

## GALVIJŲ INFEKČINIO RINOTRACHEITO IR VIRUSINĖS DIARĖJOS DIAGNOSTIKOS IR PREVENCIJOS PROBLEMAS

Algirdas Šalomskas<sup>1,2</sup>, Violeta Mockeliūnienė<sup>2</sup>, Eugenijus Jacevičius<sup>1</sup>, Raimundas Lelešius<sup>2</sup>, Raimundas Mockeliūnas<sup>1</sup>, Rolanas Kliučinskas<sup>3</sup>, Saulius Petkevičius<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Užkrečiamųjų ligų katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lietuva*

<sup>2</sup>*Virusologijos skyrius, LVA Veterinarijos institutas, Instituto g. 2, LT-56115, Kaišiadorys, Lietuva*

<sup>3</sup>*Imunotechnologijos laboratorija, VU Imunologijos institutas, Molėtų pl. 29, LT-2021, Vilnius, Lietuva*

**Santrauka.** Darbo tikslas buvo ištirti galvijų infekcinio rinotracheito (GIR) epizootologinę situaciją kai kuriose veislinėse bandose, įvertinti polimerazės grandininės reakcijos galimybes diagnozuojant ūmią galvijų I tipo herpesvirusų (GHV-1) infekciją; įvertinti lizdinės AT-PGR metoda diagnozuojant persistentinę ir ūmiją galvijų virusinės diarėjos (GVD) virusų infekcijas, nustatyti persistentiškai infekuotų (PI) galvijų reikšmę plintant GVD.

Nustatyta, kad aukšto produktyvumo bandose 45,9 proc. galvijų buvo užsikrėtę GIR sukėlėjais – galvijų I tipo herpesvirusais. Padėtis išanalizuota devyniuose pasirinktuose ūkiuose, iš kurių septyniuose (77,8 proc.) rasta užsikrėtusių galvijų. GIR daug dažniau nustatyta karvių, ypač vyresnių, grupėje ( $p < 0,01$ ). Tyrimai PGR metodu parodė, kad veršelių bronchopneumonijų priežastis buvo GHV-1. Taip pat nustatyta, kad lizdinė AT-PGR gali būti taikoma rutininėje diagnostikoje identifikuojant PI galvijus bandose; nustatyta, kad PI galvijai per 3–4 savaites gali apkirsti nuo 22,2 iki 38,5 proc. imlių, neturinčių antikūnų prieš GVDV, galvijų.

**Raktažodžiai:** galvijų infekcinis rinotracheitas, galvijų virusinė diarėja, diagnostika, polimerazės grandininė reakcija, prevencija.

## DIAGNOSIS AND PREVENTION OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS AND BOVINE VIRAL DIARRHOEA IN LITHUANIA

Algirdas Šalomskas<sup>1,2</sup>, Violeta Mockeliūnienė<sup>2</sup>, Eugenijus Jacevičius<sup>1</sup>, Raimundas Lelešius<sup>2</sup>, Raimundas Mockeliūnas<sup>1</sup>, Rolanas Kliučinskas<sup>3</sup>, Saulius Petkevičius<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Infectious Diseases, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės st. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania*

<sup>2</sup>*Department of Virology, Veterinary Institute of Lithuanian Veterinary Academy, Instituto st. 2, LT-56115, Kaišiadorys, Lithuania*

<sup>3</sup>*Laboratory of Immunotechnology, Institute of Immunology, Vilnius University, Molėtų pl. 29, LT-2021, Lithuania*

**Summary.** The study was designed to estimate the distribution of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and bovine viral diarrhoea (BVD) in randomly selected high productive cattle herds in Lithuania. For this purpose the polymerase chain reaction (PCR) for detection of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in the case of calves acute respiratory disorders was implemented, the one tube nested PCR for detection of BVD virus persistently infected (PI) animals was evaluated, and the role of PI animals on the rate of BVD virus spread within the herd was estimated.

This study demonstrated that in investigated nine cattle herds 45.9% of animals were seropositive to BHV-1. It was statistically higher amount of seropositive animals among cows compared to the heifers ( $P < 0.01$ ). In addition, four outbreaks of calves' acute respiratory disorders were analyzed and in three cases BHV-1 nucleic acid in clinical samples was detected by PCR. A positive correlation between the presence of PI animals and BVD virus infection incidence within the herds was detected.

**Keywords:** Infectious bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhoea, diagnosis, polymerase chain reaction.

**Įvadas.** Galvijų infekcinis rinotracheitas (GIR) – tai užkrečiama liga, kurią sukelia I tipo galvijų herpesvirusai (GHV-1). Priklausomai nuo virusų subtipo ir gyvulių amžiaus, infekcija pasireiškia plaučių uždegimais, konjunktyvitais, rinotracheitais, encefalitais, balanopostitais, reprodukcijos sutrikimais (Veselinovič et al., 1992; Oirschot et al., 1993; Kaashoek et al., 1996). Suaugę gyvuliai dažniausiai serga subklinicine forma arba jiems pasireiškia lytinių organų patologijos, o karvėms ir telyčioms būdingas beržgdumas (Weiblen et al., 1992; Oirschot et al., 1993; Šalomskas et al., 1995). Dėl to ši liga dar vadinama infekciniu pustuliniu vulvovaginitu (IPV), arba infekciniu balanopostitu (IBP).

Galvijų virusinės diarėjos virusai (GVDV) priskiriami *Flaviviridae* šeimos *Pestivirus* genčiai. Tai vieni

labiausiai išplitusių patogenų pasaulio galvijų populiacijoje. Jie padaro ženklus ekonominius nuostolius daugelyje galvijus auginančių šalių (Baker, 1987; Houe, 1999). GVDV kultivavimas ląstelių kultūrose parodė, kad virusai yra dviejų biotipų – sukeliantys ir nesukeliantys ląstelėms patogeninį efektą, tačiau abu virusų biotipai yra patogeniški galvijams (Bolin et al., 1985) ir apsprendžia susirgimo pobūdį. Liga pasireiškia keliais klinikiniais sindromais: suaugusiems galvijams ūmia galvijų virusine diarėja (didelis sergamumas ir mažas gaištamumas) arba lėtine, kartais ūmia gleivinių liga (mažas sergamumas ir didelis gaištamumas), bei vaisiaus ir veršelių persistentine infekcija (Duffel, Harkness, 1985). Pagrindinis GVDV šaltinis bandoje yra persistentiškai infekuoti (PI) gyvuliai, kurie išlieka virusų nešiotojai ir platintojai visą savo

gyvenimą (Duffel, Harkness, 1985), o esant ūmiai ligos eigai ir kliniškai sveiki gyvuliai viremijos metu, kuri trunka tik kelias dienas, platina GVDV su išmatomis, šlapimu, seilėmis, išskyromis iš nosies bei akių (Houe et al., 1995); buliai – dar ir su sperma (Kommisrud et al., 1996). GVDV yra plačiai išplitę ir Lietuvos galvijų populiacijoje (Mockeliūnienė ir kt., 2002, Kliučinskas ir kt., 2004).

Europoje GIR iki 1996 metų buvo diagnozuotas visose šalyse, kur tik buvo atlikti tyrimai, tačiau išplitęs jis netolygiai. Skandinavijos šalyse, kur GIR buvo diagnozuojamas rečiau, pradėta ligos likvidavimo kampanija. Šiuo metu GIR likviduotas Danijoje, Švedijoje, Suomijoje, Austrijoje ir Italijos Bolzano provincijoje. Kovoje su šia liga nemažai pasiekusi ir Vokietija (2004/558/EB).

Reikalavimai GIR kontrolei, daugėjant mokslo pasiekimų, palaipsniui keitėsi. Paaškęjus, kad seroteigiamų galvijų atrankos metodas GIR likviduoti ne visada tinkamas, buvo sukurtos specialios žymėtosios vakcinos. Europos Komisija atliko specialius jų efektyvumo tyrimus ir vakcinos buvo pripažintos tinkamos likviduoti GIR (Report on Bovine herpesvirus 1 (BHV1) marker vaccines, 2000).

Tarptautinis epizootijų biuras 2004 metais parengė naujus tarptautinius GIR diagnostikos ir kontrolės priemonių reikalavimus (Terrestrial Animal Health Code, 2004; Manual of Diagnostic Tests and Vaccines, 2004). 2004 metų liepos 15 d. ES komisija priėmė sprendimą dėl papildomų galvijų vidaus prekybos garantijų, susijusių su infekciniu galvijų rinotracheitu, buvo parengti nauji reikalavimai galvijų spermai (2004/558/EB; LR VMVT direktoriaus 2004 04 15 įsakymas). Šių dokumentų reikalavimai sugriežtina galvijų sveikatos normas, jei norima juos parduoti į kai kurias ES šalis. Todėl ateityje, nesiimant jokių priemonių, Lietuvos galvijų augintojai turės daug problemų eksportuodami galvijus į Europos Sąjungą, nes jau dabar kai kurios, net ir naujos ES šalys narės, ruošia GIR kontrolės ir likvidavimo planus. Kadangi vienas iš esminių GIR kontrolės priemonių yra diagnostika, šioms reikmėms labai svarbu pritaikyti greitus, jautrius ir specifiskus diagnostikos metodus.

Šiuo metu žmonių ir gyvūnų infekcinių ligų diagnostikai plačiai taikomi molekulinės biologijos metodai. Vienas iš jų yra polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodas, LVA Veterinarijos institute kiaulių ir galvijų virusinėms ir bakterinėms ligoms diagnozuoti taikomas jau daugelį metų (Stankevičius ir kt., 2002; Lelešius et al., 2004a; Lelešius et al., 2004b). GIR šiuo metodu Lietuvoje dar nebuvo diagnozuojamas, o jį galima pritaikyti ne tik galvijų, bet ir avių, ožkų, elnių, stumbrų populiacijų tyrimams, GHV-1 nešiotojams nustatyti. Pasaulyje PGR metodas plačiai taikomas galvijų kraujo, karvių pieno, bulių spermos tyrimams, nes apskritė buliai GHV-1 išskiria su sperma, o karvės – su pienu (Weiblen et al., 1992; Oirschot et al., 1993; Rola et al., 2003).

PGR metodu galima greitai (per 1–2 dienas) aptikti gyvų ir net žuvusių virusų DNR ar RNR. Tuo tarpu virusus išskiriant iš patloginės medžiagos, tyrimui gali

prireikti 1–3 persėjimų ląstelių kultūrose, o tai gali trukti keletą savaičių. PGR už virusų izoliavimo metodą gali būti jautresnis net penkis kartus (Van Engelenburg et al., 1993; Van Engelenburg et al., 1995), todėl šis metodas vis plačiau taikomas GIR rutininėje diagnostikoje (Moore et al., 2000).

Pasaulyje taikoma daugybė įvairių paprastos ir lizdinės PGR metodų, kai naudojami įvairūs oligonukleotidų pradmenys (Wiedman et al., 1993; Xia et al., 1995; Rola et al., 2003). Pradmenų pasirinkimas priklauso nuo PGR taikymo tikslų (diagnostika, įvairių viruso genomo regionų sekų nustatymas, molekulinė epidemiologija ir kt.). PGR metodais galima diferencijuoti GHV-1 epizootines ir vakcinas padermes (Fuchs et al., 1999; Schynts et al., 1999) ir nustatyti, kokio tipo virusais individas užsikrėtęs.

Lietuvoje per pastaruosius penkerius metus atlikta nemažai GIR ir GVD tyrimų. Nustatyta, kad 14,5 proc. galvijų buvo užsikrėtęs GHV-1 virusais, o GVD gali būti persirgę 58,2 proc. galvijų (Mockeliūnienė ir kt., 2002; Milius ir kt., 2005). Tačiau GIR diagnostikos problemos veislinėse bandose detalčiau nenagrinėtos nuo 1998 metų, o GHV-1 virusams nustatyti šalyje iki šiol nebuvo taikytas PGR metodas.

**Darbo tikslas** – ištirti GIR epizootologinę situaciją kai kuriose veislinėse bandose, įvertinti polimerazės grandininės reakcijos galimybes diagnozuojant ūmiają galvijų I tipo herpesvirusų infekciją; įvertinti lizdinės AT-PGR metodą diagnozuojant persistentinę ir ūmiają GVDV infekcijas, nustatyti PI galvijų reikšmę plintant GVDV.

**Medžiagos ir metodai. Serologiniai tyrimai.** Tyrimams pasirinkti septyni veislinių galvijų ūkiai, kuriuose atsitiktinai parinktiems galvijams Nacionalinėje veterinarinės laboratorijoje buvo atliekamas antikūnų prieš GHV-1 tyrimas kraujo serume. Tyrimui buvo naudojami komerciniai standartizuoti imunofermeninės analizės (IFA) rinkiniai (Institute Pourquier, Prancūzija), skirti specifiniams gB antikūnams GHV-1 viruso antigenui nustatyti kraujo serume ir piene. IFA atlikta laikantis diagnostinių rinkinių gamintojo instrukcijų.

Galvijų kraujo serumo tyrimai dėl antikūnų prieš GVDV buvo atliekami LVA Veterinarijos instituto ir Nacionalinės veterinarinės laboratorijos virusologijos skyriuose. Serologinei kraujo mėginių analizei buvo naudojami komerciniai diagnostiniai rinkiniai, pagaminti bei standartizuoti Švedijoje (Idexx) ir Prancūzijoje (Institute Pourquier), kaip aprašyta anksčiau (Mockeliūnienė ir kt., 2002).

**Klinikiniai, epidemiologiniai ir patologoanatominiai tyrimai.** Tyrimų metu atkreiptas dėmesys į GIR endemijoms būdingus požymius. Klinikiniai, patloginiai anatominiai ir epizootologiniai tyrimai dėl GIR endemijų atlikti pasirinktuose veislinių galvijų ūkiuose atsižvelgus į NVL serologinių tyrimų duomenis, klinikinius bandų sveikatos stebėjimus. Medžiaga tyrimams paimta keturiose žemės ūkio bendrovėse, kuriose buvo nustatyti GIR endemijai būdingi epizootologiniai, patloginiai anatominiai ir klinikiniai požymiai.

Patloginės medžiagos mėginiai (plaučiai ir kiti organai) paimti iš 1–2 mėnesių gydytų ar negydytų, 29

nugaišusių (staiga ar po trumpesnio arba ilgesnio gydymo antimikrobiniais preparatais) veršelių. Šnervių išskyros buvo paimitos iš 1–2 mėnesių sergančių veršelių.

**Molekulinės biologijos tyrimo metodai.** Iš viso PGR metodu dėl GIR ištirti 29 patologinės medžiagos mėginiai. DNR ekstrakcija buvo atliekama fenolo-chloroformo-izoamilo alkoholio ir Genomic metodais.

Polimerazės grandininėi reakcijai GIR diagnozuoti naudoti oligonukleotidų pradmenys iš GHV1 gB geno (Vilcek, 1993). I tipo galvijų herpesvirusų diagnostikai polimerazės grandininė reakcija atlikta naudojant 23,5 µl H<sub>2</sub>O, 4 µl 10xPGR buferio, 9 µl MgCl<sub>2</sub>, 4 µl dNTP's (10mM), 2 µl P1 pradmens (20 pmol), 2 µl P2 pradmens (20 pmol) ir 0,5 µl Taq DNR polimerazės (5U). Į kiekvieną mėgintuvėlį pridėta 45 µl reakcijos mišinio ir 5 µl DNR. Grandininės reakcijos metu atlikti 35 amplifikavimo ciklai: 95°C 1 min., 56°C 1 min. ir 72°C 1 min. Amplifikavimas užbaigtas 72°C 3 min. prailginimo procedūra. PGR metu gautas 468 nukleotidų porų produktas.

GVD tyrimams buvo panaudotos galvijų virusinės diarėjos (GVDV) referentinės pestivirusų NADL ir NY-1 padermės, atitinkančios citopatinį ir necitopatinį GVDV biotipus, klasikinio kiaulių maro (KKMV) referentinė Europos Sąjungoje padermė Alfort 187, pagausintos pestivirusams jautriose ląstelių kultūrose MDBK ir PK-15 pagal aprašytą metodiką (Mockeliūnienė ir kt., 2000).

Klinikiniai mėginiai PGR tyrimams atrinkti iš

vadinamosios rizikos grupės serologiškai neigiamų galvijų pagal H. Houe rekomendacijas (Houe, 1999). Vieno mėgintuvėlio lizdinės AT-PGR tyrimams panaudota pestivirusinė RNR buvo išskirta iš EDTA stabilizuoto kraujo vienbranduolių ląstelių arba MDBK ląstelių kultūrų mėginių naudojant išskyrimo rinkinį „Total RNA Prep Plus“, kurio veikimas paremtas modifikuotu Chomczynskio metodu (Chomczynski, Sacchi, 1987). Reakcija buvo atliekama ir gauti produktai buvo aptinkami agarozės gelyje pagal A. Stankevičiaus modifikuotą metodiką (Stankevičius ir kt., 2002).

Tyrimai atlikti laikantis 1997 11 06 Lietuvos Respublikos gyvūnų globos, laikymo ir naudojimo įstatymo Nr. 8-500 („Valstybės žinios“, 1997 11 28, Nr. 108) bei poįstatyminių aktų – LR valstybinės veterinarinės tarnybos įsakymų „Dėl laboratorinių gyvūnų veisimo, dauginimo, priežiūros ir transportavimo veterinarinių reikalavimų“ (1998 12 31, Nr. 4-361) ir „Dėl laboratorinių gyvūnų naudojimo moksliniams bandymams“ (1999 01 18, Nr. 4-16). Statistinė duomenų analizė buvo atliekama kompiuterine programa „Graph Prism 3.0™“. Apskaičiuotas Stjudento patikimumo koeficientas. Duomenys laikyti patikimais, kai p < 0,05.

**Tyrimų rezultatai.** 2005 metais GIR situacija analizuota tipiškoje labai produktyviose galvijų bandose. Iš pasirinktų devynių ūkių septyniuose (77,8 proc.) rasta galvijų, turinčių antikūnų prieš GHV-1 virusus.

1 lentelė. GIR situacija pasirinktose labai produktyviose veislinių galvijų bandose

Ūkio Nr.	Gyvulių grupė	Tirta mėginių	IGR tyrimas	
			Teigiami	%
1.	Karvės (Pasvalio r.)	45	39	86,7
	Telyčios	20	3	15,0
	Iš viso:	65	42	64,6
2.	Karvės > 5 metų (Kėdainių r.)	15	6	40,0
	Karvės < 5 metų	30	10	33,3
	Telyčios	15	0	0
	Iš viso:	60	16	26,7
3.	Karvės (Kauno r.)	40	21	52,5
	Pirmaveršės karvės	20	3	15,0
	Telyčios	40	0	0
	Iš viso:	60	16	26,7
4.	Karvės > 5 metų (Kauno r.)	15	10	66,7
	Karvės < 5 metų	15	4	26,7
	Telyčios	15	0	0
	Iš viso:	45	14	31,1
5.	Karvės > 5 m. (Kauno r.)	15	13	86,7
	Karvės < 5 m.	15	13	86,7
	Telyčios	15	9	60,0
	Iš viso:	45	35	77,8
6.	Karvės (Šakių r.)	20	8	40,0
	Telyčios	10	1	10,0
	Iš viso:	30	9	30,0
7.	Karvės (Panevėžio r.)	15	11	73,3
	Telyčios	20	13	65,0
	Iš viso:	35	24	68,6
<b>Iš viso ūkiuose:</b>		<b>340</b>	<b>156</b>	<b>45,9</b>

Analizuojant lentelėje pateiktus duomenis nustatyta, kad GIR dažniau rastas karvių, ypač vyresnių, grupėje ( $p < 0,01$ ). Telyčios GIR virusais užsikrečia patekę į pagrindinę suaugusių galvijų bandą, kai kontaktuoja su karvėmis. Kai kuriose bandose net iki 86,7 proc. karvių gali būti seroteigiamos, t. y. GHV-1 virusų nešiotojos. Pažymėtina, kad penktajame ir septintajame ūkiuose, kur GHV-1 infekcija ypač išplitusi visose amžiaus grupėse, galvijai laikomi palaidai.

Mūsų stebėjimo metu viename ūkyje, kai karvės buvo kelis kartus pergrupuotos, per 6 mėnesius infekuotų galvijų padaugėjo nuo 31 iki 90,1 proc. Tyrimą pakartojus

po 6 mėn., nustatyta, kad ir šį kartą net 180 mėginių (95,7 proc.) buvo teigiami. Akivaizdu, kad suaugusių galvijų bandoje, nesilaikant tinkamų profilaktikos priemonių, per palyginti trumpą laiką gali išplisti GIR, ir tokiose bandose neįmanoma GIR likviduoti atrankos būdu.

Atlikti tyrimai PGR metodu (2 lentelė) patvirtino, kad trijose galvijų bandose endeminio pobūdžio veršelių kvėpavimo takų ligų priežastis buvo GHV-1. Iš viso šių endemijų metu iširta 29 nugaišusių ar sergančių 1–12 mėnesių (gydytų ar negydytų antimikrobiniais preparatais) veršelių plaučių mėginiai ir šnervių išskyros. 13 atvejų (44,8 proc.) gautas teigiamas rezultatas.

2 lentelė. Veršelių, sirgusių kvėpavimo takų ligomis, patologinės medžiagos tyrimų dėl galvijų infekcinio rinotracheito PGR metodu rezultatai

Bandos Nr.	Bandos apibūdinimas	GIR seroteigiamų/ nugaišusių, %	Tiriamoji medžiaga	PGR rezultatas		
				Iširta	Teigiamų	
				n	n	%
1.	Fermoje apie 900 galvijų, laikomų palaidai	80,0/32,8	Plaučiai	7	5	71,4
2.	Tvarte apie 500 galvijų, karvės rišamos	10,0/9,4	Plaučiai	10	4	40,0
3.	Tvarte apie 200 veršelių, laikomų palaidai	71,4/5,3	Šnervių išskyros	4	4	100,0
4.	Ūkyje > 1000 galvijų, laikomų palaidai	77,8/10,0	Plaučiai, blužnis, limfmazgiai	8	0	0
<b>Iš viso:</b>				<b>29</b>	<b>13</b>	<b>44,8</b>

Norėdami nustatyti galvijus – virusinės diarėjos virusų nešiotojus, lizdinės vieno mėgintuvėlio AT-PGR metodu tyrėme specifinių antikūnų prieš GVDV neturėjusių 43 vadinamosios rizikos grupės galvijų kraujo mėginius, paimtus trijuose ūkiuose. Tyrimų duomenimis, pirmame ūkyje 5 iš 21, o antrame – 1 iš 8 tirtų gyvulių AT-PGR rezultatas buvo teigiamas. Tuo tarpu trečiame ūkyje iš 14 tirtų gyvulių visi buvo neigiami, todėl šio ūkio gyvuliai pakartotinai AT-PGR metodu tiriami nebuvo. Norėdami patvirtinti PI diagnozę ir atskirti gyvulius, sergančius ūmia GVD forma, praėjus 3–4 savaitėms šešiams

teigiamai reagavusiems AT-PGR gyvuliams dar kartą paimtas kraujas. Pakartotinas AT-PGR tyrimas patvirtino PI diagnozę 4 iš 6 tirtų pirmo ir antro ūkio galvijams. PI galvijai nustatyti visose tirtose amžiaus grupėse.

Toliau vertinome PI galvijų įtaką GVDV plitimo spartai tarp imlių galvijų (3 lentelė). Iš lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad ūkiuose, kur buvo nustatyti PI galvijai, per 3–4 savaites gali būti apkrėsta nuo 22,2 iki 38,5 proc. imlių, neturinčių antikūnų prieš GVDV, galvijų.

3 lentelė. PI individų įtaka GVDV plitimui tarp imlių galvijų

Ūkis	Seroneigiamų galvijų skaičius I tyrimo metu, vnt.	Teigiamai reagavo po 3–4 savaičių		Rasta PI galvijų, %	Bandoje seroteig. iš viso, %
		vnt.	%		
I	27	6	22,2	7,3	31,7
II	13	5	38,5	3,3	56,7
III	15	1	6,7	0	40,0

**Aptarimas ir išvados.** 2005 m. atlikti tyrimai parodė, kad net 45,9 proc. tirtų galvijų didelio produktyvumo bandose turėjo antikūnų prieš galvijų I tipo herpesvirusus – infekcinio rinotracheito sukėlėjus. Vadinas, nesiimant kontrolės priemonių veislinėse bandose, seroteigiamų galvijų nemažėja. Akivaizdu, kad iki šiol taikytų GIR kontrolės priemonių tik veislinių bulių – spermų producentų bandose neužtenka. Nerimą kelia seroteigiamų telyčių skaičiaus svyravimas. Tai dar kartą parodo, kad, netaikant specifinės profilaktikos priemonių, GHV-1 infekcijos dinamiką sunku prognozuoti. Nors iki

šiol buvo manoma, kad Lietuvoje būdinga latentinė GIR forma, mūsų atlikti PGR tyrimai parodė, kad veršelių bronchopneumonijų priežastis dažnai gali būti ir GIR virusai. Greitą GHV-1 plitimą bandoje galima būtų paaiškinti tuo, kad stebėjimo metu galvijų prieaugliui buvo nustatyti kvėpavimo organų susirgimai. Tyrimo duomenys sutampa ir su kitų mokslininkų duomenimis, kurie nustatė, kad bandos viduje GHV-1 aerogeniniu keliu plinta daug greičiau negu kontaktiniu (Mars et al., 1999). Mūsų pritaikytas diagnostinis PGR metodas leido greitai diagnozuoti GIR. Nustatyta, kad net trijuose ūkiuose iš

keturių, kur veršeliai sirgo kvėpavimo organų ligomis, viena iš susirgimų ir gaišimo priežasčių buvo galvijų I tipo herpesvirusai.

Mūsų tyrimai taip pat parodė, kad pasirinktuose ūkiuose dauguma didelio produktyvumo karvių yra seroteigiamos, todėl infekcijai likviduoti netiktų depopuliacijos metodas (t. y. seroteigiamų gyvulių atskyrimas ir skerdimas), nors būtent tuo paremtos Danijos ir Švedijos GIR kontrolės programos (The Swedish IBR/IPV eradication programme, 1995; The Danish infectious bovine rhinotracheitis programme, 1996). Reikia pažymėti, kad abiejose šalyse vykdomos programos iš pradžių buvo savanoriškos, tačiau valstybė buvo numaciusi nemažas kompensacijas dėl patirtų nuostolių skerdžiant vertingus gyvulius.

Remdamiesi Vokietijos, Belgijos, Prancūzijos ir Olandijos mokslininkų bei veterinarijos gydytojų praktiku patirtimi, rekomenduotume kai kuriose bandose likviduojant GIR/IPV naudoti vakciną, pagamintą iš mutantinio GHV-1 viruso, neturinčio glikoproteido E (Bosch et al., 1996; Thiry, 1997; Eloit, 1997; Wizigmann, 1997; De Wit et al., 1998). Teigiama šios vakcinės savybė yra ta, kad vakcinuotus galvijus būtų galima atskirti nuo natūraliai apsikrėtusių serologiniu ir molekulinės biologijos metodu (Siebert et al., 1995a; Siebert et al., 1995b; Bosch et al., 1996; Strube et al., 1996).

Mūsų atlikti galvijų virusinės diarėjos tyrimai rodo, kad vieno mėgintuvėlio lizdinė AT-PGR leido nustatyti persistentiškai infekuotus galvijus. Šie tyrimų rezultatai rodo, kad metodas yra pakankamai jautrus ir specifiškas, tinkantis identifikuoti PI, o tyrimų duomenys sutampa su kitų šalių mokslininkų duomenimis (Ridpath, Bolin, 1998). Ūkiuose, kur buvo išaiškinti PI galvijai, GVDV plito daug sparčiau negu ūkyje, kur PI galvijų nerasta. Vadinas, PI galvijai nuolat į aplinką išskiria daugybę virusų visą savo gyvenimą, o ūmiai infekuoti gyvuliai virusus išskiria kartkartėmis mažesniais kiekiais, todėl ir virusų perdavimo veiksmingumas yra silpnėjęs, nei kontakto su PI gyvuliais atveju (Meyling et al., 1990; Houe, 1999; Niskanen, Lindberg, 2003). Žinoma, kad svarbiausia likviduojant GVDV yra PI galvijų nustatymas ir pašalinimas iš bandos. Tačiau toks tyrimas yra brangus ir daug laiko reikalaujantis darbas, nes tik apie 0,5 proc. visų bandos galvijų Lietuvoje yra PI individai – virusų nešiotojai (Kliučinskas ir kt., 2004). Mūsų pasiūlytas rizikos grupių tyrimo metodas, suderintas su vieno mėgintuvėlio lizdine AT-PGR, leidžia nustatyti nuo 3,3 iki 7,3 proc. PI galvijų, t. y. galimybė aptikti PI galvijus padidėja nuo šešių iki beveik 15 kartų.

#### Išvados.

1. Net 45,9 proc. tirtų galvijų didelio produktyvumo bandose turėjo antikūnų prieš galvijų I tipo herpesvirusus – infekcinio rinotracheito sukėlėjus.

2. Nors iki šiol buvo manoma, kad Lietuvoje labiau paplitusi latentinė GIR forma, mūsų atlikti PGR tyrimai parodė, kad veršelių bronchopneumonijų priežastis dažnai gali būti GIR virusai.

3. Lizdinė AT-PGR gali būti taikoma rutininėje diagnostikoje identifikuojant PI galvijus bandose. Persistentiškai infekuoti GVD virusais galvijai pagreitina

užkrato plitimą bandoje.

#### Literatūra

1. 2004/558/EB: 2004 m. liepos 15 d. Komisijos sprendimas dėl Tarybos direktyvos 64/432/EEB dėl papildomų Bendrijos galvijų vidaus prekybos garantijų, susijusių su infekciniu galvijų rinotracheitu, ir infekcijos likvidavimo programų, pateiktų atitinkamų valstybių narių, patvirtinimo įgyvendinimo. Official Journal L 249, 23/07/2004. P. 20–25.
2. Baker J. Bovine viral diarrhoea virus: a review. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1987. Vol. 190. P. 1449–1458.
3. Bolin S. R., McClurkin A. W., Coria M. F. Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *American Journal of Veterinary Research*. 1985. Vol. 46. P. 2385–2387.
4. Bosch J. C., De Jong M. C. M., Maisan J. et al. Quantification of experimental transmission of bovine herpesvirus 1 in cattle vaccinated with marker vaccines. XIX World Buiatrics congress, Edinburgh, 8–12 July, 1996. P. 12–13.
5. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987. T. 162. P. 156–159.
6. De Wit J. J., Hage J. J., Brinkof J., Westenbrink F. A comparative study of serological tests for use in the bovine herpesvirus 1 eradication programme in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*. 1998. Vol. 61. P. 153–163.
7. Duffell S. J., Harkness J. W. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Veterinary Record*. 1985. Vol. 117. P. 240–245.
8. Eloit M. Identification and monitoring of IBR-free herds in the French IBR certification programme. IBR control programmes, Maastricht, June 1997. – [žiūrėta 2006 03 07]. Internet: <http://www.animalhealthservice.nl/pages/staff/litlijst/ibr/eloit.htm>
9. Fuchs M., Hübert P., Dettner J., Rziha H. J. Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking Glycoprotein E. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999. Vol. 37. P. 2498–2507.
10. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*. 1999. Vol. 64. P. 89–107.
11. Houe H., Baker J. C., Maes R. K., Wuryastuti H., Wasito R., Ruegg P. L., Lloyd J. W. Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1995. Vol. 7. P. 321–326.
12. Kaashoek M. J., Van Engelenburg F. A. C., Moerman A., Gielkens A. L. J. Risjewis F. A. M., Van Oirschot J. T. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase and glycoprotein E - negative bovine herpesvirus 1 mutants. *Veterinary Microbiology*. 1996. Vol. 48. P. 143–153.
13. Kliučinskas, Lukauskas K., Milius J., Mauricas M.. Galvijų virusinės diarėjos paplitimas Lietuvoje ir kontrolės priemonių efektyvumas nustatant persistentiškai infekuotus galvijus. *Veterinarija ir zootechnika*. 2004, T. 28 (50). p. 5–11.
14. Kommissrud E., Vatn T., Lang-Ree J.R., Lrken T. Bovine virus diarrhoea virus in semen from acutely infected bulls. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1996. Vol. 37. P. 41–47.
15. Lelešius R., Sereika V., Stankevičius A., Zienius D. (2004a) Detection of *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira hyodysenteriae* by means of PCR in Lithuania. Proceedings from a symposium at The faculty Veterinary Medicine, LLU, Jelgava, P. 172–175.
16. Lelešius R., Stankevičius A., Sereika V. (2004b) Detection of DNA of PPV by PCR. Proceedings from a symposium at The faculty Veterinary Medicine, LLU, Jelgava, P. 175–178.
17. LR VMVT direktoriaus 2004 04 15 d. įsakymas Nr. B1-325 dėl veterinarijos reikalavimų galvijų spermai patvirtinimo.
18. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis, 2004. – [žiūrėta 2006 01 20]. Internet: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual>
19. Mars M. H., Brusckhe C. J. M., van Oirschot. J. T. Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible

- under experimental conditions. *Veterinary Microbiology*. 1999, Vol. 66. P. 197-207.
20. Meyling A., Houe H., Jensen A. M. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*. 1990. Vol. 9. P. 75-93.
21. Milius J., Lukauskas K., Tamošiūnas V. Išlaidos galvijų virusinių ligų tyrimams Lietuvoje 2000-2004 metais. *Veterinarija ir zootechnika*. 2005, T. 31 (53). p. 37-42.
22. Mockeliūnienė V., Šalomska A., Stankevičius A., Mockeliūnas R. Seroepidemiological features of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in the Lithuanian cattle population. *Veterinarmedicinas raksti*. Jelgava, 2002. P. 168-175.
23. Mockeliūnienė V., Šalomska A., Stankevičius A., Pilinkienė A. Propagation of bovine viral diarrhoea viruses in cell culture. *Current Issues in Veterinary Medicine*. Jelgava. 2000. P. 116-119.
24. Moore S., Gunn M., Walls D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Veterinary Microbiology*. 2000. Vol. 75. P. 145-153.
25. Niskanen R., Lindberg A. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *The Veterinary Journal*. 2003. Vol. 165. P. 125-130.
26. Oirschot J. T. Van, Straver P. J., Van Lieshout J. A. H., Quak J., Westenbrink F., Van Exsel A. C. A. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Veterinary Record*. 1993. Vol. 132. P. 32-35.
27. Perrin B. et al. A European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Scientific and Technical Review of OIE*. 1993. Vol. 12. P. 969-984.
28. Report on Bovine herpesvirus 1 (BHV1) marker vaccines and the accompanying diagnostic tests. European Commission. Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Adopted 25 October 2000.
29. Ridpath J., Bolin S. R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Molecular and Cellular Probes*. 1998. Vol. 12. P. 101-106.
30. Rola J., Polak M. P., Zmudzinski J. F. Amplification of DNA of BHV1 isolated from semen of naturally infected bulls. *Bulletin of Veterinary Institute in Pullawy*. 2003. Vol. 47. P. 71-75.
31. Schyns F., Baranowski E., Lemaire M., Thiry E. A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. *Veterinary Microbiology*. 1999. Vol. 66. P. 187-195.
32. Siebert S., Auer S., Heinen E. et al. Marker vaccines – new opportunity for IBR control. Part III: routes to control IBR. *Tierarztl. Umschau*. 1995a. Vol. 50. P. 707-713.
33. Siebert S., Auer S., Heinen E. et al. Marker vaccines – new opportunities for IBR control. Part II: safety and efficacy of the gE-deleted Bayovac IBR marker vaccines. *Tierarztl. Umschau*. 1995b. Vol. 50. P. 582-584.
34. Stankevičius A., Šalomska A., Mockeliūnienė V., Stankevičienė M., Pieškus J. Vieno mėgintuvėlio atvirkštinės transkripcijos lizdinės polimerazės grandininės reakcijos (AT-PGR) panaudojimas greitam pestivirusų nustatymui ir diferencijavimui. *Veterinarija ir zootechnika*. 2002, T. 18 (40). p.67-73.
35. Strube W., Auer S., Block W. et al. Ag E deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. *Veterinary Microbiology*. 1996. Vol. 53. P. 181-189.
36. Šalomska A., Tamašauskienė B., Remeikis A. V. Isolation of bovine herpesvirus type 1 from bulls semen. *Bulletin of the Lithuanian Veterinary Institute*. 1996. P. 65-69.
37. Terrestrial Animal Health Code, 12 th edition. Chapter 2.3.5. Infectious bovine rhinotracheitis/Infectious pustular vulvovaginitis. 2004. – [žiūrėta 2006 01 20]. Internetė: <http://www.oie.int/eng/normes/mcode>
38. The Danish infectious bovine rhinotracheitis programme. Ministry of agriculture and fisheries. Danish veterinary service (1996).
39. The Swedish IBR/IPV eradication programme. Swedish board of agriculture (1995.01.12).
40. Thiry E. The Belgian field trial. IBR control programmes, Maastricht, June 1997. – [žiūrėta 2006 03 07]. Internetė: <http://www.animalhealthservice.nl/pages/staff/litlijst/litribr.htm>
41. Van Engelenburg F. A. C., Maes R. K., Van Oirschot J. T., Rijsewijk F. A. M. Rapid and sensitive detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen by a polymerase chain reaction based assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993. Vol. 31. P. 3129-3135.
42. Van Engelenburg F. A. C., Van Schie F. W., Rijsewijk F. A. M., Van Oirschot J. T. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995. Vol. 33. P. 308-312.
43. Veselinovič S., Veselinovič S., Medič D. et al. Disturbances in bovine reproduction caused by action of IBR/IPV viruses. 12-th International Congress on Animal Reproduction. The Hague, 1992. Vol. 3. P. 1605-1607.
44. Vilcek S. Detection of the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR. *Journal of Virological Methods*. 1993. Vol. 41(2). P. 245-247.
45. Weiblen R., Kreutz L. C., Canabaro T. E., Schuch L. F., Rebelato M. C. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanopostitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1992. Vol. 4. P. 341-343.
46. Wiedmann M., Brandon R., Wagner P., Dubovi E. J., Batt C. A. Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *Journal of Virological Methods*. 1993. Vol. 44(1). P. 129-139.
47. Wizigmann G. Qualifying and monitoring of IBR-free herds in Bavaria (Germany). Maastricht, June 1997. – [žiūrėta 2006 01 20]. Internetė: <http://www.animalhealthservice.nl/pages/staff/litlijst/ibr/wizig.htm>
48. Xia J. C., Yason C. V., Kibenge F. S. B. Comparison of dot blot hybridisation, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected semen. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1995. Vol. 59. P. 102-109.