

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

Федеральный исследовательский центр

вирусологии и микробиологии

На правах рукописи

Пивова Елена Юрьевна

Биологические свойства вируса заразного узелкового дерматита крупного
рогатого скота, адаптированного к перевиваемым культурам клеток

4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных»

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель

кандидат ветеринарных наук

Живодёров Сергей Петрович

Покров - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

1 ВВЕДЕНИЕ.....	5
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
2.1 Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота: общая характеристика болезни.....	11
2.1.1 Распространение, экономический ущерб.....	11
2.1.2 Эпизоотология вируса ЗУД КРС.....	16
2.1.2.1 Восприимчивость животных к вирусу ЗУД КРС.....	18
2.1.3 Патогенез вируса ЗУД КРС.....	20
2.1.4 Клинические признаки и патологоанатомическая картина болезни.....	21
2.2 Биологические свойства вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота.....	23
2.2.1 Таксономия вируса ЗУД КРС.....	23
2.2.2 Строение вируса ЗУД КРС.....	24
2.2.3 Сохраняемость во внешней среде и устойчивость к химическим и физическим факторам.....	27
2.3 Лабораторная диагностика.....	27
2.4 Иммунитет и специфическая профилактика.....	31
2.5 Культивирование и адаптация вирусов.....	35
2.5.1 Культивирование вирусов в первичных и перевиваемых линиях клеток.....	35
2.5.2 Адаптация вирусов.....	38
2.5.3 Культивирование вируса ЗУД КРС в первичных и перевиваемых линиях клеток.....	41
2.6 Заключение по обзору литературы.....	43
3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
3.1 Материалы и методы.....	46

3.1.1 Вирус.....	46
3.1.2 Культуры клеток.....	46
3.1.3 Питательные среды, растворы, сыворотки и реактивы.....	46
3.1.4 Животные.....	47
3.1.5 Оборудование и расходные материалы.....	47
3.1.6 Выращивание перевиваемых культур клеток.....	48
3.1.7 Адаптация вируса ЗУД КРС к перевиваемым линиям клеток.....	48
3.1.8 Культивирование вируса ЗУД КРС в первичных культурах клеток...	49
3.1.9 Определение инфекционной активности вируса ЗУД КРС.....	49
3.1.10 Заражение лабораторных животных.....	49
3.1.11 Отбор проб крови и патологоанатомического материала.....	50
3.1.12 Получение сыворотки.....	50
3.1.13 Постановка реакции нейтрализации.....	51
3.1.14 Постановка полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.....	52
3.1.15 Нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ.....	53
3.1.16 Постановка иммуноферментного анализа.....	54
3.1.17 Постановка метода иммуноцитохимического анализа.....	54
3.1.18 Гистологическое исследование патологического материала.....	55
3.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	56
3.2.1 Выделение изолята вируса ЗУД КРС из проб патологического материала в культурах клеток.....	56
3.2.2 Адаптация вируса ЗУД КРС к перевиваемым и первичным линиям клеток.....	57
3.2.2.1 Нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ вируса ЗУД КРС.....	63
3.2.3 Оптимизация условий культивирования вируса ЗУД КРС в перевиваемых линиях клеток.....	66

3.2.3.1	Определение оптимальной множественности заражения.....	66
3.2.3.2	Влияние концентрации сыворотки крови на накопление вируса.....	68
3.2.3.3	Влияние возраста культуры клеток на накопление вируса ЗУД.....	69
3.2.3.4	Устойчивость вируса ЗУД КРС при различных температурах хранения.....	71
3.2.3.5	Выявление антигенов вируса заразного узелкового дерматита методом иммуноцитохимического анализа.....	73
3.2.4	Изучение восприимчивости лабораторных животных к вирусу ЗУД КРС.....	76
3.2.4.1	Изучение восприимчивости мышей к вирусу ЗУД КРС.....	76
3.2.4.2	Изучение восприимчивости морских свинок к вирусу ЗУД КРС....	78
3.2.4.3	Изучение восприимчивости сирийских хомячков к вирусу ЗУД КРС.....	80
3.2.4.4	Изучение восприимчивости кроликов к вирусу ЗУД КРС.....	83
3.2.5	Гистология и гистохимический анализ для выявления антигена вируса заразного узелкового дерматита.....	91
4	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	96
4.1	ВЫВОДЫ.....	101
4.2	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	102
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	103
5	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	104
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	118
	Приложение 1.....	118
	Приложение 2.....	119

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота (ЗУД КРС) - трансмиссивная контагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся персистентной лихорадкой, образованием кожных узлов (бугорков), отеками подкожной клетчатки и внутренних органов, поражением лимфатической системы, глаз и слизистых оболочек органов дыхания и пищеварения. Наиболее восприимчивым к заражению является высокопродуктивный крупный рогатый скот, заболеваемость которого в очагах болезни может достигать – 75%, а летальность – 10% и выше. Возбудителем заразного узелкового дерматита является ДНК содержащий оболочечный вирус, относящийся к семейству Poxviridae рода Capripoxvirus, имеющий антигенное родство с вирусами оспы овец и оспы коз. В данный момент болезнь включена в список МЭБ и подлежит обязательной нотификации.

В последние десятилетия инфекция заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота стала медленно распространяться на новые территории, сначала вторгнувшись в страны Ближнего Востока и Турцию, а начиная с 2015 года, в большинство Балканских стран, на Кавказ и в Российскую Федерацию, где заболевание продолжало распространяться, несмотря на предпринятые меры по профилактике и контролю. В настоящее время ЗУД встречается в 34 странах Африки и Азии. Приказом Минсельхоза РФ заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота внесен в «Перечень заразных и иных болезней животных».

Данное заболевание приводит к снижению экономической эффективности отрасли скотоводства на 45-65%, вызывая пороки шкуры, значительное снижение удоя молока и живой массы.

Одним из ключевых аспектов борьбы и контроля ЗУД КРС, является профилактика и своевременная, и точная диагностика заболевания.

Диагноз на ЗУД КРС ставят на основании эпизоотологических и клинических данных, патологоанатомических изменений и лабораторных

исследований. Методология постановки диагноза включает обнаружение специфических антител или антигена методом иммуноферментного анализа (ИФА), идентификация генома вируса ЗУД КРС с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и выделение вируса из биологического материала от животных культуральными методами. Как правило, материалом для исследования служат пробы сывороток крови, смывы из носовой полости, выделения из конъюнктивы, пораженные участки кожи, пробы внутренних органов.

Для выделения возбудителя, согласно данным отечественных и зарубежных авторов, используют первичные культуры клеток из органов ягнят, козлят, телят. Для успешного выделения и идентификации вируса ЗУД КРС большое значение имеет соблюдение схемы культивирования возбудителя. Перспективными для культивирования вируса ЗУД КРС являются перевиваемые линии клеток, обеспечивающие получение вирусосодержащего материала в больших объемах. Вирусосодержащий материал, полученный в перевиваемых линиях клеток, широко применяется при изучении биологических свойств и молекулярно-генетических характеристик вируса. Однако, данные о методах выделения и оптимизации параметров культивирования вируса и восприимчивости к нему лабораторных животных малоизучены.

В связи с изложенным, исследования по адаптации выделенного в Российской Федерации вируса ЗУД к перевиваемым культурам клеток различного происхождения и изучение его биологических свойств являются актуальными.

Степень разработанности темы исследования. В исследованиях зарубежных и отечественных ученых показана возможность размножения вируса ЗУД КРС в перевиваемых культурах клеток различного происхождения [5, 108]. Интерес по адаптации вируса ЗУД к перевиваемым и первичным культурам клеток обусловлен возможностью длительности поддержания его в лабораторных условиях, относительной однородностью

популяции и стабильностью биологических свойств. Описаны штаммы вируса ЗУД КРС, адаптированные к перевиваемым культурам клеток Vero, ЯДК, ПО и к др. клеточным линиям [20, 37]. В тоже время на начало проведения наших исследований выделенного и адаптированного к перевиваемым линиям клеток изолята «Волгоградский» вируса ЗУД КРС, не было. Полученные новые данные принесут фундаментальные знания, и будут иметь важное прикладное значение.

Цель и задачи исследований. Целью данной работы являлось изучение биологических свойств вируса ЗУД КРС, адаптированного к перевиваемым культурам клеток.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Определить чувствительность клеточных культур и степень их перmissивности к изоляту «Волгоградский» вируса ЗУД КРС;
2. Провести адаптацию вируса ЗУД КРС, выделенного в Российской Федерации, к перевиваемым линиям клеток гомологичного и гетерологичного происхождения;
3. Отработать оптимальные параметры культивирования вируса ЗУД КРС, адаптированного к перевиваемым линиям клеток;
4. Изучить восприимчивость лабораторных животных к изоляту «Волгоградский» вируса ЗУД КРС при их экспериментальном заражении;
5. Изучить эффективность метода иммуноцитохимического анализа (ИЦХ ИФА) и динамику выявления антигенов вируса заразного узелкового дерматита в перевиваемой перmissивной культуре клеток;
6. Депонировать штамм «Волгоградский» вируса ЗУД КРС в государственную коллекцию микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ.

Научная новизна. В результате проведенных исследований на территории РФ в Волгоградской области в 2016 г. выделен вирус ЗУД КРС, получен штамм «Волгоградский» который депонирован в ГКМ ФИЦВиМ под регистрационным номером– «3192».

Определены оптимальные параметры культивирования антигенов вируса заразного узелкового дерматита в наиболее чувствительных линиях клеток (ПО, Vero, RK-13).

Изучена восприимчивость лабораторных животных к выделенному изоляту «Волгоградский» вируса ЗУД КРС.

Впервые выявлено, что вирус ЗУД КРС размножается в перевиваемых клетках диких животных КЭЛ/07 (кожа эмбриона лося) и ЛЭО (легкое эмбриона лося) с инфекционной активностью $5,0-5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Изучена динамика выявления антигенов вируса ЗУД КРС и их локализация в клетках инфицированной культуры в течение первых 10-24 часов культивирования после заражения методом ИЦХ ИФА на основе специфических гипериммунных сывороток.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выделенный на территории Российской Федерации в Волгоградской области изолят вируса ЗУД КРС депонирован в ГКМ ФИЦВиМ, как штамм «Волгоградский» и, может быть, использован при проведении НИР. Разработаны «Методические положения по адаптации вируса заразного узелкового дерматита к перевиваемым линиям клеток», которые рассмотрены на ученом совете, утверждены директором ФГБНУ ФИЦВиМ от 16.01.2020 г.

Соответствие содержания диссертации паспорту научной специальности. В соответствии с формулой специальности 4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных» в диссертации представлены данные по изучению биологических свойств вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота, адаптированного к перевиваемым культурам клеток. Приведены сведения по разработке оптимальных режимов культивирования вируса в культурах клеток гомологичного и гетерологичного происхождения, а также представлены результаты иммуноцитохимического анализа и гистоморфологического исследования.

Методология и методы исследования. В работе использовали методы культивирования первичных и перевиваемых культур клеток, вирусологические, серологические, иммунохимические, молекулярно – генетические методы и статистический анализ.

Положения, выносимые на защиту:

Культуральные свойства исходного и адаптированного к культурам клеток изолята «Волгоградский» вируса ЗУД КРС.

Результаты применения метода ИЦХ ИФА для выявления антигенов вируса ЗУД КРС и их локализацию в клетках инфицированной культуры в течение первых 10-24 после инфицирования.

Результаты изучения восприимчивости лабораторных животных к вирусу ЗУД КРС изолята «Волгоградский» при их экспериментальном заражении.

Личный вклад автора в выполнение работы. Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Отдельные этапы исследований консультативной и методической помощи научных сотрудников: В.И. Балышевой, О.В. Капустиной, С.Г. Юркова, В.М. Балышева, А.В. Луницина, О.Л. Колбасовой, за что автор выражает им глубокую признательность.

Степень достоверности и апробации результатов. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ФГБНУ ФИЦВиМ, при защите выпускной квалификационной дипломной работы педагога – исследователя, на Международной научно-практической конференции «Новое слово в науке и практике» ИГСХА им. Д. К. Беляева (г. Иваново, 2018 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 научных работах, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки для докторских и кандидатских диссертаций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста, иллюстрирована 12 таблицами и 17 рисунками. Список литературы включает 137 источников, из которых 100 – иностранные.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота: общая характеристика болезни

2.1.1 Распространение, экономический ущерб

Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота (нодулярный дерматит, бугорчатка, *Dermatitis nodularis bovim* –лат., Lumpy skin disease –англ.) – инфекционная болезнь, которая характеризуется кратковременной лихорадкой, поражениями кожного покрова, лимфатической системы, слизистых оболочек, с образованием в подкожной клетчатке бугорков и их некрозом [4, 12].

Заразный узелковый дерматит был впервые зарегистрирован в 1929 году в Замбии (ранее Северная Родезия) с описанием клинических признаков болезни [117]. Вначале проявление заразного узелкового дерматита считали следствием либо отравления, либо повышенной чувствительности к укусам насекомых. Такие же клинические признаки наблюдали у животных в Ботсване, Зимбабве и Южно-Африканской Республике в период с 1943 по 1945 год [35].

В Южной Африке заразный узелковый дерматит регистрировался как панзоотия, которая затронула восемь миллионов голов крупного рогатого скота. Болезнь, продолжавшаяся до 1949 года, привела к массовым экономическим потерям [70, 125]. В 1957 году заразный узелковый дерматит был идентифицирован в Восточной Африке в Кении. В 1972 году болезнь была зарегистрирована в Судане (Ali and Obeid 1977 год) и в Западной Африке в 1974 году, в 1983 году заболевание распространилась и в Сомали (Davies 1991) [42, 66].

В Египте, провинция Суэц, заразный узелковый дерматит был зарегистрирован в мае 1988 года (Ali 1990) [41]. Вирус был занесен в Египет с крупным рогатым скотом, привезенным из Южной Африки. Летом 1988 года болезнь распространилась локально, а в зимний период у восприимчивых животных отмечали слабовыраженные проявления

клинических признаков, либо их полное отсутствие. Летом 1989 года в Египте заболевание регистрировали в двадцати двух из двадцати шести мухафазах (административно-территориальная единица ряда арабских государств). Эта эпизоотия продолжалась в течение пяти-шести месяцев и показала низкий уровень заболеваемости (2%) вследствие проведения иммунизации вакциной против оспы овец, которая включала почти два миллиона голов крупного рогатого скота. Однако примерно 1449 животных погибли. Летом 2006 года в одной ферме болезнь возникла вновь и протекала с серьезными осложнениями [43, 115].

В Израиле заразный узелковый дерматит был зарегистрирован в 1989 году. Эта вспышка впоследствии была ликвидирована путем убоя всего заражённого крупного рогатого скота, а также животных, имевших контакт с заболевшим скотом. Кроме того, вокруг очага заболевания проводилась кольцевая вакцинация против оспы овец, которая способствовала ограничению распространения болезни [93].

Davies (1991 b) и House (1990) анализируя, возникшие эпизоотии, отметили, что болезнь распространилась на большей части африканского континента [66, 122]. В 2001 году заразный узелковый дерматит был зарегистрирован на Маврикии, Мозамбике и Сенегале. В настоящее время заразный узелковый дерматит встречается на большинстве территорий стран Северной Африки (за исключением Ливии, Алжира, Марокко и Туниса) [35]. До 1980-х годов болезнь была ограничена странами африканского континента, расположенными к югу от Сахары, хотя, вероятно, она могла выйти за пределы этой территории [67].

На Ближнем Востоке вспышки инфекции были зарегистрированы в Омане в 1984 и 2009 [90, 97, 122]. В 2009 году на ферме с поголовьем 3200 животных голштинской породы в Омане показатели заболеваемости и смертности заразного узелкового дерматита составляли 30-45% и 12% соответственно [97]. Кувейт в 1986 и 1991 годах, Египет в 1988 и 2006 годах, Израиль в 1989 и 2006 годах, Бахрейн в 1993 и 2002-2003 годах [120],

Йеменская Республика и Объединенные Арабские Эмираты в 2000 году также сообщили о возникновении заразного узелкового дерматита [90, 120].

Одна из прошедших вспышек заболевания на африканском континенте зарегистрирована в центральной Эфиопии в 2007-2011 годах. Вспышки отмечали в четырех районах: Адаме, Вэньци, Моджо и Велентити. Всего за период с 2007 по 2011 год было 1 675 вспышек, из которых 4 372 случая смерти. В 2010 году было зарегистрировано наибольшее количество вспышек, которые часто наблюдались в период с сентября по декабрь. Коэффициенты заболеваемости и смертности составили 13,61% и 4,97% соответственно [95].

В 2012 и 2013 годах вспышки заразного узелкового дерматита регистрировали в Сирии, Ливане и Иордании (Sherrylin 2013). В Турции эту болезнь регистрировали в октябре 2013 года, Иране и Ираке - в 2014 году (Рисунок 1) [2, 38].

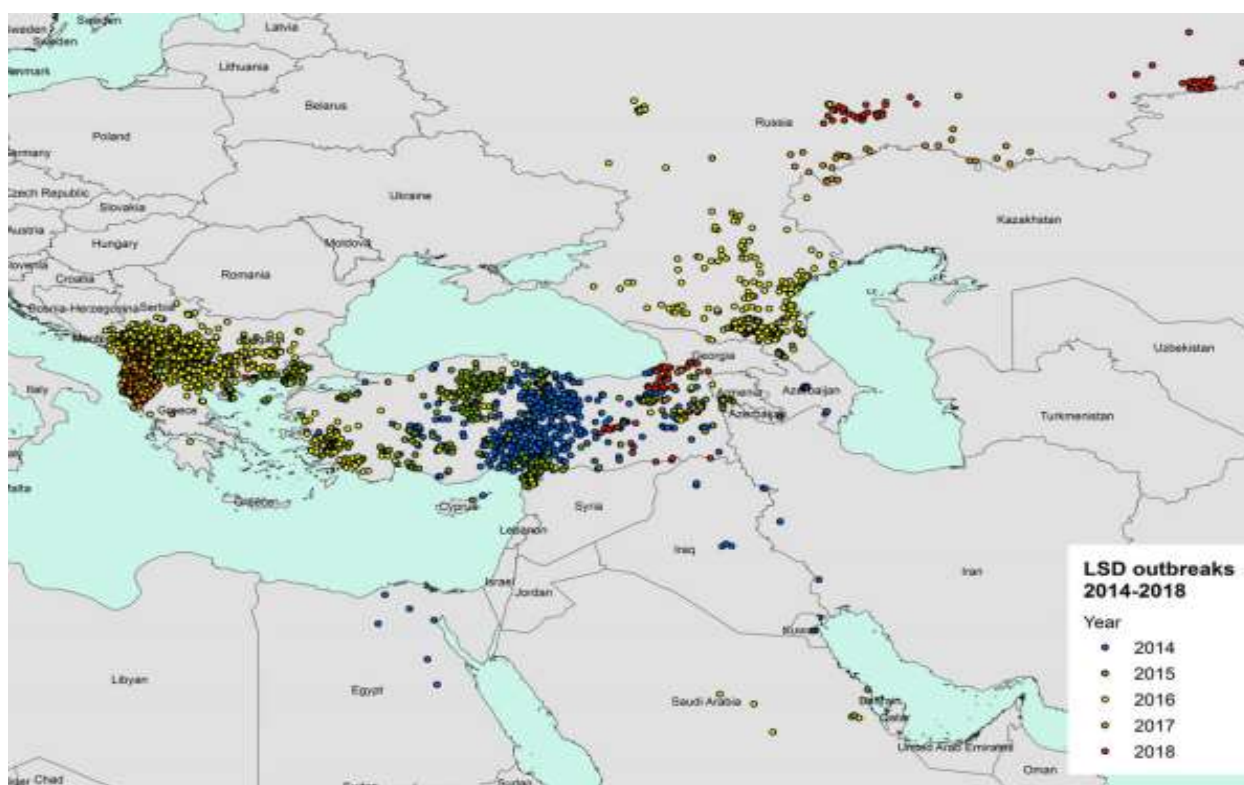


Рисунок 1 -Вспышки ЗУД КРС в Европе и на Ближнем Востоке 2014-2018 гг

В Иордании вспышка заразного узелкового дерматита произошла в середине апреля 2013 года (Abutarbush 2013). У взрослых особей КРС молочного направления в районе Бани Кенанах, провинция Ирбид, на иорданской границе Израиля и Сирии, были отмечены клинические признаки болезни у животных, характерные для заразного узелкового дерматита. Эти данные были подтверждены методом полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Общий коэффициент заболеваемости составил 26%, коэффициент смертности 1,9% и коэффициент летальности 7,5% [38].

В Иране заразный узелковый дерматит рассматривается как новая болезнь, которая была впервые выявлена в 2014 году. Всего было отмечено шесть случаев заболевания у молочных коров. Вспышки были зарегистрированы в двух деревнях на западе страны. Предполагается, что причиной вспышки является бесконтрольное перемещение животных [45].

В 2015 году болезнь впервые отмечали на территории Греции, где впоследствии в общей сложности было выявлено 117 очагов. Несмотря на карантин, контроль за передвижением восприимчивого поголовья, зонирование территорий и программ государственного мониторинга, болезнь получила дальнейшее распространение. Только за первые четыре месяца 2016 года новые очаги ЗУД КРС зарегистрированы: в Греции — 5, Болгарии — 9, Македония — 1, что указывает на укоренение заболевания на территории части Европы и повышение риска дальнейшего распространения заболевания [2].

В 2015 году заразный узелковый дерматит впервые был зарегистрирован в Российской Федерации. За 2015 – 2017 гг. было установлено 375 вспышек в 4-х Федеральных округах РФ: Северо-Кавказском (Республика Дагестан, Кабардино-Балкарская Республика, Карачаево-Черкесская Республика, Северо – Осетинская Республика, Чеченская Республика, Ставропольский край), Южном (Республика Адыгея, Республика Калмыкия, Краснодарский край, Астраханская, Волгоградская, Ростовская области), Приволжском (Оренбургская, Самарская, Саратовская

области), Центральном (Воронежская, Тамбовская, Рязанская области). Наибольшее количество вспышек ЗУД КРС в течение этого времени зарегистрировано в Северо-Кавказском ФО – 230, наименьшее - в Центральном ФО – 9. Наиболее неблагополучными регионами являлись Чеченская Республика (113 вспышек), Республика Калмыкия (55 вспышек) и Республика Дагестан (39 вспышек), которые имеют общие пограничные территории [2].

Принимая во внимание высокую степень заболеваемости восприимчивых животных (до 95%) и отсутствие вакцинации против заразного узелкового дерматита в ряде европейских стран, нельзя не признать ситуацию крайне серьезной [27].

ЗУД наносит значительный экономический ущерб животноводству ввиду того, что снижается молочная и мясная продуктивность, качество кожевенного сырья, нарушается половая цикличность у коров, а у быков развивается временная половая стерильность [28]. Экономические потери также связаны с ограничением экспорта сельскохозяйственной продукции, в частности на торговлю скотом, мясом и другими продуктами животного происхождения. Другие расходы, связанные с искоренением болезни и ее профилактикой, включают затраты на проведение вакцинации, приобретение лекарственных средств, расходы на оплату труда. Некоторые из этих затрат несут владельцы, но в некоторых странах за них платит правительство. Сложно дать общую оценку затрат на эти меры контроля, потому что существует большой разброс в наборе мер, применяемых в разных странах, и в стоимости скота. Такая изменчивость наблюдалась во время вспышки ЗУД, которая произошла в Европе в 2015–2016 гг. Например, Албания сообщила о 6235 пораженных животных до 2016 года, но только несколько сотен погибли или были выбракованы в результате заболевания ЗУД КРС. Для сравнения, Греция сообщила только о 1000 пораженных животных. Однако они использовали метод стемпинг-аут на фермах, где регистрировались вспышки ЗУД [132]. Эти различия в политике контроля возникают из-за

различий в законодательствах между отдельными странами. Ограничения международной торговли также могут быть основной причиной потерь во время вспышек. Они значительно различаются между странами. Во время вспышки в Эфиопии отказ от пораженных быков составлял более чем вдвое больше потерь, связанных со смертностью [95]. В странах Евросоюза, где торговые ограничения более строгие, потенциальные потери от приостановки торговли из-за вспышек ЗУД будут еще выше по сравнению с потерями смертности. Торговая приостановка может распространяться не только на живых животных или мясных и молочных продуктов, но и на генетические ресурсы. Например, поскольку вирус ЗУД выявляют в сперме (Irons et al. 2005), существует запрет на торговлю этим продуктом. Такие запреты несут большие убытки странам, экспортирующим бычью сперму. Таким образом, международные торговые соглашения могут влиять на политику контроля ЗУД [85].

Учитывая большую степень восприимчивого поголовья, как в неблагополучных странах Европы, так и на территории сопредельных государств, дальнейшее распространение ЗУД КРС может привести к серьезным экономическим последствиям [30].

2.1.2 Эпизоотология вируса ЗУД КРС

Напряженность эпизоотической ситуации связана с влиянием на развитие болезни комплекса природных и социально - экономических факторов [3].

Источником вируса являются больные животные и вирусоносители - животные в скрытом периоде заболевания и оставшиеся после переболевания. При первичном возникновении болезни в стаде поражается от 5 до 50%, в отдельных случаях до 75-100% животных, особенно среди скота европейских пород. У 50% заболевших животных можно наблюдать типичные признаки болезни [6].

Очаги заразного узелкового дерматита КРС наиболее часто встречаются в низких местностях – по долинам рек и озер,

характеризующихся высокой влажностью, что связано с большим количеством на этих территориях возможных механических переносчиков возбудителя болезни. Известно, что большинство заболеваний вирусной этиологии передаются через насекомых, хотя данных о роли конкретных видов членистоногих в качестве вектора передачи вируса заразного узелкового дерматита недостаточно [99, 134]. Однако вирус был выделен из: *Stomoxys* (кровососущие мухи), *Biomyia fasciata* (жалящие мухи), *Tabanidae* (слепни), *Glossina* (муха цеце) и *Culicoides* (мокрецы) [29].

Результаты эпизоотологического обследования очагов заразного узелкового дерматита, возникших в Египте, послужили основанием для предположения о том, что на территорию, где возникла вспышка заболевания, вирус мог быть занесен механически контаминированным возбудителем - мухами-жигалками (*Stomoxys calcitrans*). Расстояние между активным очагом и вновь возникшим было более 85 км. Однако это предположение не подтверждено экспериментальными данными. Известно, что в естественных условиях дальность полета большинства кровососущих насекомых редко превышает 10 км. На распространение насекомых, в том числе и контаминированных (инфицированных) вирусом, влияют направление и скорость ветра [122, 128].

Также в своих исследованиях автор С. М. Chihota и др. показали, роль *Aedes aegypti* (желтолихорадочный комар) только в экспериментальных условиях. Вопрос о том, причастен ли этот вид к передаче вируса заразного узелкового дерматита в полевых условиях, еще предстоит изучить, но если это окажется так, то, возможно, потребуется провести переоценку риска распространения вируса заразного узелкового дерматита за пределами Африки [49].

В Российской Федерации в ряде научных публикаций и в средствах массовой информации имеются сообщения о том, что вирус заразного узелкового дерматита был занесен в хозяйства, расположенные от очагов инфекции на расстоянии 300-900 км, кровососущими насекомыми [27].

Определенную роль в механическом распространении возбудителя играет человек. Вступая в прямой контакт с инфицированными животными и окружающей их средой, люди на своей одежде, обуви, на руках и в верхних дыхательных путях могут вынести вирус из очага, занести его в благополучные стада или распространить на большие расстояния. Вирусы рода *Capripoxvirus* обладают высокой устойчивостью и могут оставаться жизнеспособными в инфицированной ткани более чем на 120 дней или, возможно, дольше. Вирус также встречается сохраняется в крови, назальных выделениях, слезной секреции, сперме и слюне, которые считаются основными источниками передачи заразного узелкового дерматита. В окружающую среду вирус попадает с отторгаемыми кусочками пораженной кожи, а также с молоком, спермой, слюной и кровью, содержащие вирус ЗУД КРС [6].

Частота регистрации очагов болезни заразного узелкового дерматита КРС в тропической Африке бывает выше в периоды влажного сезона. На распространение болезни влияют профилактические мероприятия, также транспортные связи с наличием развитой сетью дорог, по которым могут перевозить больного или находящегося в инкубационном периоде крупного рогатого скота [130].

На современном этапе эволюции инфекционных болезней, заразный узелковый дерматит представляет экономически значимую болезнь, имеющую выраженную тенденцию территориального распространения и роста частоты регистрации эпизоотических вспышек. Распространение и проявление болезни в значительной мере зависит от природных и социально-экономических условий территорий [17].

2.1.2.1 Восприимчивость животных к вирусу заразного узелкового дерматита КРС

Заразный узелковый дерматит имеет узкий диапазон восприимчивых животных. Крупный рогатый скот и буйволы - это виды, которые заражаются

естественным образом во время полевых вспышек, но неизвестно, какие генетические факторы влияют на тяжесть данного заболевания [3, 8, 54].

Жираф (*Giraffa camelopardalis*) и импала (*Aepus-eros melampus*) восприимчивы к инфекции при экспериментальном заражении. У импортированных пород крупного рогатого скота, таких как фризский крупный рогатый скот, признаки заболевания наиболее выражены, чем у толстокожих местных пород, таких как африканер и африканерские кросс-породы [42]. Хотя все возрастные группы восприимчивы, но у коров на пике лактации, а также у молодых животных проявляется более тяжелая форма заболевания. В дополнение к крупному рогатому скоту у азиатского буйвола (*Bubalus bubalis*) в Египте отмечали характерные признаки инфекции, но со значительно более низкой распространенностью (1,6%), чем у крупного рогатого скота (30,8%) [72].

При экспериментальном заражении к вирусу заразного узелкового дерматита чувствительны овцы и козы. В руководстве по ветеринарной вирусологии В.Н. Сюриным (1966) приведены сведения о том, что у овец и коз появляются местные реакции в участке инокуляции вируса [8]. Проведенные в ФГБНУ ФИЦВиМ Н.И. Сальниковым с соавторами исследования с 1,5-месячными ягнятами, показали, что у животных при экспериментальном заражении наблюдали образование узелков на коже в местах введения вируса. Узелки имели доброкачественный характер, через 2 недели после их появления происходило образование струпьев, которые затем отделялись от кожи, оставляя небольшие шрамы. Клинические проявления у ягнят соответствовали 2 баллам по шкале оценки тяжести от 0 (отсутствие видимых реакций) до 10 баллов (тяжелая генерализация, требующая убоя) [7].

Минимальное количество данных по восприимчивости к вирусу заразного узелкового дерматита морских свинок и кроликов. Патогенность вируса для кроликов проявляется только в первых пассажах и в дальнейшем угасает [27]. Морские свинки оказались более восприимчивы к данному

вирусу, чем кролики. У них наблюдали поражения, сходные с поражениями у крупного рогатого скота. К вирусу ЗУД КРС штамм Neethling чувствительны мышата-сосуны, после инфицирования он вызывает их гибель на 5-6 сутки [27].

2.1.3 Патогенез ЗУД КРС

Патогенез болезни недостаточно изучен, так как в экспериментальных условиях не всегда удается воспроизвести типичные ее клинические признаки. При экспериментальном заражении используют 3 способа инфицирования: внутривенный, внутрикожный и подкожный пути. Внутривенный путь введения вируса заразного узелкового дерматита КРС развивает тяжелую генерализованную инфекцию и более тяжелую форму болезни, тогда как подкожная инокуляция крупного рогатого скота приводит к отеку в месте инъекции и увеличению региональных лимфатических узлов примерно через 7 дней после введения вируса. Внутрикожная инокуляция вирусом заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота вызывает локализованное поражение кожи в месте введения, а также у 40-50% животных вообще может не наблюдаться никаких клинических признаков болезни [115]. Репликация вируса заразного узелкового дерматита происходит внутри клеток-хозяев: макрофагах, фибробластах, пероцитях, эндотелиальных клетках в лимфатических сосудах и их стенках, вызывая васкулит и лимфангит в некоторых пораженных сосудах [96].

Вирус заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота появляется в крови на 3 - 4 сутки впоследствии повышения температурной реакции тела и обширного образования кожных узелков. Вирус с кровью разносится по всему организму, проникая в слизистую ротовой полости, носа, глаз, влагалища или препуции, в слюнные и молочные железы, семенники и другие органы и ткани. В тяжелых случаях могут развиваться тромбозы, коагуляционный некроз окружающих тканей или инфаркты [131].

JAW Coetzer and Dr. Eeva Turpurainen при экспериментальном инфицировании крупного рогатого скота вирус выявляли в течение 11 дней

после развития лихорадки в слюне, в сперме - в течение 42 дней и в узлах кожи - в течение 39 дней. У мелких жвачных животных наблюдали локальную реакцию на месте инокуляции, но сообщений о проявлении клинических признаков болезни, вызванных вирусом заразного узелкового дерматита, не было. Виремия отмечалась после первоначальной фебрильной реакции и сохранялась в течение двух недель [63].

При спонтанной инфекции у телят, дойных коров и ослабленных животных, вероятно, развивается более тяжелая форма заболевания, которая возможно вызвана нарушением гуморального иммунитета [83].

Иммунитет после переболевания при естественном инфицировании является пожизненным у большинства оставшихся в живых животных. Телята приобретают материнские антитела и устойчивы к заболеванию примерно в течение 6 месяцев [25, 109].

2.1.4 Клинические признаки и патологоанатомическая картина болезни

Заболевание, вызванное вирусом заразного узелкового дерматита, может варьироваться от острой до субклинической формы [41, 73, 87]. Инкубационный период у естественно заразившихся животных может длиться до пяти недель, а у экспериментальных инфицированных колеблется от 4 до 7 дней [77]. Кодексом здоровья наземных животных (МЭБ 2016 г.) инкубационный период при заражном узелковом дерматите определен в 28 дней [137].

Болезнь характеризуется лихорадкой, поражением органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и увеличением поверхностных лимфоузлов [16].

У большинства животных основными симптомами инфекции являются кожные узелки диаметром 0,5-5 см по всей коже или в подкожной клетчатке. Эти узелки могут также образовываться на слизистой оболочке носа, полости рта, глаз и гениталий. Их число может варьироваться от нескольких единиц до нескольких сотен. Кожные поражения могут быстро рассасываться и

сохраняться в виде твердых узелков, или оставлять глубокие язвы, частично заполненными грануляционной тканью, которая часто гноится. Микроскопически поражения различаются в зависимости от стадии развития. В острой стадии заболевания васкулит иногда сопровождается тромбозом и инфарктом, а также инфильтрацией макрофагов и некоторых лимфоцитов и эозинофилов, в частности, дермы и гиподермы. Во время острых и подострых стадий заболевания эозинофильные интрацитоплазматические включения могут присутствовать, в частности, в макрофагах и кератиноцитах кожи. Зрелые вирусные частицы могут быть случайно распределены в цитоплазме пораженных клеток [98]. Узелки наиболее легко видны в безволосых участках: промежности, вымени, внутреннего уха, морды и век, что приводит к развитию язвенных поражений с избыточным слюноотделением, слезотечением и выделениями из носа, которые могут содержать вирус заразного узелкового дерматита [63, 94].

Бесплодие является проблемой после переболевания заразным узелковым дерматитом; коровы остаются в состоянии анорексии в течение нескольких месяцев. Инфицированные быки, которые страдают от повреждений на гениталиях, также могут быть бесплодными в течение нескольких месяцев. Респираторные, ротовые, глоточные и глазные повреждения продлевают период анорексии и выздоровления. Ухудшение общего состояния происходит у сильно пострадавших животных, диапазон смертности может быть высоким. Выздоровевшие животные страдают от слабости и стерильности на срок до 6 месяцев. Но у большинства заболевших животных развивается сравнительно небольшое количество узелков, и животные восстанавливаются без осложнений. Заразный узелковый дерматит, однако, является серьезным заболеванием, влияющим на производство, хотя доля животных, с развивающимися хроническими осложнениями, может быть низкой; менее 5% пострадавших [44, 46, 94].

При патологоанатомическом вскрытии у животных оспенные поражения можно найти в респираторном и пищеварительном тракте на

поверхности практически любого органа (ФАО) [73]. При некрозе узелки содержат казеозные массы, а при отсутствии осложнений они фиброзные и плотные. Региональные лимфатические узлы значительно увеличены и могут в 3-5 раз превышать их обычный размер. Тяжелобольные животные подвержены вторичным инфекциям: бактериальной пневмонии, стенозу трахеи, острому и хроническому орхиту, маститу [72].

Патоморфологические изменения при заразном узелковом дерматите крупного рогатого скота, описанные Черных О.Ю. с соавторами были следующие: фибриноидный некроз кожи до глубоких слоев с нарушением эпителизации в очаге, инфильтрация полиморфными клетками с преобладанием лимфоцитов, распад клеток по типу кариорексиса. В одних эпителиальных клетках и макрофагах обнаружены эозинофильные включения, заполняющие клетку, в других - слабо базофильно окрашенные включения внутри клетки со смещением ядер на периферию; очаговые лимфоцитарно-гистиоцитарные инфильтраты в сердце с отеком стромы и фрагментарными фибриноидными некрозами стенок; серозно-гнойные воспаления в легких с фибриноидным некрозом стенок сосудов, очаговая эмфизема и кровоизлияния; в почках межпочечные фибринозно-гнойные инфильтраты с очаговым фибриноидным некрозом стромы, признаки резорбции некротических масс, забивающих просветы прямых канальцев, некроз эпителия извитых канальцев; воспалительные инфильтраты в стенке желудка и тонкой кишки с некрозами ворсинок [25].

2.2 Биологические свойства вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота

2.2.1 Таксономия вируса заразного узелкового крупного рогатого скота

Возбудителем заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота является ДНК содержащий вирус, относящийся к семейству *Poxviridae*, роду *Capripoxvirus* [23].

Семейство Poxviridae включает в себя два подсемейства: Chordopoxvirinae - вирусы оспы позвоночных и Entomopoxvirinae - вирусы оспы насекомых с 11 и 3 родами соответственно. Подсемейство Chordopoxvirinae состоит из 10 родов определенных:

Avipoxvirus, Capripoxvirus, Cervidpoxvirus, Crocodylidpoxvirus, Leporipoxvirus, Molluscipoxvirus, Orthopoxvirus, Yatapoxvirus, Parapoxvirus, Suipoxvirus и 1 неопределенный род Squirrelpox virus. Подсемейство Entomopoxvirinae (от греч. entomon - насекомое) состоит из трех родов Entomopoxvirus A, Entomopoxvirus B, Entomopoxvirus C [69, 84].

Род Capripoxvirus включает вирус оспы овец (ВОО), вирус оспы коз (ВОК) и вирус заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота (ЗУД КРС). Представители рода антигенно тесно связаны [50]. ВОК является близкородственным ВОО, но таксономически самостоятельный вид. ВОО и ВОК не обладают четко выраженной хозяйской специфичностью: несмотря на то, что обычно вирусы вызывают наиболее выраженное заболевание либо у овец, либо у коз, некоторые штаммы патогенны для обоих видов животных-хозяев. Биологи Alexander, Plowright и Haig разделили вирусы, вызывающие заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота, на три группы: BLD, Allerton, Neethling. Основным возбудителем являются вирусы третьей группы Neethling [47, 49, 87].

Согласно имеющейся информации, нет никаких данных о различиях в вирулентности различных штаммов вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота. Тяжесть заболевания зависит главным образом от иммунного статуса хозяина, породы, стадии производства и возраста [132].

2.2.2 Строение вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота

Возбудителем заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота является ДНК-содержащий вирус, молекула ДНК которого, образована двумя полинуклеотидными цепями, спирально закрученными друг около друга вокруг воображаемой оси, т.е. представляет собой двойную спираль (см.

рисунок 2). В соответствии с крупным размером и сложной структурой вирионы поксвирусов содержат большое количество белков (более 100 полипептидов). Главные структурные белки каприпоксвирусов идентифицированы электрофорезом в полиакриламидном геле. В препарате очищенного вируса можно различить более 20 белковых групп. Молекулярный вес белков колеблется от 14 до 130 кД. Около 70% от массы вириона приходится на четыре структурных белка. Некоторые белки локализованы на внешней поверхности внутриклеточного зрелого вириона [37]. Геном вируса ЗУД КРС состоит из центральной кодирующей области, ограниченной одинаковыми концевыми, инвертированными повторами и содержит 156 предполагаемых генов [35, 37].

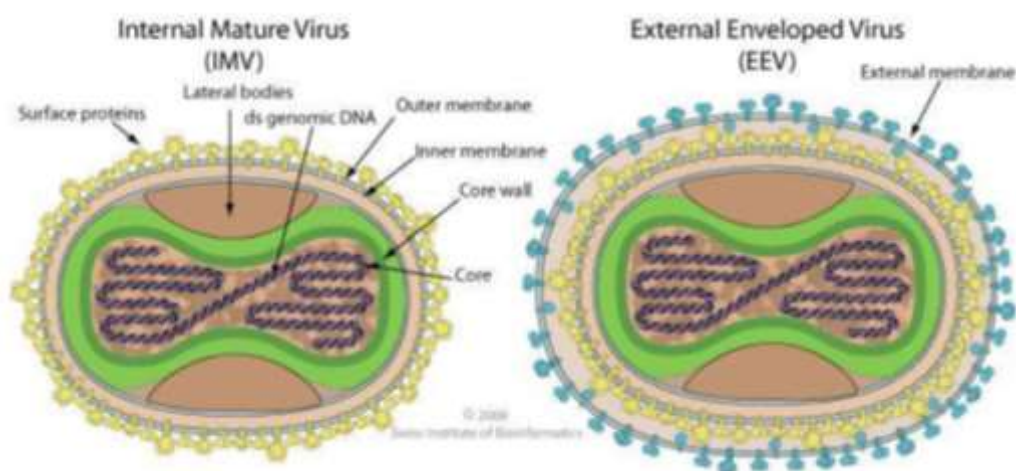


Рисунок 2 - Морфологическая структура вируса заразного узелкового дерматита (Naftu et al., 2012)

Гены заразного узелкового дерматита характеризуются высокой степенью коллинеарности и идентичности аминокислот (в среднем 65%) геномной области с генами других известных поксвирусов млекопитающих: poxviruses, particularly suipoxvirus, yatapoxvirus, and leporipoxviruses. Коллинеарность нарушается, и гомологи поксвирусов либо отсутствуют, либо имеют более низкий процент идентичности аминокислот (в среднем 43%) в концевых областях. Несмотря на то, что вирус ЗУД КРС имеет сходство с leporipoxvirus по содержанию и организации генов, он также содержит гомологи интерлейкина-10 (IL-10), белков, связывающих IL-1, рецептор СС-

хемокинов, связанных с G-белком, и белок, подобный эпидермальному фактору роста, который обнаружен в других родах поксвирусах (рисунок 2). Вирус ЗУД КРС тесно связан с другими членами *Chordoroxvirinae*, содержит уникальный набор генов, ответственных за вирусный спектр хозяина и вирулентность. Опубликованы полные последовательности генома нескольких *Sarigroхvirus*, включая заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота рисунок 3 [80].

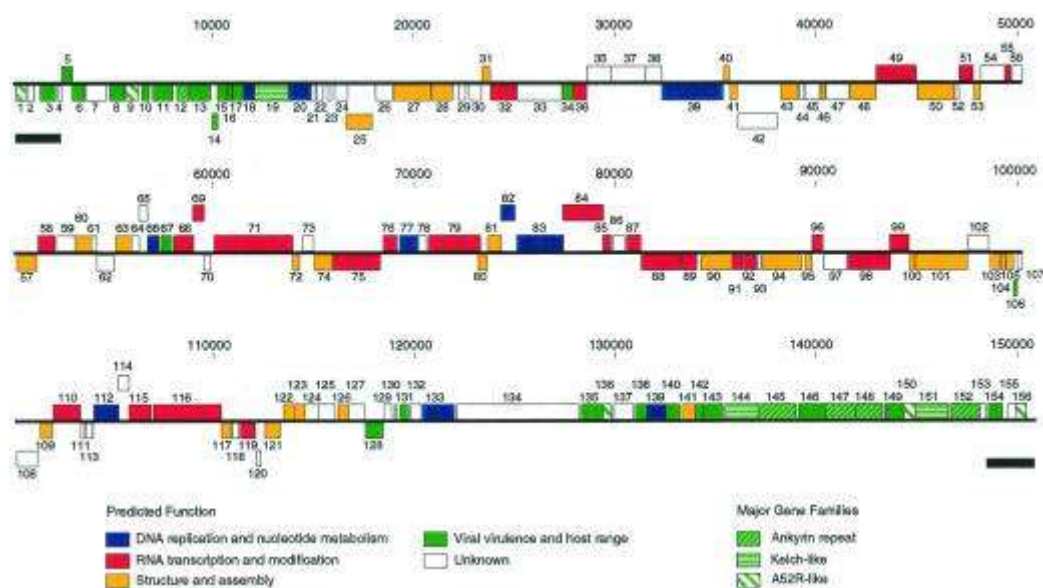


Рисунок 3 - Линейная карта генома. ORFs (открытая рамка считывания) нумеруются слева направо в зависимости от положения иницирующего кодона метионина. ORF, транскрибированные справа, расположены выше горизонтальной линии; ORF, транскрибированные слева, расположены ниже. Гены с аналогичными функциями и члены семейств генов окрашены в соответствии с рисунком ключа. ITRs представлены в виде черных полос под картой ORF (Tulman et al., 2001 at J. Virol. 2001; 75:7122-7130).

В современном представлении вирусы рода *Sarigroхvirus* имеют кирпичеобразную форму 300×270×200нм [23]. По строению вирус очень похож на возбудитель вируса оспы [8, 23].

2.2.3 Сохраняемость во внешней среде и устойчивость к химическим и физическим факторам

Вирус ЗУД чувствителен к высокощелочным или кислотным рН. Он теряет инфекционную активность при воздействии: 20% эфира, хлороформа, 1% формалина и некоторых моющих средств, также 2% фенола (15 минут), 2-3% гипохлорита натрия, соединениям йода (разведение 1:33). Вирус стабилен в течение длительного времени при температуре окружающей среды, особенно в сухих струпьях от больных животных. Заразный узелковый дерматит очень устойчив к инаktivации. Он выживает в некротических конкрециях кожи до 33 дней или дольше, 18 дней - в высушенных на воздухе шкурах. Между тем, вирус чувствителен к солнечному свету, в то время как в темных условиях окружающей среды, таких как загрязненные навесы для животных, он может сохраняться в течение многих месяцев [28, 45, 87].

2.3 Лабораторная диагностика

Диагноз на заразный узелковый дерматит КРС устанавливается комплексно, учитывая эпизоотологические, клинические данные, патологоанатомические, гистологические изменения в сочетании с лабораторным подтверждением наличия вируса или антигена [30, 46, 75, 137].

Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота необходимо отличать от крапивницы, кожной формы туберкулеза, стрептотрихоза, эпизоотического лимфангита, демодекоза, оспы, поражений, причиняемых личинками овода, последствий укусов клещей и других жалящих насекомых, поствакцинальных отеков [6].

При крапивнице эпидермис по краям бугорков не отслаивается, при кожной форме туберкулеза подкожные узелки появляются по ходу лимфатических путей, без увеличения поверхностных лимфатических узлов и повышения температуры тела. При стрептотрихозе струпьевидные поражения поверхностные, расположены симметрично и, главным образом, в

области позвоночника. Узелки появляются под кожей, по консистенции мягкие, не имеют четкой границы, при надавливании из них выделяется гной; края изъязвлений неровные. При демодекозе кожа утолщена, жесткая, узелки выпуклые, гнойные. Оспенные поражения всегда поверхностны и чаще обнаруживаются на сосках и вымени. Укусы насекомых обычно имеют сводчатую форму, кожа лопается над их центральной частью [22].

При гистопатологической диагностике наблюдают наиболее частые особенности: венозный застой, кровоизлияния, лимфоидную пролиферацию, отек, тромбоз, фиброплазию и васкулит, которые всегда связаны с узлами, включающими в себя все слои кожи, подкожную клетчатку и часто смежную мускулатуру [25].

Подтверждающий диагноз по рекомендациям МЭБ может основываться на лабораторных исследованиях и идентификации вируса на основе выделения вируса, электронной микроскопии, реакции иммуноферментного анализа, реакции нейтрализации, полимеразной цепной реакции, вестерн-блот-анализа таблица 1 [104, 105].

Таблица 1- Диагностический метод в зависимости от цели исследований

Метод	Цель					
	Свобода популяции от инфекции	Животные свободны от инфекции	Искоренение заболевания	Подтверждение клинических признаков	Доля инфицированности	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя ¹						
Вирус-выделение	+	++	+	+++	+	n/a
Детекция антигена	++	++	++	++	++	n/a
ПЦР	++	+++	++	+++	++	n/a
Детекция иммунного ответа						
РН	++	++	++	++	++	++
ИФА	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+++» – рекомендуемый метод; «++» – допустимый метод; «+» – может использоваться в некоторых случаях, но стоимость, достоверность или другие

факторы ограничивают его применение; «-» – не подходит для этой цели; n/a – не применимо. ПЦР – полимеразная цепная реакция; РН – реакция нейтрализации; ИФА – метод иммунофлуоресценции антител. 1 – рекомендуется сочетание методов идентификации возбудителя, применяемых к одному и тому же клиническому образцу

Вирусвыделение

Образцы для выделения вируса должны быть собраны в течение первой недели появления клинических признаков до возникновения образования вируснейтрализующих антител [104, 105, 137]. Материал биопсии поражений (где некроз не произошел) используют для выделения вируса и электронной микроскопии. Кроме того, вирус может быть выделен из образца крови во время вирусемической стадии болезни. Биоматериал следует брать, по меньшей мере, от трех животных. Образцы, собранные из увеличенных лимфатических узлов, могут также использоваться для изоляции вируса. Вирус заразного узелкового дерматита размножается в культуре клеток бычьего, овечьего или козьего происхождения [35].

Электронная микроскопия

Диагноз заразного узелкового дерматита может быть подтвержден трансмиссионным электронным микроскопическим методом в течение нескольких часов после приема образцов. Электронная демонстрация вируса в негативно окрашенных препаратах биопсийных образцов, взятых из пораженной кожи или слизистых оболочек, показала, что зрелые вирионы саргірох имеют средний размер 320 x 260 нм и более овальный профиль, более крупные боковые тела, чем ортопоксвирусные вирионы [104].

Иммуноферментный анализ

Непрямой метод иммуноцитохимического анализа (ИЦХ)

Метод ИЦХ ИФА на основе специфических гипериммунных сывороток позволяет выявлять антигены вируса заразного узелкового дерматита КРС и их локализацию в клетках инфицированной культуры [72].

Для изучения динамики накопления антигенов вируса заразного узелкового дерматита в процессе его культивирования, через определенные

часы инкубирования, проводят фиксацию клеточного монослоя, где целью является перевод живого вещества из лабильного состояния в стабильное, т.е. прекращение процессов аутолиза и стабилизация веществ и структур клетки в такой мере, при которой их локализация, целостность и взаимное расположение практически не изменяются [102, 103].

В местах связывания АТ специфической сыворотки с соответствующими антигенами отмечается характерное специфическое окрашивание цитоплазмы или клеточной мембраны инфицированных клеток, отсутствующее в препаратах с контрольной сывороткой и в интактной культуре клеток [103].

Реакция нейтрализации

Сущность реакции заключается в соединении вируса со специфической сывороткой, где вирус утрачивает свои инфекционные свойства, т.е. возможность репродуцироваться в живых системах.

Реакция ставится в двух вариантах. В первом случае с целью ретроспективной диагностики методом разведения испытуемых сывороток с постоянной дозой вируса. Вторым вариантом с постоянной дозой сыворотки и различными разведениями вируса - прямой серовариант с целью индикации и идентификации вируса. Определяют титр вируса в присутствии специфической и отрицательной сывороток и выражают его Ig ТЦД₅₀/мл. Видовую принадлежность вируса устанавливают при наличии разности в титрах вируса с отрицательной и положительной сыворотками не менее чем $\geq 1,5$ [104, 105].

Полимеразная цепная реакция

Суть метода заключается в многократном копировании (амплификации) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. Регистрация флуоресцентного сигнала проводится в процессе амплификации на специальном приборе - амплификаторе для Real-Time PCR. По наличию флуоресцентного сигнала с помощью программного обеспечения, прилагаемого к амплификатору,

определяется наличие или отсутствие ДНК вируса заразного узелкового дерматита; по нарастанию интенсивности вычисляется концентрация исходной матрицы ДНК [104].

Вестерн - блот представляет собой чувствительную и специфическую систему для обнаружения антител к структурным белкам каприпоксвируса, хотя тест является дорогостоящим и трудно реализуемым [105].

2.4 Иммуниет и специфическая профилактика

При возникновении подозрения на заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота вводятся меры по организации проведения комплекса мероприятий по предупреждению распространения и ликвидации болезни с учетом возможного подтверждения диагноза на заразный узелковый дерматит КРС [59].

При подтверждении диагноза принимается решение об установлении ограничительных мероприятий (карантина) на территории субъекта Российской Федерации, а также создается чрезвычайная противоэпизоотическая комиссия по борьбе с ЗУД КРС:

- определяется эпизоотический очаг, неблагополучный пункт, угрожаемая зона, зона наблюдения и указан перечень вводимых ограничительных мероприятий, а также срок, на который устанавливаются ограничительные мероприятия (карантин);

- утверждается план противоэпизоотических мероприятий по ликвидации и предотвращению распространения возбудителя инфекции;

- определяются ответственные должностные лица (в т.ч. МЧС России, органов местного самоуправления, полиции, здравоохранения и др.), участие которых необходимо при выполнении организационно - хозяйственных и специальных противоэпизоотических мероприятий по ликвидации очага заразного узелкового дерматита [25].

Во многих пострадавших странах применяется политика тотального или частичного санитарного уоя (stamping out) [25]. Но в странах с ограниченными ресурсами никакой вид санитарного уоя не является

возможным. Применение политики санитарного убоя следует сочетать с политикой целесообразной компенсации. Политика тотального санитарного убоя имеет смысл, если при заносе инфекции в страну или регион были немедленно уведомлены официальные органы, и угроза повторных заносов является низкой [32].

Поскольку раннее выявление случаев легкой формы заболевания может быть чрезвычайно сложной задачей, между первоначальной инфекцией и обнаружением заболевания может пройти несколько недель. За это время переносчики могут распространить вирус на большие расстояния. Кроме того, эпизоотической единицей может быть весь населенный пункт, а не одна ферма, что снижает эффективность политики тотального или частичного санитарного убоя. Частичный санитарный убой, направленный на забой животных с клиническим заболеванием, может снизить риск заболеваемости, но вряд ли приведет к уничтожению вируса [14].

При реализации политики санитарного убоя, забой и утилизация туш должны проходить в как можно более короткие сроки, с учётом требований по безопасности и благополучию животных. При утилизации, захоронении или сжигании необходимо соблюдать нормы охраны окружающей среды. В некоторых странах такая практика может быть и вовсе запрещена [22, 28].

Важно отметить, что независимо от того, какой вид санитарного убоя был выбран, пострадавших животных всегда следует изолировать от стада, потому что они служат постоянным источником заражения для кровососущих и кусающихся насекомых-векторов. Точно также, ни одно животное с клиническими признаками не должно направляться на бойню, их следует убивать и утилизировать на месте или на специальном заводе по переработке непищевого животного сырья [23, 73].

С целью предотвращения распространения заболевания всех восприимчивых к заразному узелковому дерматиту животных в эпизоотическом очаге подвергают обработке репеллентами [22].

Вакцинация является единственно эффективным методом борьбы с болезнью в эндемичных районах, поскольку ограничения на передвижение животных и удаление больных из стада, не приводят к искоренению болезни [38, 101].

Все представители рода *capripoxvirus*, исследованные на данный момент, имеют главный нейтрализующий сайт основного антигена, в связи, с чем большинство вакцинных штаммов обеспечивает перекрестную защиту. Поэтому для защиты животных от инфекции могут быть использованы гомологичные (Nethling LSDV strain) и гетерологичные (sheep pox or goat pox virus) живые аттенуированные вакцины [58].

Контроль вируса заразного узелкового дерматита достигается в эндемичных странах за счет использования живых вирусных вакцин, изготовленных на основе аттенуированных гомологичных вирусов, в том числе группы Nethling, а также вирус-вакцины против оспы овец и коз, поскольку эти возбудители имеют тесное антигенное родство с вирусом заразного узелкового дерматита. Небольшое количество аминокислотных изменений, вероятно, будет отвечать за ослабление каприпоксвирусов. Кроме того, вирус заразного узелкового дерматита используют в качестве вирус вакцинного вектора [57]. Иногда у животных инфицированных или вакцинированных вирусом заразного узелкового дерматита (Nethling) не наблюдается сероконверсии [134]. Однако они могут обладать иммунитетом против вируса заразного узелкового дерматита без обнаружения ответных антител. Отсутствие сероконверсии у отдельных особей КРС после контакта с вирусом заразного узелкового дерматита является основным препятствием для программ эпиднадзора и ликвидации [58, 92].

Коммерчески доступные вакцины изготовлены на основе штаммов семейства *poxviridae* (CaPV): штамм Nethling LSDV, Kenyan sheep and goat pox virus (KSGPV) O-240 и O-180, Yugoslavian RM65 sheep pox (SPP) штамм, Romanian SPP and Gorgan goat pox (GTP) штаммы [23, 38].

Недавнее исследование Gari G с соавторами в Эфиопии показало, что вакцина Gorgan GTP обеспечивает защиту КРС от ЗУД, а вакцины Neethling и KSGP O-180 имеют низкий показатель защиты животных, в связи с чем необходимо дальнейшее совершенствование и сравнительное изучение молекулярной характеристики этих недостаточно эффективных вакцин [75, 101].

В странах, ранее свободных от вируса ЗУД КРС и использующих вакцину против оспы овец для защиты овец, рекомендуется использовать одну и ту же вакцину во время вспышек ЗУД из-за потенциальных проблем безопасности, связанных с использованием живой ослабленной вакцины против вируса ЗУД КРС [47]. Кроме того, необходимо быстрое подтверждение диагноза для того, чтобы меры по ликвидации заболевания могли быть реализованы в кратчайшие сроки во время вспышки болезни [56].

В настоящее время профилактическая вакцинация крупного рогатого скота осуществляется гетерологичной живой аттенуированной вирусной вакциной из штаммов каприпкоксовирусов, полученных от овец и коз. В России имеются три производителя вакцины против оспы овец и коз (ФГБУ ВНИИЗЖ, ФГБНУ ФИЦВиМ, ФКП «Армавирская биофабрика»). Для производства данной вакцины используются варианты аттенуированного штамма НИСХИ вируса оспы овец [25].

Для профилактики заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота рекомендовано применять указанную вакцину для взрослого (старше 6 месяцев) поголовья крупного рогатого скота в 10-кратной «овечьей» дозе. Молодняк крупного рогатого скота рекомендовано вакцинировать с 3-месячного возраста в 5-кратной прививочной дозе [25].

Всемирная организация по охране здоровья животных (МЭБ) рекомендует, чтобы при использовании вакцины, предназначенной для овец или коз, ее сначала тестировали на наиболее восприимчивых породах в период максимальной лактации. Вакцины против *Carprioxvirus* вызывают видимую реакцию в месте инокуляции у парнокопытных животных. Из-за

этого побочного эффекта многие владельцы отказываются вакцинировать своих животных, поэтому вспышки заразного узелкового дерматита КРС в стадах этих видов могут быть гораздо выше [73].

Лечения против ЗУД КРС не разработано. Тем не менее, антибиотики, противовоспалительные препараты, витамины используют в некоторых случаях для лечения вторичных бактериальных инфекций, лихорадки, воспаления или улучшения состояния и аппетита животного [73].

2.5. Культивирование и адаптация вирусов

2.5.1 Культивирование вирусов в первичных и перевиваемых линиях клеток

Вирусы культивируют в культурах клеток, куриных эмбрионах или организмах чувствительных животных [5]. Выбор лабораторной живой системы для культивирования вирусов определяется целью работы и видовой чувствительностью к изучаемому объекту. Наиболее широко в вирусологических исследованиях при культивировании вируса используют мышей, белых крыс, кроликов, морских свинок, хомяков, цыплят и культуры клеток. Ту или иную инфекцию иногда изучают на животных нескольких видов, обладающих разной чувствительностью к возбудителю, что позволяет дифференцировать вирусы, вызывающие клинически сходные симптомы болезни. Способ заражения животных, как правило, зависит от тропизма вирусов к определенным тканям. Экспериментальное изучение вирусов и вирусных заболеваний возможно лишь в том случае, если исследуемый вирус способен вызывать характерные признаки инфекции при заражении каких-либо лабораторных хозяев (клеточные культуры, интактные животные) [31]. Иногда уже после первичного заражения вирусом нового хозяина возникают поражения, природа которых (а также эффективность заражения) не изменяется после серийных пассажей. Так обстоит дело, например, при заражении куриных эмбрионов или кожи кроликов вирусом коровьей оспы, выделенным от пораженной коровы. В других случаях при первичном заражении наблюдаются лишь минимальные признаки инфекции, но после

серийных пассажей, иногда весьма продолжительных, регулярно развивается смертельная инфекция, как, например, при адаптации полиовируса или вируса денге к грызунам [11]. Большинство вирусологических исследований ведется со штаммами адаптированного вируса, способного вызывать характерные поражения (например, бляшки) в культуре клеток. Частым побочным результатом такой адаптации к новому экспериментальному хозяину бывает аттенуация (ослабление) вируса для его исходного хозяина [37].

Метод культур клеток явился базой для решения многих общебиологических проблем и широкого развития различных направлений исследований в медицине, ветеринарии, биотехнологии и играет большую роль в вирусологии при изучении механизма репродукции и генетики вирусов, диагностике и профилактике вирусных инфекций. Преимущество метода культивирования вирусов в культуре клеток состоит в том, что почти большинству вирусов можно подобрать чувствительные культуры клеток или ткани, разработать стандартные условия его накопления [24, 34].

В течение многих лет наиболее доступной и эффективной моделью выращивания вирусов являлись первичные культуры клеток, изолированные с помощью протеолитических ферментов из органов и тканей животных и человека. С развитием однослойных клеточных культур (50 годы XX столетия) началась эра культуральных вакцин. Однако кроме первичных культур в настоящее время в вирусологических исследованиях широко используют перевиваемые линии клеток, перспектива использования которых особенно заманчива в плане глубинного культивирования [11].

Культура клеток *in vitro* для получения вирусосодержащего сырья является наиболее экономичной восприимчивой живой системой, заменяющей животных или куриные эмбрионы. Выращивание вирусов в клеточных культурах дает возможность получать вирусный материал с высоким титром, относительно свободный от балластных примесей, что

позволяет эффективно использовать их для приготовления вакцин и антигенов [31].

Существует несколько способов выращивания культур клеток: стационарный, роллерный (динамичный), суспензионный, выращивание на микроносителях [34]. Стационарным методом выращивают однослойные клеточные культуры в стеклянных или пластиковых матрасах, пробирках, чашках Карреля. Этот метод используют в вирусологических диагностических исследованиях, при титровании вирусов, для адаптации вирусов к культурам клеток, при изучении характера цитопатогенного действия [11]. Также высокой производительностью отличается способ выращивания клеточных субстратов на поверхности микроносителей (зерна, гранулы, частицы), о котором впервые сообщил Van Wezel A.L. [135].

Роллерный способ выращивания клеток и вирусов в сравнении с стационарным методом обладает более высокой эффективностью за счет использования в процессе культивирования клеток всей внутренней поверхности сосудов [11].

В настоящее время для массового выращивания клеток и вирусов успешно используют суспензионный метод. Данный метод культивирования имеет ряд преимуществ: высокая однородность суспензии, возможность длительного поддержания клеток в логарифмической фазе роста, перспективы математического моделирования процессов клеточного роста в зависимости от влияния факторов внешней среды, высокая экономичность метода [11]. Так, суспензионный способ выращивания клеток ВНК-21 широко используется для получения вирусосодержащего сырья при изготовлении вакцинных и диагностических препаратов против ящура, чумы лошадей, блютанга, лихорадки долины Рифт, фиксированного штамма вируса бешенства и др. вирусов [5].

Разработка и внедрение методов культивирования клеток и тканей представляет значительный вклад в вирусологию и диагностику вирусных болезней, как незаменимую биосистему для титрования вирусов и изучения

их биохимических молекулярно-биологических механизмов размножения, создания высокоэффективных противовирусных вакцин и диагностикумов [31, 34].

2.5.2 Адаптация вирусов

Для культивирования вирусов исключительно важны, во-первых, адаптация патогенных вирусов, обычно называемых дикими вирусами, на новом, чуждом хозяине, когда условия развития только частично соответствуют естественным условиям, и, во-вторых, размножение в этой новой системе. Чем незначительнее различия между обеими системами и чем больше пластичность самого вируса, тем легче проходит адаптация. Не всякая клетка чувствительна к любому вирусу. Адаптация вируса на первичных клетках проходит легче, поскольку переход от природного носителя на первичные клетки не столь сложен, как на перевиваемые линии клеток. Адаптацию используют с целью поиска лабораторных моделей для размножения, обнаружения вирусов и изучения биологических свойств, приобретенных в результате длительного пассирования. Адаптация некоторых вирусов и вирусных штаммов к размножению в культуре клеток — трудный процесс, который требует нетрадиционных подходов. Отсутствие ЦПД в первом пассаже еще не говорит об неимении вируса [36]. Развитие вируса вначале не всегда проходит настолько быстро, чтобы существенно изменить вид культуры. Слепые пассажи отражают сложность процесса адаптации вируса на выбранной клеточной системе. В среднем необходимо получить три слепых пассажа, прежде чем прекратить опыт. Нужно помнить, что многие слепые пассажи обусловлены тем, что клетки обладают короткой продолжительностью жизни. Продолжая культивировать дальше, ЦПД можно обнаружить уже в пассажах выделения. Здесь проявляется некий суммарный эффект от первых пассажей. Подлинное «слепое» переживание в противоположность этому связано с изменением самого вируса. Кроме того, среду от слепых пассажей можно проверить на еще более чувствительных клеточных системах, лабораторных животных, также в серологических

исследованиях. При адаптации вирусов, которые размножаются медленно и в первых пассажах не дают ЦПЭ, целесообразно однослойные инфицированные культуры инкубировать длительно (2-4 недели) или даже использовать пересев инфицированных клеток [5].

В некоторых случаях в биотехнологии возникает необходимость в вирусном сырье, произведенном в гетерологичной клеточной системе. Если не представляется возможным адаптировать культуральный вирус к гетерологичной клеточной системе прямыми пассажами, можно применить смешанную культуру клеток, т.е. культивировать вирус в монослое клеток, состоящем из чувствительных к вирусу клеток и клеток гетерологичного происхождения [24].

Непермиссивность клеточных линий к вирусу также может быть преодолена при помощи обработки клеток белковыми компонентами незараженных чувствительных клеток. Вирус бешенства не пассировался в диплоидных клетках человека при обычном методе заражения, но размножался в хронически инфицированных клетках, пересеваемых с помощью трипсина [34].

Изучению влияния различных факторов на репродукцию вируса в культуре ткани посвящены многие исследования. Известно, что размножение вируса может зависеть от состава питательной среды, возраста культуры, физиологического состояния клеток и других факторов, выяснение которых представляет научный и практический интерес. Знание этих вопросов имеет важное значение для разработки оптимальных параметров культивирования вирусов [84].

Успех культивирования вирусов, прежде всего, зависит от удачного выбора клеточного (тканевого) субстрата. Основными критериями при этом являются высокий выход вируса и вирусного антигена и относительная неприхотливость к условиям культивирования [34].

Заметное влияние на репродукцию вирусов оказывает фаза роста. Выход вирусов, как правило, наивысший в период энергичного размножения

клеток и заметно снижается в стационарной фазе роста культуры. Так, например, выход вируса болезни Ньюкасла был максимальным в период размножения клеток куриного эмбриона в первичной культуре. В стационарной фазе роста выход вируса снижался в более чем в 30 раз [31]. Прямая зависимость уровня размножения вируса от степени клеточного деления показана в опытах с возбудителем болезни Ауески, вирусом простого герпеса и парвовирусом [36].

По литературным данным, адаптация и длительное пассирование вируса в первичных и перевиваемых линиях клеток влияет на иммунобиологические свойства вируса. При молекулярно-генетических исследованиях культуральных вариантов адаптированного вируса иногда наблюдают делецию участков его генома [76, 88].

Генетические мутации наиболее часто сопровождаются заменой единичных нуклеотидов (точечные, миссенс мутации). Реже мутации связаны с делецией или инсерцией единичных нуклеотидов или блоков нуклеотидов. Фенотипическая экспрессия мутаций может проявляться изменением различных свойств вируса. Точечные мутации, сопровождающиеся специфическими аминокислотными заменами, в кодируемых вирусом белках могут снижать их функцию *in vivo* и тем самым вызывать аттенуацию вируса для хозяина [135].

Так, например, противооспенная вакцина 3 поколения была получена на основе ВОВ штамм *Lister* путем 45 пассажей при температуре 30°C. Его аттенуация объясняется делецией одного нуклеотида в гене B5R, который кодирует белок внеклеточного покрытия двойной оболочки вириона. В дальнейшем ген был полностью удален в штамме LC16m8 [21].

В отдельных случаях для получения аттенуированных вариантов применяют воздействие мутагенов. Так, например: аттенуированный штамм MP-12 вируса лихорадки долины Рифт получен из вирулентного египетского штамма ZH548 после проведения 12 последовательных пассажей в присутствии мутагена 5-фторурацила [52]. Данный вариант имел мутации во

всех трех сегментах генома, что привело к потере вирулентности при испытании на мышах. В дальнейшем было установлено, что мутации прежде всего в М- и L-сегментах способствовали аттенуации и снижению вирулентных свойств МР-12 [52].

Современные данные о генетике вирусов животных указывают на то, что в некоторых частных случаях важную роль в адаптации могут играть два других механизма [24]. Аденовирусы человека «адаптировались» к клеткам обезьяны благодаря комплементации латентным вирусом SV40, находившимся в этих клетках, с последующим образованием в отдельных случаях новых жизнеспособных гибридов SV40 — аденовирус, способных размножаться в обезьяньих клетках и в отсутствие SV40. Другой механизм наблюдается у лейковирусов различных животных: у многих видов практически все клетки тела содержат интегрированные вирусные геномы, которые могут функционировать в разной степени; при этом размножение лейковируса, внесенного извне, может быть комплементировано активностью эндогенного вируса [1].

2.5.3 Культивирование вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота в первичных и перевиваемых линиях клеток

Первые сведения о выращивании вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота в культуре клеток в литературе появились в 1957 году. Alexander и другие, исследователи адаптировали вирус ЗУД к размножающийся в тканевой культуре животных клеток [40].

В работах J. Coetzer and E. Turpurainen показано, что вирус ЗУД КРС растет медленно в тканевых культурах и для его адаптации может потребоваться несколько пассажей. Проявление цитопатического действия от момента внесения вирусосодержащего материала может занимать до 14 дней при первичной изоляции. Репликация сопровождается образованием тел внутрицитоплазматического включения, аналогичных тем, которые возникают при поражении кожи крупного рогатого скота. Вирус также

репродуцируется в 5-7 дневных куриных эмбрионах и на хориоантлантоисной мембране яиц, образуя оспины [63].

Вирус заразного узелкового дерматита размножается в тканевой культуре бычьего, овечьего или козьего происхождения, хотя первичная или вторичная культуры клеток бычьей дермы или клеток тестикул ягненка считаются наиболее восприимчивыми, особенно те, которые получены от тонкорунной породы овец [137]. В инфицированных клетках развивается характерный цитопатический эффект, состоящий из ретракции клеточной мембраны из окружающих клеток и, в конечном итоге, округления клеток и скапливания ядерного хроматина. В первые, 2-3 суток культивирования можно увидеть только небольшие участки цитопатического эффекта, а на 4–6 сутки наблюдают их увеличение и поражение всего клеточного монослоя [104, 105].

Е.М. Е-Nahas, А.С. Е-Nabbaa, G.F. El-bagoury and Mervat E.I. Radwan, выделяли вирус нодулярного дерматита на хориоантлантоисной оболочке куриных эмбрионов и в культуре клеток почки КРС (MDBK). В культуре клеток MDBK ЦПД характеризовалось округлением клеток, их агрегацией, объединением клеток, которые рассеивались по всему клеточному монослою в течение 72 часов после инфицирования и последующей деструкцией монослоя клеток [86].

А.В. Кононов с соавт. установили, что вирус, выделенный из патологического материала, который был получен на территории Республики Дагестан в 2015 году, размножался в клетках гомологичного происхождения — субкультуре тестикул ягненка (ТЯ) и перевиваемой культуре клеток гонады козы (ЯДК-04) [20].

В.И. Заерко с соавторами сообщили о перспективности использования культуры клеток легкого плода коровы (ЛПК) и фибробластов репродуктивных органов козы (ФРК) для научных целей и производства биопрепаратов. При инфицировании культур клеток ЛПК вирусом заразного узелкового дерматита первые признаки ЦПД проявлялись через 24 ч. Полную

деструкцию клеточного монослоя отмечали через 72-96ч. Средний титр вируса составлял $5,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Культура клеток ФРК обеспечивала продуктивную репликацию вируса с первого пассажа с развитием специфического ЦПД и деструкцией монослоя в одни и те же сроки, которая в дальнейшем не снижалась на разных пассажных уровнях. Средний урожай вируса при полном разрушении монослоя составлял $5,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ при полном разрушении монослоя [33].

Косарева О.А. и др. показали, что перевиваемая культура клеток гонад козы чувствительна к вирусу заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота штамма «Эфиопский». Сроки культивирования вируса составляли 2-3 суток, а инфекционный титр достигал величины $5, 5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ [18].

Таким образом, вирус заразного узелкового дерматита имеет чувствительность к широкому спектру первичных и перевиваемых культур клеток гомологичного и гетерологичного происхождения.

2.6 Заключение по обзору литературы

Анализ данных литературы свидетельствуют о том, что заразный узелковый дерматит относится к особо опасным болезням животных. Возбудителем заразного узелкового дерматита является ДНК содержащий оболочечный вирус, относящийся к группе Neethling, рода Capripoxvirus семейства Poxviridae, имеющий антигенное родство с вирусами оспы овец и оспы коз [80]. В течение долгого времени заразный узелковый дерматит был распространен только в Африке южнее Сахары, но между тем в течение последних лет это заболевание вновь распространяется на новые территории. Заболевание имеет разрушительные последствия для сельскохозяйственных регионов с производством, зависящим преимущественно от крупного рогатого скота, причиняя серьезный ущерб пострадавшим животноводческим хозяйствам. Единственный эффективный способ борьбы с ЗУД в регионах, где болезнь эндемична, — это вакцинация. Для специфической профилактики заразного узелкового дерматита

используют вирус-вакцину из аттенуированного гомологичного штамма Neethling или вакцины из гетерологичных аттенуированных штаммов вирусов оспы овец или оспы коз [38, 98, 101].

Специфическая профилактика и ликвидация вирусных болезней нуждается в быстрой и точной лабораторной диагностике [58]. ЗУД идентифицируют с помощью методов РСК, ИФА, РИД, ПЦР, РНИФ, выделением вируса в культуре клеток и электронной микроскопией. Сокращение времени культивирования вируса и последующая его детекция иммунологическими методами повышают эффективность и скорость идентификации возбудителя [137].

В анализируемой литературе нет конкретных данных по результатам экспериментального заражения вирусом Neethling лабораторных животных.

Для выделения и культивирования вируса ЗУД используют первичные и перевиваемые линии клеток в основном, гомологичного происхождения. В некоторых случаях возникает необходимость в вирусном сырье, произведенном в гетерологичной клеточной системе, в частности при накоплении вирусного антигена для получения специфических сывороток. Однако адаптация вируса к выбранной культуре клеток не всегда сопровождается положительным результатом, особенно при выборе гетерологичной линии клеток и часто требует применение специальных приемов и методов. Использование гетерологичных клеточных систем культивирования позволяет исключить появление фоновых антител на гомологичные тканевые антигены, что затрудняет применение сывороток в диагностических исследованиях или требует дополнительных процедур по очистке антигена [86, 91, 92].

В связи с этим, вопросы культивирования вируса ЗУД, его идентификация, получение безопасных аттенуированных штаммов для разработки высокоэффективной вирусвакцины, получение гипериммунных сывороток, изучение возможности использования лабораторных животных

для моделирования болезни являются актуальными и представляют интерес для их дальнейшего изучения.

3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Материалы и методы

3.1.1 Вирус

В работе использовали вирус ЗУД КРС, выделенный на территории РФ Волгоградской области в 2016 г. от вынужденно убитых быков калмыцкой породы.

3.1.2 Культуры клеток

Перевиваемые культуры клеток: кожа эмбриона лося (КЭЛ/07), легкое эмбриона лося (ЛЭО), почки африканской зеленой мартышки (Vero), почки обезьяны (CV - 1), (перевиваемые линии клеток почки овцы (ПО (ВНИИВиМ)), почки кролика (РК-13/2-03), почки теленка (Taurus-1), почки теленка (MDBK).

Первичную культуру клеток: тестикулы козленка (ТК).

Культуры клеток были получены в лаборатории Лекарственных средств для животных ФГБНУ ФИЦВиМ.

3.1.3 Питательные среды, растворы, сыворотки и реактивы

Синтетическая среда Игла MEM фирмы Sigma (США), фетальная сыворотка крупного рогатого скота фирм Sigma (США) и Nu Clon (США); сыворотка крови крупного рогатого скота фирмы «БиолоТ» (Россия) для культивирования клеточных культур.

Забуференный физиологический раствор (ЗФР) рН 7,2-7,4; фосфатно-буферный раствор (ФБР) рН 7,2-7,4; 0,02 % раствор версена; 0,25 % раствор трипсина.

Бактериальные среды: питательный агар (ПА), питательный бульон (ПБ), среды Сабуро (агар и бульон) и тиогликолевая.

Среды, сыворотки для культивирования клеточных культур, бактериальные среды и солевые растворы получали из лаборатории «Лекарственных средств для животных» ФГБНУ ФИЦВиМ.

Антибиотики: бензилпенициллина натриевая соль, стрептомицин, гентамицин, ципрофлоксацин («Синтез», Россия), тилозин (Sigma).

Кристаллический фиолетовый (Реахим, Россия); ацетон, спирт этиловый, глицерин.

В работе использовали эти и другие реактивы, упомянутые по тексту диссертации, уровня не ниже ХЧ.

3.1.4 Животные

Клинически здоровые лабораторные животные, получены из сектора подготовки подопытных животных ФГБНУ ФИЦВиМ. В качестве лабораторных животных были использованы аутбредные мыши живой массой 15-20 г, сирийские хомячки живой массы 40-50 г, морские свинки живой массы 600-800 г и кролики живой массы 2,5 - 3 кг. Все лабораторные животные содержались в микробиологических безопасных боксах, кормление осуществлялось полным сбалансированным рационом и водой вволю.

3.1.5 Оборудование и расходные материалы

Холодильники: низкотемпературные фирмы «Sanio», Япония холодильник бытовой с поддержанием температуры холодильной камеры не выше +4 °С; микроскоп инвертированный для светового просмотра препаратов СК-2 (Olympus, Япония); микроскоп инвертированный люминесцентный (Nikon, Япония); рН-метр милливольтметр рН-121; камера Горяева; весы аналитические; шкаф с вертикальным ламинарным потоком воздуха, обеспечивающий биологическую защиту II класса (Bellco Glass, Inc, Канада) и СО₂-инкубатор («Sanyo», Япония); термостат с водяной рубашкой электрический; центрифуга лабораторная ОНП - 108.

Микропипетки 1 и 8-канальные с наконечниками объемом от 50 до 1000 мкл («Gilson», Франция; «Ленпипет», Россия); микропланшеты полистироловые культуральные 24-, 96-луночные («Corning Incorporated», США); пробирки вакуумные VACUETTE Z Serum Clot Activator («Greiner Bio-One»,

Австрия); пробирки пластиковые 2 см³ («Axygen», США); посуда лабораторная стеклянная; стекла покровные и предметные; ступки фарфоровые с пестиками; флаконы пластиковые культуральные площадью 25 см² («Corning Incorporated», США); шприцы инъекционные 1 и 5 см³ («Helm Pharmaceuticals GmbH», Германия).

3.1.6 Выращивание перевиваемых культур клеток

Клетки в концентрации 100-180 тыс/ мл помещали в культуральные сосуды полезной площади 25 см² со средой Игла MEM с 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота и инкубировали в статических условиях при температуре 37,0 ± 0,5 °С.

Концентрацию и жизнеспособность клеток определяли с витальным красителем визуальным просмотром под микроскопом в камере Горяева.

Число клеток в 1 мл среды определяли по формуле:

$$X = a \times 15 \times 2 \times 1111,$$

где: X — число клеток в мл;

a — среднее число клеток в 15 квадратах;

2 — коэффициент разведения суспензии раствором красителя;

1111 — коэффициент пересчета.

3.1.7 Адаптация вируса ЗУД к перевиваемым линиям клеток

При адаптации вируса к гомологичным и гетерологичным линиям клеток применяли метод серийного пассирования.

Культуры клеток выращивали в среде Игла MEM с 10,0 % сыворотки крупного рогатого скота в культуральных флаконах полезной площадью 25 см². При образовании конфлюэнтного монослоя (24 часа) из культуральных сосудов удаляли ростовую среду и вносили вирусосодержащий материал. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 час при температуре (37,0 ± 0,5) °С. После этого вносили поддерживающую среду Игла MEM, содержащую 2 % фетальной — сыворотки КРС. Инфицированную культуру клеток инкубировали при температуре (37,0 ± 0,5) °С в течение 5-7 дней. Затем вирусосодержащую культуральную жидкость замораживали при температуре

минус $40,0 \pm 0,5$ °С. При проведении следующего пассажа размороженную вирусосодержащую суспензию вносили в культуру клеток. О чувствительности линии клеток судили по наличию цитопатических изменений в монослое и изменению титра вируса в процессе пассирования.

3.1.8 Культивирование вируса ЗУД в первичной культуре клеток

Вирус выращивали в статических условиях. Первичную культуру клеток ТК, инфицировали вирусом ЗУД с множественностью заражения 0,1 - 0,01ТЦД₅₀/кл с последующей адсорбцией вируса в течение 40 минут. Инкубировали зараженную культуру 5 – 7 суток в атмосфере 95 % влажности и 5 % CO₂ при $(37,0 \pm 0,5)$ °С.

3.1.9 Определение инфекционной активности вируса ЗУД КРС

Инфекционную активность вируса ЗУД определяли титрованием в 1 – 2 суточных первичных и перевиваемых линиях клеток, выращенных на 96-луночных культуральных микропланшетах. С этой целью готовили последовательные десятикратные разведения вируса (от 10^{-1} до 10^{-7}) на поддерживающей среде Игла МЕМ с 2 % фетальной сыворотки крови КРС. Каждое разведение вируса вносили в 4 лунки культурального микропланшета с монослоем культуры клеток, предварительно удалив ростовую среду. В качестве контроля использовали лунки с интактной культурой клеток. Клетки инкубировали при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С. Культуру ежедневно (в течение 7 суток) просматривали под световым микроскопом на наличие специфических для вируса ЗУД цитопатических изменений. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/см³[36].

3.1.10 Заражение лабораторных животных

Для изучения биологических свойств возбудителя заражение животных производили различными способами и дозами заражения: внутрикожно, подкожно, интраназально и внутривенно в зависимости от вида лабораторного животного. Для заражения использовали суспензию культурального материала 15 пассажа в культуре клеток ПО (ВНИИВВиМ) с инфекционной активностью $5,5 \lg$ ТЦД₅₀/ см³. Ежедневно животных

обследовали на наличие клинических признаков, включая развитие кожных узелков в местах инокуляции.

3.1.11 Отбор проб крови и патологоанатомического материала

Для проведения метода ПЦР-РВ, выделения вируса, серологических и гематологических исследований у животных брали пробы крови, на 7,14,21 28 сутки после заражения, различного объема в зависимости от вида лабораторного животного в вакуумные пробирки с ЭДТА. У мышей отбор проб крови производили путем декапитации, предварительно усыпляя диэтиловым эфиром. У морских свинок путем пункции сердца. У кроликов отбор проводили из ушной вены, а у сирийских хомячков из задней вены голени. Убой животных осуществляли гуманным способом при помощи эвтанази. При патологоанатомическом вскрытии животных производили отбор органов (легкие, селезенка, печень), а также отбирали некропсийный патологический материал в виде кожных узелков, которые хранили при температуре минус (40 ± 1) °С в полиэтиленовых герметично закрытых пакетах, с обязательной идентификацией.

3.1.12 Получение сыворотки

Для получения сыворотки крови у подопытных животных брали кровь в вакуумные пробирки до начала опыта, а затем в сроки, предусмотренные опытом. Флаконы с кровью помещали в термостат при температуре $(37,0\pm 0,5)$ °С на 30 мин, сгусток отделяли от стенок с помощью стерильной спицы из нержавеющей стали, затем флаконы помещали в холодильник при $4,0\pm 2,0$ °С на 18-20 часов. Сыворотку отбирали в центрифужные пробирки, осветляли центрифугированием 30 мин при 1500 об./мин и исследовали в серологических реакциях или хранили при минус $40,0\pm 2,0$ °С до проведения исследований.

3.1.13 Постановка реакции нейтрализации

Определение уровня вируснейтрализующих антител в сыворотках крови, полученных от животных, инфицированных вирусом ЗУД.

Для постановки реакции нейтрализации предварительно титровали вирус ЗУД в культуре клеток, затем вычисляли его титр по методу Рида и Менча [36].

Образцы исследуемых сывороток инактивировали при 56 °С в течение 30 минут. С целью определения вируснейтрализующей активности сывороток крови готовили двукратные разведения испытуемых сывороток. Затем готовили необходимый объем вируса, содержащего 100 ТЦД₅₀ в 0,1 мл, и добавляли равный объем его в каждую пробирку с разведениями сыворотками. Смесь сыворотки и вируса выдерживали в атмосфере 95 % влажности и 5 % CO₂ при температуре (37±0,5) °С в течение одного часа. После контакта в планшет с конфлюэнтным монослоем вносили соединение вируса с сыворотками и инкубировали при температуре (37±0,5) °С в течение 6 - 7 суток. Развитие ЦПД оценивали при просмотре культуральных планшетов с использованием инвертированного микроскопа. Титром сыворотки считали ее предельное разведение, сдерживающее развитие ЦПД вируса в 50 % зараженных культур клеток.

Идентификация вируса ЗУД в реакции нейтрализации.

1. Культуру клеток выращивали в 96 – луночных культуральных планшетах до формирования сплошного монослоя.
2. Готовили постоянную дозу интактной и специфической сыворотки. Рабочее разведение специфической сыворотки определяли в предварительном титровании в РН в культуре клеток ПО (ВНИИВиМ).
3. Готовили десятикратные разведения суспензии вируса от 10⁻¹ до 10⁻⁷ на среде Игла - МЕМ без сыворотки в объеме 2,0 см³ каждого разведения (1,8 см³ Игла - МЕМ , 0,2 см³ вирусной суспензии).

4. В лунки полистеролового планшета без клеточного монослоя вносили разведения вируса в количестве $0,1 \text{ см}^3$ на лунку по вертикальным рядам. 1 ряд оставляли в качестве контроля культуры.
 5. Затем параллельно в горизонтальные ряды вносили интактную и специфическую сыворотки в рабочем разведении на среде Игла - МЕМ в объеме $0,1 \text{ см}^3$.
 6. Смесь вирус-сыворотка инкубировали в течение 1,5 ч при ($37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) в CO_2 – инкубаторе, с содержанием 5,0 % углекислого газа и 95,0 % влажности.
 7. Из планшета с конфлюэнтным монослоем культуры клеток удаляли ростовую среду осторожным стряхиванием планшета на фильтровальную бумагу. Многоканальной пипеткой переносили содержимое из лунок планшета, инкубируемого при ($37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) в культуральный планшет с клеточным монослоем.
 8. Инкубировали в CO_2 – инкубаторе в течение 4-7 суток.
 9. Учет результатов. На 3-6 сутки в лунках, содержащих смесь вируса с отрицательной сывороткой, развивались характерные цитопатические изменения. В лунках со специфической сывороткой цитопатические изменения отсутствовали.
 10. Индекс нейтрализации рассчитывали как разницу в титрах вируса в присутствии нормальной сыворотки и специфической
 11. Реакция считалась положительной, если индекс нейтрализации не меньше 1,5 [104].
- При постановке РН проводили контроли на токсичность сывороток, контроли культуры клеток и дозы вируса.

3.1.14 Постановка полимеразной цепной реакции реального времени

Для исследований использовали, стабилизированную кровь, культуральный материал и 10% суспензию биоматериала.

Нуклеиновые кислоты выделяли с использованием набора «РИБО-сорб» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) в соответствии с инструкцией

производителя. Вирусную геномную ДНК выявляли по методике Bowden с соавт. с олигонуклеотидными праймерами CaPV 074 F1 (5'-AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA-3'), CaPV 074 R1 (5'-AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA-3') и гибридизационным зондом CaPV-074P1 (5'-6FAM-TGG CTC ATA GAT TTCCT-MGB-NFQ-3').

Реакционная смесь включала 10 пмоль каждого праймера, 5 пмоль флуоресцентного зонда (ЗАО «Синтол», Россия), 2,5 мкл. 10-х ДНК-буфера (Thermo Scientific, США), 10 ммоль смеси dNTPs (Thermo Scientific, США), 12,5 мкмоль хлорида магния (ЗАО «Синтол», Россия) и 1,5 ед. активности рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы («Thermo Fisher Scientific», США).

ПЦР в реальном времени проводили на детектирующем термоциклере «ДТпрайм» (ООО «ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: предварительная денатурация в течение 10 мин при 95 °С; 45 циклов амплификации (15 с при 95 °С, 1 мин. при 60 °С).

Результаты интерпретировали на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с автоматически установленной прибором пороговой линией (Threshold). Результат считали положительным, если для него получено значение Ct, не превышающее 40.

3.1.15 Нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ

Выделение специфичных продуктов амплификации из агарозного геля осуществляли с помощью коммерческого набора для выделения нуклеиновых кислот «Axy Prep DNA Gel Extraction Kit» согласно инструкции производителя. Секвенирование очищенных амплифицированных фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты проводили на автоматическом секвенаторе «GeneticAnalyzer 3130» с использованием набора «BigDye Terminator 3.1.» в соответствии с инструкцией производителя.

Филогенетическое древо строили по общепринятым для анализа генома методом максимального правдоподобия (MaximumLikelihood). Расчет эволюционных дистанций осуществляли по алгоритму Кимуры, достоверность распределения последовательностей по группам проверяли

путем бутстрэп-анализа со 100-кратным ресемплингом. Для построения филогенетического дерева было использовано программное обеспечение MEGA 6.0.

3.1.16 Постановка иммуноферментного анализа

Постановку ИФА осуществляли коммерческим диагностическим набором IDVET, ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species на наличие антител против вируса заразного узелкового дерматита, согласно инструкции производителя.

3.1.17 Постановка метода иммуноцитохимического анализа

При постановке метода ИЦХ использовали стандартизированную специфическую гипериммунную сыворотку против оспы овец, с активностью в РН с вирусом ЗУД КРС в разведении 1:16. Монослой клеток, культивируемых на 96 луночных планшетах, заражали вирусом ЗУД КРС в дозе 0,1 – 1,0 ТЦД₅₀/кл, оставляя лунки с клетками нечетных рядов интактными в качестве отрицательного контроля.

Динамику накопления антигенов вируса ЗУД КРС в процессе его культивирования изучали через 6, 12, 18, 24 и 36 ч инкубирования при температуре (37±0,5) °С, в атмосфере 95%ной влажности и 5 % CO₂. Для этого клеточный монослой фиксировали согласно методическим рекомендациям [13].

В лунки вносили специфическую сыворотку против вируса оспы овец в рабочем разведении 1:300 и параллельно в качестве отрицательного контроля – фетальную сыворотку крупного рогатого скота.

Планшеты инкубировали 1,5 ч при 20 – 22 °С во влажной камере. Лунки трехкратно отмывали фосфатно-буферным раствором с добавлением 0,025 % твин-80 (ФБР-Т) и подсушивали. Затем в каждую из них вносили по 0,1 см³ антивидового пероксидазного конъюгата (ООО "Сорбент", Россия) в разведении 1:500 [128]. После чего планшеты инкубировали 40 – 60 мин, лунки пятикратно отмывали раствором ФБР-Т, вносили в них по 0,1 см³ раствора 3-амино-9-этилкарбазола на 0,05 М ацетатном буфере рН 4,4 с

содержанием 0,02 % перекиси водорода и 10 – 15 минут вновь инкубировали. Затем в монослое клеток на планшетах изучали окрашенные места специфического взаимодействия антигенов вируса ЗУД КРС с антителами в инфицированных клетках.

3.1.18 Гистологическое исследование патологического материала

Для изучения гистологической картины болезни отбирали некротический материал в виде кожных узелков. В качестве контроля использовали ткани, полученные от здоровых животных. Образцы полученной кожи помещали в 10% раствор забуференного формалина. Дальнейшую подготовку проб и диагностические исследования выполняли классическим методом гистологической проводки образцов - удалением воды и липидов в восходящих концентрациях изопропилового спирта с последующим пропитыванием парафином, получением срезов тканей толщиной 5мкм и их окрашиванием гематоксилином и эозином. Исследование окрашенных срезов осуществляли методом оптической микроскопии с использованием светового микроскопа AxioVision A 1.0.

Для оценки гистопатологических изменений кожных узелков кроликов использовали криотомные срезы исследуемых патологически измененных нативных образцов кожи. В работе применяли непрямой метод ИГХ исследования, который основан на двухэтапном нанесении специфичных и антивидовых антител. В качестве первичных антител использовали Ig овцы против оспы с 5% обезжиренного молока на физиологическом растворе. В качестве вторичных антител применяли конъюгат пероксидазы хрена, производства «Хема» (Ig G). Для удобной визуализации структурных элементов тканей использовали метод докрасивания ядер клеток гематоксилином Майера.

3.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.2.1 Выделение изолята вируса ЗУД КРС из проб патологического материала в культурах клеток

Пробы органов (легкие, селезенка, лимфатические узлы) и пораженной подкожной клетчатки были получены от вынужденно убитых быков калмыцкой породы (хозяйства Волгоградской области, 2016 год) с характерными проявлениями клинических признаков ЗУД КРС. Из проб готовили 10 % суспензию в среде Игла MEM; «Sigma» с добавлением антибиотиков (пенициллин и стрептомицина по 200-1000 ЕД на 1 мл, нистатина 20 ЕД на 1 мл). После осветления центрифугированием при 2000 об/мин вирус содержащую суспензию в объеме 0,1 -0,2 см³ вносили в культуральные флаконы полезной площадью 25 см² со конфлюэнтным монослоем клеток. На этом этапе для выделения вируса использовали первичную культуру клеток тестикул козленка (ТК), а также перевиваемую линию почки овцы (ПО (ВНИИВиМ)).

Сосуды инкубировали при (37,0±1)°С до появления ЦПД вируса более, чем в 80% клеток монослоя. Затем вирусную суспензию в культуральных сосудах трехкратно замораживали-оттаивали и осуществляли следующий пассаж по той же методике. Таким образом, провели три последовательных пассажа.

В 1-м пассаже изменений в культуре клеток ПО не наблюдали, начиная со 2-го пассажа выявляли незначительные изменения морфологии клеток, их округление. В 3-м пассаже отмечали характерное цитопатическое действие (ЦПД) вируса в виде разрыва клеточного монослоя и отделения клеток от подложки, в то время как в контрольной культуре таких изменений не выявляли.

Инфекционную активность вируса на уровне 3-го пассажа определяли титрованием в 1-2-суточной культуре перевиваемой линий клеток ПО (ВНИИВиМ) и рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/см³. Инфекционная активность вируса составляла 4,5 lg ТЦД₅₀/см³.

В первичной культуре клеток ТК на уровне 3-го пассажа также регистрировали ЦПД вируса, которое проявлялось в округлении клеток, но характер поражения был менее выражен, чем в культуре клеток ПО. Инфекционная активность вируса составляла $3,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Таким образом, изолят вируса ЗУД КРС был выделен с использованием как первичной, так и перевиваемой культуры клеток. Вирус ЗУД КРС в культуре клеток ТК достигал значений $3,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а в культуре клеток ПО $4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно.

3.2.2 Адаптация вируса ЗУД КРС к перевиваемым и первичным линиям клеток

Для адаптации изолята к перевиваемым линиям клеток и определения, чувствительных к нему культур использовали линии гомологичного и гетерологичного происхождения: КЭЛ/07, ЛЭО, MDBK, ПО, CV-1, Vero, RK-13/2-03. Перевиваемые линии клеток эмбриона лося (КЭЛ/07), почки телят (MDBK), почки африканской зеленой мартышки (VERO), почки обезьяны (CV – 1), почки овцы (ПО (ВНИИВиМ)), почки кролика (RK-13/2-03) выращивали в культуральных флаконах полезной площадью 25 см^2 в среде Игла – MEM с добавлением 10,0 % фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота [15].

В некоторых случаях в биотехнологии возникает необходимость в вирусном сырье, произведенном в гетерологичной клеточной системе. Поскольку не представлялось возможным адаптировать культуральный вирус к гетерологичной клеточной системе RK-13/2-03 прямыми пассажами, применяли смешанную культуру клеток, т.е. культивировали вирус в монослое клеток, состоящем из чувствительных к вирусу клеток и клеток гетерологичного происхождения.

При образовании сформировавшегося клеточного монослоя смешанной культуры клеток RK-13/2-03 и ПО (ВНИИВиМ), из культурального флакона удаляли ростовую питательную среду, клетки 1-2 раза промывали средой Игла - MEM, для удаления сывороточных антител и ингибиторов.

Затем в каждый культуральный флакон вносили по 1,0 мл культурального вирусосодержащего материала, при этом множественность заражения составляла 0,1-0,01 ТЦД₅₀/кл, покачиванием распределяли его равномерно по монослою клеток и проводили адсорбцию вируса при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 40-60 минут. Затем вносили поддерживающую среду Игла — МЕМ содержащую 2% фетальной сыворотки крови КРС. Инфицированную культуру клеток инкубировали при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 5-6 дней без смены среды.

Для контроля клеток оставляли 1 - 2 культуральных флакона с незараженной культурой клеток, в которых заменяли ростовую среду на поддерживающую. Интактные и инфицированные культуры клеток инкубировали при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 5 - 6 дней.

Все культуральные флаконы после заражения клеток ежедневно просматривали под малым увеличением микроскопа на наличие цитопатогенного действия. По истечению срока инкубации инфицированную культуру клеток замораживали при температуре минус $(40 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и оттаивали при комнатной температуре, для освобождения вируса.

Следующий пассаж выполняли аналогично описанному выше. Для адаптации вируса провели 15 пассажей в смешанной культуре клеток до появления характерного ЦПД. После этого было проведено еще 30 пассажей в данной культуре клеток.

Адаптацию в других системах культивирования проводили методом серийного пассирования вируса.

Характер и проявление ЦПД в разных культурах клеток был различен и зависел от системы культивирования. Так, в культуре клеток РК-13/2-03 (Рисунок 4 А) проявление ЦПД вируса было сходным с таковым при его репродукции в культуре клеток ПО (Рисунок 4 Г): через 48 ч после заражения здесь регистрировали формирование тяжей из веретенообразных клеток, а через 72 ч — округление и отслоение инфицированных клеток от подложки с лизисом и деструкцию клеточного монослоя. В инфицированной культуре

Vero (Рисунок 4 В) наблюдалось нарастающее округление клеток, формирование включений, не свойственных неинфицированным клеткам, с последующим лизисом и отслоением. Инфекционная активность вируса в этих культуральных системах также различалась (Таблица 2).

При инфицировании перевиваемых культур КЭЛ/07 и ЛЭО наблюдали аналогичные изменения, где на 2 и 3 сутки отмечали образование веретенообразных клеток и их округление (Рисунок 4 Б), вирус накапливался в титре $5,0-5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

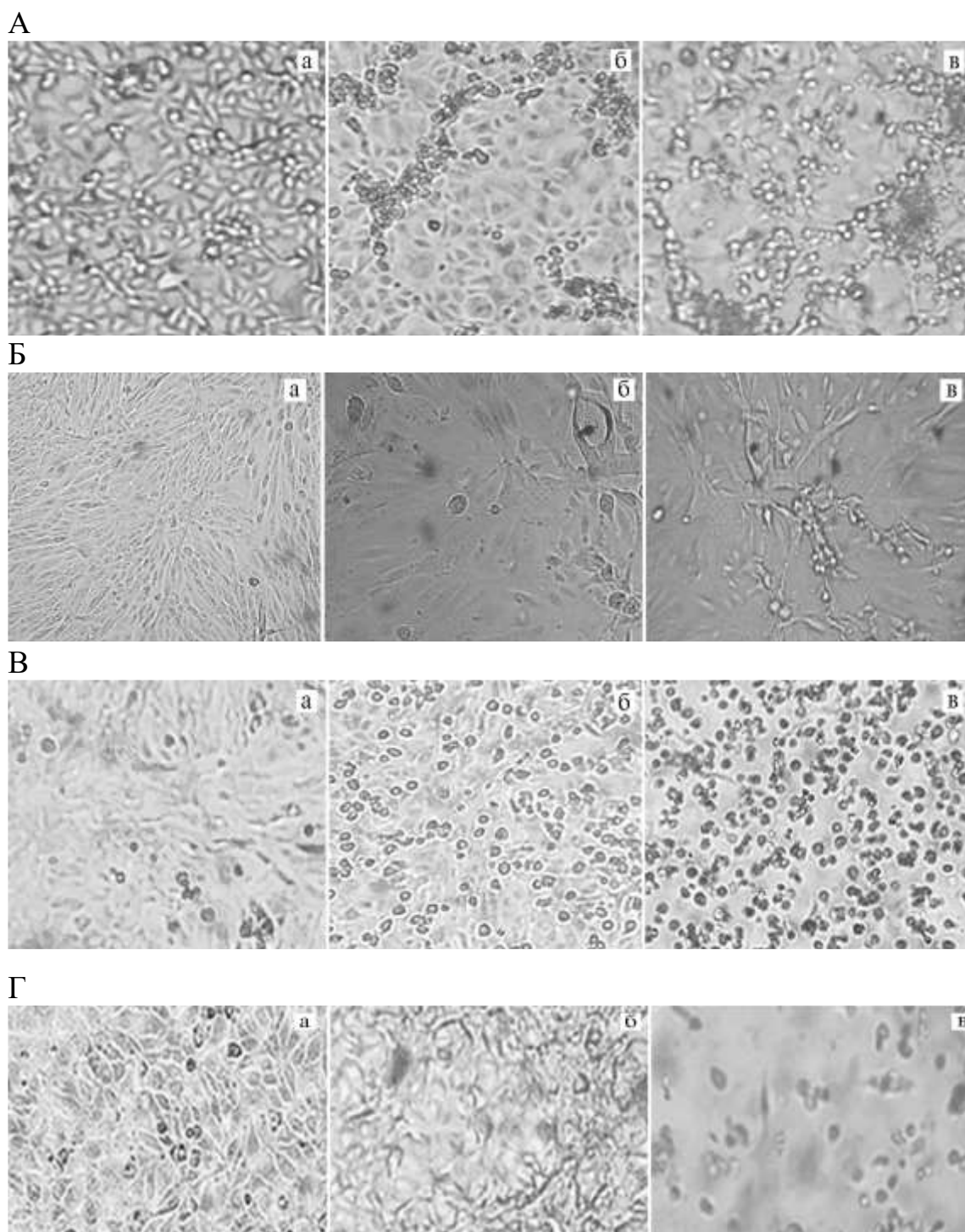


Рисунок 4 - Цитопатическое действие вируса ЗУД КРС в перевиваемых линиях клеток почки кролика РК-13/2-03 (А), кожи эмбриона лоса КЭЛ/07 (Б), почки африканской зеленой мартышки Vero (В), почки овцы ПО (Г): а — контрольная культура клеток, б, в — культура клеток на 2-е и 3-и сут (для клеток ПО — на 4-е сут) после заражения (увеличение $\times 150$, микроскоп Olympus СКХ31, Япония)

Таблица 2 - Инфекционная активность вируса ЗУД КРС в различных культурах клеток (n=3, M±m)

Культура клеток	Пассажи	Выявление ЦПД, ч	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³
Гомологичные культуры клеток			
МДВК	4-6	48	5,11 ±0, 36
КЭЛ/07	4-6	72	5,00±0, 35
ТК	4	120-144	3,92±0, 37
ПО	4	120	4,61±0, 07
	5-10	72-96	6,11±0, 13
	11	48	6,44±0, 07
ЛЭО	4-6	72	5,00±0, 35
Гетерологичные культуры клеток			
РК-13/2-03	4-7	48-72	5,23±0,35
VERO	4-9	48	5,03±0,20
CV-1	4-9	48-72	5,02±0,35

Из таблицы видно, что при культивировании вируса ЗУД в гомологичных культурах клеток МДВК и КЭЛ/07, ЛЭО на уровнях 4-6 пассажей время наступления ЦПД являлось 48-72 часа инфекционная активность составляла 5,11±0, 36 и 5,00±0, 35 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно.

В тоже время в первичной культуре клеток ТК, титр вируса был ниже на 1,0-1,5 lg ТЦД₅₀/см³ и достигал 3,92±0, 37 lg ТЦД₅₀/см³. В перевиваемой линии клеток ПО, начиная с 5 пассажа, наблюдали увеличение инфекционной активности до 6,11± 0,13 lg ТЦД₅₀/см³ и ярко выраженного ЦПД на 2 сутки культивирования характерного для вируса ЗУД КРС. Максимальное накопление вируса в данной культуре клеток составляло 6,44±0, 07 lg ТЦД₅₀/см³.

При адаптации к гетерологичным культурам клеток РК-13/2-03, Vero и CV-1, после проведения девяти пассажей, инфекционная активность вируса ЗУД КРС была примерно в равных диапазонах и равнялась 5,23±0,35 lg ТЦД₅₀/см³.

Таким образом, последовательное пассирование изолята вируса ЗУД КРС позволило адаптировать его гомологичным культурам клеток: МДВК,

ТК, КЭЛ, ЛЭО, ПО. Максимальное накопление вируса наблюдали в гомологичной культуре клеток ПО, титр составил $6,44 \pm 0,07 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а в гетерологичной РК-13/2-03 достигала $5,23 \pm 0,35 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Применяя метод смешанного культивирования, поспособствовало адаптации изолята вируса ЗУД КРС к перевиваемой культуре клеток РК-13/2-03 с инфекционной активностью $5,23 \pm 0,35 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Полученные данные показывают, что данный метод культивирования позволяет эффективно адаптировать вирус ЗУД КРС к гетерологичным культурам клеток.

Для дальнейшего изучения культуральных свойств вируса ЗУД КРС использовали из гомологичных культур культуру клеток ПО, а из гетерологичных Vero и РК-13/2-03, так как они имели высокое накопление вируса. Однако, гомологичные клеточные культуры ТК, КЭЛ/07, ЛЭО, MDBK, и гетерологичная культура CV-1 имели более низкий титр вируса по сравнению с культурами клеток ПО, Vero РК-13/2-03 и потому могут служить дублирующими системами для дальнейших исследований.

В перевиваемой культуре клеток ПО всего было проведено 60 последовательных пассажей. Во втором пассаже при культивировании вируса ЗУД КРС наблюдали незначительное округление клеток. Начиная с третьего последовательного пассажа, ЦПД вируса регистрировали на 5 сутки культивирования после заражения. Оно характеризовалось появлением веретенообразных клеток с последующим их лизисом и отслоением от подложки. Инфекционная активность составляла $4,61 \pm 0,07 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В течение последующих 5-10 серийных пассажей сроки наступления ЦПД сократились и наступало через 72-96 часов, а вирус стал накапливаться в титре $6,11 \pm 0,13 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. На уровне одиннадцатого пассажа, динамика развития ЦПД вируса была более интенсивной. Время появления ЦПД вируса составляла 48 часов с момента заражения клеток, титр вируса был равен $6,44 \pm 0,07 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В период с 11 до 15 последовательного пассажа характер ЦПД вируса не изменялся и проявлялся в виде округления клеток,

отслоения клеток от субстрата с последующей деструкцией. Инфекционная активность составляла $5,92 \pm 0,13 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Вирус культивировали в течении 5 суток после заражения. Начиная с 15 пассажа титр вируса варьировал в пределах $5,5-6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, и оставался в этом диапазоне до 60 пассажа, с ярко выраженным ЦПД через 48 часов после заражения, которое характеризовалось дегенеративными изменениями в клетках с образованием внутриклеточных включений.

В гетерологичных культурах клеток Vero и RK-13/2-03 начиная с 4 и до 40 последовательного пассажа, срок наступления ЦПД составлял 48-72 часа, максимальное накопление вируса в процессе пассирования в этих культурах клеток достигало $5,23 \pm 0,35 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

3.2.2.1 Нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ вируса ЗУД КРС

Для секвенирования были выбран ген *LSDV 011*, поскольку данный ген, кодирует белок GPCR хемокинового рецептора вируса ЗУД КРС и считается одним из основных молекулярных биомаркеров, применяемый для дифференциальной диагностики каприпоксвирусов: оспы овец, оспы коз и ЗУД КРС. Исследования проводили совместно с к.б.н. Усадовым Т.Р.

Поскольку ген *LSDV 011* имеет 1142 пар оснований (E. R. TULMAN, 2001г.), для более точного прочтения гена на секвинаторе GeneticAnalyzer 3130» (AppliedBiosystems, США) были использованы последовательности 2-х пар праймеров для амплификации фрагмента размером 1098 п.о. GPCR1f - 5'-ackcttagwacagtttagtagc-3', GPCR 1r - 5'-ttgagacaatccaaccacc-3' кодирующие 631 п.о.; GPCR 2f - 5'-tatgttttactttgttggtt-3'; GPCR 2r - 5'-ttatccratgctaatactac-3' кодирующие 649 п.о. [35].

При проведении секвенирования фрагмента гена *LSDV 011* штамма «Волгоградский» ДНК из двух последовательных пассажей вируса (15 и 60 пассажные уровни в клеточной линии ПО) нами были получены нуклеотидные последовательности и проведён их сравнительный анализ с сиквенсом изолята «Neethling», доступного в открытой базе данных

«GenBank». Анализ полученных нуклеотидных последовательностей не выявил никаких изменений и, таким образом, данные последовательности являлись идентичными.

Далее для построения филогенетического древа нами были использованы изоляты, взятые из базы «GenBank» и полученный нами штамм «Волгоградский» вируса ЗУД КРС.

Результат Филогенетического анализа штамма «Волгоградский» вируса ЗУД КРС, приведён на рисунке 5.

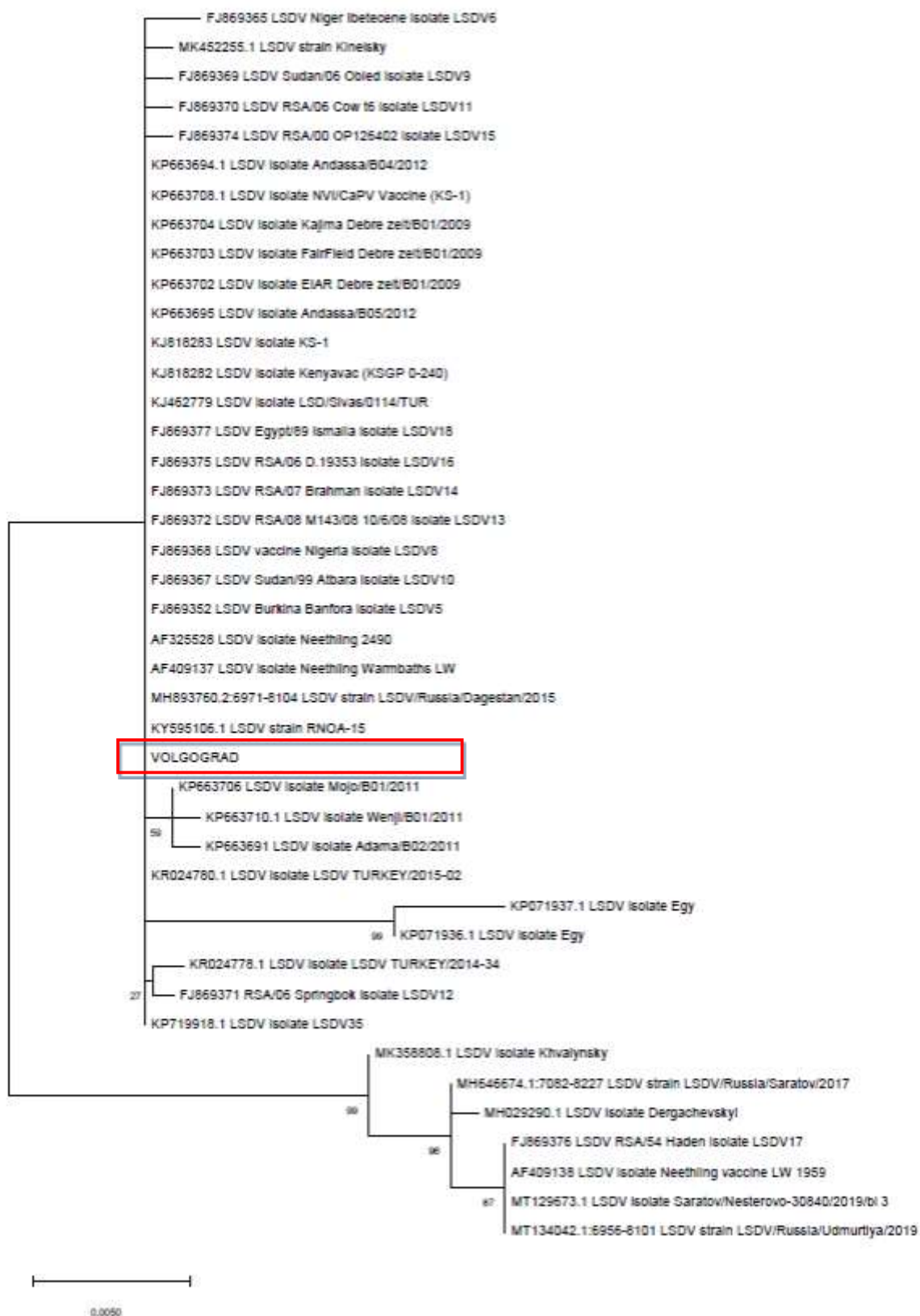


Рисунок 5 - Филогенетический анализ культурального штамма «Волгоградский» заразного узелкового дерматита, основанный на последовательности гена LSDV 011

Филогенетический анализ показал, что исследуемый штамм «Волгоградский» вошел в один кластер с 34 изолятами и штаммами вируса ЗУД КРС. На филогенетическом дереве, данный вирус располагается в одном кластере с вирулентными вирусами заразного узелкового дерматита, выделенными в Республике Северная Осетия и Республике Дагестан в 2015 году.

3.2.3 Оптимизация условий культивирования вируса ЗУД в перевиваемых линиях клеток

3.2.3.1 Определение оптимальной множественности заражения

С целью оптимизации условий культивирования вируса в перевиваемых линиях клеток Vero, RK-13/2-03 и ПО определяли оптимальную множественность заражения.

Культуры клеток инфицировали вирусом ЗУДа, разными дозами (0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001 ТЦД₅₀/кл). Для заражения использовали вирус ЗУДа КРС, прошедший 15 пассажей в культуре клеток ПО с инфекционной активностью 5,5 lg ТЦД₅₀/см³. Длительность культивирования зависела от проявления полной деструкции инфицированного клеточного монослоя. Заражение культуры клеток RK-13/2-03, Vero и ПО проводили со сменой ростовой питательной среды на поддерживающую. Культуру клеток инкубировали при температуре (37,0±0,5) °С до полной деструкции клеточного монослоя.

Результаты определения инфекционной активности вируса при различной множественности заражения культуры клеток представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Накопление вируса ЗУД (\lg ТЦД₅₀/см³) в перевиваемых культурах клеток в зависимости от множественности заражения ($n = 3, M \pm m$)

Множественность заражения (ТЦД ₅₀ /кл)					
Культура клеток	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001
	Титр вируса, \lg ТЦД ₅₀ /см ³				
ПО	4,50±0,21	5,0±0,19	5,5 ±0,00	5,0±0,15	4,30±0,04
РК-13/2-03	4,50±0,17	4,77±0,08	5,0±0,15	4,61±0,07	4,26±0,04
Vero	4,50±0,21	4,61±0,07	5,08±0,13	4,50±0,21	4,30±0,04

Результаты, представленные в таблице 3 показывают, что при множественности заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл. инфекционная активность в культурах клеток ПО и Vero составляла: $4,50 \pm 0,21$ ТЦД₅₀/см³, а в РК-13/2-03 $4,50 \pm 0,17$ ТЦД₅₀/см³ соответственно. При множественности заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл. в исследуемых клеточных системах вирус накапливался в ПО – $5,0 \pm 0,19 \lg$ ТЦД₅₀/см³, РК-13/2-03 – $4,77 \pm 0,08 \lg$ ТЦД₅₀/см³ и Vero – $4,61 \pm 0,07 \lg$ ТЦД₅₀/см³. При данных дозах ЦПД проявлялось через 48 часов инкубирования. После заражения в дозе 0,001 ТЦД₅₀/кл. регистрировали повышение титра вируса до $5,5 \pm 0,00 \lg$ ТЦД₅₀/см³ в культуре клеток ПО, а в культурах клеток Vero и РК-13/2-03 до $5,0 \pm 0,15$ и $5,08 \pm 0,13 \lg$ ТЦД₅₀/см³ соответственно. Кроме того, при использовании данной множественности заражения сокращалось время культивирования вируса на 1-2 суток. В дозах 0,0001 и 0,00001 ТЦД₅₀/кл. отмечалась медленная «работа вируса». Так, деструкция клеточного монослоя наступала через 9, 11 и 13 суток для культур клеток ПО, Vero, РК-13/2-03.

Таким образом, удалось установить, что оптимальными заражающими дозами для культивирования вируса ЗУД КРС в клеточных системах ПО, Vero и РК-13/2-03 являются 0,01-0,001 ТЦД₅₀/кл, при которых вирус накапливается в максимальных титрах 5,0– 5,5 \lg ТЦД₅₀/см³.

3.2.3.2 Влияние концентрации сыворотки крови на накопление вируса

Сыворотка представляет собой чрезвычайно сложную смесь мелких и крупных молекул, способных как вызывать, так и тормозить рост и репродукцию клеток.

Для оценки влияния содержания фетальной сыворотки КРС в поддерживающей среде на накопление вируса оценивали при концентрациях 2, 5 и 10 %, а так же возможность культивирования вируса без сыворотки.

Односуточные культуры клеток ПО и Vero инфицировали вирусосодержащей суспензией 15 пассажа с инфекционной активностью $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в дозе $0,001 \text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$. При 2, 5 и 10 % концентрациях сыворотки в инфицированных клетках ПО и Vero отмечали развитие характерных для вируса ЗУД цитопатических изменений на 3 – 7 сутки инкубации. Однако, несмотря на примерно равное, на конечных стадиях культивирования проявление цитопатического действия в инфицированной культуре, динамика развития ЦПД была более интенсивной в культуре клеток, культивируемой в присутствии 2 и 5 % фетальной сыворотки крови КРС.

Наибольшая инфекционная активность вируса была при добавлении 2-5 % сыворотки — в культурах клеток ПО – $5,41 \pm 0,11 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и Vero – $5,08 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. При культивировании этих инфицированных культур клеток ПО и Vero в среде без добавления сыворотки и с добавлением 10 % сыворотки титр вируса составлял $4,0 \pm 0,16 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $3,78 \pm 0,33 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Накопление вируса при добавлении 10 % сыворотки в культурах клеток ПО и Vero составляла $5,23 \pm 0,10 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $4,74 \pm 0,04 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (таблица 4).

Таблица 4 - Инфекционная активность вируса при различных концентрациях сыворотки крови в питательной среде (n = 3, M±m)

Линия клеток	Количество сыворотки, %	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³
ПО	0	4,0±0,16
Vero		3,78±0,33
ПО	2	5,33±0,33
Vero		5,08±0,09
ПО	5	5,41±0,11
Vero		5,08±0,09
ПО	10	5,23±0,10
Vero		4,74±0,04

Изучение влияния концентрации сыворотки крови в питательной среде на накопление вируса ЗУД показало, что содержание сыворотки крови в количестве 2 – 5 % является оптимальным при культивировании вируса ЗУД в перевиваемых линиях клеток ПО и Vero (таблица 4).

Таким образом, учитывая, что накопление вируса ЗУД при культивировании в этих культурах клеток с поддерживающей питательной средой без добавления сыворотки крови и с содержанием 10%, на 1,0 – 1,5 lg ТЦД₅₀/см³ ниже, чем при культивировании с 2-5% ее содержанием. Для дальнейшего культивирования с целью экономии и максимального накопления вируса ЗУД КРС использовали питательные среды с 2 % содержанием фетальной сыворотки КРС.

3.2.3.3 Влияние возраста культуры клеток на накопление вируса ЗУД

С целью оценки влияния возраста сформировавшегося монослоя клеток на репродукцию вируса ЗУД культуры клеток ПО и Vero инфицировали вирусосодержащей суспензией 15 пассажа с инфекционной активностью 5,5 lg ТЦД₅₀/см³ в дозе 0,001ТЦД₅₀/кл. в момент посева клеток (в суспензию), 24, 48 и 72 часовой монослой культуры клеток. Культуры готовили из одной

расплодки клеток, используя посевную концентрацию 100 – 150 тыс. кл/см³, выращивая в среде Игла – MEM, содержащей 10 % сыворотки крови КРС. Инкубировали при температуре (37±0,5) °С. Инфекционную активность вируса определяли титрованием в культуре клеток ПО. Результаты определения инфекционной активности вируса представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Влияние возраста культуры клеток на накопление вируса ЗУД (n = 3, M±m)

Культуры клеток	Характеристики репродукции вируса	Возраст культуры			
		Суспензия клеток	24 ч	48 ч	72 ч
ПО	Выявление ЦПД (сутки)	3 - 4	4 - 5	4 - 5	6 - 7
Vero	Длительность культивирования (сутки)	5 - 6	6 - 7	6 - 7	7 - 8
ПО	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³	4,74±0,04	5,08±0,09	5,50±0,21	4,50±0,21
Vero		4,50±0,21	4,74±0,04	5,08±0,09	4,00±0,15

Результаты, представленные в таблице 5 показывают, что динамика развития ЦПД в обеих культурах клеток была сходная. 24-48-часовой монослой как у культуры клеток ПО, так и у культуры клеток Vero был сформирован молодыми клетками, находящимися в логарифмической стадии роста, что благоприятно сказывалось на процесс репродукции вируса. ЦПД проявлялось дегенеративными изменениями в виде нарастающих округленных клеток с последующим лизисом и отслоением. Титр вируса в культуре клеток ПО составлял 5,08±0,09 и 5,50±0,21 lg ТЦД₅₀/см³, а в культуре клеток Vero 4,74±0,04 lg ТЦД₅₀/см³ и 5,08±0,09 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. При использовании культур клеток 72-часового выращивания ЦПД вируса было слабо выражено, накопление его было значительно ниже и приводило к снижению инфекционной активности вируса составляла в ПО 4,50±0,21 lg ТЦД₅₀/см³ и Vero 4,00±0,15 lg ТЦД₅₀/см³.

Как видно из приведенных данных в таблице 6 при температуре 4°C вирус ЗУД КРС сохранял устойчивость в течение 12 месяцев без снижения его исходной инфекционной активности. Начиная с 18 месяца с момента исследования регистрировали снижение титра на 0,5 lg ТЦД₅₀/см³. В период всего исследования (24 месяца) отмечали снижение исходной инфекционной активности на 1,5 lg ТЦД₅₀/см³.

Хранение вирусосодержащих суспензий при температуре минус 20±0,5 °С показало значительное снижение титра вируса. В течение 6 месяцев инфекционная активность уменьшилась на 0,5 lg ТЦД₅₀/см³, через 12 месяцев – на 1 lg ТЦД₅₀/см³, через 18 месяцев - на 1,5 lg ТЦД₅₀/см³, 24 месяцев снижение составило 2,83 lg ТЦД₅₀/см³.

Хранение вирусосодержащей суспензии при температуре минус 40±0,5 °С способствовало сохранению вируса без изменений его титра 5,5 lg ТЦД₅₀/см³ в течение 24 месяцев.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сохранность вируса ЗУД зависит от температуры хранения. Так при температуре при (2±2) °С вирус сохранял свою активность в течение 12 месяцев, при температуре минус 20±0,5 °С снижение инфекционной активности было значительной. Наиболее благоприятной температурой хранения вирусосодержащего материала была при температуре минус 40±0,5°C.

Таким образом, определены следующие оптимальные параметры культивирования вируса ЗУД КРС в перевиваемых линиях клеток гетерологичного и гомологичного происхождения ПО, Vero и РК-13/2-03: питательная среда Игла – МЕМ содержащая 2 - 5 % фетальной сыворотки КРС; множественность заражения 0,01 – 0,001 ТЦД₅₀/кл ; длительность выращивания 5 – 7 суток. При таких условиях культивирования вирус накапливался в них в титре 5,00 - 6,00 lg ТЦД₅₀/см³.

3.2.3.5 Выявление антигенов вируса заразного узелкового дерматита методом иммуноцитохимического анализа

С целью оценки специфичности проявляемого ЦПД вируса и сроков выявления антигенов вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота в перевиваемой перmissive культуре клеток проводили реакцию непрямого иммуноцитохимического анализа.

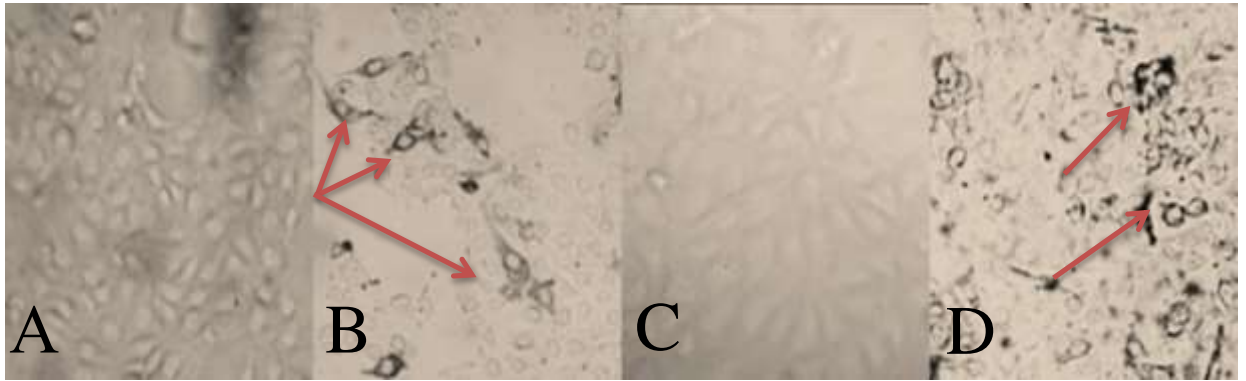
В работе использовали: стандартизованную специфическую гипериммунную сыворотку против оспы овец, с активностью в РН с вирусом ЗУД КРС в разведении 1:16; перевиваемую линию клеток почки овцы (ПО, ВНИИВВиМ) (катал. № 22.1).

Монослой клеток, культивируемых на 96-луночных планшетах, заражали вирусом ЗУД КРС в дозе 0,1 – 1,0 ТЦД₅₀/кл, оставляя лунки с клетками нечетных рядов интактными в качестве отрицательного контроля.

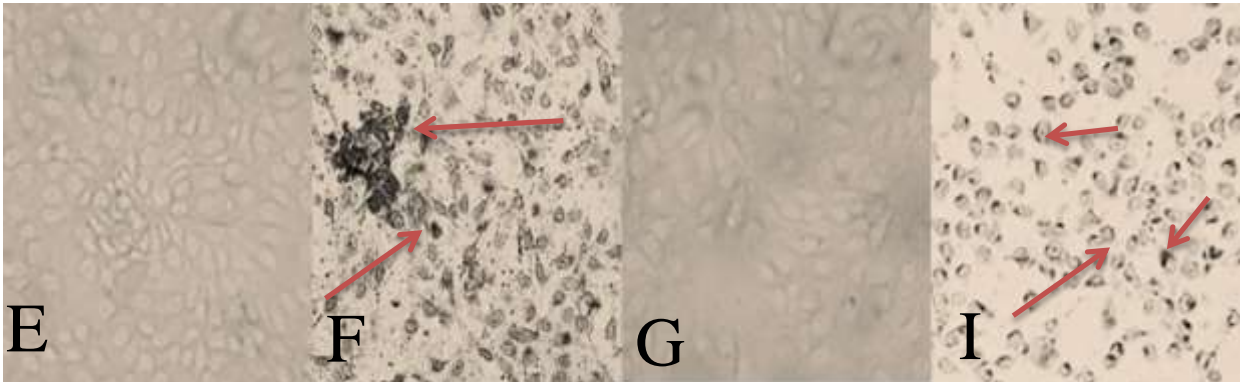
Динамику накопления антигенов вируса ЗУД КРС в процессе его культивирования изучали через 6, 12, 18, 24 и 36 ч инкубирования при температуре (37±0,5) °С, в атмосфере 95%-ной влажности и 5 % СО₂. Для этого клеточный монослой фиксировали согласно методическим рекомендациям [13].

Предварительные опыты по взаимодействию вируса ЗУД КРС с клеткой-хозяином позволили выявить характер цитопатического действия (ЦПД) возбудителя ЗУД КРС в культуре клеток ПО (ВНИИВВиМ). Цитопатический эффект проявлялся через 48 ч после заражения формированием тяжей из веретенообразных клеток, а спустя 72 ч – округлением и отслоением инфицированных клеток подложки с последующим лизисом и деструкцией клеточного монослоя.

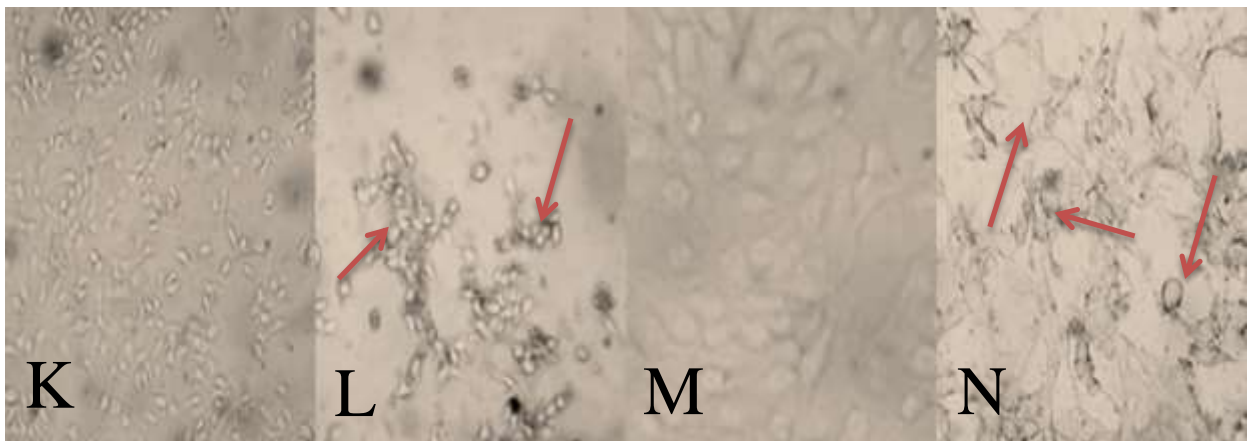
На рисунке 6 представлены антигены вируса ЗУД КРС в инфицированной перевиваемой культуре клеток ПО (ВНИИВВиМ), выявленные иммуноцитохимическим методом, в течение 36 ч культивирования.



10 – 12 ч культивирования инфицированной культуры клеток ПО (ВНИИВВиМ)



18 – 24 ч культивирования инфицированной культуры клеток ПО (ВНИИВВиМ)



36 ч культивирования инфицированной культуры клеток ПО (ВНИИВВиМ)

Рисунок 6 - Результаты выявления антигенов вируса ЗУД КРС методом иммуноцитохимического анализа (иммунопероксидазное окрашивание) в клетках перевиваемой линии ПО (ВНИИВВиМ) (B, D, F, I, L, N) при разных методах фиксации: A, B, E, F, K, L – 80%-ным раствором ацетона; C, D G, I, M, N – 0,05%-ным раствором глутарового альдегида; A, C, E, G, K, M – контрольные образцы с нормальной сывороткой; B, D, F, I, L, N – со специфической гипериммунной сывороткой; световая микроскопия (ув.×150); стрелками указаны специфически окрашенные клетки

Установлено, что сыворотка крови овец, содержащая антитела к вирусу оспы овец специфически взаимодействует с антигенами вируса ЗУД КРС (рис. 2 В, D, F, I, L, N) без фонового неспецифического связывания с клеточными антигенами. В местах взаимодействия антител специфической сыворотки с соответствующими антигенами вируса ЗУД КРС отмечается характерное специфическое красно- или желто-коричневое окрашивание цитоплазмы или клеточной мембраны инфицированных клеток, отсутствующее в препаратах с контрольной нормальной сывороткой и в интактной культуре клеток.

При исследовании окрашенных фиксированных препаратов через 0 – 6 ч культивирования специфического окрашивания клеток не регистрировали. Начиная с 10 – 12 ч после заражения, в зависимости от метода фиксации клеток отмечали специфическое окрашивание цитоплазмы или клеточной мембраны отдельных инфицированных клеток. Так, при фиксации 80%-ным раствором охлажденного ацетона наблюдали окрашивание цитоплазмы клеток (рис.5, В), а при фиксации 0,05%-ным глутаровым альдегидом – клеточных мембран (рис. 5, D) – мест локализации вирусных антигенов, накопления вирусных белков в цитоплазме и на мембране инфицированных клеток. Спустя 24 ч культивирования число специфически окрашенных клеток значительно увеличивалось (рис. 5, F, H). К этому времени выявляли и специфические очаги цитопатического действия вируса (рис. 5, E) с окрашенными в них клетками (рис. 5, F). Через 36 ч после заражения отмечали деструкцию монослоя (рис. 5, K, L, M, N), а специфический антиген вируса ЗУД КРС выявляли только в отдельных сохранившихся клетках (рис. 5, L, N). Препараты культуры клеток при дальнейшем культивировании не исследовали, ввиду проявления 80 – 90 % ЦПД вируса ЗУД КРС.

Таким образом, результаты, полученные с помощью иммуноцитохимического метода свидетельствуют о том, что выявляемое ЦПД является специфическим для вируса ЗУД, минимальное время раннего

выявления антигенов вируса ЗУД КРС в инфицированной перевиваемой линии культуры клеток ПО (ВНИИВВиМ) составляет 10 – 12 ч культивирования, что опережает развитие специфического ЦПД вируса при той же дозе заражения на 36 – 48 ч.

3.2.4 Изучение восприимчивости лабораторных животных к вирусу ЗУД КРС

С целью изучения восприимчивости лабораторных животных к вирусу заразного узелкового дерматита проводили заражение белых аутбредных мышей, сирийских хомяков, морских свинок и кроликов. Для заражения лабораторных животных использовали культуральный материал 15 пассажа в культуре клеток ПО (ВНИИВВиМ) с инфекционной активностью $5,5 \lg$ ТЦД₅₀/мл. Для каждого вида животных была контрольная группа, которым вводили предварительно инактивированный термообработкой ($65 \pm 0,5$) °С – 30 мин.) вирусосодержащий материал.

3.2.4.1 Изучение восприимчивости мышей к вирусу ЗУД КРС

Для изучения восприимчивости использовали аутбредных белых мышей весом 18-20 гр, из которых сформировали три группы.

Группа №1 состояла из 30 мышей. Животным вводили внутрикожно в две точки по 50 мкл и в две точки подкожно по 250 мкл культуральный вирусосодержащий материал с инфекционной активностью $5,5 \lg$ ТЦД₅₀/мл.

Группа №2 состояла из 30 мышей. Животным вводили интраназально по 200 мкл культуральный вирусосодержащий материал с инфекционной активностью $5,5 \lg$ ТЦД₅₀/мл.

Контрольная группа. Состояла из 20 мышей. Животным вирус не вводили.

Для индикации генома и серологических исследований у мышей брали пробы крови и сыворотки крови перед заражением и через 7, 14, 21 и 28 суток после заражения. Взятие проб крови и сыворотки у мышей всех групп проводили декапитацией животного. При каждом отборе проб в

первой и второй группе было использовано по 6 животных, а в контрольной группе по 4 животных. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7- Результат индикации генома и титра антител к вирусу ЗУД КРС у мышей.

№ группы	Способ заражения	Результат обнаружения генома вируса ЗУД/ Титра антител к вирусу ЗУД в пробах сыворотке крови*(сутки)									
		0		7		14		21		28	
		ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР	РН
1	в/к, п/к	-	-	3/6	-	4/6	1:8	-	1:8	-	1:8
2	и/н	-	-	3/6	-	6/6	1:16	3/6	1:16	-	1:8
Контрольная группа	в/к, п/к	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	и/н	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: * в/к – внутрикожно, п/к – подкожно, и/н- интраназально; «/» - числитель- количество животных, у которых выделен геном вируса в крови, знаменатель- количество животных в опыте; РН - реакция нейтрализации.

Результаты, представленные в таблице 7, показывают, что у всех животных, используемых в эксперименте, перед заражением, ДНК вируса выявлен не был, вируснейтрализующие антитела отсутствовали и при постановке ИФА коммерческим диагностическим набором IDVET антитела не выявляли.

После подкожной и внутрикожной инокуляции вирусосодержащего материала животным группы № 1, через 7 суток, геном вируса выявляли у трех из шести животных. На 14 сутки у четырех особей из шести, а на 21 и 28 сутки геном вируса не выявляли. Вируснейтрализующие антитела, у инфицированных животных, начинали выявлять с 14 суток в титре 1:8, на 21 и 28 сутки титр антител оставался на том же уровне и составлял 1:8. Полученные результаты также были подтверждены помощью метода ИФА на наличие антител против вируса ЗУД КРС.

У животных группы № 2, через 7 суток после интраназального введения вирусосодержащего материала, геном выявляли у трех из шести животных, на 14 сутки геном выявляли у всей опытной группы, на 21 сутки у трех из шести животных, а на 28 сутки геном выявлен не был. Вируснейтрализующие антитела, у инфицированных животных начинали выявлять с 14 суток в титре 1:16. На 21 и 28 сутки антитела выявляли 1:16 и 1:8 соответственно. Полученные результаты также были подтверждены помощью метода ИФА на наличие антител против вируса ЗУД КРС.

В течение всего срока наблюдения (28 суток) животных групп №1 и № 2 оставались клинически здоровыми. Состояние не отличалось от животных контрольной группы. При патологоанатомическом вскрытии у зараженных и контрольной группы мышей, поражения во внутренних органах не наблюдали, при исследовании образцов кожи, печени, лёгких и селезёнки методом ПЦР-РВ геном вируса ЗУД не выявили.

Полученные данные показывают, что белые аутбредные мыши не чувствительны к заражению вирусом ЗУД КРС.

3.2.4.2 Изучение восприимчивости морских свинок к вирусу ЗУД КРС

Морских свинок в количестве 8 голов заражали внутрикожно культуральным вирусосодержащим материалом с инфекционной активностью $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ в 4 точки по 250 мкл. Для индикации генома и серологических исследований у морских свинок брали пробы крови и сыворотки крови перед заражением и через 7, 14, 21 и 28 суток после заражения. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Результат индикации генома и титр антител к вирусу ЗУД КРС у морских свинок.

№ животного	Способ заражения	Результат обнаружения генома вируса ЗУД/ Титра антител к вирусу ЗУД в пробах сыворотке крови*(сутки)									
		0		7		14		21		28	
		ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР	РН
1	в/к	-	-	+	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16
2		-	-	+	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16
3		-	-	+	-	-	1:4	-	1:8	-	1:16
4		-	-	+	-	+	1:4	+	1:16	+	1:16
5		-	-	+	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16
6		-	-	+	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16
7		-	-	+	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16
8		-	-	+	-	+	1:4	+	1:8	+	1:8
Контроль		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: в/к – внутрикожно. «+» - положительно, «-» - отрицательно; РН - реакция нейтрализации.

Результаты, представленные в таблице 8, показывают, что у морских свинок, перед заражением геном вируса выявлен не был, вируснейтрализующие антитела также отсутствовали. На 7 сутки после заражения, геном выявляли у всех экспериментальных животных, на 14, 21 и 28 сутки после инфицирования геном был выявлен у семи из восьми особей, что составляло 75% от общего числа животных данной группы. Вируснейтрализующие антитела, у инфицированных животных начинали выявлять с 14 суток в титре 1:4, а на 21 и 28 сутки титр составлял 1:8-1:16 соответственно. Полученные результаты также были подтверждены помощью метода ИФА на наличие антител против вируса ЗУД.

После внутрикожной инокуляции вирусосодержащей суспензии морским свинкам, клинических признаков у животных не наблюдали. Однако при вскрытии на 28 сутки после заражения патологоанатомические изменения были обнаружены в легких трех животных. Легкие были кровенаполнены с кровоизлияниями на разрезе (Рисунок 7), при этом у

контрольной группы животных изменения во внутренних органах не наблюдали. При исследовании методом ПЦР-РВ 10% суспензий внутренних органов (печени, легких, селезенки) геном вируса выявляли в легких у всех животных. В других органах геном не обнаружен.

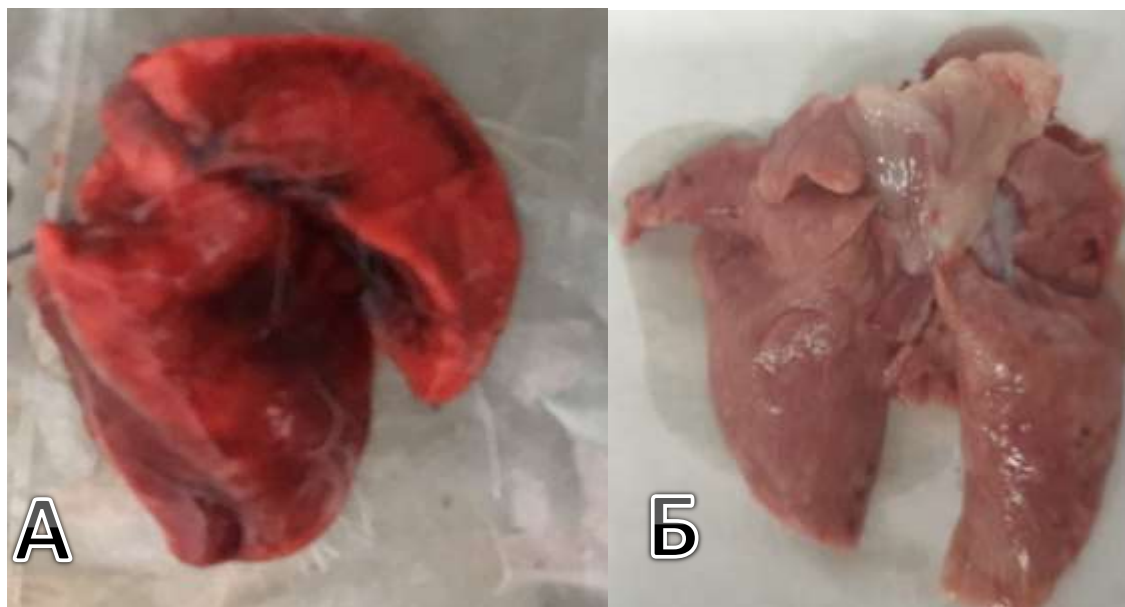


Рисунок 7 - А - Пораженные легкие морской свинки. В - Легкие интактной морской свинки

Полученные данные показывают, что вирус ЗУД КРС репродуцируется в легких морских свинок.

3.2.4.3 Изучение восприимчивости сирийских хомячков к вирусу ЗУД КРС

Учитывая исследования Кабанова А.С. с соавторами, в которых были установлены модельные биосистемы (степные сурки вида Байбак) для исследования в отношении ортопоксвирусов [21], для нас представляло интерес изучить восприимчивость к вирусу ЗУД сирийских хомячков.

Сирийских хомячков в количестве восьми голов заражали культуральным вирусосодержащим материалом с инфекционной активностью $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ внутрикожно в 4 точки по 250 мкл. Для индикации генома вируса ЗУД КРС и серологических исследований у животных проводили отбор проб крови и сывороток крови перед заражением и через 7, 14, 21 и 28 суток после заражения. Результаты исследований в таблице 9.

Таблица 9- Результат индикации генома и титр антител к вирусу ЗУД КРС у сирийских хомячков

№ группы	Способ заражения	Результат обнаружения генома вируса ЗУД/ Титра антител к вирусу ЗУД в пробах сыворотке крови (сутки)									
		0		7		14		21		28	
		ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР	РН
1	в/к	-	-	8/8	-	8/8	1:8 - 1:32	6/6	1:8 – 1:16	4/6	1:4 - 1:8
Контроль		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: в/к – внутривенно; «/» - числитель - количество животных, у которых выделен геном вируса в крови, знаменатель - количество животных в опыте; РН - реакция нейтрализации.

Результаты, представленные в таблице 9, показывают, что геном вируса ЗУД КРС в крови хомячков, отобранных перед заражением, выявлен не был. На 7, 14, 21 сутки, его выявляли у всех животных, а на 28 сутки у 6 из 8 особей. Вируснейтрализующие антитела, у инфицированных животных начинали выявлять с 14 суток в титрах 1:8 – 1:32, к 21 и 28 суткам титр составлял 1:8-1:16 соответственно. Полученные результаты также были подтверждены помощью метода ИФА на наличие антител против вируса ЗУД. У контрольной группы животных перед заражением и в течение 7, 14, 21 и 28 суток геном вируса ЗУД КРС и вируснейтрализующих антител выявлено не было. Животные, на коже которых отмечены поражения, подвергались эвтаназии для отбора проб кожи.

При визуальном клиническом осмотре у 2 сирийских хомячков белого окраса (альбиносов) на 10 сутки на коже наблюдали образование узелков размером 0,5 см (Рисунок 8). При патологоанатомическом вскрытии видимых изменений во внутренних органах не регистрировали. В это же время у контрольной группы образование кожных узелков не отмечали.



Рисунок 8 - Узелок у хомяка-альбиноса

Из отобранных узелков, полученных на 10 и 14 сутки, готовили 10 % суспензии и исследовали на наличие в них генома вируса ЗУД и проводили выделение вируса в перевиваемой культуре клеток ПО. Начиная, со 2 суток после заражения в клеточном монослое наблюдали цитопатические изменения, характерные для вируса ЗУД КРС в виде образования тяжей, на 5 сутки отмечали округление клеток с последующей деструкцией монослоя (Рисунок 9). Наличие генома в культуральной суспензии подтверждено методом ПЦР-РВ. Идентификацию вируса подтверждали в реакции нейтрализации со специфической сывороткой против оспы овец, где индекс нейтрализации составил 2,5.

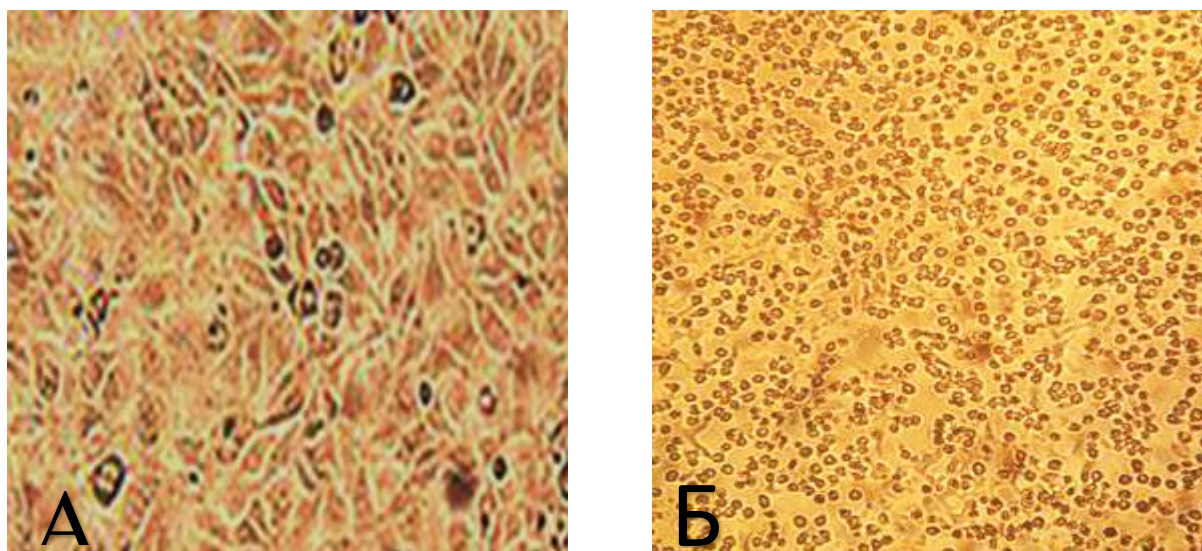


Рисунок 9 - Цитопатический эффект вируса ЗУД в перевиваемой линии клеток ПО (А, Б). А- контрольная культура клеток, Б- на 5 сутки заражения. Световая микроскопия. (Увел. $\times 150$)

3.2.4.4 Изучение восприимчивость кроликов к вирусу ЗУД КРС

Для изучения восприимчивости кроликов использовали 8 особей. Инфицирование осуществляли двумя способами одновременно внутрикожно в 2 точки по 250 мкл и внутривенно 500 мкл культуральным вирусосодержащим материалом с инфекционной активностью $5,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Контрольная группа включала в себя два кролика, которым вводили инактивированный материал. Для выделения генома вируса ЗУД КРС методом ПЦР-РВ и постановке реакции нейтрализации у кроликов проводили отбор проб крови и сывороток крови, перед заражением и через 7, 14, 21 и 28 суток после заражения. Результаты по выявлению генома вируса и вируснейтрализующих антител представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Результат индикации генома и титр антител к вирусу ЗУД КРС у кроликов

№ животного	Способ заражения	Результат обнаружения генома вируса ЗУД/ Титра антител к вирусу ЗУД в пробах сыворотке крови*(сутки)								
		0		7		14		21		28
		ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР	РН	ПЦР
1	в/к, в/в	-	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16	+
2		-	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16	+
3		-	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16	+
4		-	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16	+
5		-	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16	+
6		-	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16	+
7		-	-	+	1:4	+	1:8	+	1:16	+
8		-	-	+	1:4	-	1:16	-	1:16	-
Контроль		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: в/к – внутрикожно, в/в – внутривенно, «+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат.

Результаты, представленные в таблице 10, показывают, что ДНК возбудителя вируса ЗУД КРС в крови кроликов, отобранных перед заражением, выявлено не было, вируснейтрализующие антитела отсутствовали. На 7 сутки геном вируса выявляли у всех животных, однако, на 14, 21 и на 28 сутки исследования у семи из восьми особей. Вируснейтрализующие антитела обнаруживали начиная с 14 суток после заражения в титре 1:4, на 21 сутки их титр возрастал и составил 1:8-1:16 на 21 и 28 сутки соответственно. Полученные результаты также были подтверждены с помощью метода ИФА на наличие антител против вируса ЗУД.

При визуальном клиническом осмотре у инфицированных животных на 4 сутки в месте инокуляции было отмечено образование кожных узелков диаметром 2,0 – 2,5 см. (Рисунок 10), которые рассасывались через 8-9 суток после заражения кроликов. Для определения специфичности поражений из образовавшихся на коже узелков готовили 10% суспензии и исследовали

методом ПЦР-РВ на наличие в ней генома вируса ЗУД КРС и проводили выделение вируса в перевиваемой культуре клеток ПО.



Рисунок 10 - Узелок на коже кролика, инфицированного вирусом ЗУД (А) и отобранный образец (Б)

Результаты ПЦР показали наличие генома в суспензии, приготовленной из пораженной кожи. Также был выделен вирус в перевиваемой культуре клеток ПО. Наличие генома в культуральной суспензии подтверждено методом ПЦР-РВ. Дополнительно идентификацию, выделенного из пораженной кожи кролика, вируса проводили в реакции нейтрализации со специфической сывороткой против оспы овец. Индекс нейтрализации составил 2,5.

При введении инактивированного материала интактным кроликам, в месте введения поражений не отмечали. На 6-7 сутки производили отбор проб кожи кроликов, геном методом ПЦР-РВ выявлен не был.

При патологоанатомическом вскрытии зараженных и интактных кроликов видимые поражения внутренних органов отсутствовали, при исследовании внутренних органов (печень, лёгкие, селезёнка) на наличие генома ЗУД КРС методом ПЦР-РВ, были получены отрицательные результаты.

Так как была показана специфичность поражений, вызываемых вирусом ЗУД КРС у кроликов, следующим этапом, нашей работы было

изучение возможности получения адаптированного к кроликам штамма вируса ЗУД КРС. Для этого были проведены серии пассажей на животных.

- 1 пассаж. Кроликам внутрикожно (в 2 точки по 250 мкл) и внутривенно (в ушную вену по 500 мкл) вводили культуральный вирусосодержащим материалом с инфекционной активностью $5,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$.

- 2 и последующие пассажи. Животным внутрикожно и внутривенно вводили 10% суспензию, полученную из участков пораженной кожи животных от предыдущего пассажа.

При проведении пассажей использовали по 4 опытных и 4 контрольных кролика.

При проведении 1 пассажа у всех зараженных животных на 4 сутки после введения в месте инокуляции отмечали образование кожных узелков диаметром 2,0 – 2,5 см (Рисунок 10). По два кролика из опытной и контрольной групп умертвляли, из пораженных участков кожи готовили 10% суспензию и исследовали на наличие генома, и проводили выделение вируса в перевиваемой линии клеток почки овцы (ПО). Два зараженных кролика с образовавшимся кожными узелками оставляли для наблюдения за развитием патологического процесса (28 суток срок наблюдения).

У опытной группы в полученной суспензии выявляли геном вируса, который был в последующем выделен в культуре клеток ПО. Наличие генома в культуральной суспензии подтверждено ПЦР-РВ. При исследовании образцов, полученных от контрольной группы, геном методом ПЦР-РВ выявлен не был.



Рисунок 11 - Макроскопические изменения кожи кроликов при проведении 1 пассажа. Стрелками указаны узелки на коже кроликов, инфицированных вирусом ЗУД КРС

При проведении 2 пассажа животным вводили внутрикожно и внутривенно 10% суспензию 1 пассажа. Начиная, с 4 суток у кроликов на местах введения отмечали образование кожных узелков в размере 2,0-2,5 см. В апикальной части утолщения наблюдали начальный процесс изъязвления кожного покрова с выделением экссудата (Рисунок 12). По две особи из каждой группы умертвляли и проводили отбор проб пораженных участков для приготовления суспензии. Затем из полученной взвеси осуществляли 3 пассаж на животных, где, на 4 сутки регистрировали формирование кожных узелков размером до 1 см (Рисунок 13), полученные образцы при исследовании методом ПЦР-РВ были положительны.

При проведении 4 пассажа, у инфицированных кроликов не наблюдали поражений кожи в месте введения материала (Рисунок 14). Через 6 суток после заражения 2 животных из опытной и контрольной группы вывели из опыта и отобрали пробы кожи в местах введения 10 % суспензией 3 пассажа. При постановке ПЦР-РВ все исследуемые образцы дали отрицательный результат.

Обобщенные данные динамики проявления кожных поражений у кроликов на разных пассажных уровнях представлены в таблице 11.

Таблица 11- Динамика проявления кожных поражений у кроликов

№ пассажа	Инкубационный период (сутки)	Длительность клинической картины (сутки)	Размер нодул, см
1 пассаж	4	4-5	2.0-2,5
2 пассаж	4	4-5	1.5-2.0
3 пассаж	4	2	До 1.0
4 пассаж	-	-	-



Рисунок 12- Макроскопические изменения кожи кроликов при проведении 2 пассажа. Стрелками указаны узелки на коже кроликов, инфицированных вирусом ЗУД.



Рисунок 13 - Макроскопические изменения кожи кроликов при проведении 3 пассажа. Стрелкой указаны узелки на коже кроликов, инфицированных вирусом ЗУД.



Рисунок 14 - Кожи кроликов в месте введения при проведении 4 пассажа.

Результаты, представленные в таблице 12, показывают, что с момента инфицирования до проявления клинических признаков (образование кожных узелков) составляло 4 суток. Образовавшиеся узелки имели розоватый цвет, в зависимости от пассажа имели разные размеры. При проведении первого и второго пассажа 2,0-2,5 см в то время как на третьем – 0,5-1,0 см. При наблюдении за животными отмечали сохранение нодул в течении 4-5 суток на первом и втором пассаже и 2 суток на третьем пассаже. По истечению этих сроков узелки рассасывались. На месте рассосавшихся узелков не регистрировали следы поражения. При осмотре животных, других видимых клинических признаков заболевания не наблюдали. При патологоанатомическом вскрытии зараженных и интактных кроликов видимые поражения внутренних органов отсутствовали, при исследовании на наличие генома ЗУД в паренхиматозных органах (лёгкие, печень, селезёнка, почки), были получены отрицательные результаты. При исследовании образцов кожи кроликов из контрольной группы не было выявлено патологических изменений.

При введении инактивированного материала интактным кроликам, в месте его введения поражений не отмечали. На 6-7 сутки производили отбор проб кожи кроликов, геном вируса ЗУД КРС методом ПЦР-РВ выявлен не был.

Данные по индикации генома вируса ЗУД КРС в суспензии из кожных поражений у экспериментально инфицированных кроликов представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Выявление генома вируса ЗУД КРС в суспензии из кожных поражений у экспериментально инфицированных кроликов

Пассаж	Кролик № 1		Кролик № 2		Кролик № 3		Кролик № 4	
	Результат ПЦР	ст	Результат ПЦР	ст	Результат ПЦР	ст	Результат ПЦР	ст
I	Положит.	24,8	Положит.	23,1	Положит.	23,8	Положит.	24,5
II	Положит.	35,3	Положит.	35,0	Положит.	34,6	Положит.	35,7
III	Положит.	37,8	Положит.	37,7	Отриц.	-	Положит.	37,2
IV	Отриц.	-	Отриц.	-	Отриц.	-	Отриц.	-

В ходе проведённых исследований геном вируса ЗУД КРС выявляли в суспензии кожных узелков у экспериментально зараженных кроликов на уровне 1-3 пассажей. При этом с каждым следующим пассажем геном вируса выявлялся на более поздних циклах, что свидетельствует об уменьшении количества вируса в исследуемых образцах при пассировании. На уровне 4 пассажа узелки в месте введения материала не образовывались и геном вируса ЗУД КРС выявлен не был.

Таким образом, в результате проведенных исследований по изучению восприимчивости лабораторных животных к вирусу ЗУД КРС было установлено, проявления клинических признаков болезни, характерных для ЗУД КРС (появление кожных узелков), наблюдали только у кроликов на 4 сутки и у сирийских хомяков альбиносов на 10 сутки после инфицирования. В крови инфицированных животных обнаруживали вирусный геном с 7 суток после заражения, а так же в сыворотках крови присутствуют вируснейтрализующие антитела, которые начинали выявлять с 14 суток.

Полученные данные при заражении, кроликов и сирийских хомяков альбиносов показывают, что вирус ЗУД репродуцируется в организме этих животных с проявлением клинических признаков и формированием

иммунного ответа. Это указывает, на то, что виды этих животных могут играть определенную роль в поддержании эпизоотического процесса.

3.2.5 Гистология и гистохимический анализ для выявления антигена вируса заразного узелкового дерматита

Для изучения гистологических изменений в тканях у кроликов, инфицированных вирусом ЗУД, а также локализации антигена вируса ЗУД в поврежденных клетках кожи животных использовали иммуногистохимический анализ.

При макрокартине у инфицированных кроликов на 4 сутки в месте инокуляции было выявлено локальное, утолщение кожного покрова диаметром 1,0 – 1,5см, выступающее над поверхностью кожи (Рисунок 15). В апикальной части утолщения наблюдали начальный процесс изъязвления кожного покрова с выделением экссудата.



Рисунок 15 - Макроскопические изменения кожи кролика экспериментальной группы. Стрелкой указан узелок на коже кроликов, инфицированных вирусом ЗУД

При введении инактивированного материала интактным кроликам, в месте его введения поражений не выявлено. При патологоанатомическом вскрытии на 6-7 сутки зараженных и интактных кроликов видимые поражения внутренних органов отсутствовали, при исследовании

паренхиматозных органов (печень, лёгкие, селезёнка) на наличие генома ЗУД методом ПЦР-РВ, были получены отрицательные результаты.

Отобранный некротический материал в виде кожных узелков животных, был тщательно обследован. В приготовленной из узелков 10% суспензии в физиологическом растворе методом ПЦР-РВ был выявлен геном вируса.

При гистологическом исследовании образцов кожи кроликов из контрольной группы не было выявлено патологических изменений, слои кожи были с четкими границами, кровеносные сосуды с умеренным наполнением, гистоархитектоника сохранена.

В коже инфицированных животных в верхних слоях сосочкового слоя наблюдали маляцию эпидермиса и лизис клеток крови. Кровеносные сосуды запустевшие, выявлен отек стенки артерии. В просвете вены регистрировали однородное оксифильное содержимое (плазма крови), ее стенка была истончена. Подкожная клетчатка (Рисунок 16) находилась в состоянии воспаления, что характеризовалось инфильтрацией лимфоидными клетками, в нервном стволе кожи выявлен отек и геморрагии, десквамация интимы в просвете вены.

Данные признаки свидетельствуют о развитии патологического процесса в слоях кожи кролика, аналогичные изменения в тканях кожи также наблюдают у животных, инфицированных оспой овец и коз и у КРС, инфицированного вирусом ЗУД [68].

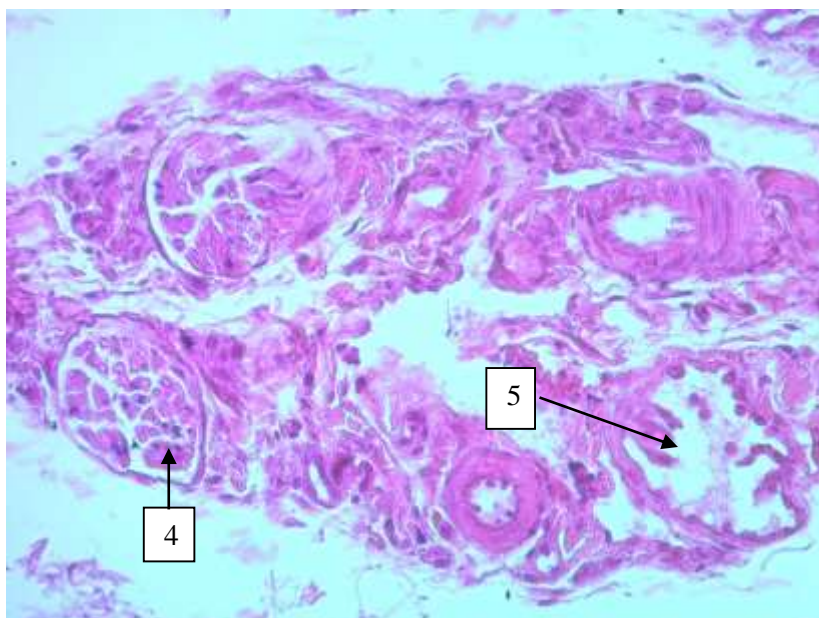
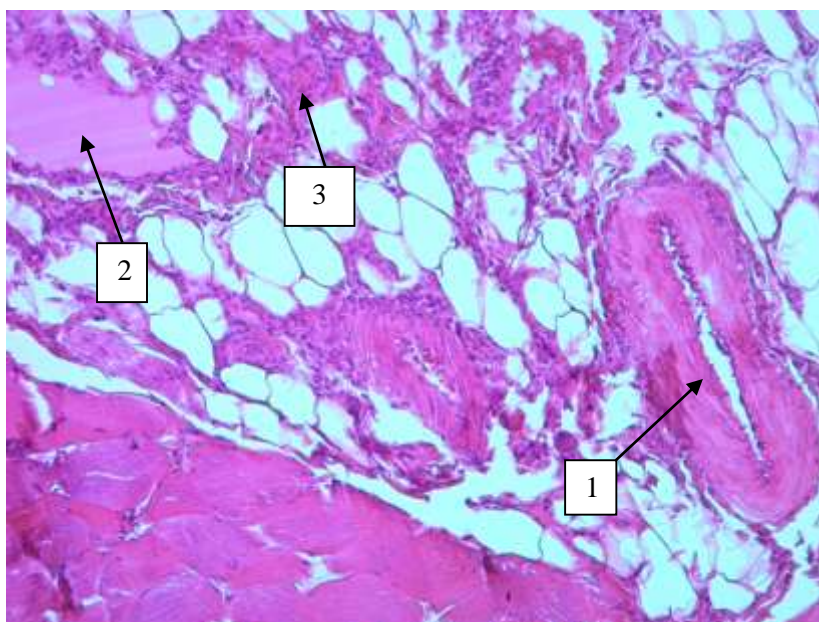


Рисунок 16 – Подкожные структуры: 1 артерия; 2 вена; 3 лимфоидная инфильтрация; 4 отек и гемморагии в нервном стволе кожи; 5 десквамация интимы в просвет вены. Окраска гематоксилин-эозин. Световая микроскопия (Увел. $\times 150$)

Для визуальной оценки мест локализации вирусного антигена в клетках ткани при инфицировании кроликов вирусом ЗУД КРС использовали иммуногистохимический метод исследования. На рисунке 17 представлены гистологические срезы с выполненной ИГХ реакцией: положительно

реагирующий участок (А) и контрольный срез (Б). При выполнении ИГХ реакции использовали концентрацию первичных антител 1:20, в результате было выявлено положительное окрашивание метки антивидовых антител в образцах кожи экспериментальных животных, что свидетельствовало о наличии антигена вируса ЗУД КРС в инфицированной ткани кроликов.

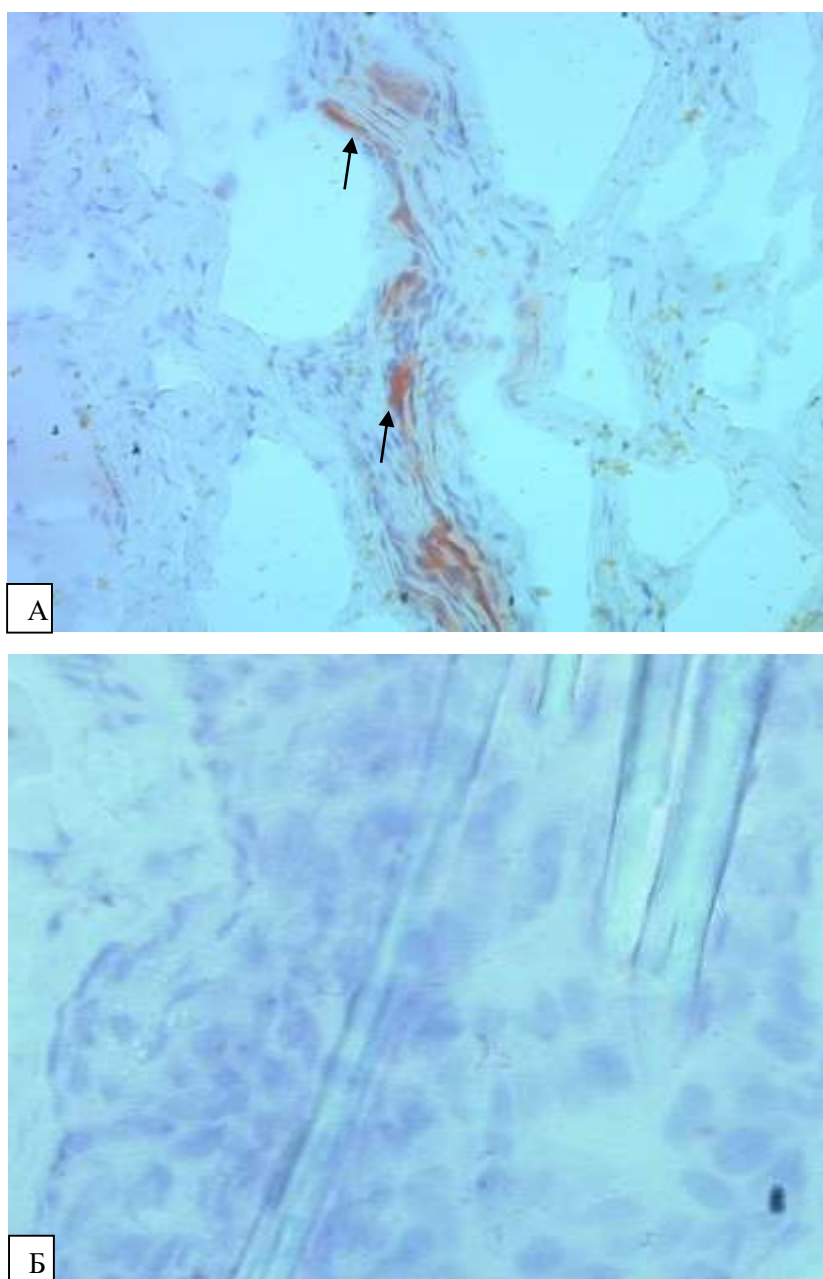


Рисунок 17 - Положительная, непрямая ИГХ реакция (стрелки) - А, ув.200; Б - отрицательная ИГХ реакция, контрольный срез кожи. Световая микроскопия (Увел. $\times 400$). Докраска ядер гематоксилином Майера

Таким образом, в данном исследовании показаны и описаны гистопатологические поражения кожи у кроликов, локализация антигена ЗУД КРС в пораженных узелках, используя иммуногистохимический метод. Дегенерация эпидермального и придаточного эпителия с васкулитом и наличие нескольких внутрицитоплазматических включений были наиболее характерными патологическими повреждениями. Отличительным признаком являлось наличие очаговых твердых кожных изменений (узелков), типичных для ЗУД КРС. Таким образом, расширили описания морфологических изменений, о которых сообщают в своих трудах ряд других авторов. Так, M.S. El-Neweshy и др., используя гистохимический метод, представил локализацию вируса в тканях у естественно заразившегося скота вирусом ЗУД КРС [72]. Nikola Vaskovic с соавторами проводили аналогичные исследования, где были показаны и описаны микроскопические цитопатологии кожи КРС с применением гистохимического окрашивания [102].

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота - новая для РФ болезнь, возникшая на территории страны в 2015 года. Широкое распространение ЗУД КРС на территории РФ и угроза заноса инфекции в другие регионы является основанием для детального изучения свойств возбудителя ЗУД КРС.

Несмотря на то, что смертность при вспышках ЗУД составляет не более 10%, это заболевание влечёт за собой серьёзный экономический ущерб. На данный момент не существует специфического лечения от ЗУД КРС, поэтому основными методами борьбы с заболеванием являются вакцинопрофилактика, своевременная диагностика и принятие карантинных мер.

Разработка эффективных профилактических и диагностических препаратов при вирусных болезнях зависит от качества вирусосодержащего материала, который, как правило, получают в высокопродуктивных клеточных системах с использованием эффективных методов выращивания вирусов. Все диагностические методы разработаны таким образом, что результат зависит от концентрации вируса и качества, собранных образцов во время вспышек. Отобранные образцы требуют предварительного накопления вируса в лаборатории путем заражения чувствительных культур клеток.

В связи с этим целью нашей работы явилось изучение биологических свойств вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота, адаптированного к перевиваемым культурам клеток.

Для выделения и культивирования вируса ЗУД используют первичные и перевиваемые линии клеток. Вирус ЗУД может также размножаться в культуре клеток текстикул и надпочечников ягненка и теленка, почек овцы, эмбриональных тканей почки и кожи кролика. Перспективными для культивирования вируса ЗУД являются перевиваемые линии клеток, обеспечивающие получение однородного вирусосодержащего материала, который применяется при изучении биологических, молекулярно-

генетических свойств вируса, а также при разработке средств диагностики и специфической профилактики.

Применение перевиваемых линий клеток для накопления вирусной биомассы создает благоприятные условия для оптимизации и стандартизации методов исследований. Анализ литературных данных показывает, что вирус ЗУД КРС можно культивировать на большом разнообразии культур клеток животного происхождения.

В процессе научно-исследовательской работы был получен изолят вируса ЗУД КРС, выделенный в 2016 г. от больных коров, на территории Волгоградской области. Полученный штамм «Волгоградский» депонирован в Коллекцию штаммов микроорганизмов «ФГБУНУ ФИЦВиМ».

В ходе проведения комиссионных испытаний были изучены биологических свойств штамма «Волгоградский»: отсутствие контаминации бактериями, грибами и микоплазмами (микробиологическими методами); отсутствие контаминации посторонними вирусами и микоплазмами (методом ПЦР); биологическая активность и стабильность штамма при репродукции в культуре клеток ПО; идентификация и филогенетическое родство штамма «Волгоградский» (методом ПЦР).

В дальнейшем были проведены исследования для более подробного изучения биологических свойств вируса ЗУД.

На первом этапе нами проведен анализ чувствительности различных клеточных систем к вирусу ЗУД КРС штамма «Волгоградский». При исследовании спектра клеточных культур к вирусу заразного узелкового дерматита были чувствительны перевиваемые клеточные линии как гомологичного, так и гетерологичного происхождения. Из ряда гомологичных культур клеток чувствительными оказались MDBK, КЭЛ/07, ТК, ЛЭО, ПО, где титр вируса составлял $5,11 \pm 0,36 \text{ lgTЦД}_{50}/\text{cm}^3$, $5,00 \pm 0,35 \text{ lgTЦД}_{50}/\text{cm}^3$, $3,92 \pm 0,37 \text{ lgTЦД}_{50}/\text{cm}^3$, $5,00 \pm 0,35 \text{ lgTЦД}_{50}/\text{cm}^3$, соответственно. Из спектра гетерологичных культур клеток наиболее

чувствительными оказались культуры клеток РК-13/2-03, Vero, CV-1, где титр вируса составлял $5,00-5,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Однако, для дальнейшего изучения культуральных свойств вируса ЗУД КРС штамм «Волгоградский» использовали культуры клеток ПО и Vero, так как они имели самый высокий и стабильный титр в пассажах.

Последующий этап работы был посвящен оптимизации условий культивирования в перевиваемых линиях клеток. С этой целью нами проведен подбор оптимальных параметров и способов культивирования вируса ЗУД КРС. Известно, что накопление вируса в культуре зависит от множественности заражения, которая главным образом влияет на продолжительность накопления вируса. Нами было отмечено, что при изменении множественности заражения с $0,01-0,001 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл.}$ титр вируса увеличивался на $-1-1,5 \lg \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. При уменьшении множественности наблюдалось снижение инфекционной активности. Таким образом, определено, что максимальная активность вируса ЗУД КРС составляла в культурах клеток ПО и Vero $5,0-6,0 \lg \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а в клетках РК-13/2-03 — $5,5 \lg \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Значительное влияние на накопление вируса в культурах клеток оказывает процентное содержание сыворотки крови в среде для его культивирования. Сыворотка представляет собой чрезвычайно сложную смесь мелких и крупных молекул, способных как вызывать, так и тормозить рост и репродукцию клеток. Изучение влияния сыворотки крови на накопление вируса ЗУД показало, что количество сыворотки в среде (2 – 5 %) является оптимальным при накоплении вируса ЗУД в перевиваемых линиях клеток ПО и Vero. Учитывая, что накопление вируса ЗУД при культивировании в этих культурах клеток с бессывороточной поддерживающей средой на $0,5-1,0 \lg \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ниже, вирус в дальнейшем культивировали с использованием среды с содержанием 2 % фетальной сыворотки КРС.

На репродукцию вируса оказывает большое влияние возраст культуры клеток. Из проведенных опытов было установлено, что в 24-48-часовой монослойной культуре клеток ПО и Vero, вирус накапливался в максимальном титре $5,08 \pm 0,09$ и $5,50 \pm 0,21$ lg ТЦД₅₀/см³, и $4,74 \pm 0,04$ lg ТЦД₅₀/см³ и $5,08 \pm 0,09$ lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. Полученные результаты свидетельствуют, что с увеличением возраста культуры клеток происходит снижение накопления вируса ЗУД. Это объясняется тем, что формирование клеток, в логарифмической стадии роста, плодотворно оказывало влияние на процесс репродукции вируса.

В большой степени, оказывающее воздействие на устойчивость вирусов - роль температурного режима. Для изучения устойчивости вируса к воздействию температуры различных значений, приготовленные партии вирусосодержащих суспензий хранили при температурах 4 °С, минус 20 °С и минус 40 °С. Было установлено, что при температуре при 4 °С вирус сохранял свою активность в течении 12 месяцев, при температуре минус 20 °С снижение биологической активности было значительным. Наиболее благоприятной температурой хранения вирусной суспензии была температура минус 40 °С. Полученные данные показывают, что устойчивость вирусосодержащего материала вируса ЗУД КРС позволяет сохранять при минус 40 °С его активность в течение времени, необходимого для дальнейшего проведения научно - исследовательских работ.

Следующим этапом нашей работы являлось оценить специфичность проявляемого цитопатического действия вируса и сроков его выявления антигенов в перевиваемой перmissive культуре клеток. Для этого проводили реакцию непрямого иммуноцитохимического анализа. Результаты, полученные с помощью иммуноцитохимического метода свидетельствуют о том, что выявляемое ЦПД является специфическим для вируса ЗУД, минимальное время раннего выявления антигенов вируса ЗУД КРС в инфицированной перевиваемой линии культуры клеток ПО (ВНИИВВиМ) составляет 10 – 12 ч культивирования, что опережает развитие

специфического ЦПД вируса при той же дозе заражения на 36 – 48 ч. Современные системы визуализации комплекса антиген-антитело относятся к поколению фермент-опосредованных способов окраски и позволяют проводить иммунологические исследования при наличии только светового микроскопа.

Для более подробного изучения биологических свойств вируса ЗУД было проведено экспериментальное заражение лабораторных животных (мыши, морские свинки, хомяки, кролики). В ходе проделанной работы отмечено проявление клинических признаков в виде узелков на коже у хомяков и кроликов. Однако полученные нами результаты показали, что вируснейтрализующие антитела в сыворотках крови у всего ряда лабораторных животных выявляются в РН начиная с 14 дня после заражения и титр их постепенно возрастает к 28 дню в диапазоне разведений с 1:8-1:16. Для изучения гистологических изменений в тканях у кроликов, инфицированных вирусом ЗУД, а также локализации антигена вируса ЗУД в поврежденных клетках кожи животных использовали иммуногистохимический анализ. Метод ИГХ позволил установить наличие антигена вируса ЗУД КРС в патологически измененных тканях. В инфицированных клетках ткани места специфического взаимодействия антиген-антитело окрашивались в красно-коричневый цвет.

Разработанные «Методические положения по адаптации вируса заразного узелкового дерматита к перевиваемым линиям клеток». Данные методические положения предназначены для специалистов научно-исследовательских учреждений и лабораторий ветеринарного профиля.

Таким образом, в представленной диссертационной работе приведены данные по изучению биологических свойств вируса ЗУД КРС штамм «Волгоградский», изучению культуральных свойств в первичных и перевиваемых культурах клеток, а также данные по экспериментальному заражению лабораторных животных.

4.1 ВЫВОДЫ

1. Получены культуральные варианты изолята «Волгоградский» вируса ЗУД КРС семейства *Rovviridae*, адаптированные к перевиваемым линиям клеток гомологичного (ПО) и гетерологичного (Vero, РК-13/2-03) происхождения.

2. Определены оптимальные параметры культивирования вируса ЗУД КРС, адаптированного к перевиваемым линиям клеток ПО и Vero: питательная среда Игла MEM с 2 % фетальной сыворотки КРС; множественность заражения культуры клеток 0,01-0,001 ТЦД₅₀/кл, длительность культивирования 5 – 7 суток. При этих условиях культивирования без смены питательной среды вирус накапливался при температуре (37±0,5) °С в титре 5,00 – 6,00 lg ТЦД₅₀/см³.

3. Получен адаптированный к гетерологичной клональной перевиваемой линии клеток почки кролика РК-13/2-03 вирус ЗУД (15 пассаж) путем селективного пассирования в смешанной культуре ПО и РК-13/2-03 с инфекционной активностью — 5,00-5,50 lg ТЦД₅₀/см³, который может быть использован для наработки вирусного сырья в культуре, свободной от патогенов вирусной и прионной природы целевых животных (КРС, мелкий рогатый скот), включая возбудителей медленных инфекций.

4. Установлено, что вирус ЗУД КРС размножается в перевиваемых клетках кожи эмбриона лося (КЭЛ/07) и в легких эмбриона оленя (ЛЭО) относящегося к отряду парнокопытных представителей дикой природы.

5. Доказана эффективность метода иммуноцитохимического анализа (ИЦХ) для раннего выявления антигенов вируса ЗУД КРС в перевиваемой культуре клеток почки овцы (ПО), который позволяет выявлять антигены вируса ЗУД КРС и их локализацию в клетках инфицированной культуры в течение первых 10-24 часов культивирования после заражения.

6. Установлено, что при воспроизведении инфекционного процесса ЗУД КРС лабораторной моделью могут быть кролики и сирийские хомячки-альбиносы. При внутрикожном заражении хомячков и одновременном

внутрикожном и внутривенном заражении кроликов вирусом ЗУД КРС наблюдали клинические признаки (образование кожных узелков): у кроликов на 4 сутки и у сирийских хомяков альбиносов на 10 сутки после инфицирования.

4.2 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании проведенных исследований получен штамм «Волгоградский» вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота, который депонирован в коллекции микроорганизмов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» под регистрационным номером – «3192» (Приложение 1).

Разработаны, одобрены ученым советом и утверждены директором ФГБНУ ФИЦВиМ: «Методические положения по адаптации вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота к перевиваемым линиям клеток» (Приложение 2).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КРС – крупный рогатый скот

ЗУД КРС - заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота

ФГБНУ ФИЦВиМ - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА - иммуноферментный анализ

ТЦД₅₀ – 50%-ная тканевая цитопатическая доза

ТК – субкультура тестикул козленка

Vero – перевиваемая линия культуры клеток почки зеленой мартышки

CV – 1 – перевиваемая линия клеток почки африканской зеленой мартышки

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ПЦР РВ - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ПО (ВНИИВВиМ) – перевиваемая линия клеток почки овцы

РК-13/2-03– перевиваемая линия клеток почки кролика

ФБР – фосфатно – буферный раствор

OIE (МЭБ) – (World Organisation for Animal Health) всемирная организация по охране здоровья животных

ФГБУ «ВНИИЗЖ» – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных»

LSDV – lumpy skin disease virus

MDBK – перевиваемая линия клеток почки быка

ФАО – продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН

5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адаптация вируса к новому хозяину. Этапы адаптации вируса. [Электронный ресурс] Режим доступа: URL: <https://dommedika.com/virusologia/199.html> (дата обращения 20.07.2020).
2. Анализ и прогноз мировой эпизоотической обстановки по нодулярному дерматиту крупного рогатого скота на период до 2030 г. / В. А. Журавлёва, В.М. Балышев, А. В. Книзе [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2018. – № 139. – С. 83–98.
3. Анализ эпизоотической ситуации и моделирование потенциальных зоонозов оспы и чумы мелких жвачных животных до 2020 года / А.В. Книзе, М.В. Болгова, С.В. Париков [и др.] // Ветеринарный врач. Инфекционная патология. – 2016. – №1.– С.11–16.
4. Биологические свойства вируса бугорчатки крупного рогатого скота // В.М. Захаров, А.Н. Бурдов, Ф.А. Бадаев [и др.] // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии: материалы научной конференции ВНИИВВиМ. – Т.1.– Покров, 1992. — С. 168.
5. Биотехнология клеток животных / Р.Е. Спiera, Г.Д. Адамс, Дж. Б. Гриффитс. и др. – Москва: Агропромиздат, 1989. – 224 с.
6. Ветеринарная служба Владимирской области [Электронный ресурс] Режим доступа: URL: <https://vetvo.ru/nodulyarnyj-dermatit-krupnogo-rogatogo-skota.html> (дата обращения 20.07.2020).
7. Вирус нодулярного дерматита, выделенный в 2015 году в России от крупного рогатого скота, проявляет патогенность для овец при экспериментальном заражении / Т.Р. Усадов, Ю.П. Моргунов, С.П. Живодеров [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53, № 2. – С. 438–446.
8. Вирусная бугорчатка рогатого скота / В.И. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв и др. – Москва: Колос, 1966. – С. 634.

9. География особо опасных инфекций болезней диких животных / И.А. Бакулов, Т.А. Власова, Н.В. Дмитренко [и др.] // Ветеринария. – 1999. – № 1. – С. 17–21.
10. Голубев, Д.В. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии / Д.В. Голубев – Л.: Медицина.– 1976. – С. 224.
11. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, В.И. Плешакова. – Санкт-Петербург: Лань, 2010.– 480 с.
12. Гуненков, В.В. Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота / В.В. Гуненков // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 2005. – Т.66. – С.46–54.
13. Ездакова, И.Ю. Методические рекомендации по определению SIG В-клеток (иммунопероксидазное окрашивание) / И.Ю. Ездакова // Современные средства и методы обеспечения ветеринарного благополучия по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел. Москва. 2011.– С.111 – 116.
14. Инфекционная патология животных / А.Я.Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Е.А. Непоклонова [и др.]. Т. 1. – Москва. 2006– С.782–786.
15. Каталог коллекции клеточных культур ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. Покров. 2010 – 89С.
16. Клинические признаки у крупного рогатого скота, зараженного вирусом нодулярного дерматита (бугорчатка) / В.И. Диев, А.С. Назаров, В.М. Блотова [и др.] // Вирусные болезни с.-х. животных. – Владимир, 1995.– С. 215.
17. Колбасов, Д.В. Трансмиссивные заболевания жвачных / Д.В. Колбасов // Животноводство России. – 2013. – №10. – С. 41.
18. Косарева, О. А. Чувствительность перевиваемой культуры клеток гонад козы к вирусу нодулярного дерматита крупного рогатого скота / О.А. Косарева, А.В. Константинов, М.С. Кукушкина // Ветеринарная патология. – 2011 – № 3 – С. 95–97.

19. Косарева, О.А. Гистологические изменения в эпителиальных и лимфоидной тканях в результате экспериментального заражения КРС вирусом нодулярного дерматита / О.А. Косарева, А.В. Константинов, М.С. Кукушкина // Веткорм. – 2011. – № 6. – С. 29–30.
20. Культурально–биологические свойства возбудителя нодулярного дерматита крупного рогатого скота, выделенного на территории Российской Федерации в 2015 году / А.В. Кононов, С.В. Кононова, И.Н. Шумилова [и др.] // Ветеринария сегодня. –2016. –№3. – С. 8–13.
21. Максютлов, Р. А. Разработка новых средств диагностики и профилактики ортопоксвирусных инфекций человека: дис. ...доктор биол.наук: 03.02.02/ Максютлов Ринат Амирович – Новосибирск, 2017. – 288 с.
22. Нодулярный дерматит КРС современная эпизоотическая ситуация, профилактика и меры борьбы. [Электронный ресурс] Режим доступа: URL:<http://nv-gochs.ru/wp-content/uploads/2018/09/ОСТОРОЖНО-надулярный-дерматит-крупного-рогатого-скота.pdf> (дата обращения 20.07.2020).
23. Нодулярный дерматит крупного рогатого скота: характеристика возбудителя болезни, распространение, диагностика и меры борьбы (обзор литературы) / Н.И. Закутский, В.М. Балышев, С.Г. Юрков [и др.] // Ветеринарный врач. –2016. – № 4. – С. 3–11.
24. Основы технологии производства ветеринарных биологических препаратов / А.Я. Самуйленко, Е.А. Рубан, И.В. Павленко и [др.] // – Т.1. – Москва, 2000. – С. 190 – 241.
25. Патоморфологические изменения при нодулярном дерматите крупного рогатого скота / О.Ю. Черных, А.В. Мищенко, В.А. Мищенко [и др.] // Ветеринария Кубани. –2017. – № 3. – С. 3–9.
26. Перmissивность культур клеток различного происхождения при культивировании вируса нодулярного дерматита / В.И. Балышева, С.П. Живодеров, Е.Ю. Пивова [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 2, № 6. – С. 1265–1272.

27. Проблема нодулярного дерматита крупного рогатого скота / А.В. Мищенко, В.А. Мищенко, А.В. Кононов [и др.] // Ветеринария Кубани – 2015. – № 5 – С. 3 – 6.
28. Проблема профилактики и ликвидации очагов нодулярного дерматита крупного рогатого скота / Р.А. Кривонос, Г.А. Джаилиди, А.В. Мищенко [и др.] // Ветеринария сегодня. –2017. – № 20. – С. 38–44.
29. Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН [Электронный ресурс] Режим доступа: URL: <http://www.fao.org/docrep/u4900t/u4900t0d.html> (дата обращения 20.07.2020).
30. Рябикина, О.А. Нодулярный дерматит крупного рогатого скота (обзор литературы) / О.А. Рябикина, В.И. Диев, М.С. Кукушкина [и др.] // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии. –2015. – № 4. – С. 45–52.
31. Сергеев, В.А. Вирусы и вирусные вакцины / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер. – Москва: Библионика, 2007. – С. 524.
32. Специфическая профилактика нодулярного дерматита крупного рогатого скота / О.Ю. Черных, А.В. Мищенко, В.А. Мищенко [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2016. – № 3. – С. 3–5.
33. Сравнительная оценка чувствительности новых культур клеток к поксвирусам животных / В.И. Заерко, О.А. Гевлич, И.О. Фомина [и др.] // Ветеринария. –2018. – №10. – С. 27–33.
34. Стегний, М.Ю. Выделение вирусов в культуре клеток и методы их идентификации. Животная клетка в культуре / М.Ю. Стегний, Л.П. Поздняков, Л.П. Дьяконов; под редакцией Л.П. Дьяконова. – 2 изд. – Москва: Спутник, 2009. – С. 521 – 530.
35. Усадов, Т.Р. Молекулярно-генетические и биологические свойства вируса заразного узелкового дерматита, выделенного в Республике Северная Осетия - Алания в 2015 году: автореф. дис... канд. биол. наук: 03.02.02 / Усадов Тимур Равильевич. – Владимир, 2019. –115 с.

36. Частная вирусология / В.Н. Сюрин, Н.В. Фомина, А.Я. Самуйленко [и др.] // – Москва: Колос, 1979 – С. 472.
37. Шумилова, И.Н. Биологические свойства штамма «ВНД КРС/Дагестан/2015» вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота: автореф. дис... канд. вет. наук: 06.02.02 / Шумилова Ирина Николаевна. – Владимир, 2018. – 22 с.
38. Adverse Reactions to Field Vaccination Against Lumpy Skin Disease in Jordan / S. Abutarbush, W. Hananeh, W. Ramadan [et al.] // *Transbound emerg. dis.* – 2016. – Vol. 63, № 2. – P. 213–219.
39. Alemayehu, G. Risk assessments of lumpy skin diseases in borena bull market chain and its implication for livelihoods and international trade/ G. Alemayehu, G. Zewde, B. Admassu // *Trop. Anim. Health Prod.*–2013. – № 45. – P. 1153–1159.
40. Alexander, R. Cytopathogenic agents associated with lumpy–skin disease of cattle/ R. Alexander, W. Plowright, D. Haig // *Bull. Epiz. Dis. Afr.* –1957. – № 5. –P. 489–492.
41. Ali, A. Clinical and pathological studies on lumpy skin disease in Egypt/ A. Ali , M. Esmat , H. Attia // *Veterinary Record.* – 1990. – № 127. – P. 549–550.
42. Ali, B. Investigation of the first outbreak of Lumpy skin disease in the Sudan/ B. Ali, Obeid H. Brit. // *Vet. J.* – 1977. – № 2. – P. 184–189.
43. Ali, M. Abattoir–Based Survey and Histopathological Findings of Lumpy Skin Disease in Cattle at Ismailia/ M. Ali, A. Dessouki // *International J. of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics.* – 2013. – Vol. 3, № 3. – P. 372–375.
44. Al–Salihi, K. Lumpy Skin Disease in Iraq: Study of the Disease Emergence / K. Al–Salihi, I. Hassan // *Transbound emerg. Dis.* – 2015. – Vol. 62, № 5. – P. 457–462.

45. Al-Salihi, K., Lumpy Skin disease: Review of literature / K. Al-Salihi // *Mirror of Research in Veterinary Sciences and Animals*. –2014. – Vol. 3, № 3. – P. 6–23.
46. Annandale, C.H. Sites of persistence of lumpy skin disease virus in the genital tract of experimentally infected bulls / C.H. Annandale, P.C. Irons, V.P. Bagla // *Reprod. Domest. Anim.* – 2010. – Vol. 45, № 2. – P. 250–255.
47. Aspden, K. Evaluation of lumpy skin disease virus, a capripoxvirus, as a replication-deficient vaccine vector / K. Aspden, J. Passmore, F. Tiedt // *Journal of General Virology*. – 2003. – Vol. 84, № 8. – P. 1985–1996.
48. Baryshnikova, E.I. Application of cytochemistry enzyme immunoassay for the early y detection of small ruminant lentiviruses in primary culture of ovine synovial membrane cell / Baryshnikova E.I., Kolbasova O.L., Kapustina O.V. // 16– th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD): 10 –th OIE Seminar. – Berlin. 2013– P. 142.
49. Beard, P. Lumpy skin disease: a direct threat to Europe / P. Beard // *Vet Rec.* – 2016. – Vol.178. – P.557–558.
50. Buller, R.M. Poxviridae. Virus taxonomy: eight report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses / R.M. Buller, B.M. Arif, D.N. Black // *Viruses*. –2005. –Vol. 83. – P. 988–992.
51. Burdin, M. L. The use of histopathological examinations of skin material for the diagnosis of lumpy skin disease in Kenya / M. L. Burdin // *Bull. epizoot. Dis. Afr.* – 1959. – Vol. 7. – P. 27 – 36.
52. Caplen, H. Mutagen-directed attenuation of Rift Valley fever virus as a method for vaccine development/ H. Caplen, C.J. Peters, D.H.L. Bishop // *J. Gen. Virol.* –1985. – Vol. 66, № 10. – P. 2271–2277.
53. Capripoxvirus diseases: Current status and opportunities for control / E. Tuppurainen, E. Venter, J. Shisler [et al.] // *Transbound emerg. Dis.* – 2017. – Vol. 64, № 3. – P. 729–745.

54. Capripoxviruses: An Emerging Worldwide Threat to Sheep, Goats and Cattle / S. Babiuk, T. Bowden, D. Boyle [et al.] // *Transbound Emerg Dis.* – 2008. – Vol. 55, № 7. – P. 263–272.
55. Capstick, P. B. Lumpy skin disease—experimental infection / P. B. Capstick // *Bull. Epizoot. Dis. Afr.* – 1959. – Vol. 7. – P. 51–62.
56. Capstick, P.B Protection of cattle against lumpy skin disease. Trials with f vaccine against Neethling type infection / P.B. Capstick, W.Coakley // *Res. Vet. Sci.* –1961. – Vol. 2. – P. 362–368.
57. Carn, V.M. Review Control of capripoxvirus infections / V. M. Carn // *Vaccine* – 1993. – Vol. 11, № 13. – P. 1275–1279.
58. Characterization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus / E. Tuppurainen, C. Pearson, K. Bachanek-Bankowska [et al.] // *Antiviral Res.* – 2014. – Vol. 109. – P.1–6.
59. Chihota, C.M. Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects/ Chihota C.M., Rennie L.F., Kitching R.P. // *Medical and Veterinary Entomology.* – 2003. – Vol.17, № 3. – P. 294–300.
60. Chihota, C.M. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* / Chihota C.M., Rennie L.F., Kitching R.P. // *Epidemiology and Infection.* – 2003. – Vol. 126, №2. – P. 317–321.
61. Clinico–histopathological findings and PCR based diagnosis of lumpy skin disease in the Sultanate of Oman/ Body M.K., Singh K.P., Hussain M.H. [et al.] // *Pakistan Veterinary Journal.* – 2012. – Vol. – 32, №2. – P. 206–210.
62. Coetzer, J. A. W. Poxviridae Infectious diseases of livestock / J. A. W. Coetzer, G. R. Thomson, R. C. Tustin // Oxford University Press, Cape Town, South Africa. – 1994. – Vol. 1. – P. 601–603.
63. Coetzer, J.A. Lumpy skin disease Infectious Diseases of Livestock / J.A. Coetzer, R. Tustin // University Press Southern Africa. – Oxford, 2004. – P. 1268-1276.
64. Comparison of the efficacy of Neethling lumpy skin disease virus and x10RM65 sheep–pox live attenuated vaccines for the prevention of lumpy skin

- disease – The results of a randomized controlled field study/ Ben-Gera J., Klement E., Khinich E. [et al.] //Vaccine. – 2015. –Vol.33, № 38. – P.4837–4842.
65. Constable, P. D. A Case Report on Clinical Management of Lumpy Skin Disease in Bull / P. D. Constable // Journal of Veterinary Science & Technology. –2018. – Vol. 9, № 3. – P. 1–2.
66. Davies, F. Lumpy skin disease, an African capripox virus disease of cattle/ F. Davies // Br. Vet. J. –1991. – Vol. 147. – P. 489–502.
67. Davies, F. Lumpy skin disease. In Virus diseases of food animals/ Davies F., Gibbs E. – New York: Academic Press. – 1981. – P. 751–764.
68. Detection of lumpy skin disease virus, in skin lesions, blood, nasal swabs and milk following preventive vaccination / T. Bedeković, I. Šimić, N. Krešić [et al.] // Transbound emerg. Dis. – 2018. – Vol. 65, № 2. – P. 491–496.
69. Development of an assay to differentiate between virulent and vaccine strains of lumpy skin disease virus (LSDV) / S. Menasherow, M. Rubinstein-Giuni, A. Kovtunencko [et al.] // J. Virol. Methods. – 2014. – Vol. 199. – P. 95–101.
70. Diesel, A. The Epizootiology of Lumpy Skin Disease in South Africa/ A. Diesel // Proceedings of the 14th International Veterinary Congress – London, 1949. – P. 492–500.
71. Donald, C. Development of new cell liness for animal cell biotechnology / C. Donald // CRC Crit Rev. Biotechnol. – 1990. – Vol. 10, №2. – P. 155 – 178.
- 72.El-Neweshy, M. Pathologic and Immunohistochemical Findings of Natural Lumpy Skin Disease in Egyptian Cattle/ M. El-Neweshy, T. El-Shemey , S. Youssef // Pak Vet J. –2013. – Vol. 33, № 1. – P. 60 – 64.
- 73.Emergence of lumpy skin disease in the Eastern Mediterranean Basin countries / S. Wainwright, A. El Idrissi, R. Mattioli [et al.] // FAO Empres Watch. – 2013. – Vol. 29. – P. 1–6.
74. Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of lumpy skin diseases in coves / W. Awad, A. Ibrahim, A. Mahran [et al.] // Trop. Anim. Health Prod. – 2010. – Vol. 42, № 4. – P. 777–783.

75. Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayesian method / G. Gari, F. Biteau-Coroller, C. LeGoff [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2008. – Vol. 129, № 3. – P. 269–280.
76. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus / G. Gari, G. Abie, D. Gizaw [et al.] // *Vaccine.* – 2015. – Vol. 33, № 28. – P. 3256–3261.
77. Evidence of transstadial and mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Amblyomma hebraeum* ticks / J.C. Lubinga, E.S. Tuppurainen, R. Mahlare [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2013. – Vol. 62. – P. 174-182.
78. Experimental evidence of mechanical lumpy skin disease virus transmission by *Stomoxys calcitrans* biting flies and *Haematopota* spp. horseflies/ C. Sohier, A. Haegeman, L. Mostin [at al.] // *Veterinary record.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 1–10.
79. Gale, P. Qualitative assessment of the entry of capripoxviruses into Great Britain from the European Union through importation of ruminant hides, skins and wool / P. Gale, L. Kellya, E.L. Snarya // *Microbial Risk Analysis.* – 2016. – Vol.1, № 13. – P.1– 8.
80. Genome of Lumpy Skin Disease Virus / E. Tulman, C. Afonso, Z. Lu [et al.] // *J Virol.* – 2001. – Vol. 75, № 15. – P. 7122–7130.
81. Gershon, P. A comparison of the genomes of capripoxvirus isolates of sheep, goats, and cattle / P. Gershon, D. Black // *Virology.* – 1988. – Vol. 164, № 2. – P. 341–349.
82. Gershon, P.D. Physical characterization of the genome of a cattle isolate of capripoxviruses / P.D. Gershon, D. Black // *Virology.* – 1987. – Vol. 160, № 2. – P. 473–476.
83. Haig, D.A. Lumpy skin disease / D.A. Haig // *Bull. Epizoot. Dis. Afr.* – 1957. – Vol. 5. – P. 421–430.
84. Hughes, A. The evolutionary biology of poxviruses / A. Hughes, S. Irausquin, R. Friedman // *Infect Genet Evol.* – 2010. – Vol. 10, № 1. – P. 50–59.

85. Irons, P. Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen / P. Irons, E. Tuppurainen, E. Venter // *Theriogenology*. – 2005. – Vol. 63, № 5. – P. 1290–1297.
86. Isolation and Identification of Lumpy Skin Disease Virus from Naturally Infected Buffaloes at Kaluobia, Egypt / El-Nahas E., El-Habbaa A., El-Bagoury G. [et al.] // *Global Veterinaria*. – 2011. – Vol. 7, № 3. – P. 234–237.
87. Karaotcu, A. Lumpy Skin Disease / A. Karaotcu, Y. Yildirim // *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. – 2019. – Vol. 30, № 2. – P. 165–172.
88. Kitching, P. Insect transmission of capripoxvirus / P. Kitching, P. Mellor // *Res. Vet. Sci.* – 1986. – Vol. 40, № 2. – P. 255–258.
89. Kitching, P. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox / P. Kitching // *Dev. Biol.* – 2003. – Vol. 114. – P. 161–167.
90. Kumar, S. An Outbreak of Lumpy Skin Disease in a Holstein Dairy Herd in Oman: A Clinical Report / Kumar S. // *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. – 2011. – Vol. 6, № 8. – P. 851–859.
91. Lumpy skin disease in cattle in central Ethiopia: outbreak investigation and isolation and molecular detection of lumpy skin disease virus / Ayelet G., Haftu R., Jemberie S., [et al.] // *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* – 2014. – Vol. 33, № 3. – P. 1–23.
92. Lumpy Skin Disease in Jordan: Disease Emergence, Clinical Signs, Complications and Preliminary-associated Economic Losses // Abutarbush S.M., Ababneh M.M., Zoubi A.L. [et al.] // *Transbound emerg Dis.* – 2013. – Vol. 62, № 5. – P. 8–21.
93. Lumpy Skin Disease (LSD) in a large dairy herd in Israel / J. Brenner, M. Haimovitz, E. Oron [et al.] // *Israel Journal of Veterinary Medicine*. – 2006. – Vol. 61. – P. 73–77.
94. Lumpy Skin Disease / H. Abdulqa, H. Rahman, H. Dyary [et al.] // *Reproductive Immunology: Open Access*. – 2016. – Vol. 1, № 4. – P. 4–5.

95. Lumpy skin disease in cattle in central Ethiopia: outbreak investigation and isolation and molecular detection of the virus / G. Ayelet, R. Haftu, S. Jemberie [et al.] // *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* – 2014. – Vol. 33, № 3. – P. 877–887.
96. Lumpy skin disease in Jordan: clinical signs, complications and preliminary associated economic losses / S.M. Abutarbush, M.M. Ababneh, I. Zoubi [et al.] // *Transbound emerg. Dis.* – 2013. – Vol. 62, № 5. – P. 549–554.
97. Lumpy skin disease of cattle: an emerging problem in the Sultanate of Oman / M. Tageldin, D. Wallace, G. Gerdes [et al.] // *Trop. Anim. Health Prod.* – 2014. – Vol. 46, № 1. – P. 241–246.
98. Lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle / S. Babiuk, T.R. Bowden, G. Parkyn [et al.] // *Transbound emerg. Dis.* – 2008. – Vol. 55. – P. 299–307.
99. Macowan, K.D.S. Observations on the epizootiology of lumpy skin disease during the first year of its occurrence in Kenya / K.D.S Macowan // *Bull. Epiz. Dis. Afr.* – 1959. – Vol. 7. – P. 7–20.
100. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus* male ticks / E. Tuppurainen, J. Lubinga, W. Stoltz [et al.] // *Epidemiol. Infect.* – 2013. – Vol. 141. – P. 425–430.
101. Menasherow, S. A. high-resolution melting (HRM) assay for the differentiation between Israeli field and Neethling vaccine lumpy skin disease viruses / Menasherow S., Erster O., Rubinstein-Giun M. // *J. Virol Methods.* – 2016. – Vol. 232. – P. 12–15.
102. Morphological Characteristics of Skin Lesions in Cattle Naturally Infected with Lumpy Skin Disease Virus in Serbia / N. Vasković, Z. Debeljak, D. Vidanovic [et al.] // *Acta Veterinaria.* – 2019. – Vol. 64. – P. 369–378.
103. Neamat-Allah, A. Immunological, hematological, biochemical, and histopathological studies on cows naturally infected with lumpy skin disease / A. Neamat-Allah // *Vet World.* – 2015. – Vol. 9. – P. 1131–1136.
104. OIE. Terrestrial Animal Health Code. – Paris, 2019. – Vol. 1. Chap. 11.9. Infection with lumpy skin disease virus, Article 11.9.1.

105. OIE. Terrestrial Manual – Lumpy Skin Disease – 2012. Chapter 2.4.14.
106. Pareek, C. Sequencing technologies and genome sequencing / C. Pareek, R. Smoczynski, A. Tretyn. // J. Appl Genet. – 2011. – Vol. 52, № 4. – P. 413–35.
107. Pathology and viral antigen distribution following experimental infection of sheep and goats with capripoxvirus / C. Embury, S. Hyatt, L. Babiuk [et al.] // J. Comp. Pathol. – 2012. – Vol. 146. – P. 106–115.
108. Plowright, W. The growth in tissue cultures of a virus derived from lumpy skin disease of cattle/ W. Plowright, M. A. Witcomb, W. Plowright // J. Path. Bact. – 1959. – Vol. 78. – P. 397.
109. Prozesky, L. Study of the pathology of lumpy skin disease in cattle / L. Prozesky, B. J. Barnard // Onderstepoort J. Vet. Res. – 1982. – Vol. 49. – P.167–175.
110. Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses / C. Lamien, M. Lelenta, W. Goger [et al.] // J. Virol. Methods. – 2011. – Vol. 171. – P. 134– 140.
111. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of lumpy skin disease virus / M. A. Shalaby, A. El-Deeb, M. Eltholoth [et al.] // BMC Vet Res. – 2016. – Vol. 12, № 1. – P. 10–15.
112. Review on epidemiology and economic importance of lumpy skin disease / S. Jyoti, S. Karki, R. Nepal [et al.] // Intern. J. Basic Appl. Virol. – 2015. – Vol. 4, № 1. – P. 8–21.
113. RNA polymerase I-mediated expression of viral RNA for the rescue of infectious virulent and avirulent Rift Valley fever viruses / A. Billecocq, N. Gaudiard, N. Le May [et al.] // Virology.– 2008.– Vol. 378, № 2. – P. 377–384.
114. Rouby, S. Evidence of intrauterine transmission of lumpy skin disease virus / S. Rouby, E. Aboulsoud // Veterinary Journal. – 2015. – Vol. 209. – P. 193–195.
115. Salib, F. Incidence of lumpy skin disease among Egyptian cattle in Giza Governorate, Egypt / F. Salib, A. Osman // Veterinary World. – 2011. – Vol. 4. – P. 162–167.

116. Seminal transmission of lumpy skin disease virus in heifers / C.H. Annandale, D.E. Holm, K. Ebersohn, E.H. Venter // *Transbound emerg. Dis.* – 2013. – Vol. 61, № 5. – P. 443 – 448.
117. Serum biochemistry of lumpy skin disease virus–infected cattle / M. Şevik, O. Avci, M. Doğan [et al.] // *Biomed Res International.* – 2016. – Vol. 2. – P. 1–6.
118. Simmons, J.B. Infectious diseases of animals/ J.B. Simmons // *Agric. Soc. Engl.* –1874. – Vol. 10, № 2. – P. 237–240.
119. Snimsfiony, A. Lumpy skin disease / A. Snimsfiony // *Proc. 93rd Annu. Meet. United States Animal Health Assoc.* – 1989. – Vol. 334.
120. Spread of lumpy skin disease in Israeli dairy herds / I. Yeruham, O. Nir, Y. Braverman [et al.] // *Vet. Res.* – 1995. – Vol. 137, № 4. – P. 91–93.
121. Spread rate of lumpy skin disease in the Balkans 2015-2016/ A. Mercier, E. Arsevska, L. Bournez [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2018. – Vol. 65, № 1. – P. 240 – 243.
122. The isolation of lumpy skin disease virus and bovine herpesvirus–4 from cattle in Egypt / J. House, T. Wilson, S. El Nakashly [et al.] // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* – 1990. – Vol. 2, № 2. – P. 111–115.
123. The genomes of sheeppox and goatpox viruses / E. Tulman, C. Afonso, Z. Lu [et al.] // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76. – P. 6054– 6061.
124. The laboratory diagnosis of lumpy skin disease/ F. Davies, H. Krauss, L. Lund [at al.] // *Res. Vet. Sci.* – 1971. – Vol. 12. – P. 123–127.
125. Thomas, A.D. Knopvelsiekte / A.D. Thomas, C.V.E. Mare // *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* – 1945. – Vol. 16. – P. 36 – 43.
126. Tijssen, P. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase antibody conjugates for enzyme immunoassays / P. Tijssen, E. Kurstak // *Analytical Biochemistry.* – 1984. – Vol. 136. – P. 451 – 455.

127. Tomley, F. M. Livestock infectious diseases and zoonoses / F. M. Tomley, M. W. Shirley // *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*. – 2009. – Vol. 364 – P. 2637 – 2642.
128. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review / F. Baldacchino, V. Muenworn, M. Desquesnes [et al.] // *Parasite*. – 2013. – Vol. 20.
129. Tuppurainen, E. Lumpy Skin Disease / E. Tuppurainen, S. Babiuk, E. Klement; The Hebrew University, Israel, 2018 – P.1–109.
130. Tuppurainen, E. Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia / E. Tuppurainen, C. Oura // *Transbound. emerg. Dis.* – 2011. – Vol. 59, №1. – P. 40–48.
131. Tuppurainen, E. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques / E. Tuppurainen, E. Venter, J. Coetzer // *Onderstepoort J. Vet. Res.* – 2005. – Vol. 72. – P. 153 – 164.
132. Urgent advice on lumpy skin disease / EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) // *EFSA J.* – 2016. – Vol.14, №8 – e04573.
133. Vorster, J. Lumpy skin disease / J. Vorster, P. Mapham // *Livestock Health and Production Rev. Jaargang*. – 2008. – Vol. 10, № 1. – P. 16-21.
134. Weiss, K. Lumpy skin disease virus / K. Weiss // *Virology Monographs*. – 1968. – Vol. 3. – P. 111 – 131.
135. Wezel, A.L. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogenous culture / A.L. Wezel // *Nature*, 1967. – Vol. 216. – P.64 – 65.
136. Woods, J.A. Lumpy skin disease – a review / J.A. Woods // *Trop. Anim. Health Prod.* – 1988. – Vol. 20, №1. – P. 11–17.
137. World Animal Health Information Database (OIE. Disease Information) Interface / OIE. – Paris; France, 2018. – URL: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии»
(ФГБНУ ФИЦВиМ)
601125, Владимирская область, п. Вольгинский,
ул. Академика Бакулова, строение 1



УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ ФИЦВиМ
Д.В. Колбасов

ПАСПОРТ

1	Наименование возбудителя, его таксономия	Вирус заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота. Семейство <i>Ruminiviridae</i> , род <i>Capripoxvirus</i>
2	Название штамма, его № или условное обозначение	Волгоградский, культуральный
3	Кем, когда и от какого животного получен штамм	Пивовой Е.Ю., Живодеровым С.П., Луничным А.В. в 2016г. Выделен из патологического материала от больного КРС в Волгоградской области.
4	История пассирования	В ФГБНУ ФИЦВиМ 15 пассажей в культуре клеток почки овцы (ПО)
5	Учреждение депозитор с указанием почтового адреса	ФГБНУ ФИЦВиМ601125, Владимирская область п. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр.1
6	Производственный штамм в данное время или музейный	Музейный
7	Применяемый способ стабилизации и хранения штамма в учреждении	Лиофилизированный культуральный вирусосодержащий материал на стабилизатор сыворотка эмбриональная теленочья. Хранение при минусе 40° - 50 °С
8	Периодичность освежения штамма	1 раз в 5 лет. При активности 4,0 lg ТЦД ₅₀ /см ³ и выше срок хранения продлевается
9	Серологические свойства	Вызывает образование ВН тестов у КРС и лабораторных животных (кроликов, мышей, морских свинок и хомячков)
10	Патогенность для лабораторных, с-х. животных и КЭ	Патогенен для КРС, вызывает образование кожных узелков в местах введения вируса у лабораторных животных
11	Культурально-морфологические особенности штамма	Репродуцируется в первичных и перевитых линиях клеток гетерологичного и гомологичного происхождения (ТК, MDBK, ПО, VERO и др.) Накопление до 5,5±0,5 lg ТЦД ₅₀ /см ³
12	Дополнительные сведения о штамме	Не контаминирован бактериями, грибами и микоплазмами при посевах на питательные среды Лиофилизирован -05.02.2020 г. по 1 см ³ /амп. Инактивная активность в культуре клеток ПО 5,28 ± 0,18 lg ТЦД ₅₀ /см ³

Паспорт составил:

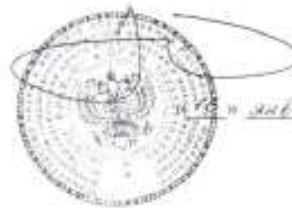
Руководитель ГКМ ФИЦВиМ:

 Пивова Е.Ю.,
 Живодеров С.П.
Болшина В.М.

№ 9

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»
(ФГБНУ ФИЦВиМ)

УТВЕРЖДАЮ
Директор
ФГБНУ ФИЦВиМ
Д.В. Колбасов



15 мая 2020 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ
ПО АДАПТАЦИИ ВИРУСА ЗАРАЗНОГО УЗЕЛКОВОГО ДЕРМАТИТА
К ПЕРЕВИВАЕМЫМ ЛИНИЯМ КЛЕТОК**



Вольгинские - 2020 г.


Заведующий учебной лабораторией: *Е.А. Малахова*

Методические положения разработаны в лаборатории Диагностики и Мониторинга и Научно - экспериментальном отделе ФГБНУ ФИЦВМ

Методические положения предназначены для использования в научно - исследовательских учреждениях ветеринарного профиля

Состав авторов:

 м.н.с. Е.Ю. Павлов

 к.в.н. С.П. Живодров

 д.б.н., профессор В.И. Балышина

Рецензент: д.б.н., профессор С.Г. Юрков

Методические положения рассмотрены и рекомендованы к утверждению на заседании объединённого ученого совета «16» 01 2020 г., протокол №14
ВВЕДЕНА В ДЕЙСТВИЕ с «16» 01 2020 г.

Заведующий учебно-научным центром