

УДК 619:578.833.3:578.2(476)

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-7-11>

Дубаневич О.В., старший научный сотрудник
Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск

ВЫЯВЛЕНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ (ПО РЕГИОНУ 5'-UTR) ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРС, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Резюме

Вирус вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV) вызывает значительные экономические потери. BVDV имеет высокое геномное разнообразие: два генотипа вируса вирусной диареи, где двадцать один субгенотип у BVDV-1 и четыре субгенотипа у BVDV-2. Вакцины – важный инструмент для уменьшения экономических потерь, вызванных этим вирусом. Однако штаммы вакцины должны соответствовать антигенному профилю вирусов, циркулирующих в регионе, где применяется вакцина. Филогенетическое исследование 13 изолятов вируса, циркулирующих на территории Республики Беларусь, показало, что генетический профиль BVDV состоял в преобладающем большинстве из субтипов BVDV-1f (76,9 %) и BVDV-1a (15,0 %) генотипа 1, в одном хозяйстве обнаружен субтип BVDV-2a генотипа 2.

Ключевые слова: вирус, филогенетический анализ, вирусная диарея крупного рогатого скота, секвенирование.

Summary

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) causes serious economic losses. BVDV has high genomic diversity: two viral diarrhoea virus genotypes, with twenty-one subgenotypes for BVDV-1 and four subgenotypes for BVDV-2. Vaccines are important tools for reducing the economic losses caused by this virus. However, the strains of the vaccine match the antigenic profile of the viruses circulating in the area where the vaccine is. A phylogenetic study of 13 virus isolates circulating in the territory of the Republic of Belarus showed that the genetic profile of BVDV consisted in the overwhelming majority of subtypes BVDV-1f (76.9 %) and BVDV-1a (15.0 %), genotype 1, in one farm the subtype was found BVDV-2a genotype 2.

Keywords: virus, phylogenetic analysis, viral diarrhoea in cattle, sequencing.

Поступила в редакцию 10.11.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусная диарея крупного рогатого скота – контагиозная болезнь, которая наблюдается у всех возрастных групп во всем мире [1] и носит, как правило, стационарный характер с заболеваемостью 10–100 % животных, гибелью 10–90 % заболевших в неблагополучном очаге и абортами до 78,6 % [2, 3].

Важным фактором заболеваемости и гибели животных являются персистентно инфицированные (ПИ) животные, составляющие от 1 до 2 % от общей численности крупного рогатого скота [4]. Получение персистентно инфицированных телят происходит при заражении плода на 80–125-м дне стельности, если это не приводит к гибели плода. Такие телята являются имму-

нотолерантными, пожизненными носителями и выделителями вируса [4]. Плоды, заражённые после 125 дней стельности, как правило, образуют вируснейтрализующие антитела и освобождаются от вируса [5].

BVDV КРС поражает преимущественно молодых животных и характеризуется эрозивно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта, постоянной или перемежающейся диареей, увеличением лимфоузлов, лихорадкой, лейкопенией. Часто болезнь протекает в виде респираторного синдрома, эрозивно-язвенного стоматита с обильным слюноотделением и хромотой. У коров чаще наблюдается латентная форма, которая может приводить к острой инфекции плодов, вы-

зывая их гибель, рассасывание и мумификацию, могут наблюдаться аборт на любой стадии беременности [1]. В настоящее время вирусная диарея КРС является эндемическим заболеванием во всех странах, в которых не было систематического контроля ее распространения [6]. В странах, где отсутствует систематический контроль, у половины стад есть ПИ животные, и до 90 % всего крупного рогатого скота подвергалось воздействию BVDV в течение жизни [7]. Болезнь регистрируется в странах Северной Америки, Европы, Ближнего Востока, ЮАР, СНГ.

Ряд стран, в том числе Швеция, Норвегия, Дания и Финляндия, ликвидировали вирусную диарею КРС или близки к тому, чтобы быть благополучными по данному заболеванию [8]. Например, в Германии, где программа искоренения заболевания была начата в 2011 году, количество ферм с ПИ животными снизилось за 5 лет более чем в 20 раз: с 3,44 до 0,16 % [8]. С каждым годом увеличивается количество стран, руководствующихся стратегией по ликвидации вирусной диареи КРС, что указывает на то, что борьба с BVDV приобретает международный уровень. Однако ликвидация все еще находится на ранних стадиях, учитывая, что ряд стран не реализовывали программы по оздоровлению стад [6].

Основопологающим аспектом программ контроля и ликвидации BVDV является диагностическое тестирование. Диагностические этапы включают тесты для выявления и удаления отдельных ПИ животных из BVDV-инфицированных стад, а затем регулярный мониторинг, подтверждающий текущий отрицательный статус BVDV [9]. В дополнение к диагностическому тестированию меры биобезопасности должны быть направлены на избежание заражения стад без BVDV, что является фундаментальной частью любой программы ликвидации вирусной диареи КРС [10, 11]. Движение зараженных животных играет решающую роль в распространении болезней [6], а перемещение ПИ животных является одним из ведущих способов распространения BVDV [12].

В странах, где отсутствуют подобные программы искоренения BVDV, применяется вакцинация [9].

Программа вакцинации включает следующие критерии:

- безопасность вакцины и уровни защиты, которые она обеспечивает;
- разнообразие антигенов и штаммов с учетом штаммов BVDV, присутствующих в регионе;
- постоянное наблюдение для выявления и характеристики возникающих полевых штаммов BVDV для правильного корректирования вакцин;
- время вакцинации в соответствии с технологическими особенностями на комплексах, направленное на снижение рождаемости ПИ телят [13, 14].

Особое значение при вакцинопрофилактике имеет соответствие субтипов BVDV, содержащихся в вакцине, подтипам штаммов, циркулирующих в регионе. За 2004–2007 гг. учеными были проведены исследования по изучению генетических различий BVDV. Так, в Чехии встречаются четыре подтипа (BVDV-1b, BVDV-1d, BVDV-1e и BVDV-1f) с преобладающими подтипами BVDV-1b и BVDV-1d, в Польше – также четыре подтипа (BVDV-1b, BVDV-1d, BVDV-1f, BVDV-1g (3,0 %) с преобладанием подтипов BVDV-1b и BVDV-1d, в Австрии – восемь подтипов (BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1d, BVDV-1e, BVDV-1f, BVDV-1g, BVDV-1h и BVDV-1k) с преобладанием подтипов BVDV-1h и BVDV-1f, в Германии – пять подтипов (BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1d, BVDV-1f и BVDV-1g) с преобладанием подтипов BVDV-1b и BVDV-1d, в Словакии – подтипы BVDV-1d, BVDV-1f и BVDV-1g [10, 15]. Генотип BVDV-2 на территории Европы выявляется редко, хотя BVDV-2a – это наиболее распространенный субгенотип BVDV-2 на всех континентах.

Дамман и другие ученые (2015 г.) в своих исследованиях установили, что вакцинация коров перед осеменением с учетом циркулирующих субтипов в регионе уменьшает распространение BVDV за счет

уменьшения количества родившихся ПИ телят. При этом выбор подходящего генотипа и субтипа BVDV является ключевым при вакцинации. Многие ученые утверждают, что эффективной гетерологичной защиты при вакцинации нет. Количество вируснейтрализующих антител может быть в несколько раз ниже к гетерологичным субтипам [14]. Например, были проведены исследования с использованием живой вакцины Бови Шилд, имеющей в своем составе штамм *Nadl*, принадлежащий к субтипу 1a. Вакцинированные животные имели титр вируснейтрализующих антител 189,4 к штамму 1a и 55,6 – к штамму 1b. При этом было доказано, что титр вируснейтрализующих антител 180 и выше предотвращал внутриутробное заражение и, соответственно, рождение персистентно инфицированных телят [16].

Поэтому целью нашей работы было выявить и определить, какие доминантные субтипы BVDV циркулируют на территории Республики Беларусь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На наличие генома BVDV исследовали пробы биоматериала (фекалии, носовую и влагалищную слизь), патологический материал от крупного рогатого скота. Биоматериал для исследования отбирался из животноводческих хозяйств всех областей Республики Беларусь. Экспериментальная часть работы выполнена в условиях научно-исследовательской лаборатории отдела молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского».

Для детекции изолятов вируса вирусной диареи КРС применяли молекулярно-биологический метод исследования ПЦР. При этом использовали следующее оборудование и материалы:

а) приборы и расходные материалы: ламинар, бытовой холодильник, термостат, микротермостат «BIOSAN-CH100» (Латвия), амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США), паровые автоклавы, микроцентрифуга высокоскоростная

(14000 об/мин) Jouan (Франция), комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария) 0,1–2,0 мкл, 0,5–10,0 мкл, 20,0–200,0 мкл, 100,0–1000,0 мкл, 1–10 мл и наконечники к ним (с фильтрами и без фильтров), пробирки типа «эппендорф» вместимостью 0,5 и 1,5 мл, вортекс «BIOSAN» (Латвия), пробирки для ПЦР 0,2 мл для прибора «С 1000 Thermal Cycler», система для электрофореза «Consort» (Бельгия), Gel Doc XR и программа imageLab Software, BIO-RAD (США), весы RADWAG AS 220/X (Польша).

б) реактивы: тест-система для детекции генома вируса вирусной диареи КРС, разработанная в отделе молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» («Fermentas», Литва), агароза («Helicon», Россия), бромистый этидий («SIGMA», США), буфер для нанесения проб.

Выделение РНК проводили российским набором «АмплиПрайм РИБО-сорб» согласно инструкции по его применению.

Обратную транскрипцию и амплификацию проводили согласно инструкции по применению тест-системы с электрофоретической детекцией.

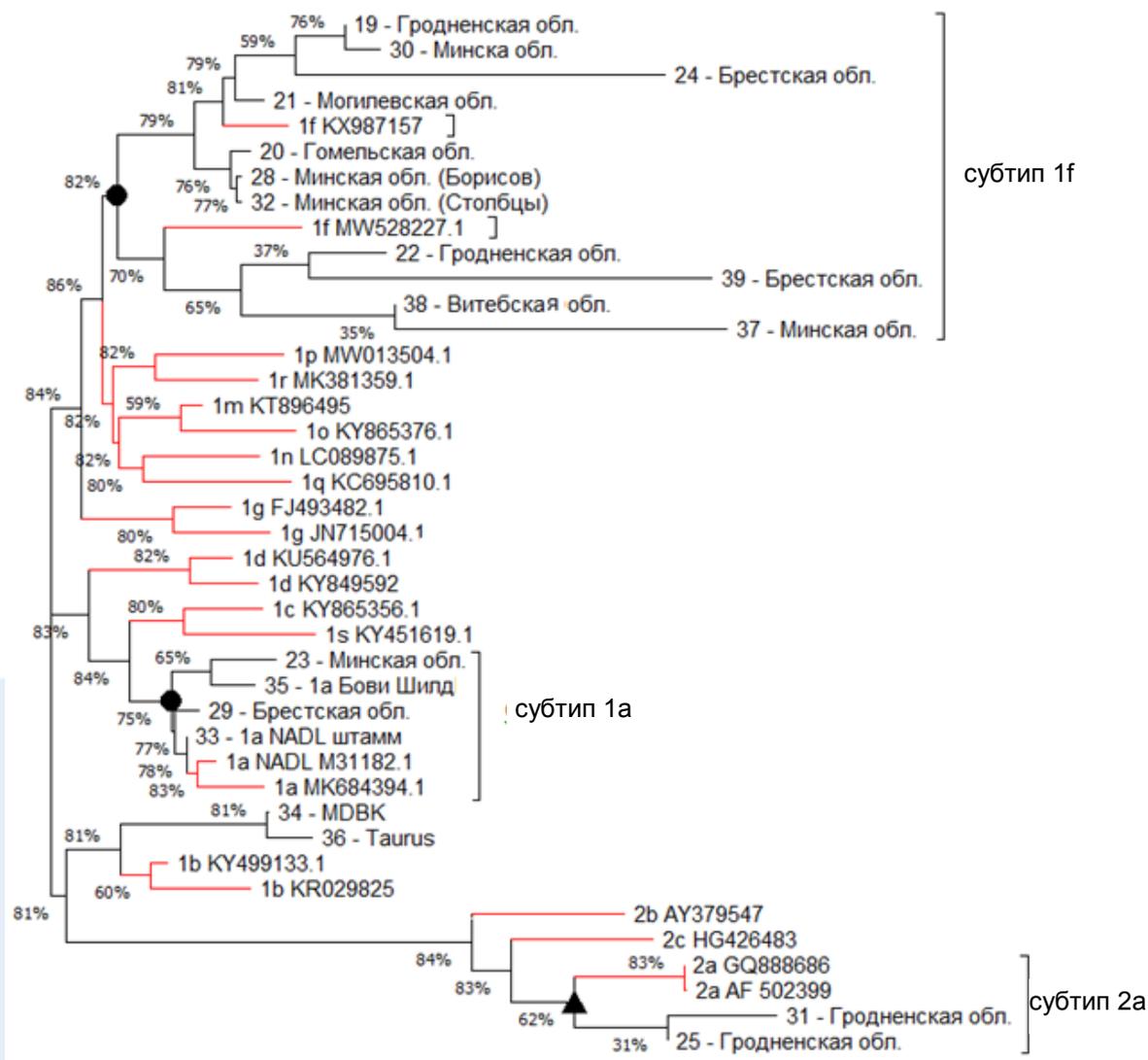
Из образцов с наиболее высокими концентрациями вируса, которые, как правило, более патогенные, делали подготовку проб для дальнейшего молекулярно-генетического анализа методом секвенирования по Сенгеру, которое проводилось в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ.

Полученные в результате секвенирования последовательности участка генома 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) изолятов вируса BVDV анализировали с помощью программы Sequence Scanner v 1.0. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA-X, используя референтные штаммы различных субтипов BVDV из базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На наличие генома BVDV исследована 371 проба биологического материала от КРС с признаками пневмоэнтеритов и патологией размножения из 60 хозяйств Республики Беларусь. При этом инфицированность хозяйств составила 60 %, заболеваемость – 34 %. Образцы с наиболее высокими концентрациями вируса секвенировали. В результате филогенетического ана-

лиза установили, что в республике циркулируют субтипы генотипа 1: BVDV-1f – 76,9 % (Островецкий, Речицкий, Кировский, Мостовский, Барановичский, Столбцовский, Смолевичский, Борисовский, Полоцкий районы) и BVDV-1a – 15,0 % (Жодинский, Пружанский районы), в одном хозяйстве обнаружен субтип генотипа 2 – BVDV-2a (Ивьевский район) (рисунок).



- – кластер (подгруппа) изолятов BVDV субтипов BVDV-1f и BVDV-1a (генотип 1);
- ▲ – кластер (подгруппа) изолятов BVDV, субтип BVDV-2a (генотип 2);
- — референтные штаммы BVDV (GenBank, NCBI)

Рисунок. – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе результатов анализа участка 5'-UTR генома изолятов BVDV, обнаруженных на комплексах КРС республики

Установление субтипов вируса вирусной диареи КРС, циркулирующих на территории Республики Беларусь, имеет важное значение при использовании вакцин и для разработки успешных программ борьбы с болезнью.

ВЫВОДЫ

Инфицированность хозяйств BVDV составила 60 %, заболеваемость – 34 %.

Персистентно инфицированные телята являются главной причиной длительной циркуляции BVDV в стаде, которой следу-

ет уделять ключевое значение при планировании методов борьбы с данной инфекцией.

Установлено, что в Республике Беларусь циркулируют три субтипа вируса вирусной диареи КРС: BVDV-1f, BVDV-1a и BVDV-2a.

Для предотвращения проникновения BVDV через трансплацентарный барьер целесообразно использовать вакцины, содержащие штаммы субтипов, которые гомологичны циркулирующим на данной территории.

ЛИТЕРАТУРА

1. OIE – World Organisation for Animal Health. Bovine Viral Diarrhoea. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2017. Available at [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> (Accessed 1 November 2017). – Date of access : 09.11.2021.
2. Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of Bovine Viral Diarrhea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain / P. Virakul [et al.] // *Theriogenology*. – 1988. – Feb. 29(2). – P. 441–449.
3. Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status / H. Houe [et al.] // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 1995. – № 7. – P. 321–326.
4. Fulton, R. W. Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States / R. W. Fulton [et al.] // *Can J Vet Res*. – 2009. – Vol. 73. – № 4. – P. 283–291.
5. Верховская, А. Е. Особенности диагностики и профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота / А. Е. Верховская, В. А. Сергеев, Т. И. Алупер // *Ветеринария*. – 2009. – № 8. – С. 3–7.
6. Moennig, V. Pestivirus control programs: how far have we 497 come and where are we going? / V. Moennig, P. Becher // *Animal Health Research Reviews*. – 2015. – № 16. – P. 83–87.
7. Position paper: epidemiology and risks. EU Thematic Network on BVDV control. Available at [Electronic resource] / A. Lindberg [et al.] – Mode of access: <https://www.afbini.gov.uk/articles/final-report-bvdvcontrol-europe> (Accessed 30 December 2017). – Date of access: 09.11.2021.
8. Six years (2011–2016) of mandatory nationwide Bovine Viral Diarrhea Control in Germany – a success story / K. Wernike [et al.] // *Pathogens (Basel, Switzerland)*. – 2017. – № 6. – P. 50.
9. Houe, H. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe / H. Houe, A. Lindberg, V. Moennig // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2006. – № 18. – P. 427–436.
10. Kuta, M. P. Predominance of bovine viral diarrhea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland / M. P. Kuta, M. Polak, J. F. Larska // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – Vol. 166. – № 25. – P. 639–644.
11. Modeling the spread of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in a beef cattle herd and its impact on herd productivity / A. Damman [et al.] // *Veterinary Research*. – 2015. – № 46. – P. 12.
12. Tinsley, M. Network modeling of BVD transmission / M. Tinsley, F. I. Lewis, F. Brülisauer // *Veterinary Research*. – 2012. – № 43. – P. 11.
13. Odeón, A. C. Control del virus de la Diarrea Viral Bovina / A. C. Odeón // *Grupo de Sanidad Animal de la EEA Balcarce. INTA*. – 2016.
14. Newcomer, B. W. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus / B. W. Newcomer, M. F. Chamorro, P. H. Walz // *Veterinary Microbiology*. – 2017. – № 206. – P. 78–83.
15. Robesova, B. Genotyping of bovine viral diarrhoea virus isolates from the Czech Republic / B. Robesova, K. Kovarcik, S. Vilcek // *Veterinarni Medicina*. – 2009. – Vol. 54. – № 9. – P. 393.
16. Immune response to bovine viral diarrhea virus (BVDV) vaccines detecting antibodies to BVDV subtypes 1a, 1b, 2a and 2c / W Robert Fulton [et al.] // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 38. – № 24. – P. 4032–4037.