

ТОВ «Агрофірма ім. Довженка»
(Полтавська обл.)

ОСОБЛИВОСТІ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТА КОНТРОЛЮ ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ ВРХ

Андрій Кокарев, Катерина Голда, Дмитро Масюк,

Тетяна Василенко, Володимир Глебенюк,

НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського ДАЕУ (Biosafety Center)

Вірусна діарея великої рогатої худоби (ВД)—це ензоотичне захворювання, що індукується одноланцюговим РНК-геномним вірусом (BVDV) з роду *Pestivirus* родини *Flaviviridae* та реєструється у більшості країн світу. Патогенез захворювання досить складний, що зумовлено біологічними особливостями цього вірусу.

На сьогодні існують сотні різних штамів вірусу, що відрізняються на генетичному рівні, але всі вони за характером ураження культури клітин під час культивування поділяються на два основні біотици:

- 1) мало поширений **цитопатичний (СР) біотип**, дія якого більш обмежена у шлунково-кишковому тракті;
- 2) значно поширений **нецитопатичний (NCP)**, який має тропізм до лейкоцитів, лімфоїдних органів та дихальних шляхів (Khodakaram-Tafti & Farjanikish, 2017).

Сприйнятливими до BVDV є всі статеві-вікові групи ВРХ, а передача збудника відбувається як по горизонталі (від тварини до тварини), так і по вертикалі (від матері до плоду). Другий механізм найбільш небезпечний в епізоотичному ланцюзі розвитку захворювання, оскільки інфікування корів вірусом BVDV під час тільності супроводжується зараженням плоду, що, залежно від стадії гестації, призводить до ембріональної смертності, тератогенного впливу чи утворення й народження персистентно (постійно) інфікованих тварин—«РІ» (схема 1).

РІ-телята є імунотолерантними до вірусу ВД, тобто сприймають антигени вірусу як частку свого організму.

Внаслідок чого імунна система цих тварин не реагує на BVDV, що супроводжується відсутністю імунної відповіді (специфічні сироваткові антитіла IgG не утворюються) до антигенів вірусу. Все це сприяє інтенсивній реплікації вірусу в організмі РІ-тварин та його виділенню у навколишнє середовище впродовж усього життя.

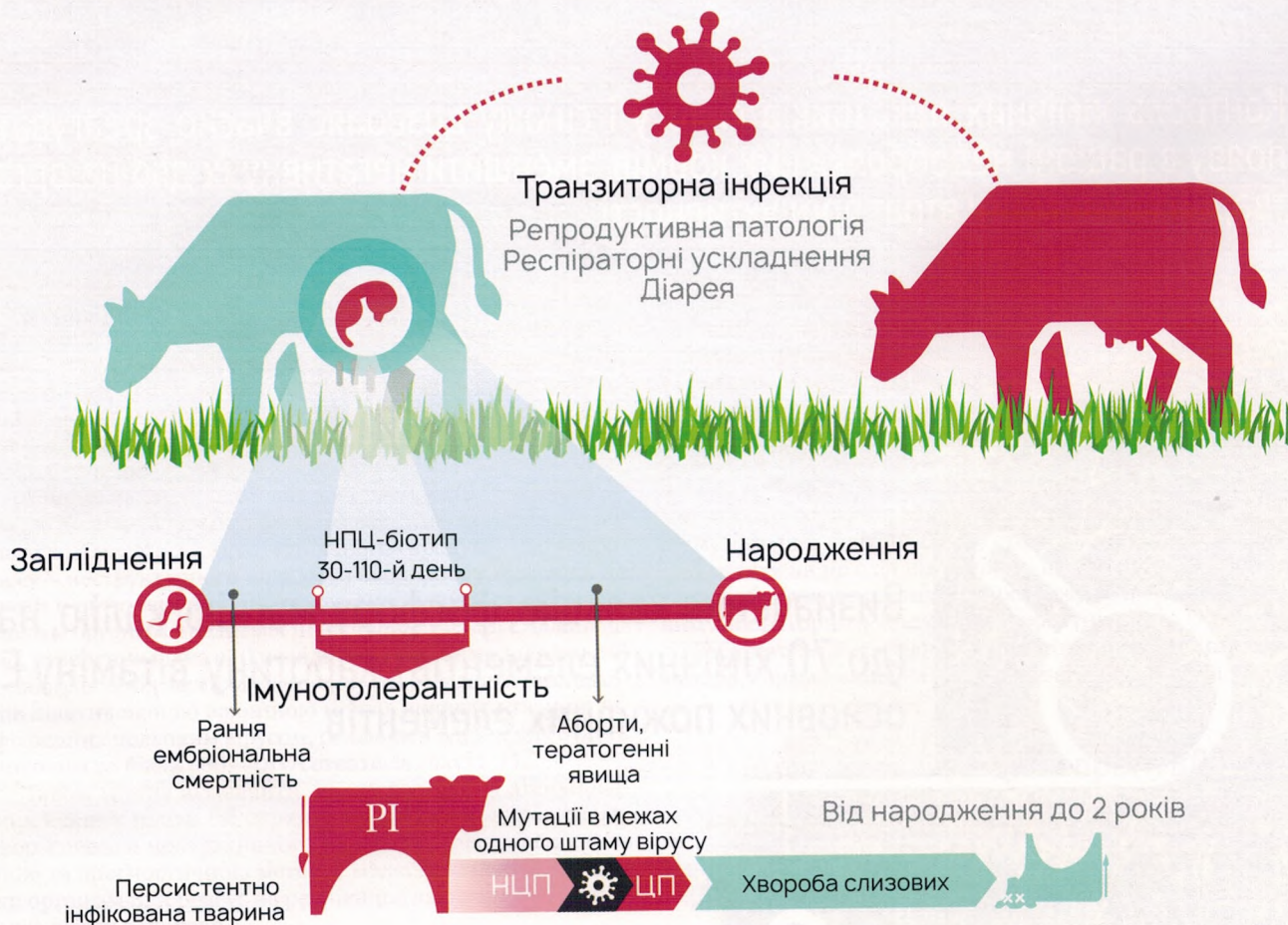
РІ-тварини можуть залишатися у стаді непоміченими протягом кількох років, інфікуючи всіх тварин навколо себе. В середньому серед тварин стада, що є неблагополучним за ВД, кількість РІ становить близько 0,5% від загальної кількості ВРХ (Robert W. Fulton et al., 2004).

Тварини, які інфікуються BVDV після народження, мають звичайну інфекцію, яка зветься транзиторною інфекцією, а тварини відповідно є «транзиторно інфікованими», або ТІ. На відміну від РІ, ці тварини виділяють вірус у середньому впродовж 3 тижнів після інфікування. При цьому кількість інфікованих може сягати 65% поголів'я усього стада (Eiras C. et al., 2012).

Слід зауважити, що оскільки транзиторну інфекцію у більшості випадків викликає нецитопатичний біотип вірусу, то і клінічно хвороба проявляється у вигляді порушень репродуктивної та/або респіраторної патології, а також іншими хворобами, які виникають на тлі імуносупресії (активація бактеріальних патогенів, артрити, ендометрити, мастити, зниження приросту маси та збільшення коефіцієнта конверсії корму тощо). Все це призводить до значних витрат, які постійно формують економічні збитки в галузі тваринництва (Saegerman, 2018).

схема 1

МЕХАНІЗМ ЗАХВОРЮВАННЯ ВІРУСНОЮ ДІАРЕСЮ (НЦП І ЦП БІОТИПИ)



Джерело: Peterhans et al., 2019.

На сьогодні у світі розроблено багато схем лікувально-профілактичних заходів, спрямованих на контроль ВД та елімінацію збудника інфекції зі стада. В основі цих схем є:

- підвищення рівня заходів з біобезпеки;
- ліквідація РІ-тварин;
- імунопрофілактика та формування групового імунітету;
- систематичний лабораторний контроль профілактичних заходів.

Підвищення рівня заходів з біобезпеки спрямоване на недопущення поширення збудника хвороби в стаді. Основними пунктами зазвичай є дотримання санітарно-гігієнічних норм утримання та годівлі тварин, проведення регулярних дезінфекційних, дезінсекційних та дератизаційних заходів, роздільно-вікове утримання тварин та дотримання принципу «пусто-зайнято», недопущення вільного доступу до території господарства тварин інших видів, оскільки вже доведено, що вірус ВД великої рогатої худоби був виявлений у овець, кіз, свиней, буйволів і більш ніж у 40 видів диких тварин (Uzal et al., 2016).

Проведення успішної кампанії з ерадикації збудника ВД із стада неможливе без виявлення та видалення всіх РІ-тварин.

Для цього необхідно проводити дослідження новонароджених та серонегативних тварин, яким більше 4-5 місяців, на наявність антигена BVDV у сироватці крові або тканинних вищипах з вух (схема 2).

Як було описано вище, РІ-тварини виділяють збудник ВД постійно, впродовж усього життя та у великих кількос-

схема 2

ВИЯВЛЕННЯ ТА ВИДАЛЕННЯ РІ-ТВАРИН ЗІ СТАДА

- 1 **Всіх безмолозивних телят досліджувати на наявність антигенів вірусу ВД у сироватці крові**
- 2 **Всіх серонегативних тварин, старших 4-5 місяців, на тлі проведеної вакцинації дослідити на наявність вірусу в сироватці крові чи вищипах з вух**
- 3 **Ізолювати та видалити РІ-тварин зі стада***

*Після підтвердження РІ-статусу тварини через 3 тижні (для виключення ПІ-тварин)

тях. Навіть одна РІ-тварина здатна забезпечити постійну циркуляцію епізоотичного штаму збудника в стаді. Тож ідентифікація та видалення зі стада РІ-тварин є основним завданням у програмі оздоровлення господарства від ВД.

Наступною не менш важливою ланкою в стратегії контролю ВД у господарстві є імунопрофілактичні заходи, які здебільшого зводяться лише до імунізації тварин шляхом вакцинації. Основним завданням цих заходів є створення групового імунітету та витіснення польового (епізоотичного) вірусу зі стада.

Для імунізації ВРХ проти збудника ВД у світі існує два типи вакцин: **атенуйовані** та **інактивовані**. Перші у своєму складі містять живий, але значно ослаблений вірус BVDV, який, потрапивши до організму клінічно здорової тварини, деякий час може розмножуватись в її організмі, але при цьому не викликає інфекційного процесу. Сліди такого вірусу можуть виявлятися впродовж 2-3 тижнів методом ПЛР. Інактивовані вакцини містять убитий вірус, який після введення його в тканини організму не має змоги розмножуватись, а тому відразу поглинається імунними клітинами.

Слід зауважити, що в процесі реплікації (розмноження) вірусу BVDV, як ослабленого вакцинного, так і польового, відбувається синтез «побічного» продукту цього процесу—неструктурного вірусного білка р80, у відповідь на який в організмі тварин також виробляються антитіла. Коли в організм вводиться інактивованій вірус, відповідно, утворення білка р80 не відбувається. Саме завдяки цій особливості під час проведення імунопрофілактичних заходів інактивованою вакциною можна виявляти тварин, інфікованих польовим вірусом, оскільки в їхній крові будуть антитіла до білка р80—DIVA стратегія (табл. 1).

Також можна відзначити, що застосування атенуйованих вакцин проти ВД сприяє швидшому та вираженому формуванню протективного імунітету, але з діагностичною та прогностичною метою є малоефективним, оскільки організм ВРХ реагує на реплікацію вакцинного і польового вірусу однаково.

Необхідно сказати, що ефективність імунопрофілактичних заходів залежить від багатьох факторів, з яких найбільше впливають:

- неповноцінна годівля—недостатність поживних чи біологічно-активних речовин у кормі або порушення їх засвоєння сприяє зниженню рівня імунної відповіді організму тварин на дію вакцинного чи польового вірусу;
- незадовільні умови утримання—велика скупченість тварин та антисанітарія збільшують ризик інфікування, навіть за високого рівня імунного захисту;
- наявність гельмінтів—паразити пригнічують імунну систему, тим самим знижують ефективність імунопрофілактичних заходів;

- порушення умов транспортування та зберігання вакцин—приводить до псування біопрепаратів;
- вакцинація тварин з високим рівнем колостральних антитіл—материнські антитіла нейтралізують вакцинний антиген, що пригнічує формування поствакцинального імунітету;
- вакцинація хворих тварин—за наявності у тварини активної інфекції (ПГ-3, РСВІ, ІРТ, неоспорози, ротавіруси, колібактеріози тощо) імунологічна реакція її організму в першу чергу орієнтована на боротьбу з хворобою, незважаючи на вакцинний антиген, у результаті чого імунна відповідь на вакцинний вірус є слабкою, а захист не має протективного (захисного) рівня;
- наявність РІ-тварин—ці тварини не виробляють антитіла проти збудника ВД;
- високий пресинг вірусу в стаді—підвищує ризик інфікування вірусом навіть на тлі високого рівня імунітету;
- вакцинація не всіх сприйнятливих тварин—приводить до неоднорідного групового імунітету стада, що сприяє поширенню захворювання.

Всі ці фактори впливають на формування індивідуального та групового імунного захисту, що робить малоефективним застосування вакцинації та зводить нанівець всю схему заходів з контролю ВД у стаді.

З огляду на це слід відзначити, що імунопрофілактика у стаді обов'язково повинна супроводжуватись систематичним лабораторним контролем її ефективності.

Лабораторний контроль, або моніторинг,—це комплекс заходів, спрямованих на систематичні дослідження, які за

**Атенуйовані вакцини проти ВД
сприяють швидшому та вираженому
формуванню протективного імунітету,
але з діагностичної та прогностичної
точки зору малоефективні,
оскільки організм ВРХ реагує
на реплікацію вакцинного
і польового вірусу однаково.**

таблиця 1

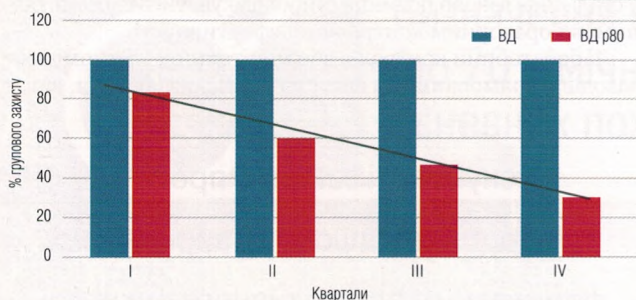
ОСОБЛИВОСТІ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У ВРХ ЗА ВАКЦИНАЦІЇ ПРОТИ ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ

	Антитіла до структурних білків	Антитіла до р80
Тварини, щеплені живою вакциною, неінфіковані	+	+
Тварини, щеплені інактивованою вакциною, неінфіковані	+	-
Тварини нещеплені, неінфіковані	-	-
Тварини нещеплені, інфіковані	+	+
Тварини, щеплені інактивованою вакциною, інфіковані	+	+

схема 3

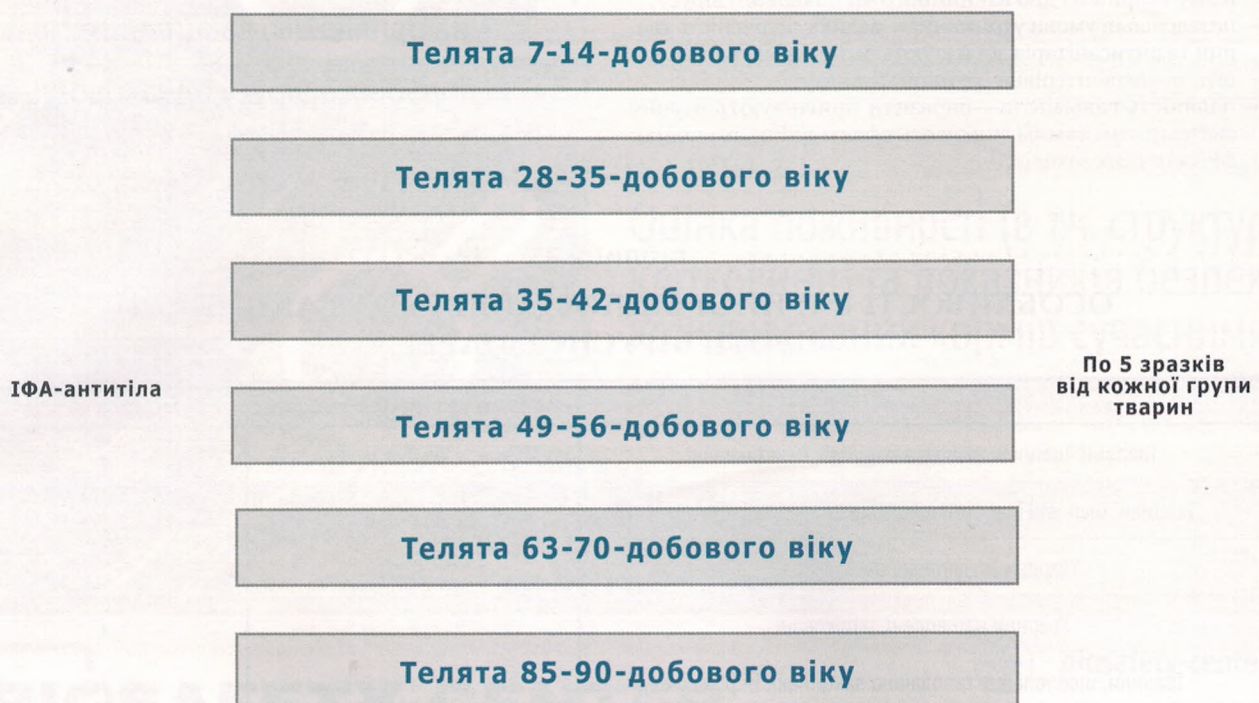
РЕЗУЛЬТАТИ СЕРОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ ВАКЦИНАЦІЇ КОРІВ
ІНАКТИВОВАНОЮ ВАКЦИНОЮ ПРОТИ ВД

Група тварин	Квартал							
	I		II		III		IV	
	ВД	ВД р80	ВД	ВД р80	ВД	ВД р80	ВД	ВД р80
% серопозитивних тварин								
Корови до вакцинації	100	100	100	80	100	60	100	40
Корови через 5-6 тижнів після вакцинації	100	70	100	60	100	50	100	30
Корови через 6 місяців після вакцинації	100	80	100	40	100	30	100	20
% групового захисту	100	83	100	60	100	47	100	30



Зниження пресингу
польового штаму.
Ефективна імунопрофілактика

схема 4

ДОСЛІДЖЕННЯ КОЛОСТРАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ, СПЕЦИФІЧНОГО
ДО АНТИГЕНІВ ВІРУСУ ВД

ретроспективного аналізу розкривають інформацію, наскільки є ефективною впроваджена у господарстві схема з оздоровлення тварин від ВД.

Метою лабораторного контролю імунопрофілактики є визначення рівня формування групового імунного захисту тварин та встановлення динаміки поширення інфекції серед поголів'я (відстежування кількості тварин, що мали контакт із польовим вірусом, за наявності антитіл до білка р80).

Основними ланками лабораторного контролю імунопрофілактики ВД є:

- 1) контроль формування групового імунітету серед корів;
- 2) контроль формування та тривалості специфічного до ВД колострального імунітету в телят;
- 3) контроль формування групового імунітету серед молодняка.

Контроль формування групового імунітету серед корів необхідно проводити не менш як 4 рази на рік за трьома основними точками—до вакцинації та через 1,5–2 і 6 місяців після вакцинації. У разі вакцинації атенуйованою вакциною груповий імунітет оцінюють лише за антитілами до структурних антигенів вірусу ВД (звичайні дослідження методом ІФА/ELISA). Якщо вакцинація корів відбувається інактивованою вакциною, то груповий імунітет оцінюють-

ся одночасно за антитілами до структурних антигенів збудника та неструктурних—р80 (схема 3).

Як видно зі схеми, рівень групового імунітету за структурними білками ВД становить 100% у кожному кварталі, тоді як за антигенами р80 серопревалентність серед тварин знижується на кінець року більш ніж у 2,7 разу порівняно з результатами досліджень I кварталу.

Можна зробити висновок, що в разі вакцинації корів інактивованою вакциною проти ВД груповий імунітет серед досліджених тварин є сформованим на 100%, а поширеність польової інфекції істотно зменшилась. Це вказує на достатню ефективність схеми імунопрофілактичних заходів, упровадженої в господарстві.

За повідомленнями низки наукових праць (Gonzalez A. M. et al., 2014), антитіла до неструктурних білків р80 можуть зберігатись у крові корів кілька років, що обов'язково треба враховувати під час інтерпретації результатів серологічного моніторингу.

Контроль формування та тривалості специфічного до ВД колострального імунітету в телят, як відзначалося раніше, необхідно здійснювати не менш як двічі на рік, оскільки він є основним джерелом захисту новонароджених тварин від патогенного впливу вірусу ВД, а також може помітно впливати на результат вакцинації молодняка.

Кілька дослідників (Robert W. Fulton et al., 2004; Masiuk D. et al., 2019) встановили, що колостральні антитіла, специфічні до антигенів вірусу ВД, у крові телят можуть зберігатись від 3-4 тижнів до 2-3-місячного віку. Тому рання вакцинація телят, коли колостральні антитіла на високому рівні, є малоефективною, оскільки може відбуватись інтерференція (одночасне зниження) рівня антитіл та нейтралізація вакцинного антигена.

У разі пізньої вакцинації утворюється так зване «серологічне вікно», коли телята вже не мають материнського захисту, а поствакцинальні антитіла ще не встигли синтезуватись у достатній для захисту їхнього організму кількості. Такі тварини можуть бути інфіковані польовим вірусом.

З огляду на це, для визначення оптимального періоду вакцинації телят виникає необхідність здійснювати лабораторний контроль колострального імунітету (див. схему 4).

Результати дослідження сироватки крові від телят 14-добового віку вказують на 100% сформований груповий імунітет проти ВД та опосередковано характеризують якість технології виховання телят, оскільки відсутність колострального імунітету до ВД у телят може бути зумовлена порушенням технології виховання молозива, порушенням адсорбційної здатності кишечника або відсутністю специфічних антитіл у молозиві (графік 1).

Рання вакцинація телят,
коли колостральні антитіла
на високому рівні, є малоефективною,
оскільки може відбуватись
інтерференція (одночасне зниження)
рівня антитіл та нейтралізація
вакцинного антигена.

графік 1

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ КОЛОСТРАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ,
СПЕЦИФІЧНОГО ДО АНТИГЕНІВ ВІРУСУ ВД**



таблиця 2

РЕЗУЛЬТАТИ СЕРОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ ВАКЦИНАЦІЇ МОЛОДНЯКА ІНАКТИВОВАНОЮ ВАКЦИНОЮ ПРОТИ ВД

	Групи тварин									
	1 місяць після вакцинації		3 місяці після вакцинації		6 місяців після вакцинації		9 місяців після вакцинації		12 місяців після вакцинації	
	ВД	ВД р80	ВД	ВД р80	ВД	ВД р80	ВД	ВД р80	ВД	ВД р80
	Результат									
Теля 1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Теля 2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Теля 3	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Теля 4	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
Теля 5	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
% групового захисту	80	20	60	20	100	40	100	40	100	60

Польовий штам у стаді.
Низька ефективність
імунопрофілактики

Результати дослідження старших вікових груп телят вказують на 100% груповий імунітет у тварин 42-ої та 63-ої доби життя, а вже на 85-ту добу антитіла виявлено лише в 1 тварини.

Можна зробити висновок, що колостральний імунітет серед досліджених телят є сформованим на 100% і зберігається до 63-ої доби життя, після чого відбувається формування «серологічного вікна». Враховуючи тривалість формування імунної відповіді на дію вакцини (2-3 тижні), можна розрахувати оптимальний вік для вакцинації молодняка ВРХ проти ВД.

Стратегія контролю формування групового імунітету серед молодняка така ж, як і щодо корів. Для цього досліджують сироватку крові від телят до вакцинації та через 1, 3, 6, 9 і 12 місяців після вакцинації (табл. 2).

Результати дослідження антитіл до структурних білків вірусу ВД вказують на недостатньо сформований рівень групового імунітету серед досліджених телят через 1 і 3 місяці після вакцинації, який становить відповідно 80% і 60%. На 6-й, 9-й і 12-й місяць після вакцинації серопревалентність становила 100%.

Аналіз результатів дослідження антитіл до неструктурного білка р80 вказує на циркуляцію польового вірусу серед молодняка та прогресію захворювання у тварин старших вікових груп.

Таким чином, отримані результати вказують на низь-

ку ефективність схеми імунопрофілактики молодняка, що провокує активацію інфекції ВД в стаді. З огляду на це слід переглянути схему вакцинації молодняка для попередження дестабілізації стада за ВД.

Підсумовуючи вище наведене, можна зробити висновок, що вірусна діарея є ензоотичним захворюванням великої рогатої худоби, складність контролю розповсюдження якого зумовлена утворенням у стаді РІ-тварин. Тому для формування ефективної схеми лікувально-профілактичних заходів, що спрямовані на боротьбу з цим захворюванням та його елімінацією зі стада, необхідно обов'язково проводити систематичний лабораторний контроль.

Використання атенуйованих вакцин сприяє швидшому та вираженому формуванню протективного імунного захисту, але не дає можливості ефективно виявляти інфікованих або перехворілих тварин та відстежувати якість проведених імунопрофілактичних заходів. Тому такі вакцини доцільно використовувати у стадах з активно циркулюючою інфекцією з метою стабілізації її осередку.

Застосування інактивованих вакцин сприяє більш довготривалому формуванню імунної відповіді, але дозволяє визначити динаміку розповсюдження захворювання серед тварин господарства та оцінити ефективність проведених заходів, що є більш ефективним для контролю інфекції в стаді та її елімінації. ●