекти лікування і профілактики хвороб тварин» (20–21 жовтня 2021 року). Полтава, 2021. С. 181–182.

8. Evaluation of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for feline leukemia virus p27 antigen and comparison to proviral DNA loads by real-time polymerase chain reaction/ M. J. Beall et al. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2019. Vol. 67. 101348 p. DOI:10.1016/j.cimid.2019.101348

9. Hofmann-Lehmann R., Hartmann K. Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2020. Vol. 22, no. 9. P. 831–846. DOI:10.1177/1098612X20941785

10. Tompkins M. B., Tompkins W. A. Lentivirus-induced immune dysregulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008. Vol. 123. no. 1–2. P. 45–55. DOI:10.1016/j.vetimm.2008.01.011

11. 2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines/ S. Little et al. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2020. Vol. 22, no. 1. P. 5–30. DOI:10.1177/1098612X19895940

12. Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus/ D.D. Addie et al. *Veterinary Record*. 2000. Vol. 146, no. 15. P. 419–424. DOI:10.1136/vr.146.15.419

13. Hartmann K., Hofmann-Lehmann R. What's New in Feline Leukemia Virus Infection. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2020. Vol. 50, no. 5. P. 1013–1036. DOI:10.1016/j.cvsm.2020.05.006

14. Lloret A. The Process of Evidence-Based Medicine. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2009. Vol. 11, no. 7. P. 529–529. DOI:10.1016/j.jfms.2009.05.001

15. Flynn J. N., Hanlon L., Jarrett O. Feline leukaemia virus: protective immunity is mediated by virus-specific cytotoxic T lymphocytes. 2000. 6 p.

16. Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats with abscesses or bite wounds and rate of veterinarian compliance with current guidelines for retrovirus testing / C. E. Goldkamp et al. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2008. Vol. 232, no. 8. P. 1152–1158. DOI:10.2460/javma.232.8.1152

17. Vaccination against the feline leukaemia virus: Outcome and response categories and long-term follow-up/ R. Hofmann-Lehmann et al. 2007. 9 p. DOI:10.1016/j.vaccine.2006.12.022

18. Rapid and sensitive insulated isothermal PCR for point-of-need feline leukaemia virus detection / R.P. Wilkes et al. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2017. 8 p. DOI:10.1177/1098612X17712847

19. Chiu E., Hoover E., VandeWoude S. A Retrospective Examination of Feline Leukemia Subgroup Characterization: Viral Interference Assays to Deep Sequencing. *Viruses*. 2018. Vol. 10, no. 1. 29 p. DOI:10.3390/v10010029

20. Viral diagnostic criteria for Feline immunodeficiency virus and Feline leukemia virus infections in domestic cats from Buenos Aires, Argentina/ S. Galdo Novo et al. *Revista Argentina de Microbiología*. 2016. Vol. 48, no. 4. P. 293–297. DOI:10.1016/j.ram.2016.07.003

REFERENCES

1. Ludwick, K., Clymer, J. W. (2019). Comparative meta-analysis of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus seroprevalence correlated with GDP per capita around the globe. *Research in Veterinary Science*. Vol. 125, pp. 89–93. (in England) DOI:10.1016/j.rvsc.2019.05.013

2. Demkin, V. V., Kazakov, A. A. (2021). Prevalence of hemotropic mycoplasmas and coinfection with feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats in the Moscow region, Russia. *Preventive Veterinary Medicine*. Vol. 190, 105339 p. (in England) DOI:10.1016/j.prevetmed.2021.105339

3. Muz, D. (2021). The molecular and serological investigation of Feline immunodeficiency virus and Feline leukemia virus in stray cats of Western Turkey. 9 p. (in England)

4. Galatyuk, O. E., Peredera, O. O., Lavrinenko, I. V. (2016). *Infekcijni hovorobi kotiv [Infectious diseases of cats]*. Zhytomyr: Polissia, 132 p. (in Ukraine). Available at: dspace.pdaa.edu.ua:8080/xmlui/handle/123456789/3035

5. Cavalcante, L. T. F., Muniz, P. P., Jia, H. (2018). Clinical and Molecular Features of Feline Foamy Virus and Feline Leukemia Virus Co-Infection in Naturally-Infected Cats. 22 p. (in England) DOI:10.3390/v10120702

6. Gomez-Lucia, E., Collado, V. M., Miró, G. (2020). Clinical and Hematological Follow-Up of Long-Term Oral Therapy with Type-I Interferon in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus or Feline Immunodeficiency Virus. *Animals*. Vol. 10, no. 9, 1464 p. (in England) DOI:10.3390/ani10091464

7. Diahnostyka ta profilaktyka virusu imunodefitytu kotiv (FIV) [Diagnosis and prevention of feline immunodeficiency virus (FIV)]. *Zbirnyk materialiv IV Vseukrainskoi naukovo-praktychnoi Internet-konferentsii «Suchasni aspekty likuvannia i profilaktyky khvorob tvaryn» (20–21 zhovtnia 2021 roku)* [Proceedings of the IV All-Ukrainian scientific-practical Internet conference "Modern aspects of treatment and

prevention of animal diseases" (October 20–21, 2021)]. Poltava, pp. 181–182. (in Ukraine)

8. Beall, M. J., Buch, J., Cahill, R. J. (2019). Evaluation of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for feline leukemia virus p27 antigen and comparison to proviral DNA loads by real-time polymerase chain reaction. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Vol. 67, 101348 p. (in England) DOI:10.1016/j.cimid.2019.101348

9. Hofmann-Lehmann, R., Hartmann, K. (2020). Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Vol. 22, no. 9, pp. 831–846. (in England). DOI:10.1177/1098612X20941785

10. Tompkins, M. B., Tompkins, W. A. (2008). Lentivirus-induced immune dysregulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 123, no. 1–2, pp. 45–55. (in England). DOI:10.1016/j.vetimm.2008.01.011

11. Little, S., Levy, J., Hartmann, K. (2020). 2020 AAEP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Vol. 22, no. 1, pp. 5–30. (in England). DOI:10.1177/1098612X19895940

12. Addie, D. D., Toth, S., Reid, S. (2000). Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. *Veterinary Record*. Vol. 146, no. 15, pp. 419–424. (in England). DOI:10.1136/vr.146.15.419

13. Hartmann, K., Hofmann-Lehmann, R. (2020). What's New in Feline Leukemia Virus Infection. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. Vol. 50, no. 5, pp. 1013–1036. (in England). DOI:10.1016/j.cvsm.2020.05.006

14. Lloret, A. (2009). The Process of Evidence-Based Medicine. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Vol. 11, no. 7, pp. 529–529. (in England). DOI:10.1016/j.jfms.2009.05.001

15. Flynn, J. N., Hanlon, L., Jarrett, O. (2000). Feline leukaemia virus: protective immunity is mediated by virus-specific cytotoxic T lymphocytes. 6 p.

16. Goldkamp, P. E., Levy, J. K., Edinboro, P. H. (2008). Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats with abscesses or bite wounds and rate of veterinarian compliance with current guidelines for retrovirus testing. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 232, no. 8, pp. 1152–1158. (in England) DOI:10.2460/javma.232.8.1152

17. Hofmann-Lehmann, R., Cattori, V., Tandon, R. (2007). Vaccination against the feline leukaemia virus: Outcome and response categories and long-term follow-up. 9 p. (in England). DOI:10.1016/j.vaccine.2006.12.022

18. Wilkes, R. P., Anis, E., Dunbar, D. (2017). Rapid and sensitive insulated isothermal PCR for point-of-need feline leukaemia virus detection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 8 p. (in England). DOI:10.1177/1098612X17712847

19. Chiu, E., Hoover, E., VandeWoude, S. A. (2018). Retrospective Examination of Feline Leukemia

Subgroup Characterization: Viral Interference Assays to Deep Sequencing. *Viruses*. Vol. 10, no. 1, 29 p. (in England). DOI:10.3390/v10010029

20. Galdo Novo, S., Bucafusco, D., Diaz, L. M. (2016). Viral diagnostic criteria for Feline immunodeficiency virus and Feline leukemia virus infections in domestic cats from Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. Vol. 48, no. 4, pp. 293–297. (in England). DOI:10.1016/j.ram.2016.07.003

Prevalence and diagnosis of retroviral infections in cats

Dovgenko V., Chekalin I., Naumchuk V., Savchenyuk M., Tsarenko T.

Cat retroviruses, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus cause diseases that have a wide range of clinical manifestations and forms of infection. Aretrospective analysis of data from the last three years in the studied hospitals showed that the infection of cats with retroviruses is 32.6% for FeLV and 13.6% for FIV from the number of infectious diseases. Such high rates indicate that one third of cats coming to veterinary clinics with infectious diseases are infected with retroviruses. These are primarily animals at risk that have free range. Early detection of such animals by a veterinarian is important for effective treatment and prevention of infection. We have adapted the algorithm for the diagnosis of retroviral infections in cats to domestic conditions and developed practical recommendations for veterinarians on the effective choice

of laboratory methods for the diagnosis of retroviral infections.

It was found that in clinics, the initial study of whole blood samples from infectiousy infected cats was performed using commercial serological test systems VetExpert FIVAb + FeLVAg. After the results of the first stage of the study, the protocol of the nested polymerase chain reaction (PCR) was tested. DNA isolation was performed using the IndiSpin Pathogen Kit. OneTaq® 2X Master PCR mix with Standard Buffer and specific oligonucleotides were used in the study. Proviral DNA was detected in 100% of blood samples for the respective pathogens FIV and FeLV. All animals that were pre-diagnosed with FIV and VLC infection at the first stage of diagnosis were diagnosed with proviral DNA and confirmed at the second stage of diagnosis. The use of the nested PCR method significantly increases the sensitivity and specificity of the study.

The first stage of diagnosis allows a veterinarian to determine the infectious status of the animal on the basis of which to choose a treatment strategy and prevent transmission of the pathogen. The second stage of diagnosis allows you to clarify the previous diagnosis and establish the form of infection. The presence of a clear and understandable diagnostic algorithm is necessary for effective control of FIV and FeLV.

Key words: polymerase chain reaction, feline viral leukemia, feline immunodeficiency virus, molecular diagnostics, retroviral infections, diagnostic algorithm.



Copyright: Довгенко В.В. та ін. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



ORCID iD:

Довгенко В.В.

<https://orcid.org/0000-0003-0725-2086>

Савченко М.О.

<https://orcid.org/0000-0003-2306-4114>

Царенко Т.М.

<https://orcid.org/0000-0003-4373-5958>