

ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ НЕПРЯМОГО «СЭНДВИЧ»-ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА ЗАРАЗНОГО УЗЕЛКОВОГО (НОДУЛЯРНОГО) ДЕРМАТИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

О. А. Рябикина¹, В. И. Диев², О. П. Бьядовская³, А. В. Константинов⁴, С. К. Старов⁵, А. В. Кононов⁶, В. Ю. Кулаков⁷, О. Н. Петрова⁸

¹ Младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: ryabikina@arriah.ru

² Доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: diev@arriah.ru

³ И. о. заведующего лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

⁴ Начальник отдела, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: konstantinov@arriah.ru

⁵ Заместитель директора, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: starov@arriah.ru

⁶ Начальник отдела, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: kononov@arriah.ru

⁷ Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: kulakov@arriah.ru

⁸ Заведующий сектором, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: petrova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота является экономически значимым заболеванием, поскольку приводит к снижению привесов и молочной продуктивности, абортам, маститам, нарушению функции воспроизводства, поражению органов дыхания, истощению животных, а в отдельных случаях – их гибели. В настоящее время болезнь включена в список МЭБ и подлежит обязательной нотификации. Возникновение и распространение заболевания на территории Российской Федерации обусловило необходимость проведения исследований в рамках совершенствования методов лабораторной диагностики. Впервые в России разработана тест-система на основе непрямого «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа для диагностики заразного узелкового (нодулярного) дерматита крупного рогатого скота, позволяющая в течение 24 часов провести исследование биоматериала. Разработка тест-системы включала в себя получение специфических антител от лабораторных животных (кролики и морские свинки), подбор оптимального разведения улавливающих и детекторных антител, состава буферных растворов и условий постановки реакции. С использованием разработанной методики исследовано 50 образцов исходных культуральных антигенов вируса заразного узелкового дерматита, а также вирусосодержащих суспензий, отобранных на различных этапах очистки и концентрирования. Для подтверждения результатов ИФА все исследованные пробы были тестированы методом ПЦР-РВ. Кроме того, для всех исследуемых материалов определяли титр инфекционной активности вируса методом титрования в культуре клеток ЯДК-04. Диагностическая специфичность теста составила 100%, а аналитическая чувствительность – 3,5 Ig ТЦД₅₀. Разработанный «сэндвич»-вариант ИФА позволяет тестировать одновременно в формате 96-луночного планшета до 24 проб антигена в разведении 1:2–1:16 и может быть использован для диагностики заразного узелкового (нодулярного) дерматита крупного рогатого скота.

Ключевые слова: заразный узелковый дерматит, иммуноферментный анализ, тест-система, крупный рогатый скот.

ВВЕДЕНИЕ

Заразный узелковый (нодулярный) дерматит (кожная бугорчатка, узелковый дерматит, кожно-узелковая сыпь, болезнь «кожного отека» у буйволов, «лоскутная» болезнь кожи, вирусная заразная бугорчатка кожи, узелковая экзантема) – болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся лихорадкой, поражением лимфатической системы, отеками подкожной клетчатки и внутренних органов, образованием кожных узелков (бугров), поражением глаз и слизистых оболочек дыхательного и пищеварительного трактов [2, 5].

Возбудителем является ДНК-содержащий вирус (лат. – *Dermatitis nodularis bovum*; англ. – Lumpy skin disease virus). В соответствии с классификацией, установленной Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy

of Viruses), относится к роду *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae*.

Заболевание проявляется в теплое время года, в период биологической активности кровососущих насекомых, быстро распространяется и протекает в виде энзоотии и эпизоотии [2, 9].

Заразный узелковый дерматит (ЗУД КРС) наносит значительный ущерб животноводству, обусловленный снижением привесов, молочной продуктивности, истощением животных, а в отдельных случаях – их гибелью.

Наличие ЗУД КРС в различные годы регистрировалось в Израиле, Ливане, Бахрейне, Кувейте, Омане, Йемене, Палестине, Иране, Ираке, Египте, Сирии, Турции и Азербайджане. В Европе возникновение заболевания отмечено в Греции, Болгарии, Македонии, Косове.

TEST-SYSTEM BASED ON INDIRECT "SANDWICH" ELISA TO DETECT THE LUMPY SKIN DISEASE VIRUS ANTIGEN

O. A. Ryabikina¹, V. I. Diev², O. P. Byadovskaya³, A. V. Konstantinov⁴, S. K. Starov⁵, A. V. Kononov⁶, V. Yu. Kulakov⁷, O. N. Petrova⁸

¹ Junior Researcher, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: ryabikina@arriah.ru

² Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: diev@arriah.ru

³ Interim Head of the Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: byadovskaya@arriah.ru

⁴ Head of the Department, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: konstantinov@arriah.ru

⁵ Deputy Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Reseracher, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: starov@arriah.ru

⁶ Head of the Department, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: kononov@arriah.ru

⁷ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: kulakov@arriah.ru

⁸ Head of the Sector, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: petrova@arriah.ru

SUMMARY

Lumpy skin disease is an economically significant disease as it results in decrease in weight gain and milk yield, abortions, mastitis, reproduction disorders, animal emaciation, lesions of respiratory organs and in some cases – death. Today the disease is included in the OIE list and is subject to obligatory notification. The emergence and spread of the disease in the Russian Federation necessitated performance of tests in the framework of laboratory diagnosis method improvement. The test-system based on the indirect "Sandwich" ELISA for diagnosis of lumpy skin disease allowing performance of biomaterial tests within 24 hours was for the first time developed in Russia. The test-system development included antibody preparation in laboratory animals (rabbits and guinea pigs), selection of optimal dilution of capture and detection antibodies, composition of a buffer solution and conditions of the reaction procedure. 50 samples of initial culture antigens of the lumpy skin disease virus as well virus-containing suspensions collected on different stages of purification and concentration were tested using this technique. To confirm the ELISA results all analyzed samples were tested using RT-PCR. Besides, the virus infectivity titer was determined by titration in YaDK-04 (Goat gonad cells). The test specificity was 100%, and analytical sensitivity – 3.5 Ig TCD₅₀. The developed "Sandwich" ELISA allows performing tests of 24 antigen samples at 1:2–1:16 dilution simultaneously using 96-well plate and it can be used for lumpy skin disease diagnosis.

Key words: lumpy skin disease, ELISA, test-system, cattle.

В 2017 г. неблагополучными по этому заболеванию были 19 стран (рис. 1).

В 2015 г. на территории Российской Федерации в Республике Дагестан установлено заболевание ЗУД КРС, которое в дальнейшем имело распространение среди крупного рогатого скота различных регионов (рис. 2).

В настоящее время болезнь включена в список МЭБ и подлежит обязательной нотификации [2]. Заразный узелковый дерматит КРС отсутствует в Перечне заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин), утвержденном приказом Минсельхоза РФ № 476 от 19 декабря 2011 г.

Диагноз ставят на основании анализа эпизоотологических и клинических данных, патологоанатомических и гистологических изменений, а также результатов лабораторных исследований. Выявление возбудителя ЗУД КРС в пробах биоматериала проводится комплексно, с применением ряда методов: реакции иммунофлюоресценции, реакции иммунодиффузии в агаровом геле, вестерн-блоттинга, вирусвыделения с использо-

ванием чувствительной культуры клеток и др., которые достаточно трудоемки и длительны по времени постановки [1, 2, 6–8].

В связи с возникновением и распространением ЗУД КРС на территории Российской Федерации возникла необходимость проведения исследований в рамках совершенствования методов лабораторной диагностики.

Целью работы была разработка непрямого «сэндвич»-варианта ИФА для выявления антигена вируса ЗУД КРС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В состав тест-системы ИФА входят: культуральный положительный антиген вируса ЗУД (нодулярного дерматита) КРС штамма «Э-95», адаптированный в перевиваемой культуре клеток яичников домашней козы (ЯДК-04), с титром инфекционной активности 5,5 Ig ТЦД₅₀/см³; культуральный отрицательный нормальный антиген; улавливающие антитела – специфическая гипериммунная поликлональная сыворотка кролика; детекторные антитела – специфическая



Рис. 1. Распространение заболевания в мире

гипериммунная поликлональная сыворотка морской свинки; антивидовой конъюгат – иммуноглобулины против IgG морской свинки, конъюгированные с пероксидазой хрена; 0,05 М карбонат-бикарбонатный буфер (рН 9,5–9,6) для разведения антигена; трис-буферный раствор (ТБР) (рН 7,4–7,6); промывочный буферный раствор ТБР с Твином-20 (ТБР-Т), Твин-20 (0,1%-й раствор); блокирующий буферный раствор (рН 7,4–7,6), на основе 10%-го раствора сухого молока; буфер для разведений проб и конъюгата; раствор 2,2-азино-ди-(3-этилбензоаминосульфата); раствор, останавливающий окраску, – 1%-й раствор додецилсульфата натрия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод твердофазного непрямого «сэндвич»-варианта ИФА основан на взаимодействии исследуемого антигена вначале с адсорбированными на поверхности улавливающими антителами (специфическая поликлональная сыворотка кролика), а затем с детекторными антителами (специфическая поликлональная сыворотка крови морской свинки). Образовавшийся иммунный комплекс выявляли с помощью антител против IgG морской свинки, конъюгированных с пероксидазой хрена, и хромогенного субстрата.

Разработка непрямого «сэндвич»-варианта ИФА включала в себя получение специфических антител от лабораторных животных (кролики и морские свинки), подбор оптимального разведения улавливающих и детекторных антител, состава буферных растворов и условий постановки реакции.

Для получения специфических сывороток крови лабораторных животных использовали очищенный и концентрированный антиген вируса ЗУД КРС. Куль-

туральную жидкость, содержащую вирус, очищали от балластных белков и фрагментов клеток низкоскоростным центрифугированием при 4800 g в течение 40 мин, далее полученную надосадочную жидкость центрифугировали 1 ч 40 мин при 45 000 g. Осадок, образовавшийся после центрифугирования, растворяли в 10 мМ трис-HCl с 100 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА (TNE) буферном растворе и подвергали дальнейшему центрифугированию через слой 30%-й сахарозы при 106 000 g в течение 2,5 ч. Полученный осадок ресуспендировали в буферном растворе TNE в объеме 1/250 от первоначального, таким образом концентрируя в 250 раз. Антиген фасовали в криопробирки и хранили до использования при температуре –80 °С.

Для оценки специфичности очищенного вирусного антигена проводили постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Нуклеиновую кислоту выделяли из 100 мкл исследуемого биологического материала с помощью набора для выделения «РИБО-сорб» («НекстБио», г. Москва) согласно инструкции изготовителя. Постановку ПЦР-РВ проводили в соответствии с методическими указаниями [4].

Все тестируемые в ПЦР-РВ образцы антигенов вируса имели пороговое значение (Ct) меньше 35 и были в диапазоне от 17 до 23, что свидетельствует о высоком содержании вируса в препаратах (рис. 3).

Концентрацию белка в препаратах антигена вируса ЗУД КРС измеряли по методу Бредфорда с использованием стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина [2], она составила 0,5–1,0 мг/мл. Очищенный и концентрированный вирусный антиген был использован для получения специфических компонентов: гипериммунных сывороток кролика и морской свинки,



Рис. 2. Распространение заболевания в Российской Федерации

используемых в качестве улавливающих и детекторных антител в ИФА.

Рабочее разведение компонентов определяли в предварительных опытах путем постановки непрямого и прямого вариантов ИФА по блок-схеме («шахматный» порядок постановки). Реакцию ставили методом последовательных разведений начиная с разведения 1:2, внося по 100 мкл соответствующих разведений антигена в лунки полистиролового планшета (Nunc MaxiSorp, Дания) с предварительно адсорбированными в них улавливающими антителами. Затем связавшийся антиген выявляли с помощью детекторных антител. Все компоненты реакции добавляли в объеме 100 мкл, инкубировали при температуре 37 °С. Для иммобилизации улавливающих антител использовали 0,05 М карбонатно-бикарбонатный буфер (рН 9,5–9,6). Тестируемые и контрольные пробы, детекторные антитела, антивидовой конъюгат разводили в 1 М трис-НСl с 0,15 М NaCl буферном растворе, содержащем 0,05% Твин-20 и 1% сухого молока. Этот же буфер, но без добавления сухого молока применяли для межэтапных промывок. В качестве субстрата использовали готовый раствор АВТС (Sigma). Реакцию останавливали добавлением 1%-го раствора додецилсульфата натрия. Учет реакции проводили спектрофотометрически при длине волны 405 нм на ИФА-ридере Sunrise (Tecan, Австрия). Результат учитывали, регистрируя оптическую плотность (ОП) при длине волны 405 нм.

Титром антигена в испытуемом образце считали его последнее разведение, в котором величина ОП двукратно превышала ОП отрицательного контроля (реакция с нормальным антигеном).

Оптимальные разведения детекторных антител и антивидового конъюгата, определенные в пря-

мом варианте ИФА, составили соответственно 1:3000 и 1:500; рабочее разведение улавливающих антител, определенное путем постановки непрямого «сэндвич»-варианта ИФА, – 1:4000.

С использованием разработанной методики исследовано 50 образцов исходных культуральных антигенов вируса ЗУД КРС, а также вирусосодержащих суспензий, отобранных на различных этапах очистки и концентрирования. Для подтверждения результатов ИФА все исследованные пробы были тестированы методом ПЦР-РВ. Кроме того, для всех исследуемых материалов определяли титр инфекционной активности вируса методом титрования в культуре клеток ЯДК-04. Результаты частично представлены в таблице 1.

В результате изучения специфической активности установлено, что вирусосодержащие материалы (ЗУД КРС) были положительными в ИФА и имели титр в пределах 1:4–1:32 (табл. 1). Все пробы с титром инфек-

Рис. 3. Результаты выявления генома вируса ЗУД КРС в ПЦР-РВ

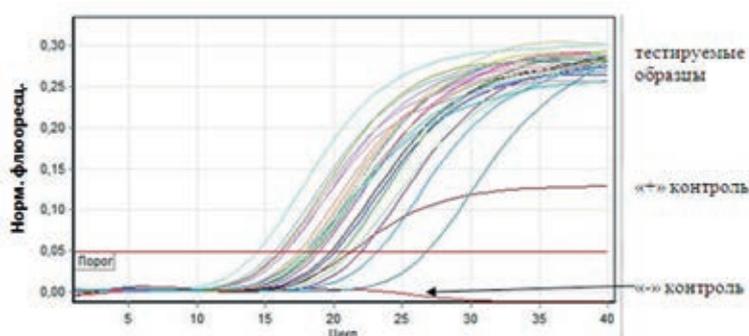


Таблица 1
Результаты выявления в ИФА антигена ЗУД КРС в вирусосодержащих суспензиях
n = 3

Характеристика исследуемого материала	Титр инфекц. активности вируса, ТЦД ₅₀ /см ³	ПЦР-РВ	Непрямой «сэндвич»-вариант ИФА	
			титр	результат
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 1 пас.	4,75	полож.	1:8	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 1 пас.	5,5	полож.	1:32	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 2 пас.	6,5	полож.	1:32	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 3 пас.	5,92	полож.	1:16	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 4 пас.	4,75	полож.	1:8	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 6 пас.	6,5	полож.	1:32	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 12 пас.	4,5	полож.	1:8	полож.
Вирусосодержащая культуральная суспензия, 13 пас.	4,5	полож.	1:16	полож.
Суспензия из узелков на семенниках	6,5	полож.	1:32	полож.
Суспензия из узелков на подгрудке	4,83	полож.	1:4	полож.
Суспензия из узелков на коже	3,5	полож.	1:16	полож.
Суспензия из узелков на коже	4,5	полож.	1:32	полож.
Суспензия из узелков на коже	3,5	полож.	1:2	сомнит.
Нормальный антиген (неинфицированная культура клеток)	отр.	отр.	< 1:2	отр.
Антиген ротавируса КРС	отр.	отр.	< 1:2	отр.
Антиген вирусной диареи КРС	отр.	отр.	< 1:2	отр.
Антиген вируса парагриппа-3 КРС	отр.	отр.	< 1:2	отр.

Полож. – положительный; отр. – отрицательный; сомнит. – сомнительный.

ционной активности 3,5–6,5 Ig ТЦД₅₀/см³ были положительными в ПЦР-РВ. Установлен позитивно-негативный порог значения результатов реакции: < 1:2 – отрицательно, 1:2 – сомнительно и ≥ 1:4 – положительно.

При определении специфичности тест-системы с различными гетерологичными антигенами (ротавируса, вирусной диареи, вируса парагриппа-3, коронавируса КРС, вируса ящура) получили отрицательный результат. Это свидетельствует о специфичности тест-системы.

Далее определяли аналитическую чувствительность твердофазного непрямого «сэндвич»-варианта ИФА. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Из данных таблицы 2 следует, что в логарифмической размерности оценка среднего контраста исследуемых величин имела показатель 3,910. Коэффициент вариации выборки составил 9,6%. Ошибка измерения среднего контраста была ± 0,240.

Это означает, что на одну оценочную единицу Ig T_{ИФА} в среднем приходилось 3,910 Ig ТЦД₅₀ (т. е. 8128 ТЦД₅₀). С учетом стандартной ошибки измерения данный показатель находился в границах 4677 ÷ 14 125 (ТЦД₅₀). Установленные величины характеризуют относительную чувствительность разработанной тест-системы.

На рисунке 4 представлена диаграмма разброса значений Ig T_{ИФА} (♦) соответственно величинам Ig ТЦД₅₀. Приведена регрессионная модель вида Ig T_{ИФА} = 0,219 (Ig ТЦД₅₀) ± 0,041, где Ig T_{ИФА} – прогнозируемая оценка титра в ИФА для заданного Ig ТЦД₅₀.

Коэффициент корреляции между показателями Ig T_{ИФА} и Ig ТЦД₅₀ составил R = 0,634, что по шкале Чеддока [3] соответствует заметному уровню связи.

Диагностическая специфичность теста составила 100%, а аналитическая чувствительность – 3,5 Ig ТЦД₅₀.

Разработанный «сэндвич»-вариант ИФА позволяет одновременно тестировать в формате 96-луночного планшета до 24 проб антигена в разведении 1:2–1:16.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в Российской Федерации разработана чувствительная и специфичная тест-система ИФА для выявления антигена вируса заразного узелково-

Рис. 4. Зависимость между инфекционным титром вируса (Ig ТЦД₅₀) и титром вирусного антигена в ИФА (Ig T_{ИФА})

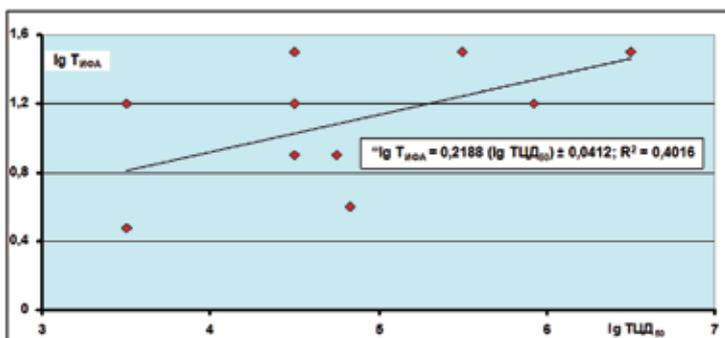


Таблица 2

Исследование связи между оценками Ig ТЦД₅₀ и Ig Т_{ИФА}

n = 3

Характеристика антигена	Титр, Ig ТЦД ₅₀ /см ³	Непрямой «сэндвич»-вариант ИФА, Ig Т _{ИФА}	Оценка контраста [d = (lg ТЦД ₅₀ /см ³) - (lg Т _{ИФА})]
Культуральный, 1 пас.	5,5 ± 0,1	1,505 ± 0,4	3,995 ± 0,12
Культуральный, 1 пас.	4,75 ± 0,2	0,903 ± 0,1	3,847 ± 0,36
Культуральный, 2 пас.	6,5 ± 0,5	1,505 ± 0,2	4,995 ± 0,24
Культуральный, 3 пас.	5,92 ± 0,4	1,204 ± 0,2	4,716 ± 0,21
Культуральный, 4 пас.	4,75 ± 0,5	0,903 ± 0,1	3,847 ± 0,26
Культуральный, 6 пас.	6,5 ± 0,2	1,505 ± 0,2	4,995 ± 0,36
Культуральный, 12 пас.	4,5 ± 0,1	0,903 ± 0,2	3,597 ± 0,23
Культуральный, 13 пас.	4,5 ± 0,3	1,204 ± 0,3	3,296 ± 0,21
Суспензия из узелков на семенниках	6,5 ± 0,2	1,505 ± 0,4	4,995 ± 0,36
Суспензия из узелков в области подгрудка	4,83 ± 0,1	0,602 ± 0,1	4,228 ± 0,45
Суспензия из узелков на коже в области шеи	3,5 ± 0,1	1,204 ± 0,4	2,296 ± 0,24
Суспензия из узелков на коже (Дагестан, с. Камилух)	3,5 ± 0,1	0,477 ± 0,3	3,023 ± 0,22
Суспензия из узелков на коже (Дагестан, с. Барнаб)	4,5 ± 0,2	1,505 ± 0,2	2,995 ± 0,20
Среднее значение контраста (± m)			3,910 ± 0,240

го дерматита КРС, позволяющая в течение 24 ч провести исследование биоматериала. Разработанная тест-система может быть использована сотрудниками научно-исследовательских учреждений и ветеринарных лабораторий для диагностики заразного узелкового дерматита КРС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Видовая и штаммовая дифференциация капприпоксвирусов методом полимеразной цепной реакции / Е. С. Орлова, А. В. Щербаков, В. И. Диев, В. М. Захаров // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 158–164.
2. Гуненков В. В. Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота // Сборник науч. тр. ВГНКИ. – М., 2005. – Т. 66. – С. 46–54.
3. Методические рекомендации по анализу параметров в системах «доза-эффект» с альтернативным способом оценивания / В. Ю. Кулаков, С. Н. Колосов, А. В. Константинов [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2016. – 31 с.
4. Методические указания по выявлению ДНК полевых изолятов вируса заразного узелкового дерматита (нодулярного дерматита) КРС с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени: утв. Россельхознадзором 13.09.17 / МУ 35-17; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2017. – 11 с.
5. Мищенко В. А. Современная ситуация по инфекционным болезням КРС в России // Актуальные ветеринарные аспекты молочного и мясного животноводства: материалы международной конференции, 23–24 апреля 2015 г. – М., 2015. – С. 1–6.
6. Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of lumpy skin diseases in cows / W. S. Awad, A. K. Ibrahim, K. Mahran [et al.] // Trop. Anim. Health Prod. – 2010. – Vol. 42, No. 4. – P. 777–783; doi: 10.1007/s11250-009-9486-5.
7. Kitching R. P. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox // Vaccines for OIE list A and emerging animal diseases / ed. F. Brown, J. A. Roth // Dev. Biol. (Basel). – 2003. – Vol. 114. – P. 161–167.
8. Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle / S. Babiuk, T. R. Bowden, G. Parkyn [et al.] // Transbound. Emerg. Dis. – 2008. – Vol. 55, No. 7. – P. 299–307; doi: 10.1111/j.1865-1682.2008.01024.x.

9. The novel Capripoxvirus vector lumpy skin disease virus (LSDV) efficiently boosts MVA HIV responses in rhesus macaques / W. A. Burgers, Z. Ginbot, Y.-J. Shen [et al.] // J. Gen. Virol. – 2014. – Vol. 95. – P. 2267–2272; doi: 10.1099/vir.0.067835-0.

REFERENCES

1. Species and strain differentiation of capripoxviruses using PCR. Ye. S. Orlova, A. B. Scherbakov, V. I. Diyev, V. M. Zakharov. *Molecular Biology*. 2006; 40 (1): 158–164 (in Russian).
2. Gunenkov V. V. Lumpy skin disease. *Sbornik nauch. tr. VGNKI*. M., 2005; 66: 46–54 (in Russian).
3. Methodical recommendations for analysis of parameters in “dose-effect” systems using an alternative assessment method. V. Yu. Kulakov, S. N. Kolosov, A. V. Konstantinov [et al.]; FGBU “ARRIAH”. Vladimir, 2016 (in Russian).
4. Methodical instructions for isolating DNA of LSD field isolates using RT-PCR: approved by the Rosselkhoz nadzor 13.09.17. MU 35-17; FGBU “ARRIAH”. Vladimir, 2017 (in Russian).
5. Mischenko V. A. Contemporary situation of bovine infectious diseases in Russia. Topical veterinary issues of dairy and meat livestock production: materials of the international conference, April 23–24, 2015. M., 2015: 1–6 (in Russian).
6. Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of lumpy skin diseases in cows / W. S. Awad, A. K. Ibrahim, K. Mahran [et al.]. *Trop. Anim. Health Prod.* 2010. Vol. 42 (4): P. 777–783; doi: 10.1007/s11250-009-9486-5.
7. Kitching R. P. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox // *Vaccines for OIE list A and emerging animal diseases* / ed. F. Brown, J. A. Roth. *Dev. Biol. (Basel)*. 2003. Vol. 114: P. 161–167.
8. Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle / S. Babiuk, T. R. Bowden, G. Parkyn [et al.]. *Transbound. Emerg. Dis.* 2008. Vol. 55 (7): P. 299–307; doi: 10.1111/j.1865-1682.2008.01024.x.
9. The novel Capripoxvirus vector lumpy skin disease virus (LSDV) efficiently boosts MVA HIV responses in rhesus macaques / W. A. Burgers, Z. Ginbot, Y.-J. Shen [et al.]. *J. Gen. Virol.* 2014. Vol. 95: P. 2267–2272; doi: 10.1099/vir.0.067835-0.

Поступила 05.06.18

Принята в печать 20.07.18