

*Key words: genetic load, exencephaly, missing maxil, short mandible, cross beak, limbless, polimeliya*

---

УДК 619:616.98:577.2

## ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ЗБУДНИКА ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В ГОСПОДАРСТВАХ ХАРКІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

---

**А.П. ГЕРІЛОВИЧ, І.В. ГОРАЙЧУК, В.І. БОЛОТІН, О.С. СОЛОДЯНКІН**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини» (Харків, Україна)  
goraichuk@ukr.net*

*Вірусна діарея великої рогатої худоби (ВД ВРХ) – це поширене контагіозне захворювання, збудник якого належить до роду Pestivirus родини Flaviviridae. Вірус зберігається в популяції великої рогатої худоби завдяки унікальному поєднанню таких властивостей, як передача збудника та його персистенція в сприятливому організмі. Персистентно інфіковані тварини можуть уражатися хворобою слизових оболонок, яка характеризується ураженнями шлунково-кишкового тракту та часто призводить до раптової смерті у всіх вікових групах. Дане дослідження було зосереджене на ідентифікації персистентно інфікованих тварин у господарствах Харківської області, в ході якого було відібрано та досліджено 1080 зразків сироватки крові від тварин із трьох господарств Харківської області. Дослідження були спрямовані на визначення присутності специфічних антитіл до вірусу діареї за допомогою імуноферментного аналізу та генетичного матеріалу збудника за допомогою ПЛР у режимі реального часу. В цьому дослідженні було виявлено 5 персистентно інфікованих тварин у двох господарствах. За допомогою подальшого філогенетичного аналізу 5'-UTR (ділянка 245 п.н.) було проведено генотипування виявлених ізолятів, яке показало належність усіх 4 вірусів з другого господарства до підтипу 1b та 1 виявленого збудника в третьому господарстві до підтипу 1f.*

**Ключові слова:** вірусна діарея великої рогатої худоби, ПЛР в реальному часі, ІФА, генотипування, філогенетичний аналіз

© А.П. Герілович, І.В. Горайчук, В.І. Болотін, О.С. Солодянкін, 2013

Розведення і генетика тварин. 2013. № 47

**Введення.** Вірус діареї великої рогатої худоби (ВД ВРХ) належить до роду *Pestivirus* родини *Flaviviridae* [1]. Збудник представлений двома генотипами – I та II, що позначаються як BVDV-1 і BVDV-2. Представниками даного роду також є збудники класичної чуми свиней та прикордонної хвороби овець. Всі пестивіруси гомологічні за генетичною та антигенною структурою [2]. Збудники ВД ВРХ I є дуже гетерогенними, серед них розрізняють щонайменше 13 підтипів, тоді як серед більш гомогенних збудників ВД ВРХ II – лише 2 підтипи [3].

Збудник ВД ВРХ зустрічається в популяціях худоби по всьому світу [4]. Його успішне розповсюдження стало можливим, в першу чергу, завдяки спроможності вірусу спричиняти персистентні інфекції. Персистенція вірусу встановлюється на ранніх строках вагітності та пов'язана з імунотолерантністю до зараження. На відміну від персистентної інфекції, спричиненої герпес- та лентивірусами, персистентно інфіковані (ПІ) тварини залишаються вільними від антитіл до збудника ВД ВРХ [5]. Тому єдиним методом визначення персистентної інфекції в поголів'ї є детекція вірусних антигенів або їх РНК. Хоча тимчасово заражені тварини також є здатними до передачі збудника, тільки завдяки ПІ тваринам в поголів'ї зберігається персистенція вірусу. Як правило, коли захворювання набуває стаціонарного характеру, серед поголів'я великої рогатої худоби виявляється близько 1% ПІ та 60% серопозитивних тварин [6, 7]. Телята, народжені від серопозитивних корів, одержують разом з молозивом антитіла до ВД ВРХ [8]. Титр цих антитіл з часом знижується, і телята стають сприйнятливими до інфекції. Частіше саме старі тварини стають серопозитивними внаслідок тривалого проміжку часу, протягом якого вони утримувались в безпосередній близькості до ПІ тварин.

ВД ВРХ призводить до значних економічних збитків [9]. Тоді як використання живих вакцин може спричинити ембріональне інфікування та навіть розвиток хвороби слизових оболонок [10], використання інактивованих вакцин є безпечним, проте не дає достатнього захисту, особливо від внутрішньоутробного зараження [11]. Деякі країни Європейського Союзу розробляють і впроваджують програми контролю та знищення (ерадикації) ВД ВРХ, першим кроком яких є виявлення та вилучення зі стада ПІ тварин. Однак при виборі ефективного методу виявлення збудника ВД ВРХ треба враховувати антигенну та генетичну варіабельність вірусу, зміну вірусного навантаження, а також вплив материнських антитіл. У країнах, де серопревалентність є низькою, ПІ тварини можуть бути виявлені шляхом визначення імунітету поголів'я до збудника ВД ВРХ. Висока серопревалентність свідчить про присутність ПІ тварин у стаді, котрі можуть бути ідентифіковані за допомогою виявлення вірусу.

Нині в Україні поголів'я великої рогатої худоби становить близько 4,5 млн [12]. Ці тварини утримуються в 4350 господарствах, з яких 10–20% налічують понад 900 гол., а найбільше – 7000. Також існує чимала кількість невеликих приватних господарств, кількість яких не визначено. Близько 60% господарств становлять молочні ферми, 30% – змішані (молочні та м'ясні), решта – м'ясні. Наразі немає ні систематичного визначення наявності збудника ВД

ВРХ у поголів'ях, ні програм його контролю. Широкого використання набули інактивовані та ослаблені вакцини, проте ступінь їхнього використання та ефективність – невідомі.

Це дослідження було зосереджене на ідентифікації ПП тварин серед поголів'я досліджуваних господарств завдяки виявленню специфічних антитіл до збудника ВД ВРХ за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) та детекції вірусної РНК з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі з подальшим генотипуванням виявлених ізолятів.

**Матеріал та методи досліджень.** *Сироватка крові.* Для проведення досліджень нами було відібрано 1080 зразків сироватки крові великої рогатої худоби з трьох господарств Харківської області. В усіх господарствах зразки відбирали від тварин різних вікових груп, враховуючи їхнє співвідношення у стаді. Загальна кількість тварин становила 815 гол. у першому господарстві, 900 і 5431 – у другому та третьому відповідно. Після відбору зразки зберігали при температурі 4°C до початку досліджень, а потім – при мінус 70°C для тривалого зберігання.

*ІФА.* Виявлення антитіл до вірусу діареї великої рогатої худоби здійснювали методом ІФА за допомогою комерційного набору BVDV Antibody Test Kit (HerdCheck, IDEXX, Швейцарія), в якому на поверхню лунок мікротитрувальних плашок вже було нанесено антигени збудника ВД ВРХ. При проведенні ІФА до кожної лунки полістеролового планшета вносили 100 мкл розчинника та 25 мкл проби. Оптичну густину зразків визначали на фотометрі iMark (Bio-Rad, США) при довжині хвилі 450 нм. Наявність чи відсутність антитіл до вірусу у досліджуваних зразках оцінювали за значенням коефіцієнта оптичного поглинання S/P наступним чином:

$$S/P = \frac{SampleA_{450} - NC\bar{x}A_{450}}{PC\bar{x}A_{450} - NC\bar{x}A_{450}},$$

де  $NC\bar{x}$  – is negative control;  $PC\bar{x}$  – is positive control;  $NCx$  – негативний контроль;  $PCx$  – позитивний контроль.

Позитивними вважали зразки, коефіцієнт оптичного поглинання S/P яких був більше 0,30. Негативними вважали зразки з коефіцієнтом оптичного поглинання нижче 0,20.

*ПЛР в реальному часі.* Вірусну РНК виділяли з сироватки крові з використанням комерційного набору QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Німеччина) відповідно до рекомендацій виробника з наступними доповненнями. Зразки сироватки крові об'єднували по 5 до одного пулу загальним об'ємом 140 мкл. РНК елюювали в 60 мкл розчину для зберігання. ПЛР в реальному часі проводили за допомогою комерційного набору *cador* BVDV RT-PCR Kit (QIAGEN, Німеччина). Об'єм реакційної суміші становив 50 мкл, з них 20 мкл розчину РНК та 30 мкл суміші Мастер Мікс. Ампліфікація проводилася в термоциклері ABI Prism 7700 Sequence Detection System за програмою: 1 × 30 хв 50°C, 1 × 10 хв 95°C та 45 × 30 с 95°C; 1 хв 55°C.

*Філогенетичне дослідження.* Зразки, позитивні в ПЛР щодо наявності генетичного матеріалу збудника ВД ВРХ, далі досліджували методом секвенування. Філогенетичний аналіз ділянки гена 5'-UTR розміром 245 п.н. був використаний для генотипування підтипів ізолятів вірусу діареї. Філогенетичне дерево було сконструйоване з використанням алгоритмів найближчих сусідів та максимального приближення. Відстань між парами визначалися за алгоритмом Мураками. Усі філогенетичні дерева було сконструйовано та проаналізовано в програмі MEGA 5 software.

*Статистичні методи.* Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми NCSS 07.1.21 statistical software (NCSS, LLC, США).

**Результати досліджень та їхнє обговорення.** На першому етапі проведених досліджень за допомогою ІФА було виявлено наявність антитіл до збудника ВД ВРХ у 713 з 1059 зразків (67,3%). Такі показники було встановлено в багатьох господарствах по всьому світу. Проте кількість позитивних зразків у господарствах була різною. Так у першому господарстві було виявлено 57 позитивних зразків сироватки крові з 283 (20,1%), у другому — 400 з 475 (84,2%) та в третьому — 256 з 301 (85%).

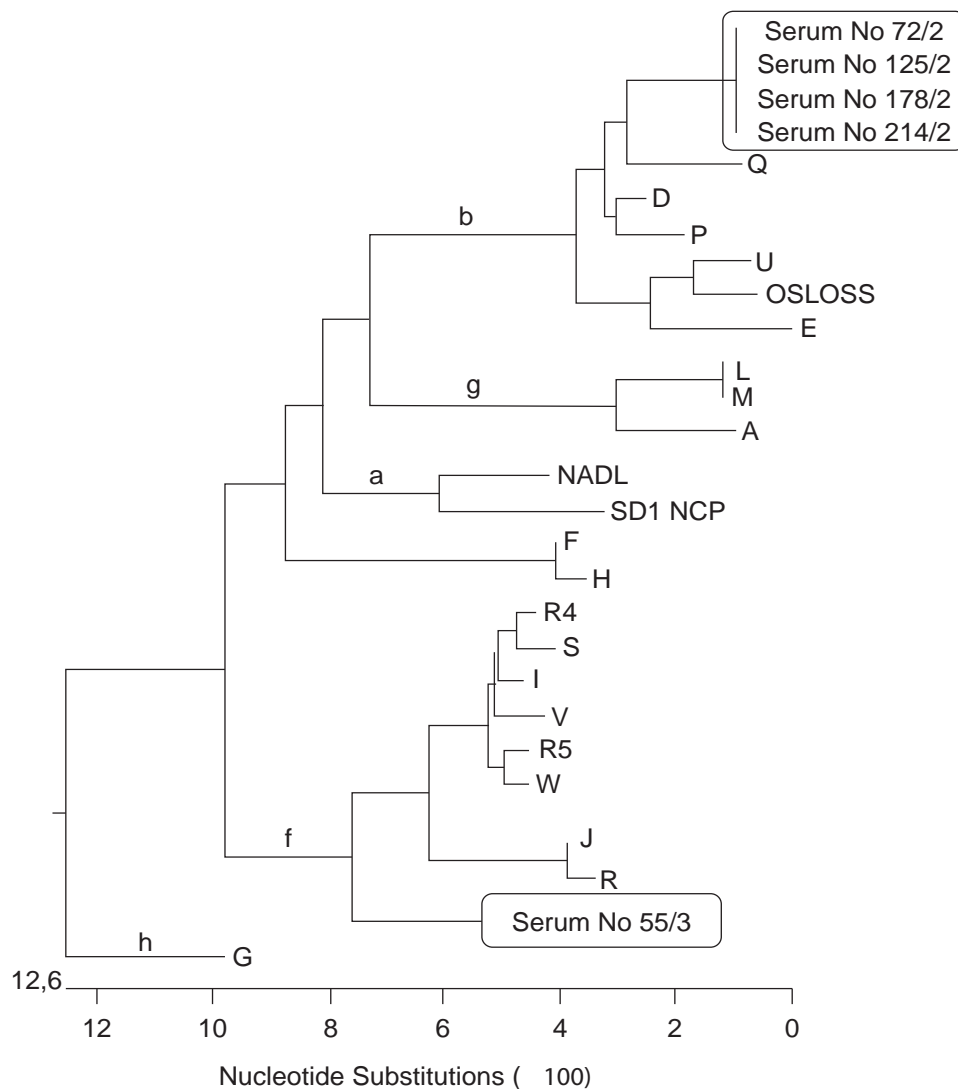
Далі за допомогою методу ПЛР у реальному часі було виявлено присутність РНК вірусу діареї великої рогатої худоби у 5 з 1068 зразків (0,5%). У другому та третьому господарствах виявили у позитивних зразки з 490 (0,8%) та 1 з 301 (0,33%). Генетичний матеріал збудника ВД ВРХ не був встановлений у зразках з першого господарства.

Тварини, сироватка крові яких містила РНК вірусу діареї, але була вільна від антитіл до цього збудника, вважалися персистентно інфікованими. На основі цих критеріїв кількість зразків, досліджених обома методами, становила 1047 з 1080. Усі 5 вірусемічних зразків були серологічно негативні. Таким чином, у ході проведених досліджень було встановлено, що 5 з 1047 (0,48%) тварин є персистентно інфікованими. Вік виявлених ПІ тварин становив 2, 4, 5 і 8 міс.

За допомогою генотипування виявлених ізолятів вірусу діареї було встановлено, що всі вони належать до 1-го генотипу. Після проведення філогенетичного аналізу було з'ясовано, що виділені ізоляти представлені 2 підтипами 1-го генотипу — b та f (рисунок). Усі чотири зразки збудника ВД ВРХ з другого господарства належали до підтипу 1b і були ідентичні в ділянці гена 5'-UTR, проте вірус діареї з третього господарства був ідентифікований як представник підтипу 1f.

Генетичне різноманіття, продемонстроване в даному дослідженні, описує приналежність ізолятів до штамів вірусів діареї підтипу 1b на відстані не більше 2–4%. Такі дані є характерними для подібних досліджень в усьому світі. Виділені віруси цього підтипу є схожими на всі віруси діареї, виділені в Україні.

Іншим виявленим підтипом був 1f. Вірус діареї даного підтипу був виявлений у декількох країнах центральної та західної України, отже, він не є унікальним для Харківської області. Розбіжність досліджуваного ізоляту з вірусом генотипу 1f становила 4,5%.



### Генотипування ізолятів вірусу діареї ВРХ за ділянкою гена 5'-UTR

У сучасній науковій літературі є описання значної ролі вірусу діареї 1-го генотипу в епідеміології ВД ВРХ по всьому світі. Даний збудник демонструє значне розповсюдження у всіх європейських країнах і тільки декілька з них стали вільними від вірусу діареї внаслідок здійснення програм ерадикації шляхом вилучення ПІ тварин та/або вакцинації.

Дослідження генетичних розбіжностей вірусів дає змогу вивчати молекулярне різноманіття вірусів для подальшого створення ефективних засобів профілактики, а також встановлювати походження й джерела вірусної контамінації для визнання епідеміології і створення програм контролю та знищення збудника.

**Висновки.** Був продемонстрований високий рівень серопревалентності вірусу діареї ВРХ (20,1–85%) в господарствах Харківської області. За допомогою ПЛР у реальному часі РНК збудника ВД ВРХ було виявлено в 0,33–0,8% досліджуваних тварин. Після секвенування було доведено, що виявлені віруси належать до вірусу діареї ВРХ 1-го генотипу та поділяються за ділянкою гена 5'-UTR на два підтипи – 1b і 1f.

1. *Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus (BVDV) strains associated with severe outbreaks and high mortalities* / [C. Pellerin et al.] // *Virology*. – 1994. – 203. – P. 260–268.
2. *Genetic and antigenic characterization of novel Pestivirus genotypes: implications for classification* / [P. Becher et al.] // *Virology*. – 2003. – 311. – P. 96–104.
3. *The extended genetic diversity of BVDV-1: typing of BVDV isolates from France* / [A. Jacková et al.] // *Vet. Res. Commun.* – 2008. – 32. – P. 7–11.
4. *Nettleton P.F. Ruminant pestiviruses* / P. F. Nettleton, G. Entrican // *Br. Vet. J.* – 1995. – 151. – P. 615–642.
5. *Chase C.C. The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture* / C.C. Chase, G. Elmowalid, A.A. Yousif // *Vet. Clin. North. Anim. Pract.* – 2004. – 20. – P. 95–114.
6. *Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections* / Houe H. // *Vet. Microbiol.* – 1999. – 64. – P. 89–106.
7. *Evaluation of economic effects and the health and performance of the general cattle population after exposure to cattle persistently infected with bovine virus diarrhea virus in a starter feedlot* / B.E. Hessman // *Am. J. Vet. Res.* – 2009. – 70. – P. 73–85.
8. *Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction* / E. Peterhans // *Vet. Res.* – 2010. – 41(6). – P. 44–58.
9. *Weldegebriel H.T. Evaluation of producer and consumer benefits from eradication of bovine viral diarrhea (BVD) in Scotland, United Kingdom* / H.T. Weldegebriel, G.J. Gunn, A.W. Stott // *Prev. Vet. Med.* – 2009. – 88. – P. 49–56.
10. *Becher P. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease* / P. Becher, M. Orlich, H.J. Thiel // *J. Virol.* – 2001. – 75. – P. 6256–6264.
11. *Van Oirschot J.T. Vaccination against bovine viral diarrhea* / J.T. Van Oirschot, C.J. Brusckhe, J. Mertsola // *Vaccine*. – 1999. – 17. – P. 1983–1991.
12. *Ministry of agrarian policy and food of Ukraine. The amount of cattle has been increased by 1,8% and pigs by 1,9% in 2012.* <http://minagro.gov.ua/uk/node/3675>. 18.01.2013.

## **ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЯ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ХОЗЯЙСТВАХ ХАРЬКОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

**А.П. Герилевич, И.В. Горайчук, В.И. Болотин, А.С. Солодянкин**

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

*Вирусная диарея крупного рогатого скота (ВД КРС) – это распространенное контагиозное заболевание, возбудитель которого относится к роду Pestivirus семейства Flaviviridae. Вирус сохраняется в популяции крупного рогатого скота благодаря уникальному сочетанию таких свойств, как передача возбудителя и его персистенция в благоприятном организме. Персистентно инфицированные животные могут ин-*

фицироваться болезнью слизистых оболочек, которая характеризуется поражениями желудочно-кишечного тракта и часто приводит к внезапной смерти во всех возрастных группах. Данное исследование было сосредоточено на идентификации персистентно инфицированных животных в хозяйствах Харьковской области, в процессе которого было отобрано и исследовано 1080 образцов сыворотки крови от животных из трех хозяйств Харьковской области. Исследования были направлены на определение наличия специфических антител к вирусу диареи с помощью иммуноферментного анализа и генетического материала возбудителя с помощью ПЦР в режиме реального времени. В этом исследовании было выявлено 5 персистентно инфицированных животных в двух хозяйствах. С помощью дальнейшего филогенетического анализа 5'-UTR (участок 245 п.н.) было проведено генотипирование выявленных изолятов, которое показало принадлежность всех 4 вирусов со второго хозяйства к подтипу 1b и 1 обнаруженного возбудителя в третьем хозяйстве к подтипу 1f.

**Ключевые слова:** вирусная диарея крупного рогатого скота, ПЦР в режиме реального времени, ИФА, генотипирование, филогенетический анализ

## GENETIC ANALYSIS OF BVDV INFECTION IN CATTLE FARMS OF KHARKOV REGION

A.P. Gerilovych, I.V. Goraichuk, V.I. Bolotin, O.S. Solodiantkin

*National scientific centre «Institute of experimental and clinical veterinary medicine»  
(Kharkiv, Ukraine)*

*Bovine viral diarrhea is a widespread infection of cattle caused by bovine viral diarrhea virus (BVDV), a member of the Pestivirus genus of the Flaviviridae family. The virus persists in the cattle population by a unique combination of transient and persistent infections. Persistently infected animals may succumb to mucosal disease, which is characterized by lesions in the gastrointestinal tract and its invariably lethal outcome. This study was focused on identification persistently infected animals in cattle farms of Kharkov region. For this reason 1080 blood samples from three different farms were tested for presence BVDV specific antibody by ELISA and viral genetic materials by real-time RT-PCR. In this study 5 persistently infected animals were detected in two farms. Following phylogenetic analysis in 5'-UTR (245 bp fragment) was used for the genetic typing of revealed BVDV isolates into subgenotypes. The genetic typing indicated that all 4 viruses from second farm were typed as BVDV-1b and all of them were absolutely identical in 5'-UTR the virus from third farm typed as BVDV-1f.*

**Key words:** bovine viral diarrhea, real-time RT-PCR, ELISA, genotyping, phylogenetic analysis