

Глотова Т.И.<sup>1</sup>, Семёнова О.В.<sup>1</sup>, Никонова А.А.<sup>1</sup>, Глотов А.Г.<sup>1</sup>, Вяткин Ю.В.<sup>2</sup>,  
Бондарь А.А.<sup>3</sup>

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАЛИЦИВИРУСА КОШЕК В СИБИРИ

<sup>1</sup>ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий» РАН, ГНУ «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока», 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск;

<sup>2</sup>ООО «АкадемДжин», 630090, г. Новосибирск;

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения РАН, 630090, г. Новосибирск

Представлены результаты изучения распространения калицивирусной инфекции в популяции кошек разных пород, содержащихся индивидуально или группами, выделения изолятов вируса в культуре клеток и филогенетического анализа их нуклеотидных последовательностей в сравнении с опубликованными последовательностями референсных эпизоотических и вакцинных штаммов *Feline calicivirus*. Клинические признаки инфекции установлены у 14,3% обследованных животных. В первично-трипсинизированной культуре клеток почки эмбриона котёнка выделили 7 цитопатогенных изолятов вируса: 1 от кошки с острой формой инфекции, 5 от животных с субклинической формой и 1 от кошки с системной формой болезни. Они адаптированы к перевиваемой культуре клеток почки котёнка FK-81, в которой накапливались в титрах  $10,0 \pm 1,15 \text{ Ig TCD}_{50} / \text{cm}^3$ . На основе анализа последовательностей региона второй открытой рамки считывания вирусного генома установлена высокая степень идентичности сибирского штамма Eshli и китайского штамма KM016908, равная 81,0%. Изоляты, выделенные от животных в Сибири, генетически отличаются от штаммов, входящих в состав импортных вакцин, применяемых для профилактики болезни в нашей стране, а также друг от друга. В питомниках, не имеющих контактов и связей друг с другом, но находящихся в одном географическом регионе, популяции вируса калицивируса кошек (FCV) могут иметь некоторые генетические отличия. Выявлено близкое родство некоторых полевых изолятов со штаммами из других стран, территориально удалённых от региона Сибири. Исследования по молекулярной эпизоотологии калицивирусов важны при разработке тест-систем и мониторинге распространения штаммов на территории РФ.

**Ключевые слова:** калицивирус кошек; клинические признаки; системная форма болезни; геном; полимеразная цепная реакция; область второй открытой рамки считывания; секвенирование; филогенетический анализ; вакцинация.

**Для цитирования:** Глотова Т.И., Семенова О.В., Никонова А.А., Глотов А.Г., Вяткин Ю.В., Бондарь А.А. Выделение и филогенетический анализ калицивируса кошек в Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(6):268-274. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-268-274>

**Glotova T.I.<sup>1</sup>, Semenova O.V.<sup>1</sup>, Nikonova A.A.<sup>1</sup>, Glotov A.G.<sup>1</sup>, Vyatkin Y.V.<sup>2</sup>, Bondar A.A.<sup>3</sup>**

### ISOLATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF FELINE CALICIVIRUS IN SIBERIA

<sup>1</sup>Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies of the Russian Academy of Science, Institute of Experimentally Veterinary Medicine of Siberia and Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation;

<sup>2</sup>Ltd. «AkademDzin», Novosibirsk, 630090, Lavrentyeva prospect, 6, Russian Federation;

<sup>3</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090, Lavrentyeva prospect, 8, Russian Federation

The results of the study of the distribution of calicivirus infection in a population of domestic cats of different breeds, contained individually or the group method, the virus isolation in the cell culture and a comparative phylogenetic analysis of their nucleotide sequences with published sequences of reference field and vaccine strains of *Feline calicivirus* (FCV) from other countries: USA, Germany, Japan, China and Korea are presented. Clinical signs of infection were found in 14.3% of the animals examined. After several passages in the primary kidney cells of the kitten embryo, seven cytopathogenic isolates FCV were isolated: 1 - from a cat with an acute infection, 5 - subclinical infection, 1 - systemic infection. They were adapted to continuous FK-81 cells in which they reached a maximum infectious activity of  $10.0 \pm 1.15 \text{ Ig TCD } 50 / \text{cm}^3$ . Based on the sequence analysis of the open reading frame 2 region of the viral genome Eshli strain showed a close relationship with strain KM016908 from China with the identity of the nucleotide sequences between them of 81.0%. The results of the investigations showed that FCV isolates obtained from animals on the territory of Siberia are genetically different from strains included to imported vaccines used to prevent disease in Russian Federation and also among themselves. This causes a decrease in the effectiveness of preventive measures. In nurseries that do not have contacts and connections between themselves but located in the same geographic region FCV populations may have some genetic differences. A close relationship of some field isolates with strains from other countries geographically located so far from the Siberian region has been revealed. Studies on the molecular epizootology of caliciviruses are important in the development of test systems and the monitoring of the spread of strains in Russia.

**Key words:** *feline calicivirus; clinical signs; genome; polymerase chain reaction; the second open reading frame; sequencing; phylogenetic analysis; vaccination.*

**Для корреспонденции:** Глотова Татьяна Ивановна, д-р биол. наук, заведующая лабораторией вирусологии СФНЦА РАН, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск. E-mail: [t-glotova@mail.ru](mailto:t-glotova@mail.ru)

**For citation:** Glotova T.I., Semenova O.V., Nikonova A.A., Glotov A.G., Vyatkin Y.V., Bondar A.A. Isolation and phylogenetic analysis of feline calicivirus in Siberia. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(6): 268-274. (In Rus.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-268-274>

**For correspondence:** Tatyana I. Glotova, Dr. Sci. Biol., Head of laboratory Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies of the Russian Academy of Science, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation.  
E-mail: [t-glotova@mail.ru](mailto:t-glotova@mail.ru)

**Information about authors:**

Glotova T.I., <http://orcid.org/0000-0003-3538-8749>  
Semenova O.V., <http://orcid.org/0000-0002-1165-5243>  
Nikonova A.A., <http://orcid.org/0000-0003-4554-1612>  
Glotov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>  
Vyatkin Y.V., <http://orcid.org/0000-0003-3910-335X>  
Bondar A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3167-138X>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 27 October 2017

Accepted 27 December 2017

## Введение

Вирус калицивируса кошек *Feline calicivirus* (FCV) широко распространён во всём мире и является возбудителем одного из наиболее часто встречаемых вирусных заболеваний у представителей семейства кошачьих [1–8]. Он относится к роду *Vesivirus*, семейству *Caliciviridae*. Геном вируса представлен положительно заряженной РНК размером 7,7 кб, которая кодирует 3 открытые рамки считывания (ORF) [5, 7, 9]. Штаммы вируса характеризуются высокой изменчивостью генома, что объясняет их антигенное разнообразие и способность вызывать у восприимчивых животных заболевания с различными клиническими проявлениями [10]. Инфекция протекает в острой и хронической форме с преимущественным поражением слизистой оболочки ротовой полости и верхних дыхательных путей и характеризуется ринитом, конъюнктивитом, стоматитом и изъязвлением эпителия верхних дыхательных путей и ротовой полости. Болезнь может сопровождаться обильными серозными выделениями из носа и ротовой полости, вялостью, повышением температуры тела, снижением или полным отсутствием аппетита. Реже встречаются язвенный дерматит, хромота, аборт, желтуха, тяжёлая форма пневмонии и внезапный летальный исход [11]. В литературе описана системная форма инфекции, приводящая к гибели до 60% больных животных. Она впервые зарегистрирована в США и Европе [10–15], а впоследствии и в нашей стране [16].

В последние годы многие исследователи обращают внимание на частоту выявления и особенности распространения вирусных инфекций у домашних кошек, в том числе вызванных FCV, отмечая его увеличение. Одной из причин этого является разведение высокопородных племенных животных, завоз их из разных регионов Российской Федерации, стран СНГ и мира [2, 3, 17–18]. Скудное содержание, частые перегруппировки, участие в выставках, племенная работа и другие мероприятия, сопровождающиеся стрессами, способствуют распространению возбудителей вирусных инфекций и росту заболеваемости животных. Кроме того, установлено, что FCV обладает высокой устойчивостью ко многим дезинфицирующим средствам. При недостаточных мерах гигиены в ветеринарной клинике или питомнике возможна косвенная его передача животному через объекты окружающей среды [19].

FCV может вызывать персистентные, длительные инфекции, которые способствуют его сохранению в ор-

ганизме переболевшего животного. Как правило, количество кошек, персистентно инфицированных вирусом, может быть небольшим, но они играют важную роль в его распространении и сохранении в популяции восприимчивых животных [1, 20, 21]. Эти животные выглядят клинически здоровыми, FCV-инфекция у них протекает бессимптомно.

Данные о распространении и результаты филогенетического анализа калицивирусов кошек в России ограничены. Известно, что эффективным методом защиты животных от вирусных инфекций является профилактическая вакцинация. Однако существование генетических вариантов вируса может снижать её эффективность [5–7, 10, 13, 14, 22]. В ветеринарии широко используют вакцины зарубежного производства, изготовленные на основе референсных штаммов F9 и F255. Для объективности оценки эффективности этих препаратов необходимы данные о генетической структуре местных штаммов вируса, циркулирующих среди животных на конкретной территории РФ. Они могут помочь при разработке эффективных схем профилактической вакцинации животных.

Целью работы являлось изучение распространения калицивирусной инфекции кошек на территории Сибири, выделение и филогенетический анализ изолятов вируса от животных с различными клиническими формами болезни в сравнении с опубликованными последовательностями вакцинных и эпизоотических штаммов.

## Материал и методы

**Эпизоотологические исследования.** Всего в период 2011–2016 гг. обследовали 1125 кошек в возрасте от нескольких недель (менее 1 мес) до 18 лет разных пород: курльского бобтейла короткошёрстной, сфинкса (канадского), британской короткошёрстной, корниш рекс, персидской, мейн-кун и ряда других, а также беспородных. Животные содержались индивидуально или группами в частных питомниках, специализирующихся на их разведении, в приютах Томской, Омской и Новосибирской областей.

Для подтверждения клинического диагноза FCV-инфекции исследовали пробы биоматериала (выделения из носа, ротовой полости, конъюнктивы) от больных животных методом ОТ-ПЦР. Для проведения дифференциальной диагностики использовали коммерческие наборы «Калицивир», «Коронавир» и «Риновир», разработанные ФГУ «Всероссийский государственный центр

Таблица 1

## Референсные штаммы FCV, использованные в работе для анализа

Номер в GenBank	Страна	Год публикации	Примечание/клинические признаки болезни
U13992	США	1970	Острый респираторный синдром
U07130		1960	Вакцинный штамм F255/ пневмония и поражения ротовой полости
U07131		1983	Хромота
JX519212		1995	Пневмония
JX519209		1996	Бессимптомное течение болезни
JX519211		1996	Хронический гингивит/ стоматит
JX519213		1996	
M86379		1958	Вакцинный штамм F9/ болезнь верхних дыхательных путей
AY560113		1993	Болезнь верхних дыхательных путей
AY560114		1998	
AY560115		2000	
AY560117		2002	Вирулентное системное заболевание
AY560118		2005	Болезнь верхних дыхательных путей
D31836	Япония	1971	То же
D90357		1991	Острый респираторный синдром
AF109465	Великобритания	1990	Хромота
AF479590	Германия	2002	-
X99449		1996	Острый стоматит
KM016908	Китай	2014	Кератит, светобоязнь, выделения из носа
GU214989		2009	-
KM111557		2014	-
KJ572400	Корея	2014	-
KJ572401		2014	-
NC001543		2013	Вирус геморрагической болезни кроликов, штамм RHDFV-FRG
JX886002		2012	Вирус геморрагической болезни кроликов, штамм CB137

качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ВГНКИ) совместно с Центральным НИИ эпидемиологии.

*Выделение FCV* проводили в первично-трипсинизированной культуре клеток почки эмбриона котёнка, которую выращивали в питательной среде Игла MEM с однократным набором аминокислот и витаминов (ООО «БиоЛот») с добавлением 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone», lot № ASA28574), 0,06% L-глутамин и 100 мкг/мл канамицина в условиях CO<sub>2</sub> инкубатора (содержание углекислоты 5%) при 37°C и влажности воздуха 90%. Суспензии, приготовленные из проб биологического материала, положительных на FCV при исследовании посредством ОТ-ПЦР, пропускали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм и вносили в объёме 100 мкл в монослой культуры

клеток в 24-луночных планшетах или флаконах 25 см<sup>3</sup> («TRP», Швейцария). Инфицированную культуру культивировали в условиях, описанных выше, в течение 5–8 сут. Всего проводили не менее 10 «слепых» пассажей до выявления цитопатогенного действия (ЦПД) вируса в культуре клеток. В последующей работе вирус адаптировали и культивировали в перевиваемой линии клеток почки эмбриона котёнка FK-81.

*Подбор праймеров.* Праймеры для амплификации фрагмента из области второй открытой рамки считывания (ORF2) геномной РНК FCV (FCV RNA) выбирали при помощи программы Primer Premier 5 («PREMIER Biosoft», США). Вследствие чрезвычайно высокой вариативности генома возбудителя известные последовательности [6] выравнивали при помощи пакета Vector NTI 10 и выбирали те варианты праймеров, которые были локализованы в консервативных участках РНК вируса. В результате наиболее оптимальной оказалась пара FCV\_5314F 5'-ATGTGCTCAACCTGCGCTAACG-3' и FCV\_7271R 5'-GCCAAATGWATTCCCATGTAGGA-3' с двумя вырожденными позициями. Праймеры использовали в двух вариантах: оригинальных и слитых на 5'-конце с M13-Forward- или M13-Reverse-последовательностями соответственно.

*Секвенирование генома FCV.* Реакция ПЦР содержала однократный «GC» буфер, смесь по 0,2 мМ каждого dNTP, 2,5 мМ свободного Mg<sup>2+</sup> в виде раствора хлорида магния, 0,2 мкМ MM13F\_FCV\_5314F-праймера, 0,4 мкМ MM13R\_FCV\_7271R-праймера с двумя вырожденными позициями в структуре, 10% глицерин и 14 МЕ/мл полимеразы Phusion Hot Start II Polymerase («Thermo Scientific Bio», Литва). В качестве матрицы использовали ревертированные с помощью обратной транскриптазы MMuLV-препараты кДНК FCV. Условия амплификации подбирали при помощи градиентной ПЦР на амплификаторе Veriti («Applied Biosystems», США). В итоге использовали следующий температурный профиль: денатурация при 98°C в течение 1 мин, затем 40 циклов – денатурация при 98°C 10 с, отжиг при 66°C 15 с, элонгация при 72°C 1 мин, после этого стадия достройки концов в течение 7 мин при 72°C и хранение реакции при 4°C до дальнейшего использования. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле при напряжении 10–14 В/см.

Наработанные в препаративном количестве фрагменты ДНК FCV очищали от компонентов ПЦР посредством сорбции на магнитных частицах AMPureXP и секвенировали по Сэнгеру со стороны праймера FCV\_5314F с помощью набора BigDye v. 3.1 Ready Reaction DNA Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Реакция Сэнгера содержала 0,3–0,5 пмоль ДНК-фрагмента, 2 мкл 10 мкМ праймера для секвенирования, 1 мл реагента BigDye v.3.1, 8 мл 5-кратного буфера для секвенирования и воду квалификации MiliQ до общего объема реакции 40 мл. Температурный профиль реакции Сэнгера состоял из денатурации при 95°C в течение 1 мин, затем 40 циклов плавления при 98°C 10 с, отжига при 50°C 5 с и элонгации при 60°C 4 мин. Продукты реакции Сэнгера очищали от невключившихся флуоресцентных красителей с помощью гель-фильтрации через предварительно замоченный в бидистиллированной воде SephadexG-50 («GE Healthcare») из расчёта 700–800 мл суспензии сорбента (вес 1:20/SephadexG-50: вода) на мини-колонку для одной реакции. Фильтрат с продуктами реакции Сэнгера высушивали на вакуум-концентраторе («Ер-

Таблица 2

## Характеристика изолятов FCV, выделенных от домашних кошек

Порода животного	Форма инфекции; клинические признаки	Источник выделения, год	Результаты ОТ-ПЦР			Изоляты FCV
			FCV	FHV-1	FCoV	
Курильский бобтейл короткошёрстный	Острая; выделения из носа и ротовой полости, эрозии на языке и слизистой оболочке носа, кашель, конъюнктивит	Выделения из носа и конъюнктивы, 2013	Положительный	Положительный	Отрицательный	FCV3
Сфинкс (канадский)	Системная; гингивит, ринит, трахеобронхит, хромота, отёки в области подушечек лап	Выделения из носа и полости рта, 2012	«	Отрицательный	«	Eshli
Британская короткошёрстная	Субклиническая; хронический гингивит	Выделения из полости рта, 2011	«	Положительный	«	FCV7
Мейн-кун		Выделения из полости рта, 2012	«	Отрицательный	«	FCV1
Мейн-кун		То же	«	«	«	FCV2
Корниш рекс		« «	«	«	«	FCV6
Беспородное		Выделения из полости рта, 2011	«	«	«	FCV9

pendorf», Германия) и секвенировали на автоматическом геномном анализаторе ABI 3130XL («Applied Biosystems»). Полученные секвенограммы использовали для сравнения нуклеотидных последовательностей исследуемых образцов FCV из сибирского региона с известными референсными и вакцинными штаммами и поиска полиморфных сайтов.

**Биоинформационный анализ.** Секвенированные участки кодирующего белок фрагмента генома изолятов были выровнены с нуклеотидными последовательностями генома вакцинных штаммов F9 и F255, а также прочих референсных штаммов FCV, представленных в базе данных GenBank (табл. 1), с помощью пакета программ Muscle (версия 3.8.31) [23].

Из полученных выравниваний был извлечён фрагмент длиной 562 пары оснований, присутствующий у всех изолятов этого исследования и штаммов FCV базы данных GenBank. Затем фрагменты геномов указанной длины всех штаммов и изолятов FCV были повторно выровнены друг относительно друга с помощью пакета Muscle. На основе полученных данных выравниваний с помощью пакета программ PhyML (версия 3.1, модель нуклеотидных замен НКУ85) [24] было сконструировано филогенетическое дерево образцов. Визуализация дерева выполнена с помощью пакета программ Tree Graph (версия 2.0.54) [25]. Вирус геморрагической болезни кроликов использовали в качестве внешней группы.

### Результаты

При клиническом обследовании у 161 (14,3%) животного выявили признаки калицивирусной инфекции, которая была подтверждена ОТ-ПЦР. Преимущественно наблюдали конъюнктивы, риниты, эрозии в ротовой полости и области носа, в редких случаях трахеиты и бронхопневмонии. Острая форма инфекции чаще сопровождалась повышением температуры тела до 40–41°C, отказом от корма, быстрой утомляемостью и вялостью животного, а субклиническая – хроническим гингивитом и стоматитом.

Вирус выявляли чаще всего в моноварианте равномерно на протяжении анализируемого периода у кошек разных пород и половой принадлежности в возрасте от 1 мес до 10 лет и старше, содержащихся как индивидуаль-

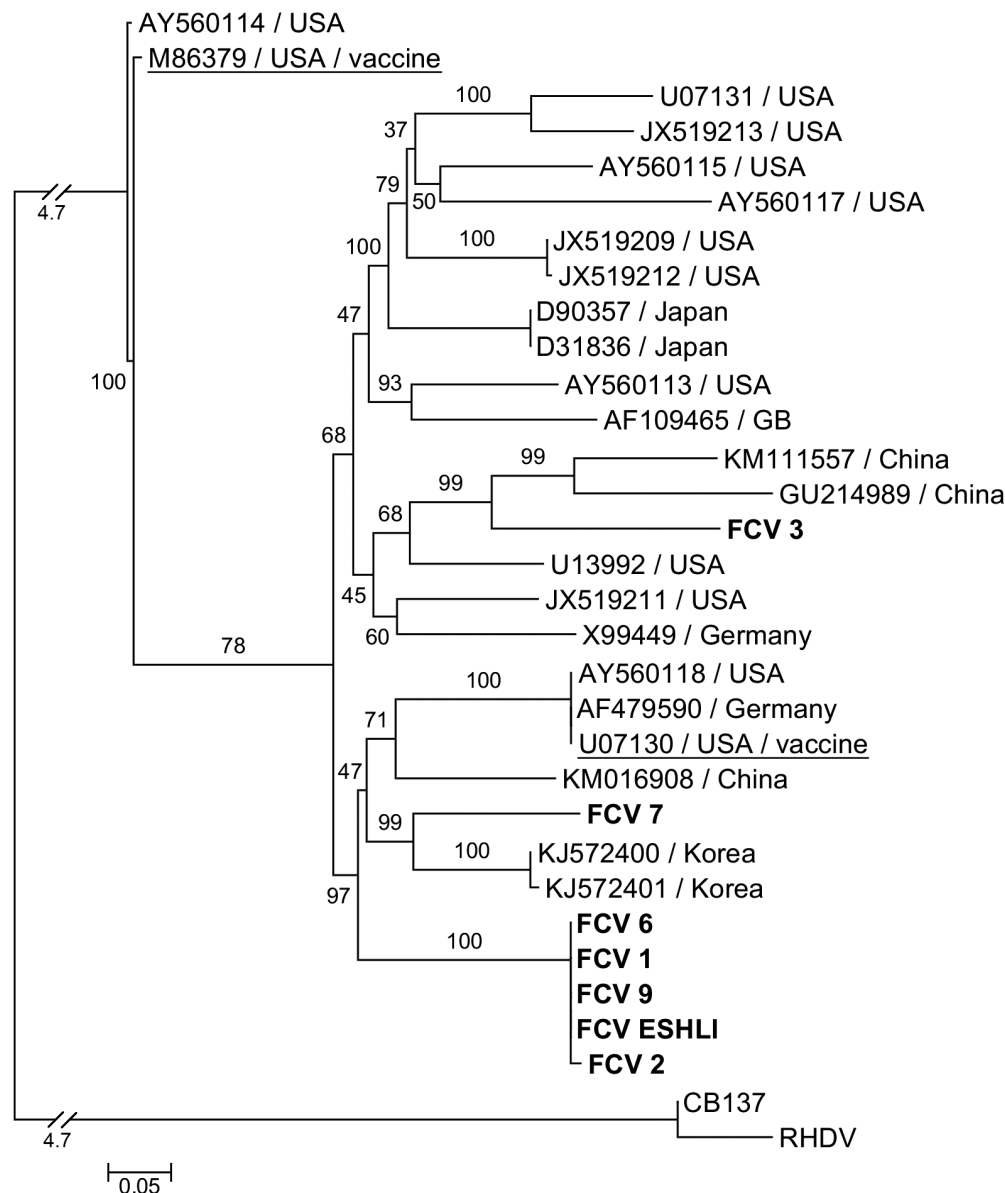
но, так и группами. В 0,7% случаев выявили ассоциации FCV с вирусами инфекционного ринотрахеита (FHV-1) и коронавирусной инфекции кошек (FCoV).

В 2012 г. в одном из частных питомников г. Новосибирска зарегистрировали вспышку системного заболевания у кошек, обусловленного FCV [16]. У 3 из 7 животных питомника в возрасте 4–6 мес выявили клинические признаки, аналогичные описанным ранее у животных в США, Англии, Франции и Германии [4, 12, 13]. В первые дни заболевания у них наблюдали повышение температуры тела до 40,5°C, отёки в области головы и передних лап, эрозии на языке и слизистой оболочке рта, хромоту, риниты и конъюнктивиты, а в более поздние сроки – развитие желтухи и гибель.

Для выделения вируса от больных животных с подтверждённым диагнозом в ОТ-ПЦР отобрали пробы биологического материала. В результате нескольких пассажей в первично-трипсинизированной культуре клеток почки эмбриона котёнка выделили 7 цитопатогенных изолятов FCV: 1 от кошки с признаками острой формы инфекции, 5 от животных с субклинической формой и 1 от кошки с системной формой болезни. Шесть животных были породистыми племенными и одно – беспородным (табл. 2). Они принадлежали разным владельцам и питомникам, территориально удалённым друг от друга.

Выделенные изоляты вируса адаптировали к перевиваемой линии культуры клеток FK-81, в которой ЦПД проявлялось уже через 18 ч после инфицирования монослоя. Оно выражалось в появлении единичных участков разрушения целостности монослоя, количество которых постепенно увеличивалось через 24 ч, приводя к полному разрушению монослоя через 48 ч. После 3 пассажей изоляты FCV накапливались в титрах от  $6,75 \pm 0,14$  до  $7,5 \pm 0,5$  lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Изолят, выделенный от кошек с системной формой инфекции, обозначили как «Eshli». Он оказывал выраженное ЦПД в первичной и перевиваемой культурах клеток через 18 ч после инфицирования и накапливался в титре  $10,0 \pm 1,15$  lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Изолят был устойчив к хлороформу, эфиру, изменениям pH до 4, чувствителен к нагреванию и инактивировался при 50°C в течение 30 мин. По результатам исследований он депонирован в государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН



Дендрограмма, построенная на основе выравнивания аминокислотных последовательностей региона ORF2 генома представленных в базе данных GenBank штаммов FCV и изолятов, выделенных в Сибири.

«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» как штамм Eshli с регистрационным номером V-697.

В научной литературе нет данных о молекулярно-генетических свойствах штаммов FCV, циркулирующих среди кошек на территории РФ, поэтому мы провели сравнительный анализ выделенных нами изолятов FCV со штаммами вируса из других стран (США, Германия, Япония, Китай и Корея), нуклеотидные последовательности которых опубликованы в GenBank. Поскольку в последние годы наметилась тенденция к снижению профилактической эффективности вакцин на основе штаммов вируса F255 и F9, их последовательности также были включены в анализ (см. табл. 2).

Дендрограмма построена на основе анализа последовательностей региона ORF2 генома FCV. В качестве внешней группы использовали родственные FCV штам-

мы вируса геморрагической болезни кроликов RHDV-FRG и CB137 (см. рисунок).

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что штамм Eshli FCV, вызвавший вспышку системного заболевания у кошек в питомнике г. Новосибирска, проявил наиболее близкое родство со штаммом KM016908 из Китая. Идентичность нуклеотидных последовательностей между ними составила 81%. Изолят FCV7 имел близкое родство с корейскими штаммами KJ572400 и KJ572401 с идентичностью последовательностей 82,4 и 82% соответственно. Изоляту FCV3 более близкими оказались штаммы GU214989 (показатель идентичности нуклеотидных последовательностей – 78,8%) и KM111557 (78,1%), выделенные в Китае. Изоляты FCV2, FCV6, FCV9, FCV1 и штамм Eshli были близкородственными китайскому штамму KM016908 с идентичностью последовательностей от 79,3 до 81%.

### Обсуждение

В результате исследований установлено, что сибирские изоляты FCV3 и FCV7, а также выделенный нами штамм Eshli имеют более значительные генетические различия между собой, чем с некоторыми зарубежными штаммами. Идентичность нуклеотидных последовательностей изолятов Eshli и FCV7 составила 79,4%, Eshli и FCV3 – 75,4%, FCV7 и FCV3 – 74,3%.

По данным некоторых исследователей, вакцины, изготовленные на основе референсных штаммов F9 и F255, не всегда защищают животных от калицивирусной инфекции, что вызвано генетической вариабельностью вируса и различиями между полевыми и вакцинными штаммами в пределах 21,3–38% [4, 8, 19, 26]. Мутации в геноме вируса затрагивают области, ответственные за репродукцию капсидных белков. Эта стратегия эволюционно сформировалась у многих вирусов для уклонения от иммунной системы организма хозяина. Результаты наших исследований подтвердили эти данные и показали, что генетические различия сибирских изолятов и вакцинных штаммов, входящих в состав импортных вакцин, применяющихся в нашей стране, также имеют место и находятся приблизительно в тех же пределах. Так, идентичность нуклеотидных последовательностей изолята FCV3 и вакцинного штамма F9 (M86379) составила 75,5%, FCV3 и вакцинного штамма F255 (U07130) – 76,1%. Для изолята FCV7 и штамма F9 эти показатели составили 76,5%, а для FCV7 и F255 – 79,7%. Идентичность штаммов Eshli и F9 составила 76,3%, Eshli и F255 – 78,7%.

Полученные данные свидетельствуют о наличии генетических различий между полевыми сибирскими изолятами и вакцинными штаммами, к тому же практический опыт использования вакцин на их основе, рост заболеваемости кошек в регионе указывают на их недостаточную эффективность. В данной работе для секвенирования мы использовали регион второй открытой рамки считывания (ORF2), анализ последовательностей которого, возможно, не полностью отражает уровень мутации генома вируса, поэтому для более глубокого анализа этих различий необходимо проводить сравнительное изучение нуклеотидных последовательностей полного генома вируса [26].

Очевидно, вакцины, содержащие штаммы вируса, выделенные несколько десятилетий назад, не могут обеспечить полноценную защиту животных от инфицирования генетически измененными штаммами, циркулирующими в настоящее время на конкретной территории [27, 28].

В России вирус впервые был выделен в 1993 г. Он депонирован в коллекцию культур микроорганизмов ВГНКИ как штамм FCV Ларс-30ДЕП [1]. К сожалению, не было возможности включения его в данный анализ.

Нами выделены изоляты FCV от животных с разными клиническими формами заболевания: острой респираторной, субклинической и системной, но не установлена связь клинической формы заболевания с определёнными последовательностями генома FCV. Ряд исследователей также безуспешно пытались определить вариации нуклеотидов генома FCV или аминокислотных последовательностей, уникальных для разных клинических проявлений болезни [5, 6, 20, 29]. Генетическая основа патогенности FCV остается пока неустановленной.

### Заключение

В последние годы наблюдается рост заболеваемости домашних кошек вирусными инфекциями, в том числе

вызванными FCV. Одной из причин является массовый, часто неконтролируемый ввоз племенных животных с неизвестным статусом в отношении инфекционных болезней и историей вакцинации из других стран, концентрация их в питомниках и частые перемещения из зоотехнических или коммерческих сооружений. В такой ситуации значительно возрастает риск заноса и распространения возбудителя на конкретной территории. Возможен также обмен генетически различными штаммами между местной и импортированной популяциями животных. В связи с этим сопоставление данных о происхождении животных с результатами филогенетического анализа может оказать большую помощь в определении источников и путей заноса возбудителей в тот или иной регион, а также в выявлении и отслеживании новых и высоковирулентных штаммов вирусов.

Результаты наших исследований показали, что калицивироз часто встречается в популяции кошек в Сибири. Вирус выявлен у 14,3% обследованных животных. Выделенные нами изоляты и штамм вируса генетически отличаются друг от друга и от референсных вакцинных и полевых штаммов, последовательности которых опубликованы в базе данных GenBank. Установлено, что в питомниках, расположенных в одном географическом регионе и не имеющих контактов и связей друг с другом, популяции вируса имеют генетические отличия. Выявлено близкое родство некоторых полевых изолятов со штаммами, циркулирующими на территории других стран, территориально удалённых от региона Сибири. Выделено от животных с клиническими признаками калицивирусной инфекции, подтверждённой результатами ОТ-ПЦР, и охарактеризовано 7 изолятов вируса. Нуклеотидные последовательности штамма Eshli опубликованы в GenBank под номером KY858969.

Полученные результаты исследований важны при разработке диагностических тест-систем и мониторинге распространения различных штаммов на территории РФ.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4-15, 19-29 см. REFERENCES)

1. Рахманина М.М. Калицивирусная инфекция кошек: биологические свойства возбудителя, эпизоотология, специфические средства и методы профилактики: Автореф. дисс. ... д-ра ветеринар. наук. М.; 2005.
2. Савойская Л.С., Клицунова Н.В., Гостева В.В., Гончаров Д.Б., Пенкина Г.А., Титова И.В. и др. Распространенность различных патогенов среди животных-компаньонов в Москве и Московской области. *Ветеринарная патология*. 2006; (3): 5-11.
3. Сочнев В.В., Медова Е.В., Пашкина Ю.В., Грачева Е.А., Параева О.М., Николаева А.С. Смешанные инфекции плотоядных на урбанизированных территориях. *Ветеринарная патология*. 2006; (3): 72-4.
4. Ядренкина Т.Г., Тугунова Т.Б., Глотов А.Г., Глотова Т.И. Вспышка системного калицивироза у кошек. В кн.: *Сборник научных докладов XVI международной научно-практической конференции «Аграрная наука – сельскохозяйственному производству Монголии, Сибирского региона, Казахстана и Болгарии»*. Улан-Батор; 2013: 161-2.
5. Рахманина М.М., Уласов В.И. Особенности клинических проявлений калицивирусной инфекции кошек, вызванной различными штаммами вируса. *Ветеринарная патология*. 2006; (3): 22-6.
6. Глотова Т.И., Ядренкина Т.Г., Глотов А.Г., Тугунова Т.Б. Распространение калицивируса среди кошек и его тропность к органам. *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние животные*. 2013; (4): 29-1.

## REFERENCES

- Rakhmanina M.M. *Calicivirus infection of cats: biological properties of the pathogen, epizootology, specific means and methods of prevention*: Diss. Moscow; 2005. (in Russian)
- Savoyskaya L.S., Klitsunova N.V., Gosteva V.V., Goncharov D.B., Penkina G.A., Titova I.V., et al. The prevalence of various pathogens among companion animals in Moscow and the Moscow Region. *Veterinarnaya patologiya*. 2006; (3): 5-11. (in Russian)
- Sochnev V.V., Medova E.V., Pashkina Yu.V., Gracheva E.A., Paraeva O.M., Nikolaeva A.S. Mixed infections of carnivores in urbanized areas. *Veterinarnaya patologiya*. 2006; (3): 72-4. (in Russian)
- Schorr-Evans E.M., Poland A., Johnson W.E., Pedersen N.C. An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. *J. Feline Med. Surg.* 2003; 5(4): 217-6.
- Radford A.D., Coyne K.P., Dawson S., Porter C.J., Gaskell R.M. Feline calicivirus. *Vet. Res.* 2007; 38(2): 319-25.
- Prikhodko V.G., Sandoval-Jaime C., Abente E.J., Bok K., Parra G.I., Rogozin I.B., et al. Genetic characterization of feline calicivirus strains associated with varying disease manifestations during an outbreak season in Missouri (1995–1996). *Virus Genes*. 2014; 48(1): 96-110.
- Sosnovtsev S.V., Green K.Y. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology*. 2000; 277(1): 193-3.
- Dawson S., McArdle F., Bennett M., Carter M., Milton I.P., Turner P., et al. Typing of feline calicivirus isolates from different clinical groups by virus neutralization tests. *Vet. Rec.* 1993; 133(1): 13-7.
- Neill J.D., Reardon I.M., Heinrichson R.L. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *J. Virol.* 1991; 65(10): 5440-7.
- Pedersen N.C., Elliott J.B., Glasgow A., Poland A., Keel K. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet. Microbiol.* 2000; 73(4): 281-300.
- Greene G.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2006:145-54.
- Reynolds B.S., Poulet H., Pingret J.L., Jas D., Brunet S., Lemeter C., et al. A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. *J. Feline Med. Surg.* 2009; 11(8): 633-44.
- Hurley K.F., Pesavento P.A., Pedersen N.C., Poland A.M., Wilson E., Foley J.E. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2004; 224(2): 241-9.
- Coyne K.P., Jones B.R., Kipar A., Chantrey J., Porter J., Barber P.J., et al. Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Vet. Rec.* 2006; 158(16): 544-50.
- Pesavento P.A., MacLachlan N.J., Dillard-Telm L., Grant C.K., Hurley K.F. Pathologic, immunohistochemical, and electron microscopic findings in naturally occurring virulent systemic feline calicivirus infection in cats. *Vet. Pathol.* 2004; 41(3): 257-63.
- Yadrenkina T.G., Tugunova T.B., Glotov A.G., Glotova T.I. Outbreak of systemic calicivirus in cats. In: *Collection of scientific reports of the XVI International Scientific and Practical Conference «Agrarian Science - Agricultural Production of Mongolia, Siberian Region, Kazakhstan and Bulgaria» [Sbornik nauchnykh dokladov XVI mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Agrarnaya nauka – sel'skokhozyaystvennomu proizvodstvu Mongolii, Sibirskogo regiona, Kazakhstana i Bolgarii»]*. Ulan-Bator; 2013: 161-2. (in Russian)
- Rakhmanina M.M., Ulasov V.I. Features of clinical manifestations of calicivirus infection of cats caused by various strains of the virus. *Veterinarnaya patologiya*. 2006; (3): 22-6. (in Russian)
- Glotova T.I., Yadrenkina T.G., Glotov A.G., Tugunova T.B. Distribution of calicivirus among cats and its tropism to the organs. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie zhivotnye*. 2013; (4): 29-1. (in Russian)
- Radford A.D., Addie D., Belak S., Boucraut-Baralon C., Egberink H., Frymus T., et al. Feline calicivirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 2009; 11(7): 556-64.
- Coyne K.P., Dawson S., Radford A.D., Cripps P.J., Porter C.J., McCracken C.M., et al. Long-term analysis of feline calicivirus prevalence and viral shedding patterns in naturally infected colonies of domestic cats. *Vet. Microbiol.* 2006; 118(1-2): 12-5.
- Wardley R.C., Povey R.C. The clinical disease and patterns of excretion associated with three different strains of feline caliciviruses. *Res. Vet. Sci.* 1977; 23(1): 7-4.
- Wardley R.C. Feline calicivirus carrier state: a study of the host/virus Relationship. *Arch. Virol.* 1976; 52(3): 243-9.
- Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(5): 1792-7.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 2010; 59(3): 307-11.
- Stöver B.C., Müller K.F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11: 7.
- Wensman J.J., Samman A., Lindhe A., Thibault J.C., Berndtsson L.T., Hosie M.J. Ability of vaccine strain induced antibodies to neutralize field isolates of caliciviruses from Swedish cats. *Acta Vet. Scand.* 2015; 57: 86.
- Bittle J.L., York C.J., Newberne J.W., Martin M. Serologic relationship of new feline cytopathogenic viruses. *Am. J. Vet. Res.* 1960; 21: 547-50.
- Kahn D.E., Gillespie J.H. Feline Viruses. X. Characterization of a newly-isolated picornavirus causing interstitial pneumonia and ulcerative stomatitis in the domestic cat. *Cornell Vet.* 1970; 60(4): 669-3.
- Willi B., Spiri A.M., Meli M.L., Samman A., Hoffmann K., Sydler T., et al. Molecular characterization and virus neutralization patterns of severe, non-epizootic forms of feline calicivirus infections resembling virulent systemic disease in cats in Switzerland and in Liechtenstein. *Vet. Microbiol.* 2016; 182: 202-12.

Поступила 27.10.17

Принята в печать 27.12.17