

УДК: 619:616.98:577.2

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОШИРЕННЯ ВІРУСУ ДІАРЕЇ ВРХ МЕТОДАМИ ІФА ТА ПЛР

*І. В. Горайчук, А. П. Герілович, Р. О. Кучерявенко, В. І. Болотін,
В. В. Кучерявенко, О. С. Солодянкін*

Національний науковий центр «Інститут експериментальної та клінічної
ветеринарної медицини», м. Харків

Наведено порівняльні результати дослідження наявності збудника вірусної діареї великої рогатої худоби методами полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу. У ході виконання роботи було відібрано та досліджено 1023 зразки сироваток крові великої рогатої худоби з трьох господарств Харківської області. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції було встановлено, що збудник вірусної діареї міститься у 143 зразках (14 %), а методом імуноферментного аналізу виявлено наявність антитіл у 694 зразках (67,8 %). Також було проведено статистичний аналіз розповсюдження вірусу діареї у різних вікових групах господарств.

Ключові слова: ІНДИКАЦІЯ, ВД ВРХ, СИРОВАТКА КРОВІ, РНК ВІРУС, ПЦР, ІФА, ВІКОВІ ГРУПИ

Вірусна діарея ВРХ — надзвичайно поширене у світі контагіозне захворювання великої рогатої худоби, збудником якого є РНК-вміщуючий вірус роду *Pestivirus* [1]. Воно проявляється переважно у молодняку і характеризується широким спектром симптомів захворювання, що ускладнює постановку діагнозу. Інфікування вірусом діареї може призвести до трьох різних клінічних і патологічних проявів, а саме, вірусної діареї великої рогатої худоби (ВД ВРХ), хвороби слизових оболонок та різних форм репродуктивних розладів [2]. Слід також зазначити, що збудник ВД ВРХ має здатність викликати імунотолерантні ембріональні захворювання, які приводять до народження персистентно інфікованих телят, що є постійним джерелом передачі вірусу в популяції ВРХ [3].

Також пестивіруси є потенційними контамінантами біологічної продукції, виготовленої з використанням сировини тваринного походження [4]. Незважаючи на постійні дослідження, збудник ВД ВРХ виявляється в спермі биків-плідників, клітинних лініях [5], фетальних телячих сироватках [6], живих та інактивованих вакцинах [7], а також в інтерфероні для людей [8]. Використання контамінованих вірусом діареї клітин для виготовлення вакцин може спричинити забруднення самих вакцин, що може призвести до сероконверсії чи захворювання у щеплених тварин [9]. Безпека, чистота та ефективність біологічної продукції потребує контролю контамінації збудником ВД ВРХ сировини, клітинних субстратів та кінцевого продукту.

Основоположним для всіх контрольних програм по ліквідації захворювання — є вибір методу діагностики, який залежить від чутливості та специфічності діагностичних тестів. До них відносяться метод антигенної пастки, імуногістохімічний та імуноферментний аналізи (ІФА), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та ізоляція вірусу на культурі клітин [10]. Вони повинні оцінюватися відповідно до мети та етапу програми ерадикації, і можуть бути

класифіковані наступним чином: 1) первинні тести для класифікації стану стада, 2) наступні тести для ідентифікації окремих інфікованих тварин, 3) подальший моніторинг для підтвердження відсутності ВД ВРХ у стаді [11].

У минулому більшість методів для виявлення персистентно інфікованих тварин полягали у виділенні вірусу в культурі клітин, що займало багато часу та потребувало ретельного контролю вірусної контамінації. Сьогодні широко використовується більш швидкий та дешевий метод ІФА, який дозволяє виявляти вірусні антитіла та антигени, проте його недоліком є важке визначення відмінності між природним імунітетом та отриманим від вакцинації [12]. Наявність генетичного матеріалу збудника ВД ВРХ може бути встановлена за допомогою ПЛР-аналізу. Крім того, цей метод має високу чутливість, що робить його придатним для дослідження зразків з потенційно низькою кількістю вірусів, таких як надой молока, об'єднаних проб сироватки або плазми крові, а також персистентно інфікованих тварин [13, 14].

Метою цього дослідження було порівняльне виявлення вірусу діареї в зразках сироватки крові ВРХ різних вікових груп за допомогою ІФА та ПЛР.

Матеріали і методи

Сироватка крові. Для проведення досліджень нами були відібрані 1023 зразки сироватки крові ВРХ з трьох господарств Харківської області. В усіх господарствах зразки відбиралися від тварин різних вікових груп, враховуючи їх співвідношення у стаді. Після відбору зразки зберігали при температурі 4 °С до початку досліджень, а після — при мінус 70 °С для тривалого зберігання.

ІФА. Виявлення антитіл до вірусу діареї ВРХ проводили методом ІФА за допомогою комерційного набору BVDV Antibody Test Kit (HerdCheck, IDEXX Switzerland AG), в якому на поверхню лунок мікротитрувальних плашок вже були нанесені антигени збудника ВД ВРХ. Результати ІФА оцінювали по коефіцієнту оптичного поглинання на фотометрі iMark (Bio-Rad, США) при довжині хвилі 450 нм. Наявність чи відсутність антитіл до вірусу діареї у досліджуваних зразках оцінювали по значенню оптичної щільності S/P наступним чином:

$$\frac{S}{P} = \frac{Sample A_{450} - NC_x A_{450}}{PC_x A_{450} - NC_x A_{450}}$$

де:

NC_x — негативний контроль;

PC_x — позитивний контроль.

Позитивними вважали зразки, коефіцієнт оптичної щільності S/P яких був більше 0,30 оптичних одиниць (о.о.). Рівень оптичної щільності нижче 0,20 приймали за негативний результат.

ПЛР. Вірусну РНК виділяли безпосередньо з клінічних зразків за допомогою методу афінної сорбції [15]. Зворотну транскрипцію з метою отримання кДНК на матриці РНК проводили з використанням набору «GenePak RT Master Mix Core» (ТОВ «Лабораторія Ізоген», Росія).

Ампліфікацію проводили за допомогою комерційного набору «GenePak PCR Master Mix Core» (ТОВ «Лабораторія Ізоген», Росія) та системи універсальних праймерів 324/4236, комплементарних ділянці гена 5' UTR пестивірусного геному [16].

В якості позитивного контролю використовували зразок культуральних розплодок ВД ВРХ штаму Oregon.

Облік результатів реакції проводили у променях УФ-світла після електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі за сили току 30 mA та напруги 15 В/см.

Результати й обговорення

На першому етапі досліджень з 1023 зразків сироватки крові ВРХ, які були відібрані в трьох господарствах Харківської області, методом ПЛР була встановлена наявність РНК збудника ВД ВРХ у 143 зразках (14,1 %). З них у першому господарстві було виявлено 32 позитивних зразка (12,8 %) з 250, у другому — 79 (16,7 %) з 473 зразків та в третьому — 32 зразки (10,7 %) з 300.

Далі за допомогою методу ІФА була встановлена наявність антитіл до вірусу діареї ВРХ в 694 зразках сироватки крові (67,8 %) з 1023. З них у першому господарстві було виявлено 43 позитивних зразка (17,2 %) з 250, у другому — 398 (84,1 %) з 473 зразків та в третьому — 253 зразки (84,3 %) з 300.

Отримані дані були проаналізовані щодо наявності генетичного матеріалу вірусу діареї та антитіл до нього у зразках сироватки крові ВРХ різних вікових груп та представлені у таблиці 1. За результатами проведеного аналізу даних встановлено, що 77,6 % усіх зразків, які містили генетичний матеріал збудника ВД ВРХ, були позитивними щодо вмісту антитіл до зазначеного збудника. На нашу думку це може бути пов'язано з тим, що деякі зразки були відібрані від тварин, які знаходилися на початковій стадії захворювання або мали знижений імунітет за рахунок розвитку інфекційного процесу іншого походження.

Таблиця 1

Порівняння результатів ПЛР та ІФА у різних вікових групах ВРХ та господарствах

Вік	Господарство № 1		Господарство № 2		Господарство № 3		Разом	
	ПЛР +, %*	ІФА +, %**	ПЛР +, %*	ІФА +, %**	ПЛР +, %*	ІФА +, %**	ПЛР +, %*	ІФА +, %**
< 1 міс	10	100	0	0	16	100	14,1	100
< 1 року	15,7	26,3	17,5	88,6	8	75	14,7	67,7
1-5 років	9,8	0	17,2	100	11,1	81,3	13,6	80
> 5 років	10,8	75	14,6	100	0	0	12,9	94,1
Разом	12,8	28,1	16,7	94,9	10,7	84,4	14	77,6

Примітка: * — з загальної кількості зразків, ** — з кількості ПЛР-позитивних зразків

Висновки

1. При дослідженні 1023 зразків сироваток крові ВРХ з різних господарств Харківської області наявність РНК вірусу діареї ВРХ методом ПЛР встановлено у 143 зразках (14 %), що свідчить про інфікованість тварин на час дослідження, а ще у 694 зразках (67,8 %) спостерігалася сероконверсія, встановлена методом ІФА. Це свідчить про значне поширення захворювання серед досліджених груп тварин.

2. Дослідження зразків сироваток крові за допомогою ІФА дозволило виявити антитіла до збудника ВД ВРХ у 77,6 % з ПЛР-позитивних зразків.

3. Задля ефективного контролю ВД ВРХ є необхідність у вдосконаленні підходів щодо моніторингу інфекції при залученні комплексу серологічних та молекулярно-генетичних методів.

Перспективи подальших досліджень. У майбутньому планується продовжити моніторинг розповсюдження вірусу діареї ВРХ у різних господарствах України.

*I. V. Goraichuk, A. P. Gerilovych, R. O. Kucheryavenko, V. I. Bolotin,
V. V. Kucheryavenko, O. S. Solodyankin*

COMPARATIVE STUDY BETWEEN PCR AND ELISA FOR DISTRIBUTION BVDV

Summary

The comparative results of the presence of Bovine Viral Diarrhoea Virus by Polymerase Chain Reaction and [Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay](#) are presented. During the work 1023 samples of blood serum of cattle from three farms in the Kharkiv region were selected and analyzed. Using PCR virus was found in 143 samples (14 %) and antibodies were detected in 694 samples (67,8 %) by ELISA. Also statistical analysis of distribution of Bovine Viral Diarrhoea Virus in different age groups of farms was quoted.

*И. В. Горайчук, А. П. Герілович, Р. А. Кучерявенко, В. И. Болотин,
В. В. Кучерявенко, А. С. Солодянкин*

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВД КРС МЕТОДАМИ ПЦР И ИФА

Аннотация

Приведены сравнительные результаты исследования наличия возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота методами полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа. В ходе работы было отобрано и исследовано 1023 образца сыворотки крови крупного рогатого скота из трех хозяйств Харьковской области. С помощью полимеразной цепной реакции, было установлено, что возбудитель вирусной диареи содержится в 143 образцах (14 %), а методом иммуноферментного анализа установлено наличие антител в 694 образцах (67,8 %). Также был проведен статистический анализ распространения вируса диареи в разных возрастных группах хозяйств.

1. *Герілович А. П.* Генотипування вірусу діареї, виявленого в спермі бугаїв і біологічних препара / А. П. Герілович // Вісник аграрної науки. — 2009. — № 7. — С. 43–46.
2. *Grom J.* Bovine viral diarrhoea (BVD) infections — control and eradication programme in breeding herds in Slovenia / J. Grom, D. Barlic-Maganja // *Vet. Microbiol.* — 1999. — Vol. 64. — P. 259–264.
3. *Bolin S. R.* Control of bovine virus diarrhoea virus / S. R. Bolin // *Res. Sci. Tech.* — 1990. — Vol. 9, No. 1. — P. 163–171.
4. *Golemba M. D.* Simple procedures to obtain exogenous internal controls for use in RT-PCR detection of bovine pestiviruses // M. D. [Golemba](#), V. [Parreno](#), L. R. [Jones](#) // [Mol. Cell. Probes](#). — 2008. — Vol. 22, No. 3. — P. 212–214.
5. *Harasawa R.* Demonstration and genotyping of pestivirus RNA from mammalian cell lines / R. Harasawa, H. Mizusawa // *Microbiol. Immunol.* — 1995. — Vol. 39, No. 12. — P. 979–985.
6. *Bolin S. R.* Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum / S. R. Bolin, J. F. Ridpath // *J. Vet. Diagn. Invest.* — 1998. — Vol. 10, No. 2. — P. 135–139.
7. *Giangaspero M.* Genotypes of pestivirus RNA detected in live virus vaccines for human use // M. Giangaspero, G. Vacirca, R. Harasawa et al. // [J. Vet. Med. Sci.](#) — 2001. — Vol. 63, No. 7. — P. 723–733.

8. *Harasawa R.* Sequence analysis of the 50 untranslated region of pestivirus RNA demonstrated in interferon for human use / R. Harasawa, T. Sasaki // *Biologicals*. — 1995. — Vol. 23, No. 4. — P. 263–269.
9. *Wessman S. J.* Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production / S. J. Wessman, R. L. Levings // *Dev. Biol. Stand.* — 1999. — Vol. 99. — P. 3–8.
10. *Saliki J. T.* Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea infections / J. T. Saliki, E. J. Dubovi // *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* — 2004. — Vol. 20, No. 1. — P. 69–83.
11. *Houe H.* Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe / H. Houe, A. Lindberg, V. Moennig // *J. Vet. Diagn. Invest.* — 2006. — Vol. 18, No. 5. — P. 427–436.
12. *Fulton R. W.* Multiple diagnostic tests to identify cattle with Bovine viral diarrhoea virus and duration of positive test results in persistently infected cattle / R. W. Fulton, B. E. Hessman, J. F. [Ridpath](#), et al. // [Can. J. Vet. Res.](#) — 2009. — Vol. 73, No. 2. — P. 117–124.
13. *Munoz-Zanzi C. A.* Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle / C. A. Munoz-Zanzi, W. O. Johnson, M. C. Thurmond et al. // *J. Vet. Diagn. Invest.* — 2000. — Vol. 12, No. 3. — P. 195–203.
14. *Radwan G. S.* Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus / G. S. Radwan, K. V. Brock, J. S. Hogan et al. // *Vet. Microbiol.* — 1995. — Vol. 44, No. 1. — P. 77–91.
15. *Boom R.* Rapid and simple methods for purification of nucleic acids / R. Boom, C. Sol, M. Salimans et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1990. — Vol. 28, No. 3. — P. 495–503.
16. *Vilcek S. I.* Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis / S. I. Vilcek, A. J. Herring, J. A. Herring et al. // *Arch. Virol.* — 1994. — Vol. 136. — P. 309–323.

Рецензент: провідний науковий співробітник лабораторії молекулярної епізоотології та діагностики ННЦ «ІЕКВМ», доктор біологічних наук, старший науковий співробітник Лиманська О. Ю.