

УДК 619:616.98:577.2

ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО ЗБУДНИКА ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

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

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

E-mail: goraiчук@ukr.net

Отримано 13.03.2013

Вірусна діарея великої рогатої худоби — поширене контагіозне захворювання, яке має широкий спектр клінічних симптомів у свійських та диких жуйних тварин і завдає значних економічних збитків сільському господарству. Вірус уражує різні вікові групи тварин і спричинює як імуносупресію, так і розлади репродуктивної, респіраторної та травної систем. Персистентно інфікована худоба є постійним джерелом виділення вірусу, а отже і основним чинником передачі захворювання між сприйнятливими тваринами. У статті наведено порівняльні результати дослідження наявності антитіл за допомогою двох методів — імуноензимного аналізу та реакції нейтралізації вірусів. У ході виконання роботи було відібрано й досліджено 1 010 зразків сироваток крові великої рогатої худоби із трьох господарств Харківської області. Присутність антитіл до збудника вірусної діареї було встановлено за допомогою імуноензимного аналізу в 704 зразках (69,7%) із використанням комерційного набору та в 690 зразках (68,3%) — методом *in house*. Після уточнення результатів з використанням реакції нейтралізації вірусів антитіла до вірусу діареї великої рогатої худоби виявлено в 712 зразках (70,5%). Імуноензимний аналіз рекомендовано для проведення масового скринінгу поголів'я великої рогатої худоби щодо наявності вірусу діареї. Отримані дані підтверджують, що чутливість імуноензимного аналізу задовольняє потребам діагностичних методів. Використання реакції нейтралізації вірусів, як «золотого стандарту» серед серологічних методів, є доцільним для уточнення результатів імуноензимного аналізу. З огляду на наявність в отриманих даних значної кількості хибнопозитивних результатів слід проводити комплексні дослідження із застосуванням як серологічних, так і молекулярно-генетичних методів.

Ключові слова: вірусна діарея великої рогатої худоби, сироватка крові, імуноензимний аналіз.

Збудник вірусної діареї великої рогатої худоби (ВД ВРХ) — це одноланцюговий з позитивною полярністю РНК-вмісний вірус діаметром 40–60 нм [1]. Він є представником роду *Pestivirus* родини *Flaviviridae* [2]. Збудники ВД ВРХ зазвичай поділяють на два генотипи, а кожен генотип — на цитопатичний та нецитопатичний біотипи.

Збудники діареї ВРХ спричинюють пригнічення імунітету та розлади репродуктивної, травної і респіраторної систем. Перебіг захворювання супроводжується як субклінічними, так і геморагічними формами [3]. Інфікування нецитопатогенним біотипом вірусу діареї корів на ранніх термінах вагітності може призвести до народження персистентно інфікованих (ПІ) телят [4]. Такі телята є основним джерелом збудника ВД ВРХ [5].

Антиген збудника ВД ВРХ у ПІ тварин трапляється в епітеліальних клітинах усіх слизових оболонок, а отже вірус постійно потрапляє у навколишнє середовище разом із сечею, екскрементами, спермою, секретарми слизових оболонок очей і носа, плодовими водами та оболонками під час абортів [6]. Зараження ПІ тварин цитопатогенним біотипом вірусу діареї ВРХ може спричинити розвиток системних уражень слизових оболонок, що призводить до інтоксикації та летальних наслідків [7].

Як правило, коли захворювання набуває стаціонарного характеру, серед поголів'я ВРХ виявляють близько 1% ПІ та 60% серопозитивних тварин [8, 9]. Телята, народжені від серопозитивних корів, одержують разом із молозивом антитіла до вірусу діареї ВРХ [10]. Титр цих антитіл із часом знижується,

і телята стають сприйнятливими до інфекції. Частіше саме старі тварини стають серопозитивними унаслідок тривалого проміжку часу, протягом якого вони утримувались у безпосередній близькості до III тварин.

Здатність антитіл до нейтралізації ВД ВРХ залежить як від штаму вірусу, так і від кількості та ізотипів антитіл, що виробляються. Непрямим показником наявності збудника ВД ВРХ є виявлення вірус-специфічних антитіл у сироватці крові тварин. Існує багато методів для виявлення антитіл до ВД ВРХ: реакція нейтралізації вірусів (РН), реакція імуофлюоресценції (РІФ) та імуоензимний аналіз (ІЕА) [11, 12]. Реакцію нейтралізації вірусів, також відому як сироваткова нейтралізація, вважають «золотим стандартом» серед методів виявлення антитіл до збудника ВД ВРХ і використовують у всьому світі [13].

Попри вакцинацію, ВД ВРХ завдає значних збитків сільському господарству. Деякі країни Європейського Союзу розробляють і впроваджують програми контролю та знищення (ерадикації) ВД ВРХ, першим кроком яких є виявлення й вилучення зі стада III тварин. Проте вибираючи ефективний метод виявлення збудника ВД ВРХ, слід враховувати антигенну та генетичну варіабельність вірусу, зміну вірусного навантаження, а також вплив материнських антитіл.

Тому з метою підбору оптимального підходу дослідження було зосереджено на порівняльному виявленні антитіл до ВД ВРХ у господарствах Харківської області за допомогою двох методів — імуоензимного аналізу та реакції нейтралізації вірусів.

Матеріали і методи

Сироватка крові

Для проведення досліджень нами було відібрано 1 010 зразків сироватки крові ВРХ з трьох господарств Харківської області. В усіх господарствах зразки периферичної крові брали від тварин різних вікових груп, враховуючи їх співвідношення у стаді. Сироватку крові отримували за загальноприйнятою методикою. Зразки зберігали за температури 4 °С до початку досліджень методом ІЕА, а потім — при -70 °С з метою тривалого зберігання для проведення ІЕА та реакції нейтралізації.

ІЕА виявлення антитіл до ВД ВРХ

Антитіла до ВД ВРХ виявляли за допомогою комерційного набору BVDV Antibody Test Kit (Herd Check, IDEXX, Швейцарія),

в якому на поверхню лунок мікротитрувальних плашок вже було нанесено антиген збудника ВД ВРХ. Під час проведення ІЕА до кожної лунки полістиролового планшета вносили 100 мкл розчинника та 25 мкл проби. Оптичну густину зразків визначали на фотометрі iMark (Bio-Rad, США) за довжини хвилі 450 нм. Наявність чи відсутність антитіл до вірусу в досліджуваних зразках оцінювали за значенням коефіцієнта оптичного поглинання S/P таким чином:

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

де: NC_x — негативний контроль;

PC_x — позитивний контроль.

Позитивними вважали зразки, коефіцієнт оптичного поглинання S/P яких був більший за 0,30, негативними — зразки з коефіцієнтом оптичного поглинання нижче 0,20.

Метод ІЕА in house

Отримання антигену, його іммобілізацію та ІЕА проводили згідно з методом *in house*, розробленим у Національній референс-лабораторії вірусології Ветеринарного університету м. Берн (Швейцарія) [14]. Розчин антигенів вносили у полістиролові 96-луночні планшети PolySorb (Nunc, Данія). Інактивовані сироватки крові та антивидовий кон'югат Goatanti-BovineIgG(H+L)-PO розчиняли в 1%-му розчині сухого молока. Оптичну щільність визначали за довжини хвилі 405 нм в аналізаторі SUNRISE (Tecan, Німеччина).

Реакція нейтралізації вірусів

Реакцію нейтралізації проводили у разі отримання різних результатів обох ІЕА з використанням плоскодонних 96-луночних мікропланшетів фірми TPP (Німеччина) за методом Steck [15]. Сироватки крові прогрівали за температури 56 °С протягом 30 хв з метою інактивації неспецифічних інгібіторів, таких як комплемент, що реагують з мультімолекулярними імунними комплексами. Потім готували двократні розведення кожного зразка від 1:4 до 1:512 на живильному середовищі МЕМ, в які додавали в рівних об'ємах (по 50 мкл) 100 ТЦД₅₀ ВД ВРХ (R1935/72-AG-03/06) та інкубували упродовж 1 год за температури 37 °С в умовах 5% CO₂. У кожну лунку вносили 100 мкл суспензії культури клітин назального епітелію ембріона теляти (ЕКaNaEp), яку культивували за методикою Canal [14], у концентрації 3·10⁵ кл/мл та інкубували за тих самих

умов протягом 78 год. Облік реакції враховували за інфекції вірусу (зміни моношару, що супроводжувалася загибеллю клітин унаслідок репродукції в них вірусу) у контрольних лунках з інфікованою культурою клітин без сироватки крові за допомогою мікроскопа. Титру віруснейтралізуючих антитіл відповідало останнє розведення сироватки, що запобігало розвитку цитопатогенної дії 50% моношару клітин.

Статистичні методи

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми NCSS 07.1.21 statistical software (NCSS, LLC, США), в якій порівнювали результати за чутливістю, специфічністю та охопленням діагностичних методів згідно з методиками порівняння результатів серологічних тестів [16]:

чутливість тесту (Se) — частота позитивних результатів методу ІЕА стосовно позитивних результатів РН:

$$Se = \frac{\text{позитивні результати ІЕА} - \text{хибнопозитивні результати ІЕА}}{\text{позитивні результати РН}}$$

хибнонегативні результати (FN) — частота негативних результатів ІЕА, які є позитивними в реакції РН:

$$FN = \frac{\text{негативні результати ІЕА}}{\text{позитивні результати РН}}$$

охоплення діагностичних методів (Ct) — кількість випадків з однаковими результатами у двох методах ІЕА до загальної кількості досліджених зразків:

$$Ct = \frac{\text{позитивні результати обох методів} + \text{негативні результати обох методів}}{\text{кількість досліджених зразків}}$$

Результати та обговорення

На першому етапі досліджень із 1 010 зразків сироватки крові ВРХ методом ІЕА з використанням комерційного набору BVDV Antibody Test Kit (Herd Check, IDEXX, Швейцарія) антитіла до збудника ВД ВРХ було виявлено в 704 зразках (69,7%). Із них у першому господарстві виявлено 56 позитивних зразків (20,6%) із 272, у другому — 394 (87%) із 453 та в третьому — 254 (89,1%) із 285.

Далі всі відібрані зразки сироватки крові ВРХ досліджували із застосуванням методу *in house*. Наявність антитіл до ВД ВРХ було встановлено у 690 зразках сироватки крові (68,3%) із 1 010. З них у першому господарстві виявили 9 позитивних зразків (3,3%),

у другому — 429 (94,7%) і в третьому — 252 (88,4%).

У разі проведення ІЕА двома різними методами розбіжність в отриманих результатах становила близько 1,4%. Саме ці зразки були додатково досліджені в реакції нейтралізації, після проведення якої наявність антитіл до збудника ВД ВРХ підтверджено в 712 зразках (70,5%) із 1 010 ($P \leq 005$). З них у першому господарстві було виявлено 10 позитивних зразків (3,7%), у другому — 428 (94,5%) і в третьому — 274 (96,1%) (таблиця).

За результатами проведених досліджень

Результати серологічних досліджень зразків сироватки крові ВРХ щодо вірусної діареї ($n = 1 010$)

| Номер господарства | ІЕА IDEXX | | ІЕА Швейцарія | | Позитивні зразки з урахуванням реакції нейтралізації вірусу, % |
|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| | Позитивні зразки, % | Хибно-позитивні, % | Позитивні зразки, % | Хибно-позитивні, % | |
| 1 | 20,6 | 16,9 | 3,3 | 0,4 | 3,7 |
| 2 | 87 | 0,2 | 94,7 | 0,9 | 94,5 |
| 3 | 89,1 | 0,4 | 88,4 | 0 | 96,1 |

було встановлено значну розбіжність хибно-позитивних зразків з першого господарства з використанням ІЕА IDEXX, а саме 16,9% порівняно з результатами, отриманими в дослідженні зразків з інших господарств, що становило менше 1% ($P \leq 005$). На наш погляд, це може бути пов'язано з перехресною реакцією до інших пестивірусів, зокрема до збудника прикордонної хвороби овцець, що було визначено також у роботах інших дослідників [17, 18]. На цій підставі результати дослідження зразків від тварин з першого господарства, отримані за допомогою комерційного набору IDEXX, є статистично недостовірними ($P \leq 005$), тому не враховуватимуться в подальших розрахунках чутливості реакцій.

Порівняння одержаних результатів серологічних досліджень зразків із трьох господарств обома методами ІЕА з урахуванням хибнопозитивних зразків з результатами реакції нейтралізації вірусів показало, що чутливість реакції нейтралізації вірусів значно вища, що відповідає «золотому стандарту» серед методів виявлення антитіл за

наявності в поголів'ї серопревалентності або сероконверсії.

Порівняно з реакцією нейтралізації вірусів чутливість комерційного набору IDEXX становила 92,3%, а методики, розробленої у Ветеринарному університеті м. Берн — 96,5%. Кількість хибнонегативних результатів — 7,7% для комерційного набору та 3,5% — для *in house* методики — ($P \leq 005$). Охоплення випробуваних методів ІЕА досягло 86,1%.

Отже, за результатами серологічних досліджень 1 010 зразків сироваток крові ВРХ з трьох господарств Харківської області було виявлено антитіла до збудника ВД ВРХ у 712 (70,5%) зразках, що свідчить про значне поширення захворювання на цій території. Також було визначено чутливість

комерційного набору IDEXX та *in house* методики Ветеринарного університету м. Берн, яка становила 92,3% та 96,5% відповідно, що задовольняє діагностичні потреби для масового скринінгу поголів'я щодо наявності збудника ВД ВРХ. Враховуючи трудомісткість та часозатратність реакції нейтралізації вірусів, цей метод є більш доцільним для підтвердження позитивних результатів, отриманих за допомогою ІЕА. Задля ефективного контролю розповсюдження ВД ВРХ та уникнення хибнопозитивних зразків у разі використання серологічних методів досліджень є потреба в удосконаленні підходів щодо моніторингу інфекції при залученні комплексу серологічних та молекулярно-генетичних методів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Krey T., Thiel H.-J., Rummenapf T. Acid-Resistant Bovine Pestivirus Requires Activation for pH-Triggered Fusion during Entry // *J. Virol.* — 2005. — V. 79, N 7. — P. 4191–4200.
2. Heinz F., Collett M., Purcell R. et al. Family Flaviviridae. Virus taxonomy // *Abst. 7th Int. Commit. Taxonomy Viruses, San Diego, USA, 2000.* — P. 859–878.
3. Grooms D., Baker J., Ames T. Diseases caused by bovine virus diarrhoea virus / *Large Animal Internal Medicine.* — St. Louis: Mosby, 2002. — P. 707–714.
4. Peterhans E., Bachofen C., Stalder H. P., Schweizer M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction // *Vet. Res.* — 2010. — V. 41, N 6. — P. 44–58.
5. Mudry M., Meylan M., Regula G. et al. Epidemiological Study of Pestiviruses in South American Camelids in Switzerland // *J. Vet. Intern. Med.* — 2010. — V. 24. — P. 1218–1223.
6. Fulton R., Whitley E., Johnson B. et al. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States // *Can. J. Vet. Res.* — 2009. — V. 73. — P. 283–291.
7. Perler L., Schweizer M., Jungi T. et al. Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and -independent pathways // *J. Gen. Virol.* — 2000. — V. 81. — P. 881–887.
8. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections // *Vet. Microbiol.* — 1999. — V. 64. — P. 89–106.
9. Hessman B., Fulton R., Sjeklocha D. et al. Evaluation of economic effects and the health and performance of the general cattle population after exposure to cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus in a starter feedlot // *Am. J. Vet. Res.* — 2009. — V. 70. — P. 73–85.
10. Endsley J., Ridpath J., Neill J. Induction of T lymphocytes specific for bovine viral diarrhoea virus in calves with maternal antibody // *Viral Immunol.* — 2004. — V. 17, N 1. — P. 13–23.
11. Saliki J., Dubovi E. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections // *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* — 2004. — V. 20, N 1. — P. 69–83.
12. Sandvik T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes // *Vet. Microbiol.* — 2005. — V. 72. — P. 3–16.
13. Fulton R. Vaccines / *Bovine Viral Diarrhoea Virus. Diagnosis, Management, and Control.* — Iowa: Blackwell, 2005. — P. 197–208.
14. Canal C. W., Strasser M., Hertig C. et al. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil // *Vet. Microbiol.* — 1998. — V. 63, N 2–4. — P. 85–97.
15. Steck F., Lazary S., Fey H. et al. Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine virus diarrhoea-mucosal disease // *Zbl. Vet. Med.* — 1980. — V. 27. — P. 429–445.
16. Courtney C., Cornell J. Evaluation of heartworm immunodiagnostic tests // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* — 1990. — V. 197, N 6. — P. 724–729.
17. Braun U., Bachofen C., Buchi R. et al. Infection of cattle with Border disease virus by sheep on communal alpine pastures // *Schweiz Arch. Tierheilkd.* — 2013. — V. 155, N 2. — P. 123–128.
18. Cranwell M. P., Otter A., Errington J. et al. Detection of Border disease virus in cattle // *Vet. Rec.* — 2007. — V. 161, N 6. — P. 211–212.

ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

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

Национальный научный центр
«Институт экспериментальной и клинической
ветеринарной медицины», Харьков, Украина

E-mail: goraichuk@ukr.net

Вирусная диарея крупного рогатого скота — распространенное контагиозное заболевание, которое имеет широкий спектр клинических симптомов у домашних и диких жвачных животных и причиняет значительные экономические убытки сельскому хозяйству. Вирус поражает разные возрастные группы животных и вызывает как иммуносупрессию, так и расстройства репродуктивной, респираторной и пищеварительной систем. Персистентно инфицированный скот является постоянным источником распространения вируса, а следовательно, основным фактором передачи заболевания между восприимчивыми животными. В статье приведены сравнительные результаты исследования наличия антител с помощью двух методов — иммуноэнзимного анализа и реакции нейтрализации вирусов. В ходе выполнения работы было отобрано и исследовано 1 010 образцов сывороток крови крупного рогатого скота из трех хозяйств Харьковской области. Присутствие антител к возбудителю вирусной диареи было установлено иммуноэнзимным анализом в 704 образцах (69,7%) с использованием коммерческого набора и в 690 образцах (68,3%) — методом *in house*. После уточнения результатов с помощью реакции нейтрализации вирусов наличие антител к вирусу диареи крупного рогатого скота было установлено в 712 образцах (70,5%). Иммуноэнзимный анализ рекомендован для проведения массового скрининга поголовья крупного рогатого скота на наличие вируса диареи. Полученные данные подтверждают, что чувствительность иммуноэнзимного анализа удовлетворяет требованиям, предъявляемым к диагностическим методам. Использование реакции нейтрализации вирусов, как «золотого стандарта» среди серологических методов, целесообразно для уточнения результатов иммуноэнзимного анализа. Учитывая значительное количество ложноположительных результатов, необходимо проводить комплексные исследования с применением как серологических, так и молекулярно-генетических методов.

Ключевые слова: вирусная диарея крупного рогатого скота, сыворотка крови, иммуноэнзимный анализ.

DETECTION OF THE BOVINE VIRAL DIARRHEA ANTIBODIES

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

National Scientific Centre
«Institute of Experimental and Clinical
Veterinary Medicine»,
Kharkiv, Ukraine

E-mail: goraichuk@ukr.net

Bovine viral diarrhoea is a widespread infection of cattle that has a wide range of clinical symptoms in domestic and wild ruminants. It is a major problem in cattle and causes significant economic losses in the cattle industry. The virus infects bovines of all ages and causes both immunosuppression and reproductive, respiratory and digestive disorders. Persistently infected cattle are the main factor in transmission of the disease between and among herds. Comparative results of antibodies presence received by two methods of enzyme immunoassay and virus neutralization test are given in the paper. During the work, 1010 samples of blood serum of cattle from three farms in the Kharkiv region were selected and analyzed. Bovine viral diarrhoea virus concerning antibodies were found by enzyme immunoassay in 704 samples (69.7%) using commercial kit and in 690 samples (68.3%) using *in house* method. After results clarification by virus neutralization test, bovine viral diarrhoea antibodies were found in 712 samples (70.5%). Immunoenzyme analysis is recommended for mass screening of cattle for viral diarrhoea occurrence. The results confirm that the sensitivity immunoenzyme analysis satisfies the requirements of the diagnostic methods. Using the neutralization reaction of viruses as the «gold standard» of serological methods, it is appropriate to clarify the results of immunoenzyme analysis. Since the results contain a significant number of false positive results, it is necessary to carry out comprehensive studies using both serological and molecular genetics methods.

Key words: viral diarrhoea of bovine animals, serum, enzyme immunoassay.