

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos 2 kurso magistrantė

Neringa GUDAITYTĖ

Magistro baigiamasis darbas

**Kačių korona virusinės infekcijos diagnostika**

Darbo vadovė:

Dr. Ingrida Jacevičienė

Vilnius, 2019

## **Kačių korona virusinės infekcijos diagnostika**

Darbas atliktas

Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute, Virusologinių tyrimų skyriuje

Neringa GUDAITYTĖ

Darbo vadovė:

Dr. Ingrida JACEVIČIENĖ

## TURINYS

Santrumpos .....	4
ĮVADAS .....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	7
1.1. Taksonomija, genetika ir morfologija .....	7
1.2. FCoV serotipai ir biotipai .....	9
1.3. FCoV plitimas .....	12
1.4. Kačių korona viruso dauginimasis organizme .....	12
1.5. Rizikos veiksniai FCoV infekcijos pasireiškimui .....	14
1.6. FECV ir FIP sukeltos infekcijos ir jų skirtumai .....	15
1.7. FCoV diagnostika .....	16
1.8. FCoV gydymas .....	18
1.9. Apsaugos priemonės FCoV infekcijos suvaldymui .....	19
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	21
2.1. Medžiagos .....	21
2.2. Metodas .....	22
2.3. Statistinis duomenų apdorojimas .....	29
3. REZULTATAI .....	30
3.1. Kačių korona viruso pasireiškimo įvertinimas .....	30
3.2. Kačių korona viruso tyrimų aktualumas .....	30
3.3. FCoV pasireiškimas pagal lytį .....	31
3.4. FCoV pasireiškimas pagal amžiaus grupes .....	32
3.5. FCoV pasireiškimas pagal veislę .....	33
3.6. FCoV pasireiškimas pagal laikymo vietą .....	34
3.7. FCoV pasireiškimas pagal sezoniškumą .....	35
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....	37
IŠVADOS .....	40
Santrauka .....	41
Summary .....	42
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	43

## Santrumpos

IFA – imunofermentinė analizė

FCoV – kačių korona virusas (angl. Feline Corona Virus)

HRPO – krienų peroksidazės konjugatas su polikloniniais prieš-rūšiniais antikūnais

TMB – substratas

FECV – kačių enterito korona virusas (angl. Feline Enteric Corona Virus)

FIPV – kačių infekcinio peritonito virusas (angl. Feline Infectious Peritonitis Virus)

NK – neigiama kontrolė

TK – teigiama kontrolė

M – tiriamas mėginys

RK – ribinė kontrolė (angl. Cut-off)

OT – optinis tankis

SD – standartinis nuokrypis

Bl – tuščias (angl. Blank)

mAb – monokloniniai antikūnai

FPV – kačių panleukemijos virusas

FHV – kačių herpes virusas

FCV – kačių calici virusas

FIV – kačių imunodeficito virusas

FeLV – kačių leukemijos virusas

CCV – šunų korona virusas

TEGV – perduodamas gastroenterito virusas

ORF – atviro skaitymo rėmelis

APN – aminopeptidazė N

fAPN – kačių aminopeptidazė N

ADE – nuo receptoriaus nepriklausomas mechanizmas

EVL – Europos veterinarijos laboratorija (angl. *European Veterinary Laboratory*)

## ĮVADAS

Kačių korona virusas (FCoV) etiologinis agentas dažnai pasitaikantis naminiuose ir laukiniuose katinių šeimos gyvūnuose (Tuba ir kt., 2010).

Kačių korona virusas egzistuoja dviejų klinikinių formų, kačių enterito korona virusas (angl. *FECV*) ir kačių infekcinio peritonito virusas (angl. *FIPV*) (Kipar ir Meli, 2014). *FECV* yra labai užkrečiamas virusas, kuris dažniausiai plinta fekaliniu-oraliniu būdu. Daugumai užsikrėtusių kačių ligos požymiai nepasireiškia arba pasireiškia silpnas viduriavimas (Pedersen NC ir kt., 2009a). Tačiau retais atvejais *FECV* infekcija yra pirmas žingsnis lemiantis *FIP* išsivystymą.

Kadangi korona virusai yra sudaryti iš daugelio nukleotidų, pagrindinių genetinės medžiagos vienetų, jie itin linkę mutuoti (Aguas ir Ferguson, 2013). Kai virusas atsinaujina, atsiranda klaidų kopijuojant šiuos nukleotidus. Tai yra natūralus RNR viruso polimerazių korektūros veiklos trūkumas, dėl ko nuolat atsiranda naujų virusinių genetinių variantų (Santiago ir Sanjuán, 2005). Kuo daugiau nukleotidų, tuo daugiau mutacijų pasitaiko. Nors dauguma šių mutacijų yra tyliosios (neutralios), o kai kurios jų suteikia *FECV* galimybę mutuoti į *FIPV*.

*FIP* išsivysto tik santykinai nedideliame skaičiui kačių (nuo 5 proc. iki 12 proc.), tačiau dažniausiai baigiasi gyvūno mirtimi (Brown ir kt., 2009). Todėl kačių korona virusinis infekcinis susirgimas - viena iš dažniausiai sutinkamų problemų. Veisėjai ir veterinarijos gydytojai anksčiau su šia liga beveik nesusidurdavo, tačiau atsiradus pačioms įvairiausioms kačių veislėms, šios ligos atvejų daugėja. Nes visų pirma, nuo korona virusinės infekcijos nėra specifinio gydymo plano, kuris pagelbėtų išgyti. Antra, nėra sukurtos efektyvios vakcinos, kuri palaikytų aktyvų imunitetą. Trečia, aukšto virulentiškumo *FCoV* padermė gali mutuoti į kačių infekcinį peritonito virusą (*FIPV*). Dėl to *FCoV* diagnostika ir pasireiškimą įtakojančių epidemiologinių veiksnių (lyties, amžiaus, laikymo vietos, sezoniškumo, veislės) analizė yra labai svarbi, siekiant kontroliuoti viruso plitimą (Little ir kt., 2009, Westman ir kt., 2016).

### **Darbo tikslas:**

Ištirti ir įvertinti kačių korona viruso sukeltą infekciją ir išanalizuoti epidemiologinius ypatumus.

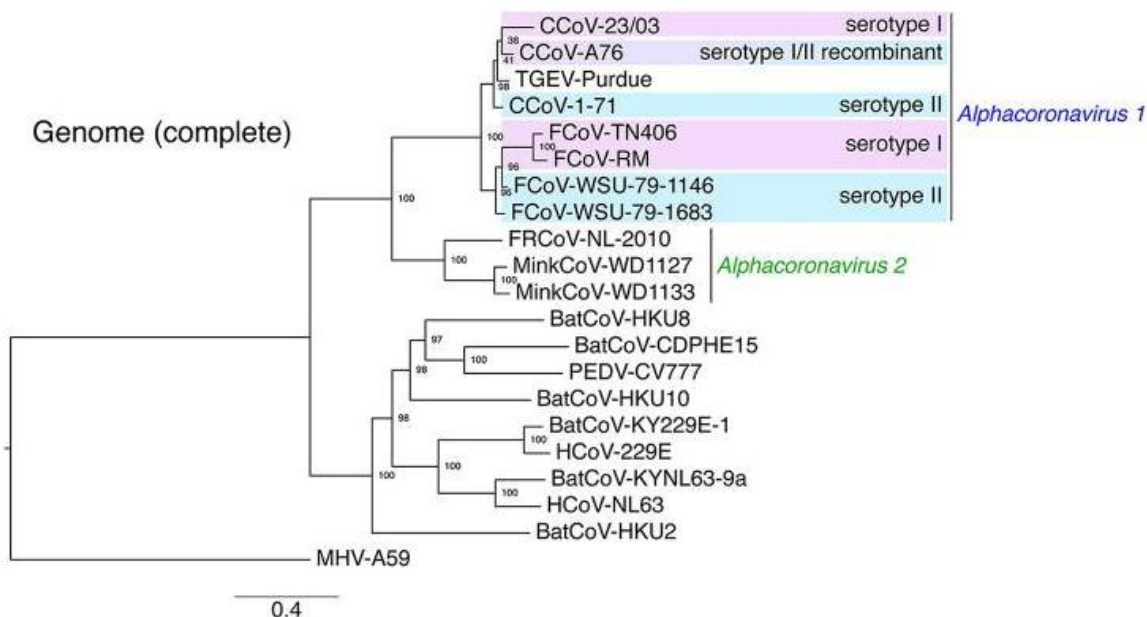
**Darbo uždaviniai:**

1. Atlikti kačių specifinių korona virusui antikūnų serologinius tyrimus imunofermentinės analizės metodu.
2. Įvertinti kačių specifinių korona virusui antikūnų tyrimų duomenų analizę.
3. Nustatyti, kokioje kačių amžiaus grupėje kačių specifiniai korona virusui antikūnai cirkuliuoja ir palyginti užsikrėtusių kačių skaičių įvairiose grupėse, atsižvelgiant į jų lytį ir veislę.
4. Įvertinti ir nustatyti kačių specifinių korona virusui antikūnų pasiskirstymo dažnį pagal sezoniškumą.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

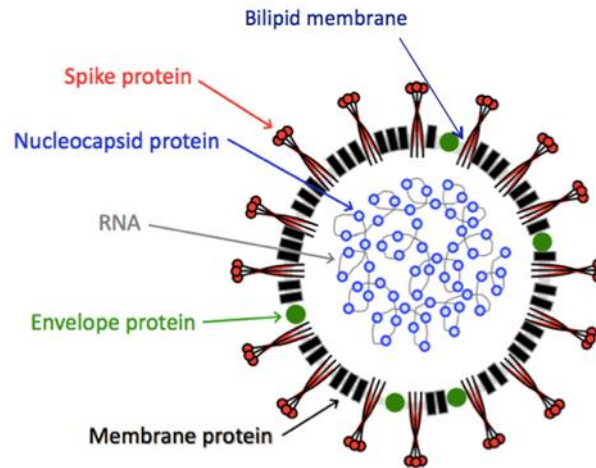
## 1.1. Taksonomija, morfologija ir genetika

Kačių korona virusas (FCoV) priklauso *Coronaviridae* šeimai *Alphacoronavirus* genčiai. *Coronaviridae* šeimos nariai yra suskirstyti į keturias gentis. *Alphacoronavirus* ir *Betacoronavirus* apima virusus, kurie daugiausia užkrečia žinduolius. Šios gentys kilusios iš šikšnosparnių genų pulo. *Gammacoronavirus* ir *Deltacoronavirus* grupės virusai, užkrečia paukščius ir žinduolius. Šios gentys gautos iš paukščių ir kiaulių genų pulo (Woo ir kt., 2012). *Alphacoronavirus* genčiai taip pat priklauso šunų korona virusas (angl. *CCV*) ir perduodamas gastroenterito virusas (angl. *TEGV*) (1.1. pav.) (Beth ir kt., 2013).



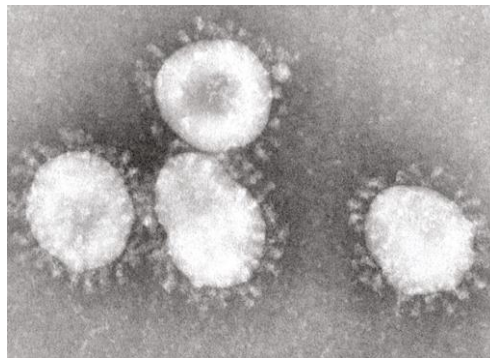
1.1 pav. *Alphacoronavirus* genties filogenetinis medis (Gary ir kt., 2018).

Kačių korona viruso virionas sudarytas iš genomo padengto nukleokapsidės (N) baltymais, kurį supa bilipidinė membrana arba apvaskalas kilęs iš šeimininko ląstelės. Šiame apvaskale išsidėstę trys pagrindiniai struktūriniai baltymai (spyglio (angl. *Spike*), membranos (angl. *Membrane*) ir apvaskalo (angl. *Envelope*)), kurie užbaigia viriono struktūrą (1.2. pav.) (Pedersen ir kt., 2009b).



**1.2. pav.** FCoV virusinės dalelės struktūra. Nukleokapsidės baltymai padengia RNR genomą. Spyglio, membranos ir apvalkalo baltymai yra įtvirtinti šeimininko ląstelių kilmės bilipidinėje membranoje (Tasker S., 2018).

Spyglio (S) baltymai yra 150 kilodaltonų (kDa), kurių didžioji dalis išsikišę už virusinės dalelės apvalkalo. Šie žiedlapių formos S baltymai suteikia į karūną panašią formą, kuri matoma elektroninio mikroskopo nuotraukose (1.3. pav.). S baltymas yra esminis FCoV patogeniškumo veiksnys, kurio pagalba užtikrinama veiksminga makrofagų infekcija (De Groot ir kt., 1989).



**1.3. pav.** Elektroniniu mikroskopu atlikta korona virusinės dalelės nuotrauka. Korona virusas yra 100 nm – 160 nm skersmens (German, 2012).

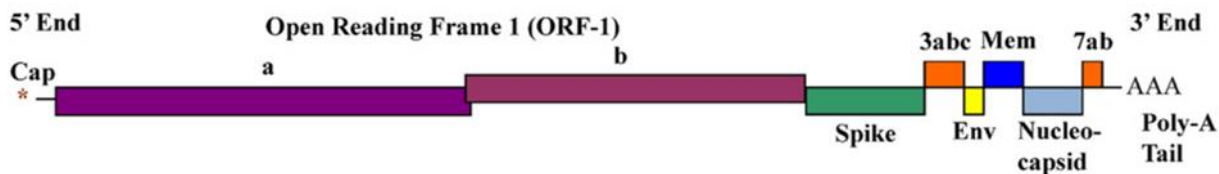
Apvalkalo (E) baltymai (10 kDa) beveik visiškai įterpti į bilipidinę membraną. Jie turi trumpą citoplazminę uodegą (Maeda ir kt., 2001). E baltymai yra būtini apvalkalo formavimuisi ir kitų membraninių baltymų fiksavimui viriono susidarymo vietoje (Lim ir Liu, 2001).

Membranos (M) baltymai (25 kDa – 30 kDa) yra pagrindinė viruso apvalkalo sudedamoji dalis. 10 proc. šio baltymo yra išsikišę už virusinės dalelės apvalkalo. M baltymų sąveika su N baltymais skatina virusinės dalelės surinkimą (Holmes, 1985; Spaan ir kt., 1988; Lai, 1990).



Nukleokapsidės (N) baltymai (43 kDa – 50 kDa) jungiasi prie RNR grandinės ir sudaro spiralinę nukleokapsidę. Sąveikaujant N ir M baltymams nukleokapsidė yra įtraukiama į naujai suformuojamą virioną (Narayanan ir kt., 2000). N baltymas taip pat dalyvauja viruso RNR replikacijos ir transkripcijos procese (Spaan ir kt., 1988).

Korona virusai turi didžiausią genomą iš visų šiuo metu žinomų RNR virusų, kurių sudaro maždaug 30 kilobazių. Kačių korona virusas priklauso viengrandės RNR grupės apvaskalėtųjų virusų šeimai. RNR geno 5' gale išsidėstę 2 atviro skaitymo rėmeliai, ORF-1a ir ORF-1b (angl. *ORF* – *open reading frame*), koduojantys du polimerazės poliproteinus (1a ir 1b). Šie poliproteinai viruso replikacijos metu yra suskaidomi į nestruktūrinius funkcinis baltymus, kurie yra naudojami viruso RNR replikacijai ir transkripcijai. Genomo 3' gale išsidėstę likę atviro skaitymo rėmeliai, kurie koduoja struktūrinius ir papildomus baltymus (1.4. pav).



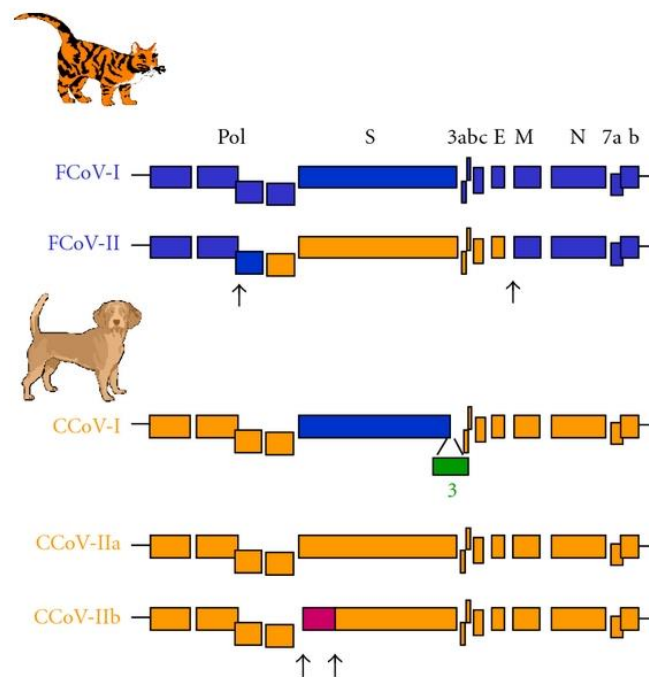
**1.4. pav.** FCoV geno organizavimo schema. 5' galo poliadenilinta uodega ir 3' galo kepurėlė yra tipinė RNR struktūra naudojama baltymų generavimui ląstelėje (Chang ir kt., 2010, Brown ir kt., 2009).

Viruso genome koduojami papildomi baltymai nėra būtini jo replikacijai ar infekcijos eigai. FCoV papildomus baltymus koduoja 3abc ir 7ab atviro skaitymo rėmeliai. Tiksliai papildomų baltymų funkcija nežinoma, tačiau vieno ar abiejų šių geno klasterių ištrynimasis slopina viruso poveikį organizmui (Haijema ir kt., 2004). 3c, 7a arba 7b papildomų baltymų mutacijos galimai daro įtaką FIPV padermių vystymuisi iš FECV padermių (Vennema ir kt., 1998; Kennedy ir kt., 2001). 7b papildomas baltymas (26,5 kDa) išskiriamas iš užkrėstų ląstelių gali veikti kaip imuninės sistemos modulatorius (Rottier, 1999).

## 1.2. FCoV serotipai ir biotipai

FCoV yra skirstomas į du serotipus (I ir II). Jie gali būti skirstomi pagal gebėjimą augti ląstelių kultūroje ir antigeninį ryšį su CCoV (Kipar ir Meli, 2014, Lewis ir kt., 2015, Shiba ir kt., 2007).

FCoV serotipų paplitimas buvo tiriamas daugelyje šalių, įskaitant JAV (Vennema ir kt., 1999), Jungtines Karalystes (Addie ir kt., 2003), Japoniją (Hohdatsu ir kt., 1992, Shiba ir kt., 2007), Austriją (Benetka ir kt., 2004) ir Šveicariją (Kummrow ir kt., 2005). Nepriklausomai nuo naudotų tyrimo metodų, didžioji dalis (nuo 80 proc. iki 90 proc.) natūraliai pasitaikančių infekcijų buvo priskirtos FCoV I serotopui. Kačių korona viruso I serotipui būdingas genetinės medžiagos panašumas artimas kiaulių transmisinio gastroenterito virusui. FCoV II serotipo genomus artimas šunų korona virusui (1.5. pav.). Genetinės medžiagos apsikeitimas greičiausiai įvyko dėl FCoV I serotipo ir šunų korona viruso rekombinacijos. Dėl šios rekombinacijos FCoV I serotipo spyglio genas ir gretimi regionai buvo pakeisti atitinkama šunų korona viruso genomo dalimi (Gergely ir kt., 2008).



**1.5. pav.** Genetiniai ryšiai tarp skirtingų kačių ir šunų korona virusų genotipų. Kačių sekos žymimos mėlyna spalva, šunų sekos žymimos oranžine spalva, kiaulių sekos žymimos violetine spalva. Rodyklės nurodo galimas rekombinacijų vietas (Sophie ir kt., 2011).

Serotipuose įvairių S genų buvimą atspindi skirtingos *in vitro* augimo charakteristikos. II FCoV serotipo dauginimas ląstelių kultūroje vyksta itin gausiai. Efektyvus II FCoV serotipo augimas ląstelių kultūroje leidžia platų jo panaudojimą daugelyje atliekamų tyrimų. Tačiau ląstelių kultūroje auginami I FCoV serotipo izoliatai pasižymi maža augimo sparta. Reikėtų

pabrėžti, kad I serotipas sudaro didžiausią dalį vyraujančio FCoV, kurio neefektyvus augimas riboja serotipo panaudojimą tyrimams (Gergely ir kt., 2008).

Kačių korona virusas skirstomas į 2 biotipus (kačių žarnyno korona virusą (angl. *FECV*) ir kačių infekcinio peritonito virusą (angl. *FIPV*). Šie biotipai skiriasi savo virulentiškumu. Labiausiai aplinkoje paplitęs FCoV biotipas – FECV. Kačių žarnyno korona virusas yra mažai virulentinis arba avirulentinis tipas, sukelia lengvas žarnyno trakto infekcijas. Šios infekcijos klinikiniai požymiai dažniausiai neaptinkami arba yra nežymūs (pvz.: jaunų kačiukų viduriavimas). Ankstesnių tyrimų duomenimis teigta, kad FECV replikuoja tik žarnyno epitelio ląstelėse (Liesbeth ir kt., 2010, Pedersen ir kt., 2008, Beth ir kt., 2013). Ši hipotezė buvo laikoma pagrindiniu skirtumu tarp kačių žarnyno korona viruso ir kačių infekcinio peritonito. Naujausi moksliniai tyrimai atskleidžia, kad natūralios infekcijos eigoje FECV aptinkamas ir kraujyje, tik daug mažesniais kiekiais nei FIP. Pernešamas krauju FECV gali patekti į daugelį vidaus organų (mezenteralinius limfmazgius, tonziles, skydliaukę, blužnį, kaulų čiulpus). Reikėtų pabrėžti, kad FECV infekcija patekdama į vidaus organus nesukelia sisteminių pažeidimų, kurie yra pastebimi FIP užsikrėtimo atvejais (Meli ir kt., 2004, Chang ir kt., 2010).

Kačių infekcinio peritonito virusas yra labai virulentiškas ir sukelia sunkią sisteminę infekciją. FIP aptinkama rečiau negu FECV, tačiau FIP infekcijos baigtis dažniausiai – letalinė (Pedersen ir kt., 2008, Beth ir kt., 2013). FIP sukelia daugelio organų ir audinių pažeidimus, dažniausiai pasitaikančius pilvaplovės srityje (Hui-Wen ir kt., 2011, Pedersen ir kt., 2009a, Pedersen ir kt., 2012). Kačių infekcinio peritonito atsiradimas siejamas su FECV mutacijų pasireiškimu. Ši infekcija neplinta įprastu fekaliniu-oraliniu būdu, o išsivysto sporadiškai (Pedersen ir kt., 2008, Beth ir kt., 2013).

Mutacijos teorija teigia, kad FECV užsikrėtusios katės veikiamos pasikartojančios infekcijos ciklo ir FECV mutacijų (vykstančių gyvūno viduje) sukelia viruso virulentiškumo ir tropizmo pokyčius. Šie veiksniai paskatina FIPV išsivystymą. Kačių infekcinio peritonito išsivystymas sustabdo infekcijos perdavimo galimybę (Pedersen, 2009, Pedersen ir kt., 1981b, Poland ir kt., 1996). Šių įvykių eigoje panaikinamas enterocitų tropizmas, virusui suteikiami įrankiai produktyviai daugintis monocituose, makrofaguose ir sistemingai plisti už žarnyno trakto ribų (Pedersen ir kt., 2014). Mutacijų atsiradimas siejamas su struktūriniais (S genu) ir papildomais (3abc ir 7ab genais) virusiniais genais (Chang ir kt., 2010, Chang ir kt., 2012, Chang ir kt., 2011, Herrewegh ir kt., 1995, Kennedy ir kt., 2001, Licitra ir kt., 2013, Pedersen ir kt., 2012, Vennema ir kt., 1998).

### 1.3. FCoV plitimas

FCoV infekcijos pasireiškia įvairiuose *Felidae* šeimos nariuose (naminėse, laukinėse katėse). Didžiausi FCoV susirgimai stebimi naminių kačių populiacijoje. Veislynuose sergamumas svyruoja nuo 80 proc. – 90 proc. gyvūnų. Prieglaudose virusą skleidžia apie 75 proc. – 100 proc. kačių. Namuose laikomų kačių (kuriuose auginama viena katė) sergamumas dažniausiai svyruoja nuo 10 proc. iki 50 proc. gyvūnų (Sharif ir kt., 2009).

FCoV į organizmą dažniausiai patenka po kontakto su užterštomis išmatomis, fekaliniu-oraliniu būdu (Sabshin ir kt., 2012) arba oro-lašelinio būdu. Pradiniuose infekcijos etapuose virusas gali būti aptinkamas seilėse, kvėpavimo takų išskyrose ir šlapime. Praėjus savaitei nuo užsikrėtimo kačių išmatose galima aptikti virusą (Pedersen ir kt., 2014). FCoV dažniausiai yra perduodamas sveikoms katėms dalijantis viena kraiko dėžute su užsikrėtusia kate (Pedersen ir kt., 2008). Užsikrėtusių kačių išmatose virusas aptinkamas nuo kelių savaičių iki kelių mėnesių. Virusas atsiradimas išmatose gali būti periodinis arba nuolatinis (Kipar ir Meli, 2010). Lėtiškai serganti FCoV katė tampa nuolatinio užkrato šaltiniu. Dėl pastovaus užkrato katės aplinkoje susiformuoja fazių cikliškumas: užsikrėtimas, šalinimas, pasveikimas ir pakartotinas užsikrėtimas (Pedersen ir kt., 2009b). Šis ciklas paskatina naujų virusinių padermių vystymąsi. FECV infekcijos padariniai gali skirtis priklausomai nuo imuniteto ar individualių gyvūnų savybių. Po pirmo kontakto su infekcija imuninės sistemos aktyvavimas neleidžia katei susirgti, tačiau esant pakartotinam kontaktui, katės organizmas tampa labiau imlus FECV, kuomet pasireiškia simptomatika (70 proc. – 80 proc. kačių). Kita dalis kačių gali tapti besiptomiaisiais nešiotojais ir viruso platintojais (10 proc. – 15 proc. kačių). Maža dalis kačių yra atspari FCoV infekcijai (5 proc.). Joms neaptinkama šiai ligai būdingų simptomų. Reikėtų pabrėžti, kad esant dideliame FCoV paplitime FECV mutacijos ir FIP išsivystymas pasireiškia tik 5 proc. užsikrėtusių kačių.

Daugelis korona virusų (pvz.: sukeltantys sunkų ūminį kvėpavimo takų sindromą (angl. SARS) yra zoonoziniai. Šie korona virusai gali plisti tarp gyvūnų ir žmonių. FCoV atveju infekcija nėra užregistruota žmonių tarpe (Dye ir kt., 2008).

### 1.4. Kačių korona viruso dauginimasis organizme

Kačių organizme korona viruso replikacija prasideda virionui prisitvirtinus prie ląstelės-šeimininko receptoriaus. Šiam prisijungimui naudojamas viriono S baltymas, kuris jungiasi prie šeimininko ląstelės membranoje esančios aminorpeptidazės N (angl. APN) (Balint ir kt., 2012, Cham TC ir kt., 2017). Dauguma alfa korona virusų naudoja šs šeimininko ląstelės paviršiaus

receptorių (Andrew D. Regan ir kt., 2008, Andrew D. Regan ir kt., 2010). APN yra ląstelių paviršiaus glikoproteinas (apie 150 kDa), išreiškiamas ant granuliocitų, monocitų, fibroblastų, neuronų bei inkstų, kvėpavimo ir virškinimo epitelio ląstelių paviršiaus. II serotipo (ne I serotipo) FCoV S baltymas ir kiti alfa korona virusai prisijungimui naudoja specifiską kačių viruso formai skirtą šeimininko ląstelės receptorių (angl. *fAPN*) (Van Hamme E, ir kt., 2011).

FCoV patekimui į ląstelę gali būti naudojamas nuo receptoriaus nepriklausomas mechanizmas (angl. ADE – antibody-dependent enhancement). Šis mechanizmas veikia imuninį atsaką, kurio pagalba virusu yra užkrečiami monocitai ir makrofagai. Šiuo būdu virusas pasklinda po visą organizmą (Jaimas ir kt., 2018). ADE patekimo mechanizmą FIPV II serotipas naudoja nesant specifinio *fAPN* receptoriaus. Atliktų tyrimų duomenimis nustatyta, kad šis mechanizmas naudojamas FIPV II serotipo patekimui į ląstelę in vitro metodu ir FIPV I serotipo patekimui į ląstelę in vivo metodu (Takano ir kt., 2008a, Takano ir kt., 2008b).

FCoV replikacijos ciklas tęsiasi viriono dalelei prisijungus prie ląstelių receptoriaus ir patekus į ląstelės citoplazmą. FCoV į ląstelę-šeimininką patenka endocitozės būdu. Šio patekimo būdu, su ląstelės receptoriais susijungęs virusas, sukelia virusinės ir ląstelinės membranos susiliejimą. Virusinės ląstelės membranos susiliejimą skatina FCoV S baltymas (Burkard C ir kt., 2014).

Virusinės ir ląstelės-šeimininko receptorių susirišimą lydi du biocheminiai reiškiniai. Sėkmingam membranos susiliejimo indukavimui su endocitinėmis pūslelėmis vykdoma: proteazės aktyvacija arba FCoV S skilimas ir endosominio pH kritimas (Fehr ir kt., 2015, Millet ir kt., 2015). Dėl membranos susiliejimo, FCoV nukleokapsidė išleidžia viruso genomą į citoplazmą. Ląstelės-šeimininko citoplazmoje atliekama viruso genomo replikacija ir baltymų sintezė. FCoV susintetinti replikazės baltymai inicijuoja genomo replikaciją (Masters ir kt. 2013, 825–858 p.)

Replikacijos eigoje sintezuojami nestruktūriniai baltymai, kurie surenkami kartu su replikazės-transkriptazės kompleksu. Šis kompleksas sudaro sąlygas RNR replikacijai ir vėlesnei struktūrinių baltymų transkripcijai. Apdorotus sintezės ir replikazės baltymus virusinis viengrandės teigiamos ribonukleorūgšties (angl. *ssRNA* +) genomas nukopijuoja į *ssRNA* tarpinę molekulę. Subgenominėse RNR (angl. *sgRNR*) transkribuojami likusieji struktūriniai ir papildomi genai (Masters ir kt., 2013, 825–858 p.).

FCoV S, M ir E struktūrinių baltymų įterpimas ir brendimas prasideda endoplazminio tinklo (angl. *ER*) citoplazmoje. Galutiniai struktūrinių baltymų brendimo procesai (pvz.: glikozilinimas) vyksta virusinius baltymus gabenant pernešimo keliu į ER-Golgi tarpinį

kompartimentą (angl. ERGIC – *endoplasmic reticulum-Goldi intermediate compartment*) (Millet ir kt., 2015). Lygiagrečiame procese, ERGIC srityje, N baltymai jungiasi prie sintezuotų genominių ssRNR + molekulių, kurios įtraukiamos į subrendusius virionus. Naujų virusinių dalelių surinkimas labiausiai reguliuojamas M baltymui sąveikaujant su N baltymu esančiu ERGIC srityje. Šios sąveikos skatina viriono susiformavimą (Fehr ir kt., 2015). Kai virionas yra visiškai surenkamas, naujas FCoV virusas transportuojamas per sekretorines pūsleles į ląstelės paviršių ir pašalinamas už ląstelės ribų. Virusų šalinimas vyksta egzocitozės būdu, kuris nėra reguliuojamas viruso (Masters ir kt., 2013, 825–858 p.).

### **1.5. Rizikos veiksniai FCoV infekcijos pasireiškimui**

Remiantis serologinių tyrimų duomenimis nustatyta, kad FCoV išplitimą gali lemti didelis kačių apgyvendinimo tankis. Šis veiksnys lemia greitą užsikrėtimą virusu. Aukšto patogeniškumo virusas mutuoja ir vyksta tolimesnis FCoV vystymasis (Rottier ir kt., 2005, Foley ir kt., 1997). FCoV plitimą gali paveikti įvairūs pokyčiai vykstantys užkrėsto gyvūno organizme, kaip: šeimininko imuninis atsakas, veislė, genetika, amžius ar lytis (Yunjeong ir kt., 2016, Norris ir kt., 2005, Foley ir kt., 1997, Rohrbach ir kt., 2001, Pesteanu-Somogyi ir kt., 2006).

Didelėje kačių grupėje (n) epidemiologinės mutacijos (E) rizika yra didesnė ir teoriškai išreikšta formulėje:  $E = n^2 - n$ . Galima teigti, kad namuose, kuriuose yra 2 katės – mutacijos rizika  $E = 2$ . Kai šiuose namuose gimsta 4 kačiukai (iš viso 6 katės), rizika eksponentiškai padidėja nuo 2 iki 30 ( $6^2 - 6$ ). Didelis individų skaičius sparčiai padidina mutacijų kiekį ir FECV vartimo į FIPV riziką. Didelis kačių skaičius yra vienas iš pagrindinių rizikos veiksnių, kuris siejamas su kačių infekcinio peritonito išsivystymu (Rottier ir kt., 2005).

Nustatyta, kad kačių korona virusinė infekcija pasireiškia katėms turinčioms silpną imuninę sistemą, kurią dažnai lemia amžius. Reikšmingai didesnėje susirgimo rizikos grupėje yra jaunesni kačiukai (apie 70 proc.) ir senos katės (Rottier ir kt., 2005, Pedersen ir kt., 2014). FIP dažniausiai pasireiškia nuo 3 savaičių iki 3 metų amžiaus katėms (Addie ir Jarrett, 2006). Kačiukai gimę endeminiuose namuose tampa jautrūs infekcijai, kai praranda pasyvų sisteminį ir vietinį (laktogeninį) motinos imunitetą. Įprastai jų amžius nuo 6 savaičių iki 10 savaičių. Siekiant apsaugoti jaunus kačiukus (apie 5 sav. – 6 sav. amžiaus) rekomenduojama juos nujunkyti ir atskirti nuo motinos. To nepadarus didėja jų užsikrėtimo rizika. Kačiukai, kurie per pirmuosius 2 gyvenimo mėnesius (svarbus imunologinis laikotarpis) neturi kontakto su virusu aplinkoje ir užsikrėtusia motina, gali būti apsaugoti nuo užsikrėtimo (Addie ir kt., 2009). FIP infekcijos išsivystymo tikimybė padidėja vyresnėms nei 10 metų katėms. Ši rizika susijusi su imuninio

atsako sumažėjimu. Imuninio atsako mažėjimas pasireiškia dėl senatvės arba kitų imunosupresijos veiksnių. Reikia pabrėžti, kad stiprus imuninio atsako susilpnėjimas pasireiškia FIV (kačių imunodeficito viruso) ar FeLV (kačių leukemijos viruso) infekcijos atveju (Ariani ir kt., 2019).

## **1.6. FECV ir FIP sukeltos infekcijos ir jų skirtumai**

FECV infekcijos dažniausiai yra siejamos su ligomis, kurių daugelis susirgimo atveju lieka asimptominiais. Jauniems kačiukams gali pasireikšti lengvas trumpalaikis viduriavimas trunkantis keletą dienų, kas yra vienintelis ligos ženklas. Vėmimas pasireiškia mažesniame atveju skaičiui ir paprastai nėra reikšmingas simptomas. Tik retais atvejais virusas gali sukelti sunkų ūminį arba lėtinį vėmimą ir (arba) viduriavimą, kuris gali pasibaigti mirtimi (Sharif ir kt., 2010).

FIPV sukelia peritonitą, kuris dažniausiai pasireiškia 3 mėnesių – 16 mėnesių ir vyresnio amžiaus (> 10 metų) katėms. Ši infekcija yra viena iš pagrindinių naminių kačių mirties priežasčių. Nuo 5 proc. iki 12 proc. kačių, užsikrėtusių FCoV infekcija, gali pasireikšti FIP išsivystymas (Liesbeth ir kt., 2010). FIP būdingas difuzinis vaskulitas, poliserozė ir sunki limfopenija (Addie ir kt., 2009, Kipar ir Meli, 2014, Pedersen, 2009a).

Laikotarpis nuo pradinio kontakto su FECV iki klinikinių ligos požymių atsiradimo gali trukti iki kelių savaitių, mėnesių arba retais atvejais net iki kelių metų. Šis laikotarpis gali atspindėti laiką, kurio reikia FIPV mutantams vystytis arba ligai progresuoti iš subklinikinės į klinikinę būklę (Legendre ir kt., 2009, Pedersen, 2009b). Ligos simptomų atsiradimas – tai signalas, kad katės imuninė sistema neatsilaikė prieš virusą. Šiuo atveju pasveikimo tikimybė yra labai maža. Nepaisant įvairių gydymo bandymų daugeliui pacientų nedelsiant ar po kelių savaitių atliekama eutanazija. Pasitaiko išskirtinių atvejų, kai katė atsigauna, tačiau klinikiniai požymiai gali pasikartoti po mėnesių ar net po metų (Legendre ir kt., 2009).

Kačių, kurių imuninis atsakas yra silpnas išsivysto efuzinė arba šlapia kačių infekcinio peritonito forma. Ligos pradžioje atsiranda nespecifiniai ligos požymiai, tokie kaip lėtinis svorio sumažėjimas, karščiavimas, apetito praradimas ir mieguistumas. Gali pasireikšti anemija sukelianti gleivinės pabalimą (pvz.: dantenu). Taip pat gali pasireikšti vidurių užkietėjimas arba viduriavimas. Šlapia ligos forma sparčiai progresuoja, sukelia baltymų turinčio skysčio nuotėkį į pilvo ertmę, kas lemia pilvo išsipūtimą (pagrindinis FIP sergamčios katės požymis). Skystis taip pat gali būti kaupiamas krūtinės ertmėje ir sukelti kvėpavimo sutrikimus. Dauguma kačių su šlapia FIP forma miršta per artimiausius 2 mėnesius nuo pirmų ligos požymių atsiradimo (Addie, 2009).

Katėms, turinčioms dalinį ląstelių imunitetą išsivysto sausa kačių infekcinio peritonito forma. Ligos pradžioje stebimi panašūs ligos simptomai, kaip ir šlapioje FIP formoje. Būdingas svorio mažėjimas, karščiavimas, apetito stoka ir mieguistumas. Kiti požymiai pasireiškia priklausomai nuo to, kokie vidaus organai yra pažeisti granulomų (pilvo limfmazgiai, žarnos, kepenys, inkstai, akys, plaučiai). Nuo 10 proc. iki 25 proc. kačių pasireiškia neurologiniai sutrikimai. Granulomos atsiradusios centrinėje nervų sistemoje sukelia paralyžių, disorientaciją, pusiausvyros praradimą, drebulį, traukulius, elgesio pokyčius ir šlapimo nelaikymą. Dažnai atsiranda kepenų ir inkstų pažeidimų, kurie diagnozuojami naudojant cheminius testus. Granulomos gali atsirasti ir krūtinėje. Kai kuriais atvejais vienintelis paveiktas organas būna akis (Addie, 2009). Kadangi sausa FIP forma progresuoja lėčiau, katės gyvenimo trukmė – ilgesnė nei sergant šlapia forma. Galima teigti, kad jei akis – vienintelis organas paveiktas granulomų, katė tikėtina gyvens ilgiau. Katės turinčios apetitą, bet neturinčios neurologinių požymių ar anemijos paprastai gali išgyventi iki vienerių metų po pirmųjų klinikinių požymių atsiradimo. Tačiau nusilpus imuninei sistemai sausa ligos forma gali pereiti į šlapią FIP, taip pakeičiant ligos eigą. (Pedersen NC, 2009a). Nepaisant vyraujančios formos, liga neišvengiamai pasibaigia gyvūno mirtimi (Patel ir kt., 2009, Goodson ir Randell, 2009).

## **1.7. FCoV diagnostika**

Nuolatinė FCoV cirkuliacija kačių populiacijoje galimai padidina virulentiško FIP išsivystymo tikimybę. Kadangi FIP patogenezė yra menkai suprantama, nuolatinis užsikrėtusių ir FCoV platinančių kačių aptikimas ir izoliavimas gali sumažinti FIP atsiradimo riziką. Tam naudojami įvairūs FCoV diagnostiniai metodai (Sharif ir kt., 2010).

### **1.7.1. Serologiniai tyrimai**

Siekiant nustatyti FCoV įtariamai infekuotoms katėms yra naudojamas imunofermentinės analizės metodas (IFA), kurio pagalba yra nustatomas kiekybinis kačių korona viruso antikūnų skaičius kraujo mėginiuose. FIP atvejais kačių korona viruso antikūnų skaičius yra didesnis nei FECV, tačiau nėra tiksliai nustatyto atitinkamo intervalo, kuris indikuotų FIP infekciją. Siekiant diagnozuoti FIP yra atliekami papildomi tyrimai (Sharif ir kt., 2010).

### **1.7.2. Rivalta testas**

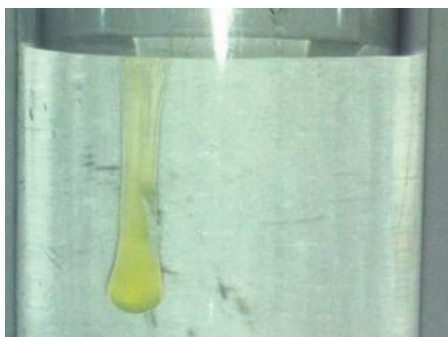
Tikslesnis FIP nustatymo testas (pvz.: Rivalta testas) yra paremtas efuzinių skysčių mėginių tyrimais. FIP sergančios katės paprastai turi geltoną, klampų, turtingą baltymais skystį, kuriame aptinkamas mažas ląstelių kiekis. Įprastai efuziniame skystyje vyraujanti baltymų



koncentracija yra  $> 35$  gramų /l su mažu albumino ir globulino kiekiu (Tasker, 2018). Uminės fazės baltymo (angl. *AGP – acute phase protein*) aptikimas susidariusiame skystyje yra galimas FIP diagnostinis rodiklis. FIP seroteigiamų kačių mėginiuose AGP koncentracija yra  $> 1,55$  mg/ml (Giori ir kt., 2011).

Rivalta testas yra paprastas, nebrangus metodas, kuriam nereikia specialios laboratorinės įrangos ir gali būti lengvai atliekamas privačioje praktikoje. Jis labai naudingas siekiant nustatyti ar susikaupęs efuzinis skystis yra sukeltas FIP ar galimai kitos ligos. Teigiamą testo reakciją sukelia didelė baltymų, fibrino ir uždegiminių mediatorių koncentracija.

Bandymui atlikti yra naudojamas skaidrus vamzdelis (10 ml) pripildytas ~ 8 ml distiliuoto vandens į kurį įdedamas 1 lašas acto rūgšties (labai koncentruotas actas, 98 proc.), turinys gerai išmaišomas. Šio tirpalo paviršiuje kruopščiai yra paskirstomas 1 lašelis efuzinio skysčio. Rivalta bandymas yra neigiamas, jei efuzinio skysčio lašelis išnyksta, o tirpalas išlieka skaidrus. Jei lašas išlaiko savo formą, lieka prisitvirtinęs prie paviršiaus arba lėtai plūduriuoja link vamzdelio dugno (lašelio, medūzos pavidalo), bandymas apibrėžiamas kaip teigiamas (1.6. pav.). FIP atžvilgiu šis metodas pasižymi 91 proc. jautrumu ir 66 proc. specifiškumu. Teigiami rezultatai kartais gali būti užfiksuoti katėms sergančioms bakteriniu peritonitu ar limfoma. Tačiau tokį efuzinį skystį lengva atskirti atliekant mikroskopinius ar citologinius tyrimus, kurių metu yra nustatoma bakterijų kultūrą (Hartmann ir kt., 2003, Addie ir kt., 1990, 300–312 p.)



**1.6. pav.** Teigiamas Rivalta testo mėginys (Tasker ir kt., 2019).

### 1.7.3. PGR metodas

Atvirkštinės transkriptazės polimerazinė grandininė reakcija (angl. *RT-PCR*) yra greitas ir jautrus FCoV aptikimo metodas. FCoV nustatymui atlikti naudojami į genomo konservatyvius regionus nukreipti pradmenys: Pol (Escutenaire ir kt., 2007, Dye ir kt., 2008), 7b geną (Kennedy ir kt., 2008, Kiss ir kt., 2000), ir 3' netransliuojamą regioną (angl. *3'UTR*) (Sharif, ir kt., 2008, Duarte ir kt., 2009). Šių pradmenų naudojimas leidžia aptikti daugumą FCoV padermių (Benetka ir kt., 2004, Addie ir kt., 2003).

FCoV RNR aptikimui (RT-PCR metodu) gali būti naudojami audinių, efuzinių skysčių, kraujo, smegenų skysčio (angl. *CSF*) ar vandenyje esantys mėginiai. RNR yra labai jautrus degradacijai biopolimeras. Surenkant RNR mėginius iš audinių nevykdomas fiksavimas formalinu. Formalinas gali degraduoti tikslią RNR ir sumažinti PGR tyrimo jautrumą. Tyrimų tikslais imami mėginiai dažniausiai surenkami į specialius RNR konservavimo skysčius (Barker ir kt., 2017).

FCoV RNR aptikimas (ypač didelis kiekis) kraujyje, efuziniame skystyje, audiniuose, CSF ir (arba) vandeniniuose mėginiuose yra svarbus FIP diagnozavimo rodiklis. Tačiau FCoV RNR buvimas tiriamuosiuose mėginiuose neturėtų būti vienintelis kriterijus, pagal kurį nustatoma galutinė diagnozė (Barker ir kt., 2017).

FCoV RNR aptikimas išmatų mėginiuose vykdomas atliekant PGR tyrimą. Šio tipo tyrimas yra jautrus ir naudingas metodas naudojamas FCoV platinančių kačių sekimui. PGR signalo stiprumas išmatose koreliuoja su žarnyne esančiu viruso kiekiu. Šie rezultatai naudingi nustatant kates platinančias didelį viruso kiekį ir didinančias sveikų kačių užsikrėtimo riziką (Sharif ir kt., 2009).

#### **1.7.4. Histopatologija ir Imunohistocheminiai metodai**

Galutinė FIP diagnozė atliekama atlikus histopatologinius audinių tyrimus (kepenų, inkų, žarnų limfmazgių). Pagrindiniai FIP infekcijos požymiai – granuliomatoziniai mazgeliai vidaus organuose ir efuzinis skystis krūtinės ar pilvo ertmėje. Histopatologinių tyrimų rezultatams patvirtinti atliekami imunohistocheminiai metodai (angl. IHC), kurie nustato FCoV antigeną audinių mėginiuose (Gibson ir kt., 2007, Giordano ir kt., 2005).

### **1.8. FCoV gydymas**

FIP ligos eiga greitai progresuoja, o sergančių kačių mirtingumas pasireiškia beveik 100 proc. atvejų (Malbon ir kt., 2019). FCoV infekcijos plitimui sumažinti gyvūnai gali būti vakcinuojami. FIP sergančios katės nepagydomos. Taikomas simptominis gydymas, kuris sušvelnina ligos klinikinius požymius

FIP vakcinų kūrimo eigoje buvo atlikta daug nesėkmingų bandymų. Tikrinant vakcinų efektyvumą nustatyta, kad didžiąją sergančių gyvūnų dalį sudarė vakcinuotos katės. Šiuo metu yra sukurta viena vakcina, kurią galima įsigyti JAV ir kai kuriose Europos šalyse. Vakcina skiriama intranazaliai. Ją sudaro temperatūrai jautrus II tipo FCoV padermės (DF2) mutantas. Reikia pabrėžti, kad aplinkoje didesnę paplitimą sudaro I tipo korona virusai (Addie ir kt., 2001,

Addie ir kt., 2003). Atliktuose vakcinuotų kačių tyrimuose nenustati dažnesni FIP susirgimo atvejai, todėl galime teigti, kad sukurta vakcina yra saugi.

Atlikti vakcinacijos efektyvumo tyrimai yra nenuoseklūs. Pasiiekta vakcinuotų gyvūnų apsauga yra nuo 0 proc. iki 75 proc. (Hoskins ir kt., 1995, McArdle ir kt., 1995, Scott ir kt., 1995, Gerber ir kt., 1990). Vakcina neveiksminga katėms turėjusioms kontaktą su FCoV, dėl to jos naudojimas yra ribotas. Vakcinacijos veiksmingumas priklauso nuo katės amžiaus. Tačiau reikia pabrėžti, kad vakcina gali būti naudojama tik nuo 16 savaitės ir vyresnio amžiaus katėms. Dėl šių priežasčių vakcina dažniausiai nerekomenduojama.

Medikamentų naudojimas neapsaugo nuo FIP susirgimo, bet gali pagerinti gyvūno fizinę būklę. Mokslininkų atliktuose tyrimuose nustatyta, kad Chlorokvino vartojimas (maliarijai gydyti) slopina FIP viruso replikaciją, turi priešuždegiminį poveikį. Nudojant Chlorokviną katėm buvo stebimi geresni klinikiniai rezultatai. Tačiau dėl galimo toksinio poveikio, kurį rodo padidėjęs alanino aminotransferazių kiekis, šio vaisto naudojimas – ribotas. Ištirtas Ciklosporinas A blokuoja korona virusų dauginimąsi ląstelių kultūroje, tačiau jis nebuvo išbandytas in vivo. Nustatyta, kad imunosupresiniai vaistai (pvz.: kačių omega interferonas) buvo naudoti FIP pacientų gydymui, tačiau jų poveikis ribotas ir mažai ištirtas. Pastebėta, kad kačių gydymas Prednizolonu ir Ciklofosfamidu gali sumažinti FIP klinikinius simptomus, tačiau mažai pakeičia ligos eigą (Pedersen ir kt., 2015).

Dabartinės rekomenduojamos FIP sergančių kačių gydymo procedūros susijusios su gyvenimo kokybės gerinimu iki neišvengiamos mirties. Siekiant FIP ligos simptomų palengvinimo taikoma terapinė paracentezė (ištraukiamas pilvo ar kitose srityse susikaipęs efuzinis skystis) pilnavertė mityba, antibiotikai (siekiant išvengti antrinės bakterinės infekcijos). Sunkios anemijos atvejais atliekamas kraujo perpylimas. Terapijos taikymas gali pagerinti katės apetitą ir padėti priaugti netekto svorio. Tačiau iki šiol eutanazija yra vienintelis būdas siekiant apsaugoti katę nuo galimų kančių (Addie ir kt., 2009).

## **1.9. Apsaugos priemonės FCoV infekcijos suvaldymui**

Kontrolė yra efektyviausias ligos suvaldymo metodas, kuris gali užkirsti kelią FCoV infekcijos paplitimui. Infekcijos pašalinimui arba sumažinimui yra naudojamos kelios kontrolės strategijos. Aplinkos kontrolė yra plačiausiai naudojama priemonė, o geros higienos priemonės neatsiejama jos dalis (Dye ir kt., 2008).

FCoV ant įvairių paviršių (drabužių, žaislų, priežiūros įrankių), neturtingos aplinkos ar išmatų gali išgyventi iki 7 savaičių. Tinkamas valymas ir dezinfekavimas yra svarbus viruso

sunaikinimo būdas. Virusas gali būti inaktyvuojamas su dauguma buityje naudojamų dezinfekantų. Viena iš galimų dezinfekavimo priemonių yra natrio hipochlorito 1:32 tirpalas. Šis tirpalas ruošiamas tik naudojimo metu, apsaugant nuo neigiamo šviesos poveikio (Drechsler ir kt., 2011).

Aplinkos apsaugos ir rekomenduojamos geros higienos priemonės:

- Kačių kraiko dėžutės turi būti laikomos švarios ir išdėstytos atokiau nuo maisto ir vandens dubenėlių. Kiekvieną dieną išvaloma pašalinant išmatas. Visiškai išvaloma ir dezinfekuojama bent kartą per savaitę (Addie ir kt., 2009).
- Kačių skaičiaus mažinimas prieglaudose ir veislynuose, kuriuose vyrauja didelis kačių skaičius. Vienoje vietoje rekomenduojama laikyti ne daugiau kaip 2–5 kačių grupę. Šios grupės turėtų būti suskirstytos pagal amžių (kačiukai jaunesni nei 4 mėn. turėtų būti atskirti nuo suaugusių kačių) (MacLachlan ir kt., 2010).
- Ligos pasireiškimo dažnumą taip pat galima kontroliuoti atskiriant jaunos kačiukus, kuriems kyla infekcinė rizika užsikrėsti nuo motinos. Izolijuojant sergančias kates nuo sveikų individų (Lutz ir kt., 2002, MacLachlan ir kt., 2010).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

**Tyrimo vieta.** Tyrimai buvo atliekami Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute (NMVRVI), Virusologinių tyrumų skyriuje nuo 2017 metų sausio mėnesio iki 2019 metų gegužės mėnesio. Tyrimas atliktas laikantis Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų, patvirtintų Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 (Žin., 2012, Nr. 130-6595).

**Tyrimo objektas.** Tyrimo laikotarpiu IFA metodu FCoV atžvilgiu buvo ištirti 137 kačių kraujo serumo mėginiai, kurie buvo pristatyti į NMVRVI iš Lietuvos įvairių veterinarijos klinikų ir pavienių gyventojų auginančių kates.

**Tyrimo planavimas.** Katės suskirstomos į tiriamas grupes, pagal:

1. lytį (moteriškosios ir vyriškosios).
2. amžių (tiriamieji suskirstyti į 3 grupes: katės iki 2 metų amžiaus, vyresnės nei 2 metai katės ir vyresnės nei 10 metų katės).
3. veislę (sudarytos 2 grupės: mišrūnų ir veislinių kačių).
4. gyvenamąją vietą (sudarytos dvi grupės: naminės katės ir prieglaudoje auginamos katės).
5. sezoną (sudarytos 4 grupės: žiemos, pavasario, vasaros, rudens).

### 2.1. Medžiagos

**Tyrimui naudoti reagentai ir cheminės medžiagos:**

- Plovimo tirpalas (prieš naudojimą praskiedžiamas 20 kartų)
- TMB substrato tirpalas
- Ribinė kontrolė
- Teigiama kontrolė
- Neigiama kontrolė
- FCoV konjugatas
- Reakcijos sustabdymo tirpalas
- Virkon S – dezinfekcinis tirpalas (1 proc.)
- Teigiama kontrolė (sausai šaldyta), atskiesta laikoma - 25 °C (± 5 °C) temperatūroje
- Neigiama kontrolė (sausai šaldyta), atskiesta laikoma - 25 °C (± 5 °C) temperatūroje
- Plovimo tirpalas (prieš naudojimą praskiedžiamas 200 kartų)
- Substrato tirpalas „A“

- Substrato tirpalas „B“

### **Įrenginiai ir nustatyti parametrai:**

- Spektrofotometras (automatinis mikroplokštelių analizatorius): 650 nm/450 nm
- Centrifuga: 1000 aps./min – 2000 aps./min.
- Termostatas: + 37°C ±3°C, + 18°C – + 26°C temperatūra
- Skyčių purtyklė.
- Šaldytuvas + 5 °C (±3 °C) temperatūra
- Šaldiklis - 25 °C (±5 °C) temperatūra

## **2.2. Metodas**

Kačių korona viruso diagnostika buvo atliekama pritaikant kokybinės imunofermentinės analizės (IFA) techniką, kuri leidžia identifikuoti kačių korona viruso antikūnus (Ak) individualiuose kačių kraujo serumo ir pilvo ertmės skysčio mėginiuose.

### **Naudoti rinkiniai:**

1. EVL (angl. *European Veterinary Laboratory*, Nyderlandai).
2. NovaTec (Immunodiagnostica GmbH, Vokietija), pradėtas naudoti nuo 2018 metų lapkričio mėnesio.

### **2.2.1. Imunofermentinė analizė**

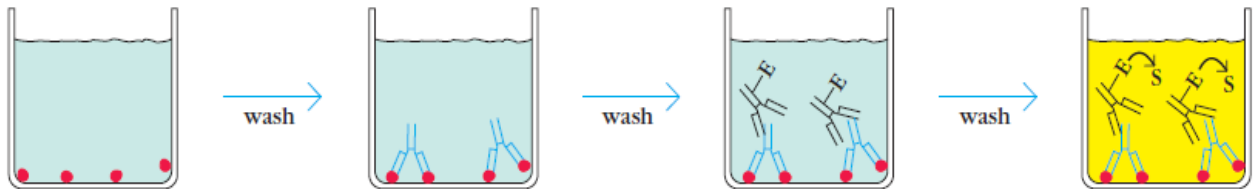
#### **Veikimo principas:**

FCoV Ak nustatymui yra naudojama neteisioginės imunofermentinės analizės technika (2.1. pav.), kuriai naudojamos mikroplokštelės duobutės padengtos FCoV specifiniu antigenu (glikoproteinais).

Tyrimo metu testuojami mėginiai yra atskiedžiami ir inkubuojami duobutėse, kuriose esantys specifiniai FCoV antikūnai sudaro FCoV antikūnų imuno–koleksą ir pasilieka surišti mikroplokštelės duobutėse. Su FCoV specifiniu antigenu nesusijungęs antikūnų perteklius išplaunamas. Po šulinėlių plovimo į duobutes įpilama HRP žymėto konjugato tirpalo, kuris prisijungia prie specifinių FCoV antikūnų. Neprisijungęs HRP žymėto konjugato tirpalo perteklius išplaunamas. Pakartotinai praplovus į šulinėlius pilamas substratas (TMB ir peroksido mišinys). Peroksidazė skaido peroksidą ir katalizuoja tetrametilbenzidino oksidaciją bei, atitinkamai spalvos pasikeitimą. Jei tiriamajame serume yra antigenui specifinių antikūnų,

šulinėlio reakcijos spalva tampa mėlyna. Sustabdžius fermentinę reakciją (0,2 M sieros rūgšties tirpalu) šulinėlių spalva tampa geltona.

Spalvos intensyvumas yra proporcingas antikūnų koncentracijai tiriamajame mėginyje (kuo didesnis intensyvumas, tuo didesnė FCoV antikūnų koncentracija mėginyje; kuo mažesnis spalvos intensyvumas, tuo mažesnė mėginio Ak koncentracija, tuo daugiau iš rinkinio prisijungusių su fermentu surištų antikūnų), kuri matuojama automatinio mikroplokštelių analizatoriumi (spektrofotometru).



**2.1. pav.** Imunofermentinės analizės (angl. ELISA) tyrimo schema.

### Mėginių paruošimas

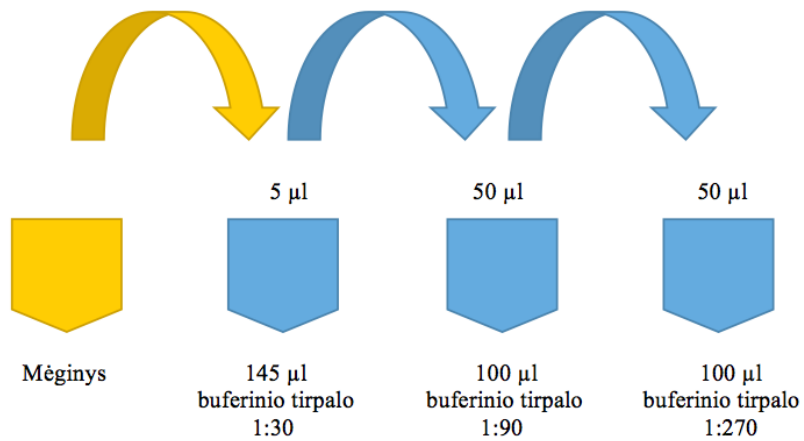
Kraujo mėginys surenkamas į mėgintuvėlius be antikoagulianto. Surinktas kraujo mėginys paliekamas netrikdomai kambario temperatūroje (15 min. – 30 min.), leidžiant kraujui sukrešėti. Krešulys pašalinamas centrifuguojant 1000 aps./min – 2000 aps./min, 10 minučių šaldomoje centrifūgoje. Gautas supernatantas vadinamas serumu. Po centrifugavimo svarbu skystą komponentą (serumą) nedelsiant perkelti į švarų polipropileno mėgintuvėlį, naudojant pastero pipetę. Tyrimo metu mėginiai turi būti laikomi + 2 °C – + 8 °C temperatūroje.

### Pasiruošimas tyrimui (EVL)

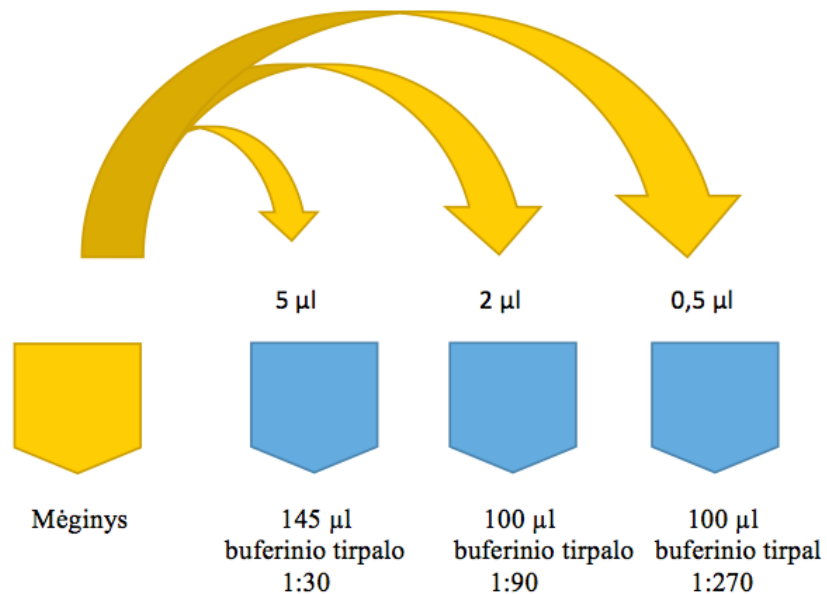
Prieš naudojimą visi reagentai palaikomi 15 min. + 18 °C – + 26 °C temperatūroje tamsioje vietoje. Atskiedžiamas koncentruotas (200 ×) plovimo tirpalo buteliukas su 3980 ml distiliuoto vandens. Šis tirpalas yra vadinamas „Plovimo tirpalu“. Į visas duobutes įpilama po 250 µl atskiesto „Plovimo tirpalo“, tada iškratoma ir kartojama dar 4 kartus. Po paskutinio plovimo mikroplokštelė nusausinama absorbuojančiu popieriumi, taip pašalinant „Plovimo tirpalo“ likučius.

Naudojant rinkinį pirmą kartą, teigiama kontrolė atskiedžiama su 0,5 ml distiliuoto vandens, o neigiama kontrolė atskiedžiama su 1,0 ml distiliuoto vandens, tuomet išpilstoma į šaldomuosius mėgintuvėlius ir laikoma - 25 °C (±5 °C) temperatūroje.

Atskiroje mikroplokštelėje atliekami kontrolių (neigiamos, teigiamos) ir tiriamųjų mėginių 3 kartiniai skiedimai, pradedant santykiu 1:30, tuomet 1:90, 1:270 (2.2. pav. arba 2.3. pav.).



**2.2. pav.** Pirmas skiedimo būdas (mėginių ir kontrolių).



**2.3. pav.** Antras skiedimo būdas (mėginių ir kontrolių).

### Procedūra

1. Į paruoštą (išplautą) rinkinio mikroplokštelę įpilama po 100 µl buferinio tirpalo (BI) (į A1, A2, A3 duobutes).
2. Į mikroplokštelę perkeliama po 100 µl atskiestų kontrolių (neigiamą ir teigiamą) ir tiriamųjų serumų (2.4. pav.)
3. Mikroplokštelė uždengiama (dangteliu, aliuminio folija ar lipnia juosta) ir paliekama inkubuotis 1 valandą + 37 °C (± 1 °C) temperatūroje.



	1:30	1:90	1:270	1:30	1:90	1:270	1:30	1:90	1:270	1:30	1:90	1:270
A	Bl.	Bl.	Bl.									
B	N	N	N									
C	T	T	T									
D	1	1	1									
E	2	2	2									
F	3	3	3									
G	...											
H												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Bl. – duobutės su buferiniu tirpalu  
 N – neigiama kontrolė  
 T – teigiama kontrolė  
 1 – Mėginys Nr. 1  
 2 – Mėginys Nr. 2  
 3 – Mėginys Nr. 3  
 4 – .....

**2.4. pav.** Kontrolių ir mėginių išpilstymas mikroplokštelėje.

4. Mikroplokštelės turinys iškratomas rankiniu būdu, mikroplokštelė plaunama į visas duobutes įpilant po 250 µl atskiesto „Plovimo tirpalo“. Mikroplokštelė iškratoma, plovimas kartojamas dar 4 kartus. Po paskutinio plovimo mikroplokštelė nusausinama absorbuojančiu popieriumi, taip pašalinant „Plovimo tirpalo“ likučius.
5. Į kiekvieną mikroplokštelės duobutę išpilstoma po 100 µl HRPO anti-rūšinių antikūnų konjugato.
6. Mikroplokštelė uždengiama (dangteliu, aliuminio folija ar lipnia juosta) ir paliekama inkubuotis 1 valandą + 37 °C (± 1 °C) temperatūroje.
7. Mikroplokštelės turinys iškratomas rankiniu būdu ir plaunamas į visas duobutes įpilant po 250 µl atskiesto „Plovimo tirpalo“. Mikroplokštelė iškratoma, plovimas kartojamas dar 4 kartus. Po paskutinio plovimo mikroplokštelė nusausinama absorbuojančiu popieriumi, taip pašalinant „Plovimo tirpalo“ likučius.
8. Lygiomis dalimis sumaišomas substrato „A“ tirpalas su substrato „B“ tirpalu (3 eilutėms: „A“ 1,5 ml + „B“ 1,5 ml). Švelniai papurtoma ir išpilstoma po 100 µl į kiekvieną mikroplokštelės duobutę.
9. Mikroplokštelė paliekama inkubuotis 10 min. – 13 min. + 18 °C – + 26 °C temperatūroje tamsioje vietoje.
10. Į kiekvieną mikroplokštelės duobutę išpilstoma po 50 µl „STOP“ tirpalo.
11. Rezultato nuskaitymas atliekamas per 10 min. po reakcijos sustabdymo.
12. Optinis tankis mikroplokštelės duobutėse nuskaitymas naudojant automatinį mikroplokštelių analizatorių, matuojant su 450 nm ilgio bangos filtru.
13. Vertinamas kiekvieno mėginio titras (1:30, 1:90, 1:270) pagal optinio tankio reikšmes.

Rezultatų skaičiavimas:

Mėginys yra teigiamas, jei  $MOT_{450} > 2,5 \times NKOT_{450}$  (skiedime 1:30).

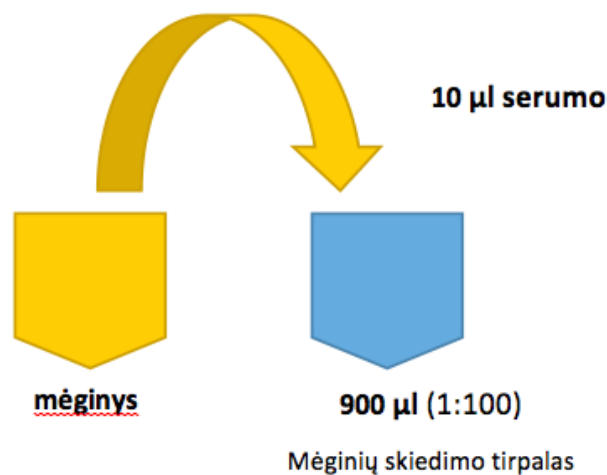
Kiekybinio antikūnų tyrimo rezultatai yra vertintini, kai:

Neigiamos kontrolės  $OT_{450}$  dydis yra  $\leq 0,400$ , titro pabaigos taškas  $\leq 1:30$  skiedime.

Teigiamos kontrolės  $OT_{450}$  dydis yra  $\geq 0,800$ , titro pabaigos taškas  $\geq 1:270$  skiedime.

### Pasiruošimas tyrimui (NovaTec)

Prieš naudojimą visi reagentai palaikomi apie 30 min + 18 °C – + 26 °C temperatūroje tamsioje vietoje. Atskiedžiamas reikiamas kiekis koncentruoto (20×) plovimo tirpalo (pvz.: 10 ml plovimo tirpalo + 190 ml distiliuoto vandens). Taip paruoštas tirpalas yra vadinamas “Plovimo tirpalu”. Atskirame mėgintuvėlyje atliekami tiriamųjų mėginių skiedimai (1:100): 10 µl mėginys sumaišomas su 900 µl buferinio tirpalo pagal 2.5. paveiksle nurodytą schemą (kruopščiai sumaišoma naudojant skysčių purtyklę).



**2.5. pav.** Tiriamųjų mėginių ir kontrolių skiedimo schema.

### Procedūra

1. Į rinkinio plokštelės šulinėlius po 100 µl išpilstomos kontrolės ir praskiesti (1:100) mėginiai (pav. 2.6. arba 2.7). Šulinėlis A1 arba A1 + A2 paliekamas substratui (TMB) tuščias.
2. Mikroplokštelė uždengiama (aliuminio folija ar lipnia juosta, pateikta kartu su rinkiniu) ir inkubuojama + 37 °C ( $\pm 1$  °C) temperatūroje apie 1 val. ( $\pm 5$  min.).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bl.	2										
B	NK	3										
C	RK	3										
D	RK	4										
E	TK	4										
F	1	5										
G	1	ir t.t										
H	2	...										

Bl – tuščias  
 NK – neigiama kontrolė  
 TK – teigiama kontrolė  
 RK – Cut off kontrolė  
 1 – Mėginys Nr. 1  
 2 – Mėginys Nr. 2

2.6. pav. Kontrolių ir mėginių išpilstymo mikroplokštelėje schema.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bl.	Bl.	ir t.t	ir t.t								
B	NK	NK	...	...								
C	RK	RK										
D	TK	TK										
E	1	1										
F	2	2										
G	3	3										
H	4	4										

Bl – tuščias  
 NK – neigiama kontrolė  
 TK – teigiama kontrolė  
 RK – Cut off kontrolė  
 1 – Mėginys Nr. 1  
 2 – Mėginys Nr. 2

2.7. pav. Kontrolių ir mėginių išpilstymo mikroplokštelėje schema.

3. Mikroplokštelės turinys iškratomas rankiniu arba automatinio būdu.
4. Mikroplokštelės šulinėliai pripildomi “Plovimo tirpalu” po 300 µl. Mikroplokštelė iškratoma rankiniu arba automatinio būdu. Plovimas kartojamas dar 2 kartus (viso 3 plovimai). Plovimas tarp kiekvieno ciklo turėtų būti > 5 s. Blogai išplauta plokštelė gali parodyti aukštesnius OT.
5. Į visus šulinėlius išpilstoma po 300 µl FCoV konjugato, išskyrus A1 ar A1 + A2.
6. Mikroplokštelė uždengiama (aliuminio folija ar lipnia juosta, pateikta kartu su rinkiniu) ir inkubuojama + 18 °C – + 26 °C tamsoje apie 30 min.
7. Mikroplokštelės šulinėliai pripildomi “Plovimo tirpalu” po 300 µl. Mikroplokštelė iškratoma rankiniu arba automatinio būdu. Plovimas kartojamas dar 2 kartus (viso 3 plovimai).
8. Į kiekvieną mikroplokštelės duobutę išpilstoma po 100 µl TMB substrato tirpalo.
9. Mikroplokštelė uždengiama (dangteliu) ir inkubuojama + 18 °C – + 26 °C temperatūroje tamsoje apie 15 min.

10. Į kiekvieną mikroplokštelės duobutę išpilstoma po 50 µl „STOP“ tirpalo.
11. Rezultatų nuskaitymas atliekamas per 30 min. po reakcijos sustabdymo.
12. Optinis tankis mikroplokštelės duobutėse nuskaitymas naudojant automatinį mikroplokštelių analizatorių, 450/620 nm ilgio bangos filtru.
13. Patikrinami rinkinio kontrolių patvirtinimo kriterijai (jeigu nors vienas kriterijus neatitinka, tyrimą reikia kartoti) (2.1. lentelė).

**2.1. lentelė.** Kontrolių patvirtinimo kriterijai.

Mikroplokštelių duobutės		Absorbcijos vertė
B1 su TMB tirpalu	A1 arba A1 + A2	< 0,100
NK	B1 arba B1 + B2	< 0,200 ir RK-cut-off
RK	C1 + D1 arba C1 + C2	0,150 – 1,30
TK	E1 arba E1 + E2	> RK

Rezultatų skaičiavimas:

Ribinis absorbcinis vidurkis (RK) nustatomas apskaičiavus ribinę kontrolių (RK) vertę.

Pvz.:  $RK\ 0,39 + 0,37 = 0,38$

Rezultatai verčiami į NTU (angl. Nova Tec Units) vienetus (2.5. lentelė).

$$\frac{\text{Mėginio OT (vidurkis)} \times 10}{RK} = \text{NovaTec Units (NTU)}$$

$$\text{Pvz.: } \frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU (angl. Units)}$$

**2.2. lentelė.** Rezultatų vertinimas pagal pateiktas reikšmes.

Rezultatas	NTU	Interpretacija
Teigiamas	> 11	Mėginyje aptikti antikūnai prieš patogeną
Įtariamasis	9 – 11	Neaiškus antikūnų aptikimas prieš patogeną. Rekomenduojama tyrimą pakartoti po 2 sav. – 4 sav., paėmus naują mėginį. Jeigu ir vėl rezultatai tokie patys, mėginys vertinamas, kaip neigiamas
Neigiamas	< 9	Mėginyje antikūnų prieš patogeną neaptikta

Rezultatai laikomi patikimais, kai  $B1_{OT450} < 0,100$ ,  $NK_{OT450} < 0,200$  ir  $NK < B1$ ,  $TK_{OT450} > RK_{OT450}$  ( $RK_{OT450}$  absorbcijos vertė nuo 0,150 – 1,30).

### **2.3. Statistinis duomenų apdorojimas**

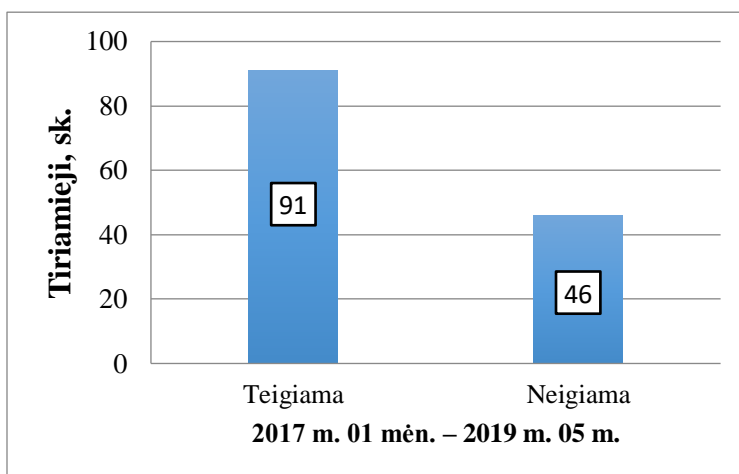
Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojantis SPSS 25 (Statistical Package for the Social Sciences) programą ir Microsoft Exel skaičiuoklę.

Kokybinių duomenų 2 nepriklausomų grupių palyginimui buvo naudotas  $\chi^2$  kriterijus (angl. *Chi-square tests*). Yra apskaičiuojamas ligos pasireiškimų dažnis (seroteigiami ir seroneigiami gyvūnai), procentinė dalis ir statistinis reikšmingumas tarp grupių. Skirtumai tarp grupių laikyti statistiškai reikšmingi, kai  $p < 0,05$ .

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. Kačių korona viruso pasireiškimo įvertinimas

Tyrimo metu išanalizuoti 137 kačių tyrimo rezultatai. Nustatyta, kad didžioji mėginių dalis (66 proc.) yra seroteigiami, turi specifinių antikūnų prieš FCoV. Seroneigiamų rezultatų dalis kur kas mažesnė (34 proc.) (3.1. pav.). Tirtų rizikos faktorių aprašomosios statistikos rezultatai pateikiami 3.1. lentelėje. p reikšmė rodo atlikto tyrimo statistinį patikimumą, kurio pagalba galime pagrįstai atmesti klaidingą hipotezę. Kai  $p > 0,05$  iškelta hipotezė laikoma statistiškai nereikšminga ir atmetama,  $p < 0,05$  rodo, kad yra maža tikimybė, jog nustatytas skirtumas buvo tik atsitiktinumas.



**3.1. pav.** Kačių korona viruso sergamumo pasireiškimas nuo 2017 metų sausio mėnesio iki 2019 metų gegužės mėnesio.

**3.1. lentelė.** Statistiniai rizikos faktorių rezultatai.

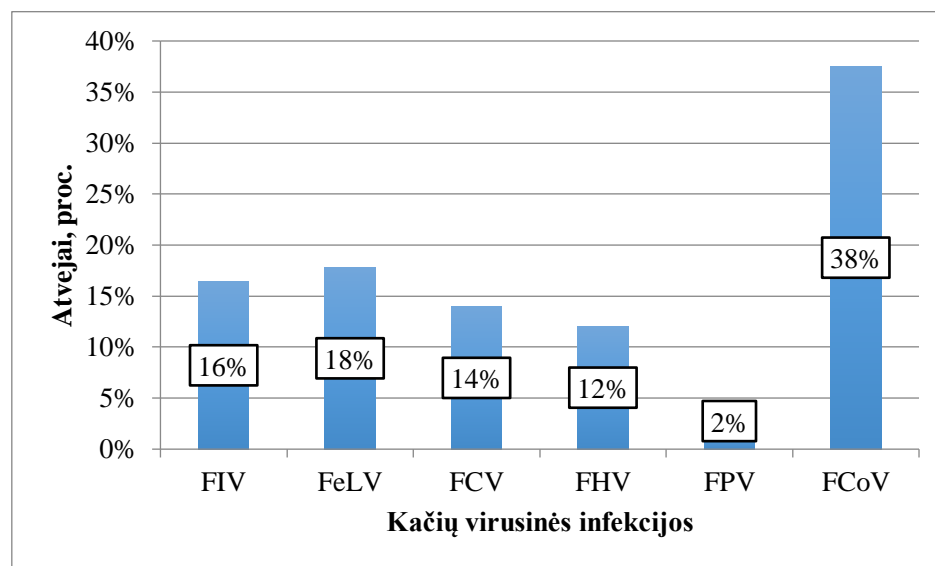
Rizikos faktoriai	P reikšmė
Lytis	0,509
Amžius	0,269
Veislė	0,489
Vieta	0,491
Sezonas	0,102

#### 3.2. Kačių korona viruso tyrimų aktualumas

Nuo 2017 metų sausio mėnesio iki 2019 metų gegužės mėnesio buvo atlikti 365 virusinių infekcijų tyrimai. Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute, Virusologinių tyrimų skyriuje atliekami šie virusologiniai tyrimai: panleukemijos viruso (angl. *FPV*), kačių

herpes viruso (angl. *FHV*), kačių kalici viruso (angl. *FCV*), kačių imunodeficitu viruso (angl. *FIV*), kačių leukemijos viruso (angl. *FeLV*), kačių korona viruso (FCoV) tyrimai.

Didžiąją tyrimų dalį sudarė kačių korona viruso tyrimai (137). Panašiu dažnumu pasižymėjo kačių herpes viruso (atlikti 44 tyrimai), kačių kalici viruso (atlikti 51 tyrimai), kačių imunodeficitu viruso (atlikti 60 tyrimų) ir kačių leukemijos viruso (atlikti 65 tyrimai) diagnostiniai tyrimai. Kačių panleukemijos viruso tyrimai sudarė mažiausią atliktų tyrimų dalį (atlikti 8 tyrimai). Atliktų tyrimų dažnio pasiskirstymas rodo, kad kačių korona viruso tyrimai yra vieni iš paklausiausių Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute, Virusologinių tyrimų skyriuje, lyginant su kitomis kačių virusinėmis infekcijomis (3.2. pav).



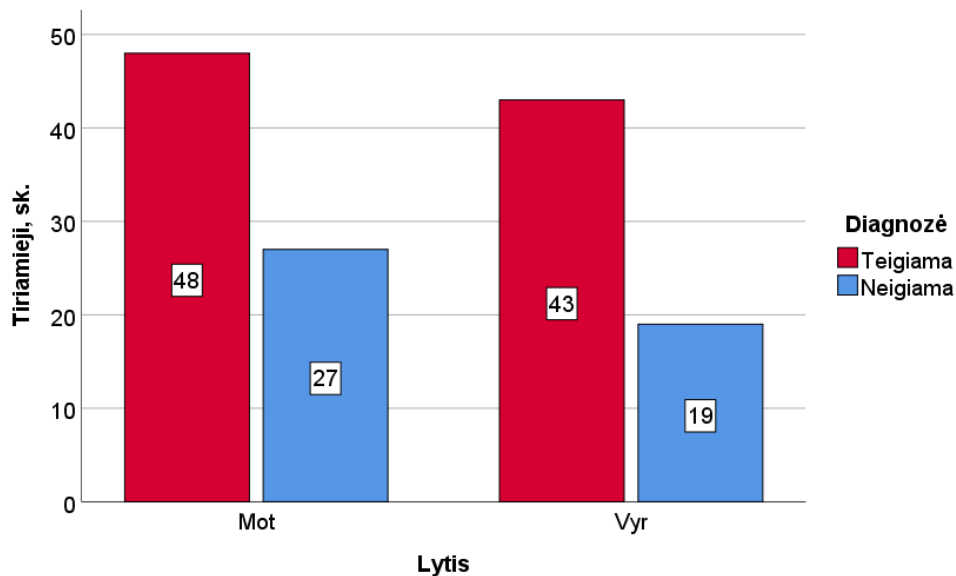
**3.2. pav.** Kačių virusinių infekcijų tyrimų dažnis Nacionaliaame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute, Virusologinių tyrimų skyriuje.

### 3.3. FCoV pasireiškimas pagal lytį

Buvo vertinama kačių korona viruso pasireiškimo priklausomybė pagal lytį. Sudarytos dvi grupės, kurias sudarė moteriškosios ir vyriškosios lyties atstovai.

Ištyrus 75 moteriškosios lyties kates, 64 proc. kačių buvo diagnozuotas korona virusas. 36 proc. (iš 75 individų skaičiaus) kačių tyrimai buvo neigiami. Iš 62 vyriškosios lyties kačių teigiama diagnozė pasireiškė 69,4 proc. individų. 30,6 proc. (iš 62 gyvūnų) vyriškosios lyties kačių nebuvo diagnozuotas korona virusas.

Kadangi  $p > 0,05$  galima teigti, kad tyrimas – nereikšmingas. Nėra reikšmingo ryšio tarp lyties ir FCoV pasireiškimo (3.3. pav.).



**3.3. pav.** Kačių FCoV sergamumo priklausomybė pagal lytį.

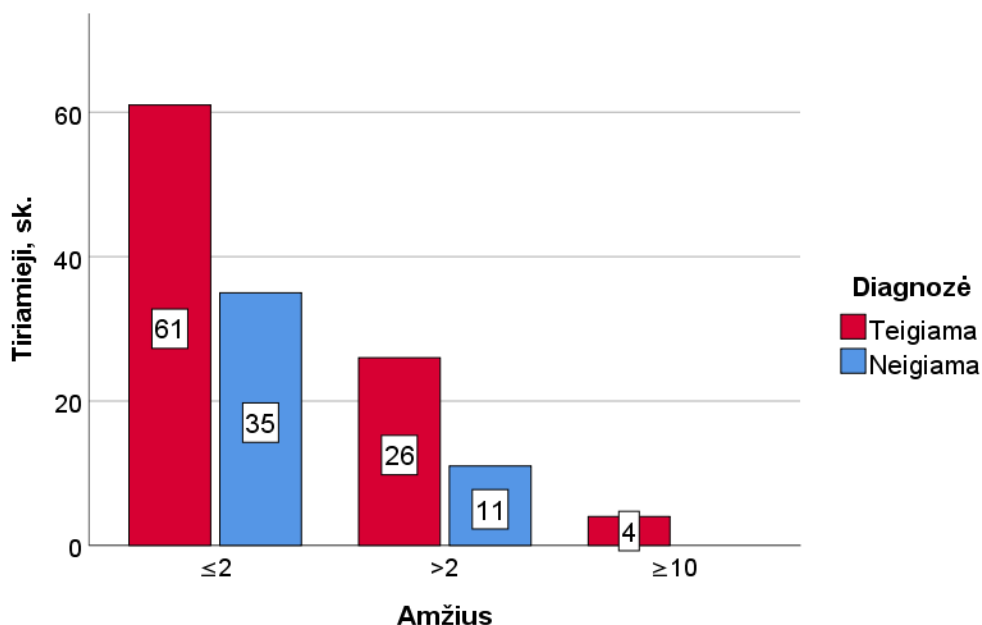
### **3.4. FCoV pasireiškimas pagal amžiaus grupes**

Buvo vertinama kačių korona viruso pasireiškimo priklausomybė pagal amžiaus grupes. Ištirtų gyvūnų amžius svyravo nuo 2 mėnesių iki 15 metų. Grupes sudarė:  $\leq 2$  metų – jauni gyvūnai,  $> 2$  metų – vidutinio amžiaus katės,  $\geq 10$  metų – senos katės.

Didžiąją dalį tirtų gyvūnų sudarė jaunos katės (70 proc.). Tyrimo metu nustatyta, kad pirmoje grupėje, kurioje vyravo jauni gyvūnai, 63,8 proc. (iš 96 kačių) teigiamai diagnozuota korona virusinė infekcija. 36,5 proc. (iš 96 individų skaičiaus) kačių nesirgo. Antroje grupėje – vidutinio amžiaus katės, iš 37 individų 70,3 proc. užfiksuoti teigiami korona viruso rezultatai. 29,7 proc., antros grupės, sudarė sveikos katės. Ištyrus trečiąją grupę, senas kates – 100 proc. buvo teigiamai diagnozuotas korona virusas. Trečioje kačių grupėje sveikų kačių neaptikta.

Kadangi  $p > 0,05$ , galima teigti, kad tyrimas – nereikšmingas. Nėra reikšmingo ryšio tarp amžiaus ir FCoV pasireiškimo (3.4. pav.).





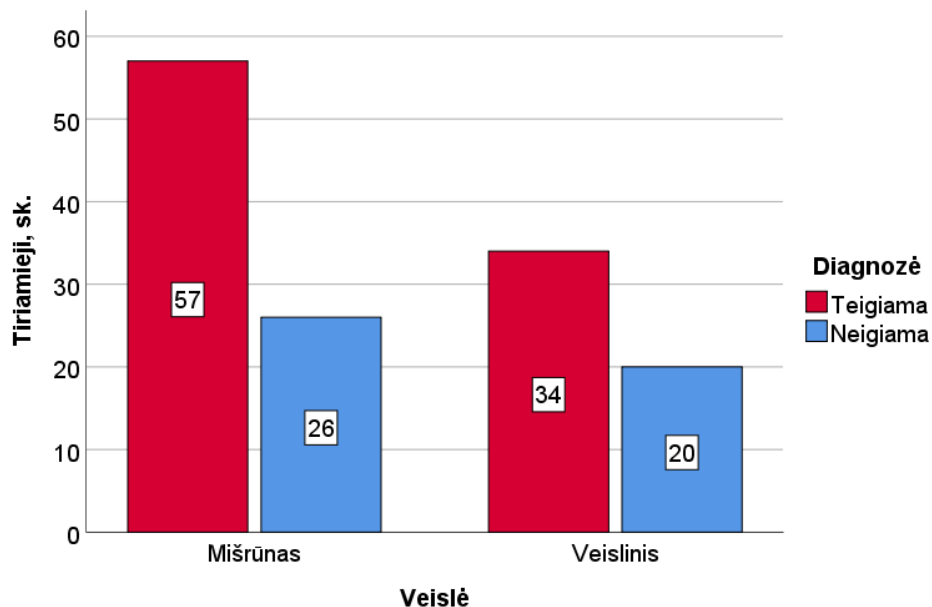
**3.4. pav.** Kačių FCoV sergamumo priklausomybė pagal amžiaus grupes.

### 3.5. FCoV pasireiškimas pagal veislę

Buvo vertinama kačių korona viruso pasireiškimo priklausomybė pagal veislę. Gyvūnų veislė buvo suskirstyta į dvi grupes: veislinės katės ir mišrūnai.

Didžiąją dalį tirtų gyvūnų sudarė mišrūnai (66,6 proc.). Tyrimo metu nustatyta, kad mišrūnų tarpe 68,7 proc. (iš 83 tirtų gyvūnų) sirgo korona virusu. 31,3 proc. (iš 83 tirtų individų) gyvūnų nebuvo diagnozuota korona virusinė infekcija. Veislinių kačių tarpe buvo ištirtos 54 katės, iš kurių 63 proc. individų diagnozuotas kačių korona virusas. 37 proc. (iš 54 tirtų gyvūnų) ištirtųjų nebuvo diagnozuotas korona virusas.

Kadangi  $p > 0,05$ , galima teigti, kad tyrimas – nereikšmingas. Nėra reikšmingo ryšio tarp veislės ir FCoV pasireiškimo (3.5. pav.).



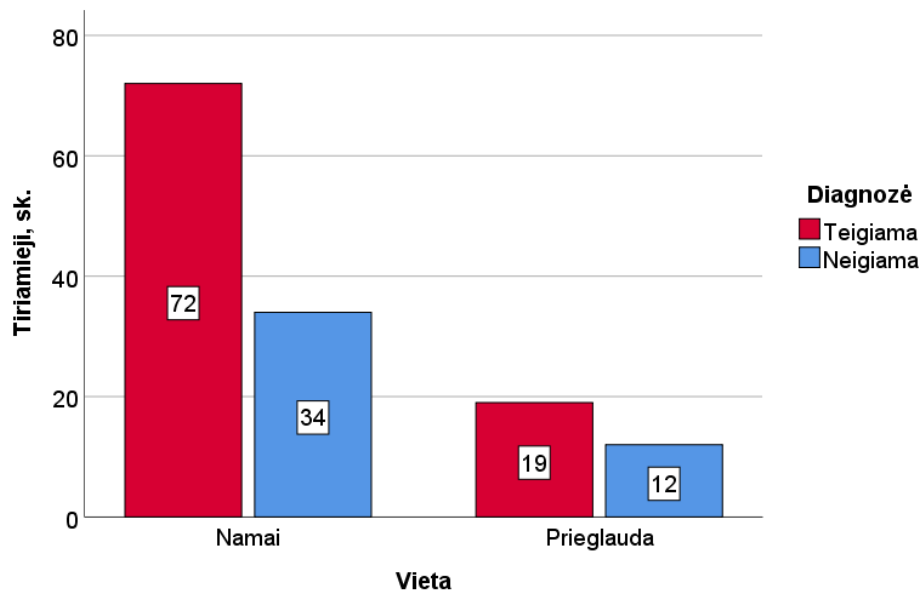
**3.5. pav.** Kačių FCoV sergamumo priklausomybė pagal veislę.

### **3.6. FCoV pasireiškimas pagal laikymo vietą**

Buvo vertinama kačių korona viruso pasireiškimo priklausomybė pagal laikymo vietą. Sudarytos dvi grupės, kurias sudarė katės auginamos namuose (viena arba kelios katės) ir prieglaudoje (su dideliu skaičiumi kačių).

Didžiąją dalį tirtų gyvūnų sudarė katės auginamos namuose (77,4 proc.). Tyrimo metu nustatyta, kad iš 106 namuose auginamų kačių 67,9 proc. serga kačių korona virusu. Šie rezultatai parodo gana neįprastai aukštą namuose laikomų kačių sergamumą. 32,1 proc. (iš 106 tirtų individų) namuose laikomų kačių nesirgo kačių korona virusine infekcija. Prieglaudoje laikomų kačių tyrimai sudarė itin mažą dalį tirtų gyvūnų skaičiaus (22,6 proc.). Iš 31 mėginio kačių korona virusine infekcija sirgo 61,3 proc. individų. 38,7 proc. (iš 31 tirtų mėginio) kačių užfiksuoti seroneigiami rezultatai.

Kadangi  $p > 0,05$ , galima teigti, kad tyrimas – nereikšmingas. Nėra reikšmingo ryšio tarp kačių laikymo vietos ir FCoV pasireiškimo (3.6. pav.).



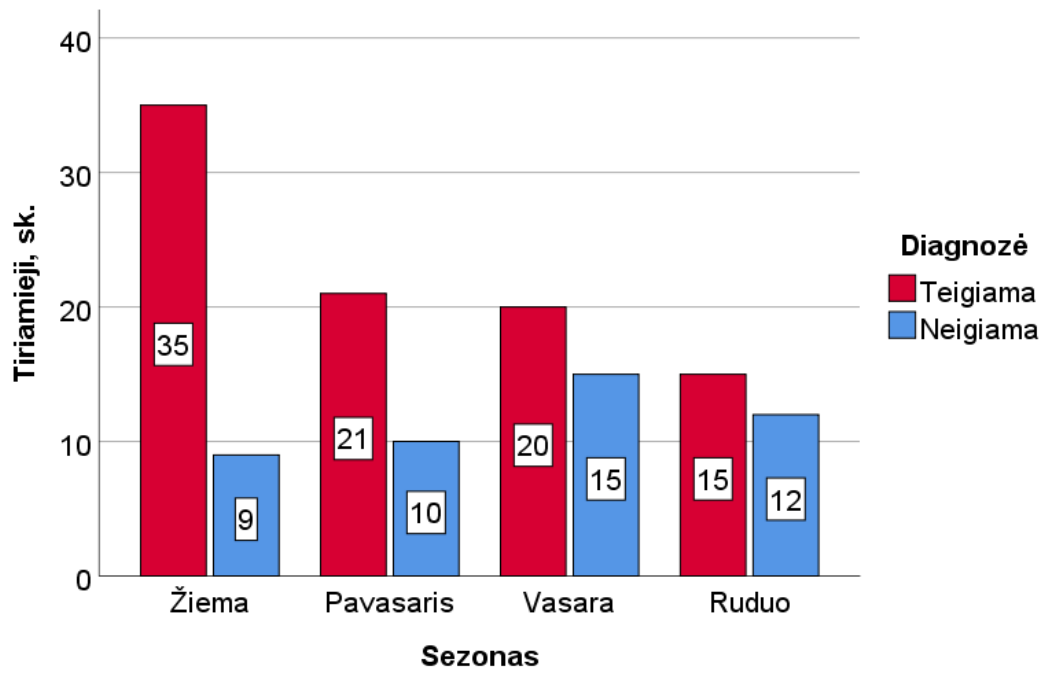
**3.6. pav.** Kačių FCoV sergamumo priklausomybė pagal laikymo vietą.

### **3.7. FCoV pasireiškimas pagal sezoniškumą**

Buvo vertinama kačių korona viruso pasireiškimo priklausomybė pagal sezoniškumą. Sudarytos keturios tiriamųjų grupės priklausomai kuriuo metų laiku buvo atliktas diagnostinis tyrimas (žiemos, pavasario, vasaros, rudens).

Dižiausias tyrimų atlikimo dažnis užfiksuotas žiemos laikotarpiu (32 proc.). Tyrimo metu, žiemos laikotarpiu, nustatyta, kad iš 44 tirtų kačių 79,5 proc. buvo diagnozuotas kačių korona virusas. 20,5 proc. (iš 44 individų) kačių nesirgo korona virusu. Pavasario laikotarpiu iš 31 tirtos katės seroteigiamų rezultatų dalį sudarė 67,7 proc gyvūnų. 32,3 proc. kačių (iš 31 atvejo) neaptikta korona virusinė infekcija. Vasaros laikotarpiu iš 35 kačių 57,1 proc. tiriamųjų buvo užsikrėtę korona virusu. 42,9 proc. (iš 35 individų) gyvūnų buvo užregistruoti seroneigiami ligos rezultatai. Rudens laikotarpiu nustatyta, kad iš 27 tirtų kačių mėginių 55,6 proc. gyvūnų sirgo korona virusu. 44,4 proc. tirtų kačių nenustatytas korona virusas.

Kadangi  $p > 0,05$ , galima teigti, kad tyrimas – nereikšmingas. Nėra reikšmingo ryšio tarp sezono ir FCoV pasireiškimo (3.7. pav.).



**3.7. pav.** Kačių FCoV sergamumo priklausomybės tyrimai pagal sezoną.

#### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

**Sergamumas.** Nuo 2017 metų sausio mėnesio iki 2019 metų gegužės mėnesio atlikti tyrimai ir gauti rezultatai parodė, kad FCoV infekcija yra plačiai paplitusi tirtose kačių populiacijose. 66 proc. kačių yra užsikrėtusios kačių korona virusu. Atskleistas viruso paplitimo mastas parodo vakcinų ir tinkamų viruso valdymo būdų poreikį Lietuvos kačių populiacijoje.

**Pasiskirstymas pagal lytį.** Tiriant FCoV priklausomybę nuo lyties buvo ištirta 45,3 proc. vyriškosios lyties ir 54,3 proc. moteriškosios lyties kačių. Seroteigiamai diagnozuota 64 proc. moteriškosios lyties kačių ir 69,4 proc. vyriškosios lyties kačių. Atlikus statistinę analizę nebuvo aptiktas reikšmingas skirtumas tarp lyties ir FCoV pasireiškimo. Šie rezultatai rodo, kad bet kokie su lytimi susiję skirtumai neturi didelės įtakos FCoV išsivystymui. Gautus rezultatus patvirtina ir kitų mokslininkų, Bell ir kt. (2006), Ariani ir kt. (2019), Cave ir kt. (2004) atlikti serologiniai tyrimai. Kitų autorių duomenimis dažnesnis FIP susirgimų skaičius diagnozuotas vyriškosios lyties katėms (Robison ir kt., 1971, Rohrbach ir kt., 2001, Pesteanu-Somogyi ir kt., 2006, Kate ir kt., 2012). Šie rezultatai siejami su gyvūno reprodukcija. Teigiama, kad nekastruoti individai turi didesnę riziką užsikrėsti FCoV, dėl galimybės patekti į lauką. Šiuo atveju patiria didesnę streso lygį (kovoje dėl patelių ar teritorijos) ir galimai tampa imlesni FIP.

**Pasiskirstymas pagal amžių.** Tiriant FCoV paplitimą pagal amžiaus grupes, buvo ištirtas didelis jaunų kačiukų (nuo 2 mėnesių iki 3 metų amžiaus), skaičius (70,1 proc. visų tirtų mėginių). Teigiama diagnozė nustatyta 63,8 proc. jauniems gyvūnams, 70,3 proc. vidutinio amžiaus katėms ir 100 proc. senoms katėms. Amžius laikomas svarbiu FIP išsivystymo rizikos veiksniu (Yunjeong ir kt., 2016). Nors katės kačių korona virusu gali užsikrėsti visų amžiaus grupių, tačiau dažniausiai FIP išsivysto katėms nuo 3 mėnesių iki 3 metų amžiaus. 10 metų ir vyresnio amžiaus katės, dėl susilpnėjusios imuninės sistemos, taip pat priskiriamos prie šios rizikos grupės (Addie ir Jarrett, 2006, Rottier ir kt., 2005, Pedersen ir kt., 2014, Botucatu ir kt., 2019). Atlikto tyrimo rezultatai neparodo jokių reikšmingų skirtumų pagal atitinkamas amžiaus grupes, kurias analizavome. Tai reiškia, kad katės, tirtose populiacijose, turi vienodą galimybę užsikrėsti FCoV. Tokius pačius rezultatus parodė ir Bell ir kt. (2007) atliktas tyrimas. Tačiau tokie rezultatai gali būti dėl mažo mėginių skaičiaus, iš atitinkamos amžiaus grupės arba tinkamas prieglaudoje auginamų kačių valdymas (pvz.: jaunų kačiukų atskyrimas nuo galimai FCoV nešiojančios katės). Kitų mokslininkų atliktuose tyrimuose (Kate ir kt., 2012, Norris ir kt., 2005, Foley ir kt., 1997, Rohrbach ir kt., 2001, Pesteanu-Somogyi ir kt., 2006, Kass ir Dent,

1995) didžiausias sergamumas nustatytas katėms nuo 2 mėnesių iki 3 metų amžiaus. Akkan ir Karaca (2009) ir Ariani ir kt., (2019) atliktuose tyrimuose nustatė didesnę seroteigiamų rezultatų dažnį suaugusiose ir pagyvenusiose katėse. Teigiama, kad šie gyvūnai, galimai dėl jų amžiaus, turi didesnę galimybę kontaktuoti su virusu ir gaminti antikūnus prieš FCoV. Siekiant tikslesnių rezultatų būtina atlikti išsamesnius tyrimus, kuriuose būtų sudarytos reprezentatyvios tiriamos amžiaus grupės.

**Pasiskirstymas pagal veislę.** Tiriant FCoV paplitimą pagal veislę buvo ištirta 60,6 proc. mišrūnų ir 39,4 proc. veislinių kačių. Seroteigiami rezultatai nustatyti 68,7 proc. mišrūnų ir 63 proc. veislinių kačių. Ištyrus mėginius nerasta jokių reikšmingų skirtumų tarp dviejų grupių. Šiuos rezultatus patvirtina Ariani ir kt., (2019) atliktas tyrimas. Tai parodo, kad visos kačių veislės gali užsikrėsti FCoV ir inicijuoti FIP išsivystymą. Tačiau pastebėta, kad kai kurios grynaveislės katės turi didesnę genetinę polinkį ligos išsivystymui (Addie ir kt. 2009). Veislės ypač linkusios FIP išsivystymui yra Abisinai, Bengalijos, Birmos, Himalajų, Ragdolai, Reksai, Egzotiškoji trumpaplaukė, Manksai, Persų, Rusų mėlynasis ir Siamo (Bell ir kt., 2006, Pesteanu-Somogyi ir kt., 2006, Addie ir kt. 2009, Norris ir kt., 2005, Foley ir kt., 1997, Rohrbach ir kt., 2001). Atliktame tyrime jokių reikšmingų skirtumų neradome, dėl galimai mažo veislinių gyvūnų skaičiaus arba mažo skaičiaus veislių, kurios turi riziką FIP išsivystumui. Siekiant tikslesnių rezultatų būtina atlikti papildomus tyrimus.

**Pasiskirstymas pagal laikymo vietą.** Tiriant FCoV paplitimą pagal laikymo vietą buvo ištirta 77,4 proc. namuose auginamų kačių, iš kurių 67,9 proc. sirgo ir 22,6 proc. prieglaudoje auginamų kačių, iš kurių sergančiųjų dalį sudarė 61,3 proc. Aplinkoje, kurioje yra didelis skaičius kačių, ligos išsivystymo rizika didesnė (Addie ir Jarrett, 2006). Namuose, kuriuose auginama viena katė seroteigiami rezultatai dažnai svyruoja nuo 10 proc. iki 50 proc. Prieglaudose virusą skleidžia apie 75 proc. – 100 proc. auginamų kačių (Sharif ir kt., 2009). Tyrimo rezultatų duomenimis šio rizikos veiksnio reikšmingų skirtumų nenustatėme. Tačiau palyginus gautus rezultatus su literatūroje pateiktais duomenimis matomas padidėjęs namuose auginamų kačių sergamumo dažnis. Tai gali įvykti, kai namuose laikoma daugiau nei 2 – 5 katės. Didelės kačių grupės padidina pakartotino užsikrėtimo tikimybę. Prieglaudose pastebimas priešingas rezultatas – sumažėjęs auginamų kačių sergamumas. Seroteigiamų kačių dažnis galimai mažesnis dėl sergančių kačių izoliavimo nuo sveikų individų. Izoliavimas gali sumažinti FCoV plitimo greitį kačių populiacijoje. Ariani ir kt. (2019) atliktame tyrime, kuriame tirtos katės nors ir gyveno

grupėse išliko sveikos. Tai buvo siejama su galimybe patekti į lauką, dėl ko rečiau naudojami bendra kraiko dėžute ir sumažinamas kontaktas su virusu. Tačiau šią hipotezę paneigia Muirden ir kt., (2002) ir Cave ir kt. (2004) atlikti tyrimai. Muirden ir kt. (2002) tyrė serologinį benamių kačių paplitimą, kurios buvo atvežtos į Birmingemo „RSPCA“ (gyvūnų gelbėjimo centrą). Tyrimo metu nustatė, kad laukinės arba pusiau laukinės katės serga beveik 2 kartus dažniau nei naminės katės. Cave ir kt. (2004) ištyrė FCoV antikūnų paplitimą katėse, kurios buvo atvežtos į gelbėjimo įstaigą, Jungtinėje Karalystėje. Tokie tyrimų rezultatai toliau gerina mūsų žinias ir supratimą apie FCoV infekcijų epidemiologiją įvairiomis aplinkybėmis.

**Pasiskirstymas pagal sezonus.** Tiriant FCoV paplitimą pagal sezoną buvo ištirta 22,6 proc. kačių pavasarį, 19,7 proc. rudenį, 25,5 proc. kačių vasarą ir 32,2 proc. žiemą. Didesnis sergančių kačių dažnis (79,5 proc.) pastebėtas žiemos laikotarpiu. Panašius tyrimo rezultatus pateikia Takehisa ir kt. (2013) atliktas tyrimas. Kuriame nurodomi 2 pagrindiniai sezonai (žiema ir ruduo), kurių metu pasiekiamas didžiausias FCoV susirgimų dažnis. Tačiau tyrimų metu atlikta statistinė analizė neparodė jokių reikšmingų skirtumų tarp ištirtų sezonų ir FCoV pasireiškimo rizikos. Galima teigti, kad viruso aktyvumas išlieka bet kuriuo metų laiku.

Šie serologinio paplitimo skirtumai gali priklausyti nuo: didelio mutacijų skaičiaus, sukeltant didelį skirtingų FCoV padermių išsivystymą, kurios gali skirtis virulentiškumu (Holmes, 2009); individualių kačių genetinių komponentų, kurie padidina FIP išsivystymo tikimybę (Golovko ir kt., 2013); aplinkos ir kačių valdymo (Sharif ir kt., 2010, Drechsler ir kt., 2011, Bell ir kt., 2007, Ying-Ting ir kt., 2013). Šie faktoriai ir atlikti tyrimai rodo, kad mes negalime paprasčiausiai manyti, kad kitoje šalyje atliekami serologinio paplitimo skaičiavimai yra panašūs į mūsų pačių. Todėl FCoV infekcijos tyrimai turi būti vykdomi įvairiose vietose taip išsiaiškinant būdingus epidemiologinius faktorius specifinėje kačių populiacijoje.

## IŠVADOS

1. Ištyrus kačių serumo mėginius nustatėme, kad FCoV yra plačiai paplitęs. Daugiau nei pusė tirtų kačių (66 proc.) yra užsikrėtusios kačių korona virusu.
2. Pagal lytį nepastebėtas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp moteriškosios ir vyriškosios lyties atstovų.
3. Lyginant amžiaus grupes nenustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas, pagal kurį galėtume patvirtinti jaunų, vidutinio amžiaus ar senų kačių sergamumo riziką.
4. Veislės seroteigiamų ir seroneigiamų rezultatų pasiskirstymo dažnis neatskleidė galimos rizikos grupės.
5. Lyginant gyvūnus laikomus prieglaudose ar namuose neaptikti jokie reikšmingi skirtumai, kurių dėka galėtume sukurti epidemiologinį šios populiacijos profilį.
6. Įvertinus ir nustačius FCoV pasiskirstymo dažnį pagal sezoniškumą nerastas joks statistiškai reikšmingas skirtumas, įspėjantis apie galimą rizikos faktoriaus įtaką ligos pasireiškimui.



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRO BIOMOKSLŲ INSTITUTAS  
MIKROBIOLOGIJOS IR BIOTECHNOLOGIJOS KATEDRA

Neringa Gudaitytė

## **Kačių korona virusinės infekcijos diagnostika**

Magistro baigiamasis darbas

### Santrauka

Kačių korona virusas (FCoV) yra atsakingas už kačių infekcinio peritonito (FIP), vieno iš pavojingiausių kačių infekcinių ligų sukėlimą. FCoV yra labai užkrečiama liga, dažna naminių kačių populiacijose visame pasaulyje. Šis tyrimas skirtas nustatyti FCoV infekcijos ir su ja susijusių epidemiologinių kintamųjų seropozityvumą (rizikos veiksniai: lytis, amžius, veislė, laikymo vieta, sezoniškumas).

**Darbo tikslas.** Ištirti ir įvertinti kačių korona viruso sukeltą infekciją ir išanalizuoti epidemiologinius ypatumus.

**Tyrimo metodai.** Tyrimas atlikti 2017m. – 2019 m. Nacionalinio maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute, Virusologinių tyrimų skyriuje. Tyrimo laikotarpiu buvo ištirta 137 kačių kraujo serumo mėginiai IFA metodu.

**Rezultatai ir išvados.** Ištyrus kačių serumo mėginius nustatėme, kad FCoV yra plačiai paplitęs. Daugiau nei pusė tirtų kačių yra užsikrėtusios kačių korona virusu. Pagal lytį nepastebėtas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp moteriškosios ir vyriškosios lyties atstovų. Lyginant amžiaus grupes nenustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas, pagal kurį galėtume patvirtinti jaunų, vidutinio amžiaus ar senų kačių sergamumo riziką. Veislės seroteigiamų ir seroneigiamų rezultatų pasiskirstymas neatskleidė galimos rizikos grupės. Įvertinus ir nustatčius FCoV pasiskirstymo dažnį pagal sezoniškumą nerastas joks statistiškai reikšmingas skirtumas, įspėjantis apie galimą rizikos faktoriaus įtaką ligos pasireiškimui. Lyginant gyvūnus laikomus prieglaudose ar namuose neaptikti jokie reikšmingi skirtumai, kurių dėka galėtume sukurti epidemiologinį šios populiacijos profilį.

**Raktiniai žodžiai.** Kačių korona virusas, FCoV, IFA

VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER BIOSCIENCES INSTITUTE  
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Neringa Gudaitytė

## **Diagnosis of feline coronavirus infection**

Master thesis

Summary

Feline coronavirus (FCoV) is responsible for the infectious diseases of feline infectious peritonitis (FIP), one of the most dangerous of cat's infections. FCoV is a highly contagious disease common in domestic cat population worldwide. This study is designed to determine the seropositivity of FCoV infection and its associated epidemiological variables (risk factors: gender, age, breed, living place, seasons).

**The aim of the thesis.** To investigate and evaluate the infection caused by cat coronavirus and to analyze epidemiological peculiarities.

**Research methods.** Study conducted in 2017 – 2019 year, in National Food and Veterinary Risk Assessment Institute, Department of Virological Research. During the study, blood serum samples of 137 cats were tested by IFA.

**Results and conclusions.** After examining feline serum samples it was discovered that FCoV is widespread. More than half of the cats were infected by feline coronavirus. There was no statistically significant difference by frequency of infection between female and male cats. There was no statistically significant difference between age groups in which we could confirm the risk of morbidity in young, middle-aged or old cats. The distribution of the seropositive and seronegative results of the breed did not reveal any potential risk groups. After evaluating and determining the frequency of FCoV distribution by seasons, no statistically significant difference was found that could show the possible impact of the risk factor. When comparing animals living in shelters or homes, no statistically significant differences were found that would allow us to create an epidemiological profile of the population.

**Key words.** Feline coronavirus, FCoV, IFA

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Addie D.D. and Jarrett O. Feline coronavirus infections. Saunders Elsevier, St Louis, sudarytojai. Infectious Diseases of the Dog and the Cat. 3rd ed. Greene C.E.; 2006.88-102 p.
2. Addie D.D., Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2009 Jul;11(7):594-604. DOI: 10.1016/j.jfms.2009.05.008.
3. Addie D.D., Jarrett O. Feline coronavirus infections. In: Greene CE, editor. Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia, Pa, USA: WB Saunders; 1990:300–312.
4. Addie, D.D., Schaap, I.A.T., Nicolson, L., Jarrett, O. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *Journal of General Virology.* 2003;84:2735-2744, DOI: 10.1099/vir.0.19129-0.
5. Aguas R, Ferguson NM. Feature Selection Methods for Identifying Genetic Determinants of Host Species in RNA Viruses. *PLoS Comput Biol.* 2013;9(10): e1003254. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003254>
6. Akkan H.A. and Karaca M. 2009. Studies on the seroprevalence, age, and gender on the distribution of feline coronavirus in Van Cat kept in a multiple-cat environment. *Bull. Vet. Inst.* 2009;53:183-186.
7. Andrew D. Regan and Gary R. Whittaker. Utilization of DC-SIGN for Entry of Feline Coronaviruses into Host Cells. *J Virol.* 2008 Dec;82(23):11992–11996. DOI: 10.1128/JVI.01094-08.
8. Andrew D. Regan, David G. Ousterout and Gary R. Whittaker. Feline Lectin Activity Is Critical for the Cellular Entry of Feline Infectious Peritonitis Virus. *J Virol.* 2010;84(15): 7917–7921. DOI: 10.1128/JVI.00964-10
9. Ariani C.S. Almeida, Maicon V. Galdino, João P. Araújo Jr. Pesq. Seroepidemiological study of feline coronavirus (FCoV) infection in domiciled cats from Botucatu, São Paulo, Brazil. *Vet. Bras.* 2019;39.2:129-133. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5706>
10. Balint A, Farsang A, Zádori Z, Hornyák Á, Dencso L, Almazán F, Enjuanes L, Belák S. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of

- the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J Virol.* 2012 Jun;86(11):6258-67. DOI: 10.1128/JVI.00189-12. Epub 2012 Mar 21.
11. Barcena M., G.T. Oostergetel, W. Bartelink, F.G. Faas, A. Verkleij, P.J. Rottier, A.J. Koster, B.J. Bosch. Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: insights into the structure of the coronavirion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009 Jan 13;106(2):582-7. DOI: 10.1073/pnas.0805270106.
  12. Barker EN, Stranieri A, Helps CR, et al. Limitations of using feline coronavirus spike protein gene mutations to diagnose feline infectious peritonitis. *Vet Res.* 2017; 48: 60. DOI: 10.1186/s13567-017-0467-9
  13. Bell ET, Jalml Toribio, DH White, R Malik, JM Norris. Seroprevalence study of Feline Coronavirus in owned and feral cats in Sydney, Australia. *Aust Vet J.* 2007;84:74-81. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2006.tb12231.x>.
  14. Bell ET, R Malik, JM Norris. The relationship between the Feline Coronavirus antibody titre and the age, breed, gender and health status of Australian cats. *Australian Veterinary Journal.* 2006;84:2-7. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2006.tb13114.x>
  15. Benetka, V. Küber-Heiss, A. Kolodziejek, J. Nowotny, N. Hofmann-Parisot, M. Möstl, K. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology.* 2004, 99(1):31-42. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.07.010
  16. Beth N. Licitra, Jean K. Millet, Andrew D. Regan, Brian S. Hamilton, Vera D. Rinaldi, Gerald E. Duhamel, and Gary R. Mutation in Spike Protein Cleavage Site and Pathogenesis of Feline Coronavirus. *Whittaker Emerg Infect Dis.* 2013 Jul;19(7): 1066–1073. DOI: 10.3201/eid1907.121094
  17. Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slattery J, Roelke ME, O'Brien SJ. Genetics and Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Virus. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1445-1452. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1509.081573>
  18. Burkard C, Verheije MH, Wicht O, van Kasteren SI, van Kuppeveld FJ, Haagmans BL, Pelkmans L, Rottier PJ, Bosch BJ, de Haan CA. Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathog.* 2014 Nov 6;10(11):e1004502. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004502. eCollection 2014 Nov.
  19. Cave T.A., Golder MC, Simpson J, Addie DD. Risk factors for feline coronavirus seropositivity in cats relinquished to a UK rescue charity. *J Feline Med Surg.* 2004 Apr;6(2):53-8. DOI: 10.1016/j.jfms.2004.01.003

20. Cham TC, Chang YC, Tsai PS, Wu CH, Chen HW, Jeng CR, Pang VF, Chang HW. Determination of the cell tropism of serotype 1 feline infectious peritonitis virus using the spike affinity histochemistry in paraffin-embedded tissues. *Microbiol Immunol.* 2017;61(8):318-327. DOI: 10.1111/1348-0421.12498.
21. Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, Rottier PJ. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol.* 2010 Feb;91(Pt 2):415-20. DOI: 10.1099/vir.0.016485-0.
22. De Groot R, Van Leen R, Dalderup M, Vennema H, Horzinek M, Spaan W. Stably expressed FIPV peplomer protein induces cell fusion and elicits neutralizing antibodies in mice. *Virology.* 1989;171:493-502
23. Diane Addie, Sándor Belák, Corine Boucraut-Baralon, Herman Egberink, Tadeusz Frymus, Tim Gruffydd-Jones, Katrin Hartmann, Margaret J Hosie, Albert Lloret, Hans Lutz, Fulvio Marsilio, Maria Grazia Pennisi, Alan D Radford, Etienne Thiry, Uwe Truyen, Marian C Horzinek. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 2009;11,7:594-604. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.008>.
24. Diaz JV, Poma R. Diagnosis and clinical signs of feline infectious peritonitis in the central nervous system. *Can Vet J.* 2009 Oct;50(10):1091-3.
25. Drechsler Y, Alcaraz A, Bossong FJ, Collisson EW, Diniz PP. Feline coronavirus in multicat environments. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011 Nov;41(6):1133-69. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.08.004.
26. Duarte A. Genetic diversity and phylogenetic analysis of Feline Coronavirus sequences from Portugal. *Vet Microbiol.* 2009 Jul 2;138(1-2):163-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.009. Epub 2009 Mar 13.
27. Dye C, Christopher R. Helps, Stuart G. Siddell J. Evaluation of real-time RT-PCR for the quantification of FCoV shedding in the faeces of domestic cats. *Feline Med Surg.* 2008 Apr;10(2-3):167–174. DOI: 10.1016/j.jfms.2007.10.010
28. Escutenaire S, Mohamed N, Isaksson M, et al. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. *Archives of Virology.* 2007;152(1):41–58. DOI: 10.1007/s00705-006-0840-x
29. Fehr A.R., S. Perlman. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* 2015;1282:1-23. DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7\_1.

30. Fiscus, S.A., Teramoto, Y.A. Antigenic comparison of feline coronavirus isolates: evidence for markedly different peplomer glycoproteins. *Journal of Virology*. 1987 Aug;61(8):2607-13.
31. Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J Am Vet Med Assoc*. 1997 May 1;210(9):1313-8.
32. Gary R. Whittaker, Nicole M. André, Jean Kaoru Millet. Improving Virus Taxonomy by Recontextualizing Sequence-Based Classification with Biologically Relevant Data: the Case of the Alphacoronavirus 1 Species. *mSphere*. 2018; 3(1): e00463-17. DOI: 10.1128/mSphereDirect.00463-17
33. Gerber JD, Ingersoll JD, Gast AM, et al. Protection against feline infectious peritonitis by intranasal inoculation of a temperaturesensitive FIPV vaccine. *Vaccine*. 1990;8:536–42.
34. Gergely Tekes, Regina Hofmann-Lehmann, Iris Stallkamp, Volker Thiel, and Heinz-Jürgen Thiel. Genome Organization and Reverse Genetic Analysis of a Type I Feline Coronavirus. *J Virol*. 2008 Feb; 82(4): 1851–1859. DOI: 10.1128/JVI.02339-07
35. German A. Update on feline infectious peritonitis. *In Practice*. 2012;34:282-291. <http://dx.doi.org/10.1136/inp.e2779>
36. Gibson C. and N. Parry. Feline infectious peritonitis: typical findings and a new PCR test. *Veterinary Medicine*. 2007;102,6:375–379.
37. Giordano A, Paltrinieri S, Bertazzolo W, Milesi E, Parodi M. Sensitivity of Tru-cut and fine needle aspiration biopsies of liver and kidney for diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet Clin Pathol*. 2005;34:368–374.
38. Giori L., A. Giordano, C. Giudice, V. Grieco, S. Paltrinieri. Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. *JSAP*. 2011;52,3:152-157. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01042.x>
39. Golovko L., Leslie A. Lyons, Hongwei Liu, Anne Sorensen, Suzanne Wehnert, Niels C. Pedersen. Genetic susceptibility to feline infectious peritonitis in Birman cats. *Virus Research*. 2013;175,1:58-63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.04.006>.
40. Goodson T, Randell S, Moore L. Feline infectious peritonitis. *Compend Contin Educ Vet*. 2009 Oct;31(10):E1-8; quiz E9.
41. Haijema B, Volders H, Rottier P. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J Virol*. 2004;78:3863-3871. DOI: 10.1128/jvi.78.8.3863-3871.2004

42. Hartmann K, Binder C, Hirschberger J, et al. Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2003;17(6):781–790. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2003.tb02515.x
43. Hohdatsu, T., Okada, S., Ishizuka, Y., Yamada, H., Koyama, H. The Prevalence of Types I and II Feline Coronavirus Infections in Cats. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1992;54,3:557-562. DOI: 10.1292/jvms.54.557
44. Hohdatsu, T., Sasamoto, T., Okada, S., Koyama, H. Antigenic analysis of feline coronaviruses with monoclonal antibodies (MAbs): Preparation of MAbs which discriminate between FIPV strain 79-1146 and FECV strain 79-1683. *Veterinary Microbiology*. 1991;28,1:13-24. DOI: 10.1016/0378-1135(91)90096-X.
45. Holmes E.C. Evolutionary Genetics of Emerging Viruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2009;40:353-372.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120248>
46. Holmes K. Coronavirus replication. *In Virology*. Raven Press New York. 1985:1331-1343 p.
47. Hoskins JD, Henk WG, Storz J, Kearney MT. The potential use of a modified live FIPV vaccine to prevent experimental FECV infection. *Feline Pract*. 1995;23:89–90.
48. Hui-Wen Chang, Herman F. Egberink, and Peter J.M. Rottier. Sequence Analysis of Feline Coronaviruses and the Circulating Virulent/Avirulent Theory. *Emerg Infect Dis*. 2011 Apr; 17(4): 744–746. DOI: 10.3201/eid1704.102027
49. Jaimes JA, Whittaker GR. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. *Virology*. 2018 Apr;517:108-121. DOI: 10.1016/j.virol.2017.12.027. Epub 2018 Jan 10.
50. Kass PH and Dent TH. The epidemiology of feline infectious peritonitis in catteries. *Feline Pract*. 1995;23:27–32.
51. Kate A Worthing, Denise I Wigney, Navneet K Dhand, Anne Fawcett, Phillip McDonagh, Richard Malik and Jacqueline M Norris. Risk factors for feline infectious peritonitis in Australian cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2012;14(6) 405–412. DOI: 10.1177/1098612X12441875
52. Kennedy M., Boedeker N., Gibbs P., Kania S. Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology*. 2001;81(3):227–234.

53. Kennedy MA<sup>1</sup>, Abd-Eldaim M, Zika SE, Mankin JM, Kania SA. Evaluation of antibodies against feline coronavirus 7b protein for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats. *Am J Vet Res.* 2008;69(9):1179-82. doi: 10.2460/ajvr.69.9.1179.
54. Kipar A, Meli ML. Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Vet Pathol.* 2014;51(2):505-26. DOI: 10.1177/0300985814522077.
55. Kipar, A., Meli, M.L., Baptiste, K.E., Bowker, L.J., Lutz, H. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *Journal of General Virology.* 2010;91,17:1698-1707. DOI: 10.1099/vir.0.020214-0.
56. Kiss I, Kecskeméti S, Tanyi J, Klingeborn B, Belák S. Prevalence and genetic pattern of feline coronaviruses in urban cat populations. *Vet J.* 2000;159(1):64-70. DOI: 10.1053/tvj.1999.0402
57. Kummrow, M. Meli, M.L. Haessig, M. Goenczi, E. Poland, A. Pedersen, N.C. Hofmann-Lehmann, R. Lutz, H. Feline coronavirus serotypes 1 and 2: Seroprevalence and association with disease in Switzerland. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 2005;12,10:1209-1215. DOI: 10.1128/CDLI.12.10.1209-1215.2005.
58. Legendre AM, Bartges JW. Effect of Polyprenyl Immunostimulant on the survival times of three cats with the dry form of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg.* 2009 Aug;11(8):624-6. DOI: 10.1016/j.jfms.2008.12.002.
59. Lewis C.S., E. Porter, D. Matthews, A. Kipar, S. Tasker, C.R. Helps, S.G. Siddell Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis. *J. Gen. Virol.*, 2015;96:1358-1368. DOI 10.1099/vir.0.000084
60. Liesbeth Vogel, Mariken Van der Lubben, Eddie G. Te Lintelo, Cornelis P. Bekker, Tamara Geerts, Leontine S. Schuijff, Guy C.M. Grinwis, Herman F. Egberink, and Peter J.M. Rottier. Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. *J Vet Res.* 2010 Sep-Oct; 41(5):71. DOI: 10.1051/vetres/2010043
61. Lim K and Liu D. The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. *J Biol Chem* 2001;276:17515-17523. DOI: 10.1074/jbc.M009731200
62. Lutz H, Gut M, Leutenegger CM, Schiller I, Wiseman A, Meli M (2002) Kinetics of FCoV infections in kittens born in catteries if high risk for FIP under different rearing conditions. In: *Second International FCoV/FIP Symposium.* Glasgow. 20 p.



63. MacLachlan, N. J., Dubovi, E. J. Fenner's Veterinary Virology 4th ed. Fenner's. Cambridge, MA: Academic Press an imprint of Elsevier. 2010. 534 p.
64. Malbon A.J., M.L. Meli, E.N Barker, A.D. Davidson, S. Tasker, A. Kipar. Inflammatory Mediators in the Mesenteric Lymph Nodes, Site of a Possible Intermediate Phase in the Immune Response to Feline Coronavirus and the Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis? *Journal of Comparative Pathology*. 2019;166:69-86. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.11.001>.
65. Masters P.S., S. Perlman Coronaviridae D.M. Knipe, P.M. Howley. Fields Virology (6th ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Sudarytojai Philadelphia, PA; 2013. 825-858 p.
66. McArdle F, Tennant B, Bennett M, Kelly DF, Gaskell RM. Independent evaluation of a modified live FIPV vaccine under experimental conditions. *Feline Pract*. 1995; 23:67-71.
67. Meli M, A. Kipar, C. Muller, K. Jenal, E. Gonczi, N. Borel, D. Gunn-Moore, S. Chalmers, F. Lin, M. Reinacher, H. Lutz. High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *J. Feline Med. Surg*. 2004;6:69-81. DOI: 10.1016/j.jfms.2003.08.007
68. Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res*. 2015 Apr 16;202:120-34. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.11.021. Epub 2014 Nov 22.
69. Motokawa, K., Hohdatsu, T., Aizawa, C., Koyama, H., Hashimoto, H. Molecular cloning and sequence determination of the peplomer protein gene of feline infectious peritonitis virus type I. *Archives of Virology*. 1995;140,3:469-480. DOI: 10.1007/BF01718424.
70. Muirden A. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus and feline coronavirus in stray cats sent to an RSPCA hospital. *Vet Rec*. 2002;150:621-625.
71. Norris JM, Bosward KL, White JD, Baral RM, Catt MJ, Malik R. Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990-2002). *Aust Vet J*. 2005 Nov;83(11):666-73.
72. Patel, J. R., Heldens, J. G. M. Review of companion animal viral diseases and immunoprophylaxis. *Vaccine*. 2009 Jan 22;27(4):491-504. DOI : 10.1016/j.vaccine.2008.11.027
73. Pedersen NC, Allen CE, Lyons LA. Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J Feline Med Surg*. 2008 Dec;10(6):529-41. DOI: 10.1016/j.jfms.2008.02.006.

74. Pedersen NC, Eckstrand C, Liu H, Leutenegger C, Murphy B. Levels of feline infectious peritonitis virus in blood, effusions, and various tissues and the role of lymphopenia in disease outcome following experimental infection. *Vet Microbiol.* 2015;175(2-4):157-66. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.10.025.
75. Pedersen NC, Hongwei Liu Monica Durden Leslie A. Lyons. Natural resistance to experimental feline infectious peritonitis virus infection is decreased rather than increased by positive genetic selection. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2016;171:17-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.01.002>
76. Pedersen NC, Liu H, Dodd KA, Pesavento PA. Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. *Viruses.* 2009a Sep;1(2):166-84. DOI: 10.3390/v1020166.
77. Pedersen NC, Liu H, Scarlett J, Leutenegger CM, Golovko L, Kennedy H, Kamal FM. Feline infectious peritonitis: role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. *Virus Res.* 2012 Apr;165(1):17-28. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.12.020.
78. Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *J Feline Med Surg.* 2009b Apr;11(4):225-58. DOI: 10.1016/j.jfms.2008.09.008.
79. Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: Virology and immunopathogenesis. *The Veterinary Journal.* 2014;201,2:123-132. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.017>
80. Pesteanu-Somogyi LD, Radzai C and Pressler BM. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. *J Feline Med Surg.* 2006; 8:1–5. DOI: 10.1016/j.jfms.2005.04.003
81. Robison, R.L., Holzworth, J., Gilmore, C.E. Naturally occurring feline infectious peritonitis: signs and clinical diagnosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1971;158:981–986.
82. Rohrbach BW, Legendre AM, Baldwin CA, Lein DH, Reed WM, Wilson RB. Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals. *J Am Vet Med Assoc.* 2001 Apr 1;218(7):1111-5.
83. Rottier P. The molecular dynamics of feline coronaviruses. *Vet Microbiol.* 1999;69, 117-125. DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00099-1
84. Rottier, Peter J. M., Nakamura, Kazuya, Schellen, Pepijn, Volders, Haukeline, Haijema, Bert Jan. Acquisition of Macrophage Tropism during the Pathogenesis of Feline

- Infectious Peritonitis is Determined by Mutations in the Feline Coronavirus Spike Protein. *Journal of Virology*. 2005;79 (22):14122–30. DOI:10.1128/JVI.79.22.14122-14130.2005.
85. Sabshin SJ, Levy JK, Tupler T, Tucker SJ, Greiner EC, Leutenegger CM. Enteropathogens identified in cats entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*. 2012 Aug 1;241(3):331-7. DOI: 10.2460/javma.241.3.331.
86. Santiago F. Elena and Rafael Sanjuán. Adaptive Value of High Mutation Rates of RNA Viruses: Separating Causes from Consequences. *J Virol*. 2005 Sep;79(18): 11555–11558. DOI 10.1128/JVI.79.18.11555-11558.2005
87. Scott FW, Olsen CW, Corapi WV. Independent evaluation of a modified live FIPV vaccine under experimental conditions. *Feline Pract*. 1995;23:74–6.
88. Sharif S, Arshad SS, Hair-Bejo M, Omar AR, Zeenathul NA, Hafidz MA. Prevalence of feline coronavirus in two cat populations in Malaysia. *J Feline Med Surg*. 2009 Dec;11(12):1031-4. DOI: 10.1016/j.jfms.2009.08.005. Epub 2009 Oct 8.
89. Sharif S, Siti Suri Arshad, Mohd Hair-Bejo, Abdul Rahman Omar, Nazariah Allaudin Zeenathul, and Amer Alazawy. Diagnostic Methods for Feline Coronavirus: A Review. *Veterinary Medicine International*. 2010;7. <http://dx.doi.org/10.4061/2010/809480>
90. Shiba, N. Maeda, K. Kato, H. Mochizuki, M. Iwata, H. Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. *Veterinary Microbiology*. 2007;124,3-4:348-352. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.04.031
91. Sophie Le Poder. Feline and Canine Coronaviruses: Common Genetic and Pathobiological Features. *Advances in Virology*. 2011:11. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/609465>
92. Spaan W, Cavanaugh D, Horzinek M (1988) Coronaviruses, structure and genome expression. *J Gen Virol*. 1988;69:2939-2952
93. Susan Little, William Sears, Jessica Lachtara, and Dorothee Bienzle. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. *Can Vet J*. 2009 Jun;50(6): 644–648.
94. Takano T, Y. Katada, S. Moritoh, M. Ogasawara, K. Satoh, R. Satoh, M. Tanabe, T. Hohdatsu. Analysis of the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection: aminopeptidase N is not important and a process of acidification of the endosome is necessary. *J. Gen. Virol*. 2008b;89:1025-1029.

95. Takano T., C. Kawakami, S. Yamada, R. Satoh, T. Hohdatsu. Antibody-dependent enhancement occurs upon re-infection with the identical serotype virus in feline infectious peritonitis virus infection. *J. Vet. Med. Sci.* 2008a;70:1315-1321.
96. Takehisa SOMA, Makoto WADA, Satoshi TAHARAGUCHI, and Tomoko TAJIMA. Detection of Ascitic Feline Coronavirus RNA from Cats with Clinically Suspected Feline Infectious Peritonitis. *J Vet Med Sci.* 2013 Oct;75(10):1389–1392. DOI: 10.1292/jvms.13-0094
97. Tasker, S. Diagnosis of feline infectious peritonitis: Update on evidence supporting available tests. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 2018;20(3):228-243. <https://doi.org/10.1177/1098612X18758592>
98. Tuba Cigdem OGUZOGLU, Kezban CAN SAHNA, Veysel Soydal ATASEVEN, Dilek MUZ. Prevalence of feline coronavirus (FCoV) and feline leukemia virus (FeLV) in Turkish cats. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2010;57:271-274. DOI: 10.1501/Vetfak\_0000002438
99. Van Hamme E, Desmarests L, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. Intriguing interplay between feline infectious peritonitis virus and its receptors during entry in primary feline monocytes. *Virus Res.* 2011 Sep;160(1-2):32-9. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.04.031.
100. Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology.* 1998;243(1):150–157. DOI: 10.1006/viro.1998.9045
101. Vennema, H. Genetic drift and genetic shift during feline coronavirus evolution. *Veterinary Microbiology.* 1999;69,1-2:139-141. DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00102-9.
102. Westman ME, Amanda Paul, Richard Malik, Phillip McDonagh, Michael P Ward, Evelyn Hall, and Jacqueline M Norris. Seroprevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in Australia: risk factors for infection and geographical influences (2011–2013). *JFMS Open Rep.* 2016 Jan-Jun; 2(1). DOI: 10.1177/2055116916646388
103. Woo P.C., S.K. Lau, C.S. Lam, C.C. Lau, A.K. Tsang, J.H. Lau, R. Bai, J.L. Teng, C.C. Tsang, M. Wang, B.J. Zheng, K.H. Chan, K.Y. Yuen. J. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Virology.* 2012;86:3995-4008. DOI: 10.1128/JVI.06540-11.

104. Ying-Ting Wang, Bi-Ling Su, Li-En Hsieh and Ling-Ling Chueh. An outbreak of feline infectious peritonitis in a Taiwanese shelter: epidemiologic and molecular evidence for horizontal transmission of a novel type II feline coronavirus. *Veterinary Research*. 2013;44:57. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-57>
105. Yunjeong Kim, Hongwei Liu, Anushka C. Galasiti Kankanamalage, Sahani Weerasekara, Duy H. Hua, William C. Groutas, Kyeong-Ok Chang, Niels C. Pedersen. Reversal of the Progression of Fatal Coronavirus Infection in Cats by a Broad-Spectrum Coronavirus Protease Inhibitor. *PLOS Pathogens*. 2016;12(5):e1005650. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005531>.