

ГАЛАЄВА М. В. ✉, ГАЛАЄВ О. В., ГАРЄЄВ О. Л.

ТОВ «ВИРОБНИЧА ФІРМА СІМЕСТА»,

Україна, 65005, м. Одеса, вул. Мельницька, буд. 20а, ORCID: 0000-0001-8133-5184, 0000-0001-7247-2910

✉ mariagal1@ukr.net

РОЗРОБКА ПЛР ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ КОРОНАВІРУСНОЇ ХВОРОБИ КОТІВ

Мета. Розробка ефективної тест-системи для діагностики коронавірусної хвороби котів на основі полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). **Методи.** Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР); полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР); ЗТ-ПЛР у реальному часі. Аналіз кривих плавлення. Електрофорез у поліакриламідному гелі. Статистичні методи. **Результати.** Розроблено ПЛР тест-систему з електрофоретичною детекцією та ПЛР тест-систему у реальному часі для виявлення коронавірусу котів (FCoV). Показано переваги ПЛР тест-системи у реальному часі та оцінено її ефективність. З використанням тест-системи у реальному часі проведено діагностику 160 котів та кішок та виявлено FCoV у 18 % досліджених тварин. **Висновки.** Висока діагностична ефективність ПЛР тест-системи у реальному часі дозволяє використовувати її для діагностики коронавірусної хвороби котів в лабораторних умовах. Незважаючи на те, що коронавірусна хвороба котів не належить до сезонних захворювань, було виявлено залежність частоти виявлення FCoV від сезону. Частота виявлення FCoV навесні становила 28 %, влітку зменшувалася до 11 %, а у вересні знову збільшувалася до 24 %. Однією з причин сезонних коливань може бути послаблення імунітету у тварин восени та навесні, що може впливати на ризик інфікування або реактивацію вірусу.

Ключові слова: котячий коронавірус (FCoV), ПЛР, ЗТ-ПЛР, ЗТ-ПЛР в реальному часі, аналіз кривих плавлення.

Коронавірус котів (FCoV) – одноланцюговий РНК-вірус з оболонкою, що належить до роду *Alphacoronavirus*, родини *Coronaviridae* та порядку *Nidovirales* [1]. Він має чотири структурні білки: спайковий (S), оболонковий (E), мембранний (M) і нуклеокапсидний (N) [2]. FCoV широко поширений серед домашніх котів у всьому світі.

Природна передача FCoV відбувається здебільшого фекально-оральним шляхом із подальшим інфікуванням епітеліальних клітин, переважно ентероцитів [1, 3]. Різні чинники відіграють важливу роль у поширенні вірусу [4–7]. Відомо, що у середовищах із кількома котами вища поширеність інфекцій FCoV, ніж в середовищах з одним котом. Однією з причин є часте використання спільних лотків для туалету в приміщеннях з кількома котами. Якщо одна кішка в розпліднику інфікована, FCoV дуже швидко поширюється в цій популяції [7]. Більшість випадків інфікування FCoV обмежуються кишковою формою хвороби й рідко призводять до летального наслідку. Зазвичай у котів, інфікованих FCoV, немає клінічних ознак захворювання або розвивається легкий ентерит [8]. Проте приблизно у 12 % котів інфікування FCoV призводить до летального синдрому котячого інфекційного перитоніту (FIP) [8, 9]. Раптові зміни тропності вірусу до макрофагів і моноцитів замість ентероцитів, що виникають через мутації в спайк-гені, сприяють або безпосередньо призводять до розвитку FIP [10, 11]. Клінічні ознаки інфекційного перитоніту котів вперше були описані у кішок у США в 1963 році, вони здебільшого неспецифічні, включають апатію, лихоманку та втрату ваги, за якими часто слідують порожнинні випоти та/або неврологічні чи очні ознаки [12]. Кішки з випотним FIP мають середній час виживання лише кілька днів.

Нещодавня розробка та доступність лікувальних протівірусних препаратів [12, 13] революціонізували підхід до лікування FIP. Зараз клініцистам потрібні діагностичні інструменти, які допоможуть швидко визначити ймовірність діагнозу FIP, щоб ефективні протівірусні препарати можна було використовувати якнайшвидше.

В даний час не існує вакцини, яка б запобігала виникненню FIP. Єдиним методом профілактики FIP є профілактика інфекції FCoV,

© ГАЛАЄВА М. В., ГАЛАЄВ О. В., ГАРЄЄВ О. Л.

тому необхідним є своєчасне виявлення FCoV, як у хворих тварин, так і у тварин без ознак захворювання. Найбільш надійним, високочутливим і специфічним методом з виявлення FCoV є полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) [14, 15]. Метою нашого дослідження була розробка ефективної тест-системи для діагностики коронавірусної хвороби котів на основі ЗТ-ПЛР в реальному часі.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень слугував клінічний матеріал (кров, асцитна рідина, випіт, зішкріб зі слизової прямої кишки) котів різного віку та статі, серед яких були як тварини з підозрою на інфекцію FCoV, так і тварини без ознак захворювання. Загалом під час дослідження було проаналізовано клінічний матеріал 160 котів.

РНК виділяли з використанням «Набору реагентів для виділення РНК/ДНК Genomic RNA/DNA Extraction kit» (ТОВ «Виробнича фірма Сіместа», Україна) згідно інструкції. Вимірювання концентрації та оцінювання якості екстрагованої ДНК здійснювали методом спектрофотометрії на спектрофотометрі «NanoDrop 2000» (ThermoScientific, Великобританія).

ПЛР зі зворотною транскрипцією ЗТ-ПЛР проводили на термоциклері CFX96 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Реакційній суміші для виявлення FCoV об'ємом 20 мкл містила наступні компоненти: суміш для одноступінної ПЛР зі зворотною транскрипцією 2×One-Step RT-PCR Mix (ТОВ «Виробнича фірма Сіместа», Україна); суміш праймерів Primer Mix (містить специфічні праймери для детекції FCoV, по 150 нМ кожного) – 5 мкл; ДНК виділена з клінічних зразків 15–30 нг / 5 мкл. В якості інтеркалюючого флуоресцентного барвника використовували водний розчин SYBR Green I в рекомендованих виробником концентраціях.

ЗТ-ПЛР з подальшою детекцією продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі проводилася за наступною програмою: 15 хв при 50 °С; 5 хв при 95 °С; потім 40 циклів: 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, 20 с при 72 °С. Продукти ампліфікації (10 мкл аліквоту ПЛР-суміші) фракціонували у 12 % неденатуруючому поліакриламідному гелі (ПААГ) у 1хТВЕ. Електрофорез у поліакриламідному гелі проводили за постійної напруги 400 V в апараті для вертикального гель-електрофорезу. Візуалізацію продуктів електрофоретичного розподілу проводи-

ли імпрегуванням гелів нітратом срібла. Калібрування молекулярної маси отриманих ампліконів здійснювали з використанням стандарту pUC19/MspI та 10 bp DNA Ladder.

ЗТ-ПЛР у реальному часі здійснювали за програмою: 15 хв при 50°С; 5 хв при 95°С; потім 40 циклів: 10 с при 95°С, 30 с при 60°С, 20 с при 72°С (зчитування флуоресценції); крива плавлення від 65°С до 95°С з кроком 0,5°С і затримкою на 15 с для зчитування флуоресценції. Графічний аналіз даних виконано за допомогою програми BioRad CFX Manager 3.1 (США). У кожному експерименті ставили контроль екстракції та контроль без матричної ДНК.

Результати інтерпретували на підставі наявності та положення температурних піків денатурації молекул ДНК. Результат ПЛР-дослідження вважався достовірним, якщо отримані результати для контрольних зразків задовольняли критеріям. Позитивні зразки і відповідно позитивний контрольний зразок мали температуру плавлення продуктів ампліфікації за каналом FAM/SYBR 79,0–83,0°С. Негативні зразки і відповідно негативний контрольний зразок мали температуру плавлення продуктів ампліфікації за каналом FAM/SYBR < 79°С.

Для визначення діагностичної ефективності тест-системи використовували наступні формули.

Позитивна передбачувана відповідність (**PPA, %**) – оцінює, наскільки добре тест виявляє справжні позитивні випадки:

$$PPA = \frac{TP}{TP+FN} \times 100\%$$

Негативна передбачувана відповідність (**NPA, %**) – оцінює наскільки добре тест виключає справжні негативні випадки:

$$NPA = \frac{TN}{TN+FP} \times 100\%$$

Загальна точність (**Accuracy, %**)

$$Accuracy = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} \times 100\%$$

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за загальноприйнятими методами.

Результати та обговорення

На першому етапі роботи було проведено ЗТ-ПЛР зі специфічними до FCoV праймерами з подальшою детекцією продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі. В результаті ЗТ-ПЛР РНК, виділеної з біологічного матеріалу котів, були ідентифіковані зразки з наявністю FCoV, добрані найбільш специфічні праймери та ство-

рено тест-систему для детекції FCoV в агарозному або поліакріламідному гелі з оптимальною концентрацією всіх компонентів ПЛР, що дозволяє ефективно виявляти FCoV у зразках РНК виділеної з різного клінічного матеріалу. Умови проведення ЗТ-ПЛР наведено в розділі матеріали і методи. Продукт ампліфікації розміром 102 п.н. вказує на наявність РНК FCoV у досліджуваного зразка. З використанням отриманої тест-системи було проаналізовано клінічний матеріал 50 котів та кішок, як з підозрою на наявність коронавірусної хвороби, так і без ознак захворювання. З досліджених зразків 10 виявилися позитивними за FCoV і, відповідно, 40 зразків – негативними.

ЗТ-ПЛР з подальшою детекцією продуктів ампліфікації в агарозному або поліакріламідному гелі є відповідним альтернативним діагностичним методом для діагностики вірусних захворювань тварин і людини, оскільки він значно дешевший порівняно з тестами ПЛР у реальному часі. Метод ЗТ-ПЛР з електрофоретичною детекцією навіть був рекомендований до впровадження для виявлення SARS-COV-2 людини в масових масштабах у країнах із низьким і середнім рівнем доходу. Діагностичний тест для виявлення FCoV з використанням електрофорезу може бути відповідною альтернативою тест-системам ПЛР у реальному часі, але він має ряд недоліків. Одними з основних недоліків є трудомісткість та довготривалість, так як гелелектрофорез потребує додаткових кроків (приготування гелю, завантаження зразків, електрофорез, фарбування та візуалізація), а також великий ризик контамінації, оскільки пробірки відкриваються після ампліфікації, зразки можуть забруднитися ампліконами, що підвищує ризик хибнопозитивних результатів.

Уникнути перелічених недоліків дозволяє ПЛР у реальному часі, яка вважається «золотим стандартом» для діагностики вірусних захворювань людей і тварин завдяки високій чутливості, специфічності, швидкості аналізу. ПЛР в реальному часі проводиться в герметично закритих пробірках з максимальною автоматизацією процесу, що значно знижує ризик контамінації.

Тому наступним етапом нашої роботи була розробка ЗТ-ПЛР тест-системи для детекції FCoV у реальному часі. ПЛР у реальному часі може використовувати два основні підходи для детекції ампліфікованої ДНК/РНК: з використанням флуоресцентних зондових систем або з інтеркалюючими барвниками. Використання

зондових систем має ряд переваг таких як висока специфічність і можливість мультиплексування, але зазначені системи є значно дорожчими через високу ціну зондів. Тому при розробці тест-системи для детекції FCoV у реальному часі ми використали неспецифічний інтеркалюючий барвник SYBR Green I. Інтеркалюючі барвники «виявляють» накопичення будь якої ДНК, включаючи димери праймерів. Специфічність отриманого продукту реакції оцінювали за допомогою кривих плавлення (melt curve analysis). Для цього по закінченню ПЛР пробірку повільно нагрівали і одночасно реєстрували зміни флуоресценції. Фрагменти ДНК різної довжини і складу плавився за різної температури, що дозволило оцінити склад реакційної суміші. Емпіричним шляхом було підібрано оптимальну температуру відпалу праймерів та температуру плавлення і виявлення сигналу. Введення до складу ПЛР-суміші інтеркалюючого флуоресцентного барвника SYBR Green I та модифікація температурного режиму реакції дозволили нам розробити протокол для ампліфікації та аналізу продуктів ПЛР у форматі реального часу. Умови проведення ЗТ-ПЛР з оцінкою кривих плавлення в реальному часі для виявлення FCoV наведено в розділі «Матеріали і методи».

У результаті було показано, що кожен позитивний зразок характеризувався одним переважним піком, що відповідав єдиній смугі на електрофореграмі. Наявність одного чітко вираженого піку кривих плавлень свідчить про специфічність використаних праймерів для ідентифікації FCoV. Діапазон значень температур плавлення продуктів ампліфікації для FCoV за каналом FAM/SYBR становив 79,0 – 83,0 °C (рис.). Негативні зразки, що не мали РНК FCoV, характеризувались температурами плавлення продуктів ампліфікації за каналом FAM/SYBR < 79 °C.

Для того щоб оцінити ефективність розробленої тест-системи «Набір реагентів для виявлення коронавірусу котів в реальному часі, FCoV RT-PCR kit» (ТОВ «Виробнича фірма Сіместа») було добрано та проаналізовано 50 зразків РНК, які паралельно були проаналізовані з використанням іншої тест-системи в реальному часі «Feline coronavirus Real-time PCR test, FCoV qPCR test» (Ring Biotechnologi Co Ltd, Китай), яку широко використовують в лабораторних дослідженнях. Результати порівняння наведено у таблиці 1.

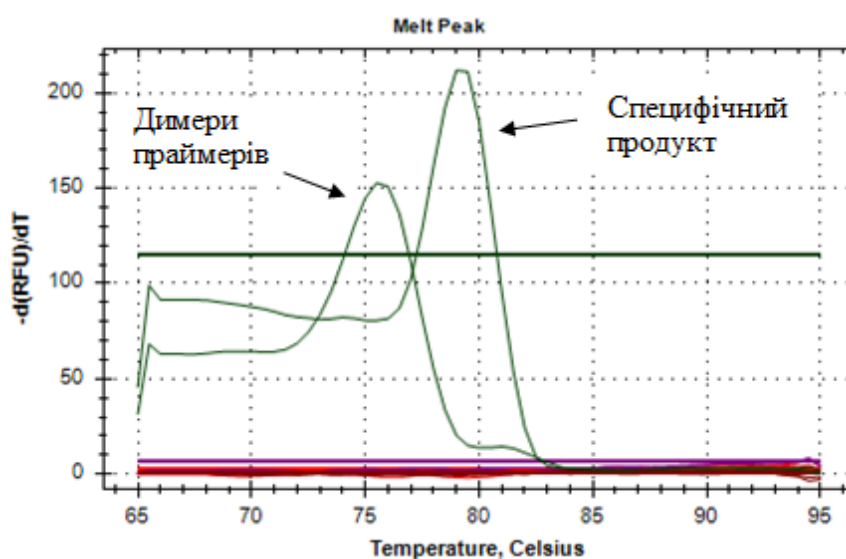


Рис. Аналіз кривих плавлення за допомогою ПЛР-аналізу в реальному часі

Таблиця 1. Порівняння результатів тест-системи «Сіместа» з тест-системою «Ring Biotechnologi»

Результати тест-системи «Сіместа»	Позитивний за тест-системою «Ring Biotechnologi» (n=20)	Негативний за тест-системою «Ring Biotechnologi» (n=30)	Усього
Позитивний	20 (TP)	0 (FP)	20
Негативний	0 (FN)	30 (TN)	30
Усього	20	30	50

Примітки: n – кількість зразків, TP – істинно позитивний (True Positive), TN – істинно негативний (True Negative), FP – хибнопозитивний (False Positive), FN – хибнонегативний (False Negative).

Розрахунки діагностичної ефективності тест-системи дозволили отримати наступні результати.

Позитивна передбачувана відповідність (**PPA, %**) – оцінює, наскільки добре тест виявляє справжні позитивні випадки:

$$PPA = \frac{20}{20+0} \times 100 = 100\%$$

Негативна передбачувана відповідність (**NPA, %**) – оцінює наскільки добре тест виключає справжні негативні випадки:

$$NPA = \frac{30}{30+0} \times 100 = 100\%$$

Загальна точність (**Accuracy, %**):

$$Accuracy = \frac{20+30}{20+0+30+0} \times 100 = 100\%$$

Отримані результати свідчать про високу діагностичну ефективність тест-системи «Сіместа», яка демонструє PPA 100% і NPA 100%. Це підтверджує її придатність для використання у діагностиці коронавірусної хвороби котів.

Під час розробки, випробувань та подальших досліджень з використанням тест-

системи «Набір реагентів для виявлення коронавірусу котів в реальному часі, FCoV RT-PCR kit» (ТОВ «Виробнича фірма Сіместа») було проаналізовано зразки біологічного матеріалу 160 котів та кішок, що надходили до лабораторії протягом 8 місяців. Для дослідження ряду зразків використовували декілька різних ПЛР тест-систем. У 29 тварин (18%) з досліджених 160 було виявлено наявність FCoV (табл. 2).

У низці наукових робіт повідомлялось про зв'язок рівня виявлення FCoV з такими факторами ризику, як вік, стать та порода кішок [16]. В нашому дослідженні ми не спостерігали подібної тенденції, проте була виявлена залежність частоти виявлення FCoV від сезону. Зразки надходили до лабораторії в період з березня по вересень 2023 року. Частота виявлення FCoV навесні становила 28 %, а влітку зменшувалась до 11 % (табл. 3). У вересні частота виявлення вірусу знову збільшувалась і становила 24 %.

Таблиця 2. Частота виявлення FCoV серед зразків біологічного матеріалу котів

Наявність FCoV	n	p±S _p , %
FCoV +	29	18,1±3,04
FCoV –	131	81,9±3,04
Всього	160	100

Примітки: n – кількість зразків; p±S_p – частота виявлення FCoV.

Таблиця 3. Частоти виявлення FCoV в залежності від сезону

Наявність FCoV	Пора року					
	весна		літо		осінь (вересень)	
	n	p±S _p , %	n	p±S _p , %	n	p±S _p , %
FCoV +	15	27,8±6,10	9	10,6±3,34	5	23,8±9,29
FCoV –	39	72,2±6,10	76	89,4±3,34	16	76,2±9,29
Всього	54	100	85	100	21	100

Примітки: n – кількість зразків; p±S_p – частота виявлення FCoV.

Коронавірусна хвороба котів не є сезонним захворюванням. FCoV поширюється переважно через фекально-оральний шлях, і його передача залежить від умов утримання тварин, рівня гігієни та щільності популяції кішок. Проте деякі фактори можуть впливати на частоту поширення FCoV в різні пори року. Як і в людей, імунітет у тварин може слабшати в певні періоди року (наприклад, восени або навесні через зміну температури та умов утримання), що може впливати на ризик інфікування або реактивацію вірусу. Влітку загальний стан здоров'я котів може бути кращим через більшу кількість сонячного світла, що сприяє виробленню вітаміну D, та доступу до якіснішого харчування.

Вірус FCoV передається через фекалії та може виживати у зовнішньому середовищі певний час. Високі температури та ультрафіолетове випромінювання сонця можуть швидше руйнувати вірус, зменшуючи ймовірність зараження. Літо може бути менш стресовим для домашніх котів, оскільки змінюється ритм життя, знижується ризик застуд та супутніх інфекцій. Проте для отримання більш чітких висновків необхідно провести додаткові дослідження.

Висновки

У результаті дослідження зразків біологічного матеріалу котів на наявність коронавірусної інфекції розроблено дві ПЛР тест-системи: тест-система з подальшою детекцією продуктів ампліфікації в агарозному або поліакріламідному гелі та тест-система у реальному часі з оцінкою кривих плавлення. Наведено переваги ПЛР у реальному часі для виявлення FCoV. Показано високу діагностичну ефективність тест-системи «Набір реагентів для виявлення коронавірусу котів FCoV в реальному часі» (ТОВ «Виробнича фірма Сіместа», Україна), що дозволяє використовувати її для діагностики коронавірусної хвороби котів.

З використанням нової тест-системи проаналізовано зразки біологічного матеріалу 160 котів. FCoV виявлено у 18 % тварин. Не зважаючи на те, що коронавірусна хвороба котів не належить до сезонних захворювань, була виявлена залежність частоти виявлення FCoV від сезону. Частота виявлення FCoV навесні становила 28 %, влітку зменшувалась до 11 %, а у вересні знову збільшувалась до 24 %. Однією з причин сезонних коливань може бути послаблення імунітету у тварин восени та навесні, що може впливати на ризик інфікування або реактивацію вірусу.

References

- Hagemeijer M. C., Rottier P. J., de Haan C. A. Biogenesis and dynamics of the coronavirus replicative structures. *Viruses*. 2012. Vol. 4. P. 3245–3269. <https://doi.org/10.3390/v4113245>.
- Tekes G., Thiel H. J. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis. *Advances in Virus Research*. 2016. Vol. 96. P. 193–218. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.002>.
- Pedersen N. C. An Update on Feline Infectious Peritonitis: Diagnostics and Therapeutics. *Vet. J.* 2014. Vol. 201. P. 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.016>.
- Taharaguchi S., Soma T., Hara M. Prevalence of feline coronavirus antibodies in Japanese domestic cats during the past decade. *J. Vet. Med. Sci.* 2012. Vol. 74 (10). P. 1355–1358. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0577>.

5. Spada E., Carrera Nulla A., Perego R., Baggiani L., Proverbio D. Evaluation of Association between Blood Phenotypes A, B and AB and Feline Coronavirus Infection in Cats. *Pathogens*. 2022. 11. 917. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080917>.
6. Kokkinaki K. C. G., Saridomichelakis M. N., Mylonakis M. E., Leontides L., Xenoulis P. G. Seroprevalence of and risk factors for feline coronavirus infection in cats from Greece. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2023. 94. 101962. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.101962>.
7. Klein-Richers U., Hartmann K., Hofmann-Lehmann R., Unterer S., Bergmann M., Rieger A., Leutenegger C., Pantchev N., Balzer J., Felten S. Prevalence of Feline Coronavirus Shedding in German Catteries and Associated Risk Factors. *Viruses*. 2020. 12, 1000. <https://doi.org/10.3390/v12091000>.
8. Gao Y. Y., Wang Q., Liang X. Y., Zhang S., Bao D., Zhao H., Li S. B., Wang K., Hu G. X., Gao F. S. An updated review of feline coronavirus: Mind the two biotypes. *Virus Res*. 2023. Vol. 326, 199059. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199059>.
9. Barker E. N., Tasker S. Advances in Molecular Diagnostics and Treatment of Feline Infectious Peritonitis. *Adv. Small Anim. Care*. 2020. Vol. 1. P. 161–188. <https://doi.org/10.1016/j.vasa.2020.07.011>.
10. Barker E. N., Tasker S., Gruffydd-Jones T. J., Tuplin C. K., Burton K., Porter E., Day M. J., Harley R., Fewes D., Helps C. R. Phylogenetic analysis of feline coronavirus strains in an epizootic outbreak of feline infectious peritonitis. *J. Vet. Intern. Med.* 2013. Vol. 27 (3). P. 445–450. <https://doi.org/10.1111/jvim.12058>.
11. Pedersen N. C. An Update on Feline Infectious Peritonitis: Virology and Immunopathogenesis. *Vet. J.* 2014. 201. P. 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.017>.
12. Tasker S., Addie D. D., Egberink H., Hofmann-Lehmann R., Hosie M. J., Truyen U., Belák S., Boucraut-Baralon C., Frymus T., Lloret A. Feline Infectious Peritonitis: European Advisory Board on Cat Diseases Guidelines. *Viruses*. 2023. 15. 1847. <https://doi.org/10.3390/v15091847>.
13. Addie D., Covell-Ritchie J., Jarrett O., Fosbery M. Rapid Resolution of Non-Effusive Feline Infectious Peritonitis Uveitis with an Oral Adenosine Nucleoside Analogue and Feline Interferon Omega. *Viruses*. 2020. 12. 1216. <https://doi.org/10.3390/v12111216>.
14. Doenges S. J., Weber K., Dorsch R., Fux R., Hartmann K. Comparison of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction of peripheral blood mononuclear cells, serum and cell-free body cavity effusion for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J. Feline Med. Surg.* 2016. Vol. 19. P. 344–350. <https://doi.org/10.1177/1098612X15625354>.
15. Kobialka R. M., Ceruti A., Bergmann M., Hartmann K., Truyen U., Abd El Wahed A. Molecular Detection of Feline Coronavirus Based on Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Pathogens*. 2021. Vol. 10. 1237. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101237>.
16. Barua S, Sarkar S., Chenoweth K., Johnson C., Delmain D., Wang C. Insights on feline infectious peritonitis risk factors and sampling strategies from polymerase chain reaction analysis of feline coronavirus in large-scale nationwide submissions. *J Am Vet Med Assoc*. 2024. Vol. 263 (1). P. 82–89. <https://doi.org/10.2460/javma.24.03.0208>.

HALAIEVA M. V., HALAIEV O. V., GAREEV O. L.

SIMESTA PE LLC,

Ukraine, 65005, Odesa, Melnitska str., 20-A

DEVELOPMENT OF A PCR TEST SYSTEM FOR DETECTING FELINE CORONAVIRUS DISEASE

Aim. Development of an effective test system for diagnosing feline coronavirus disease based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Methods.** Polymerase chain reaction (PCR); reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR); real-time RT-PCR; melting curve analysis; polyacrylamide gel electrophoresis; statistical methods. **Results.** A PCR test system with electrophoretic detection and a real-time PCR test system were developed for the detection of feline coronavirus (FCoV). The advantages of the real-time PCR test system were demonstrated, and its efficiency was evaluated. Using the real-time test system, diagnostic testing of 160 cats was conducted, revealing the presence of FCoV in 18 % of the examined animals. **Conclusions.** The high diagnostic efficiency of the real-time PCR test system allows its use for laboratory diagnosis of feline coronavirus disease. Although feline coronavirus disease is not classified as a seasonal illness, a correlation between the detection frequency of FCoV and the season was observed. The detection rate of FCoV was 28 % in spring, decreased to 11 % in summer, and increased again to 24 % in September. One of the possible reasons for these seasonal fluctuations may be the weakening of immunity in animals during autumn and spring, which could influence the risk of infection or virus reactivation.

Keywords: feline coronavirus (FCoV), PCR, RT-PCR, real-time RT-PCR, melting curve analysis.