

## БОЛЕЗНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА CATTLE DISEASE

УДК 619:578.821.2:57.082.26

# ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММА ВИРУСА НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА – ВНД КРС/ДАГЕСТАН/2015

**С. В. Кононова<sup>1</sup>, О. П. Бьядовская<sup>2</sup>, А. В. Кононов<sup>3</sup>, И. Н. Шумилова<sup>4</sup>, Е. Е. Артюхова<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kononova@arriah.ru

<sup>2</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

<sup>3</sup> Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kononov@arriah.ru

<sup>4</sup> Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kononova@arriah.ru

<sup>5</sup> Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: artuhova@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

Представлены материалы по изучению иммунобиологических свойств нового штамма вируса нодулярного дерматита крупного рогатого скота – ВНД КРС/Дагестан/2015. В ходе проведенных исследований установлено, что полученный штамм обладает высокой биологической активностью, свободен от контаминации чужеродными биологическими агентами, является типоспецифическим и по своим иммунобиологическим характеристикам соответствует паспортным данным и требованиям, предъявляемым к штаммам вирусов, используемых для изготовления вакцин и диагностических препаратов.

Ключевые слова: вирус нодулярного дерматита, культура клеток, инфекционная активность.

UDC 619:578.821.2:57.082.26

# IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF LUMPY SKIN DISEASE VIRUS STRAIN LSD CATTLE/DAGESTAN/2015

**S. V. Kononova<sup>1</sup>, O. P. Byadovskaya<sup>2</sup>, A. V. Kononov<sup>3</sup>, I. N. Shumilova<sup>4</sup>, E. E. Artyukhova<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Senior researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: kononova@arriah.ru

<sup>2</sup> Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

<sup>3</sup> Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: kononov@arriah.ru

<sup>4</sup> Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: kononova@arriah.ru

<sup>5</sup> Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: artuhova@arriah.ru

### SUMMARY

Data on the study of immunobiological properties of a novel lumpy skin disease virus strain LSD Cattle/Dagestan/2015 are presented in the paper. In the course of the research it was found that the obtained strain is biologically active, free from contamination with foreign biological agents. It is type specific and with its immunobiological characteristics meets the standards and requirements set before virus strains used for vaccine and diagnostic production.

Key words: lumpy skin disease virus, cell culture, infectivity.

## ВВЕДЕНИЕ

Нодулярный дерматит (заразный узелковый дерматит, кожно-узелковая сыпь, лоскутная болезнь кожи, кожная бугорчатка) – контагиозная инфекционная болезнь, характеризующаяся персистентной лихорадкой, поражением лимфатической системы, отеками подкожной клетчатки внутренних органов, образованием кожных узлов (бугорков), поражением глаз и слизистых оболочек органов дыхания и пищеварения [2, 5].

Возбудитель – ДНК-содержащий оболочечный вирус, имеет антигенное родство со штаммами вирусов, вызывающих оспу у овец и коз, которые отличаются на генетическом уровне и вместе с ним образуют самостоятельный род *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae* [3].

Нодулярный дерматит (НД) крупного рогатого скота (КРС) относят к особо опасным болезням животных, способным вызывать эпизоотии и наносить значительный экономический ущерб. В соответствии с новой классификацией включен в список болезней МЭБ, подлежащих обязательному уведомлению (нотификации), в категорию «Болезни и инфекции крупного рогатого скота» [1, 4].

В настоящее время НД КРС имеет широкое распространение в странах Африканского континента, Ближнего Востока, Турции, Ираке, Азербайджане. Отмечено появление заболевания в Греции, Сербии, Болгарии, Македонии [6].

В течение длительного времени Россия оставалась благополучной по данному заболеванию. Однако в 2015 г. первые случаи НД КРС в России были зарегистрированы на территории Республики Дагестан и Чеченской Республики.

25 мая 2016 г. НД КРС вновь зарегистрирован в России, на территории Краснодарского края. С 29 мая по 12 июня на территории Республики Дагестан выявлено 15 очагов данного заболевания, на фермах, где содержалось в общей сложности 36 645 животных [7].

Приведенные данные указывают, что угроза появления НД КРС в других регионах РФ и его дальнейшого распространения крайне велика, что может вызвать серьезные социально-экономические последствия для отечественного животноводства.

Поэтому необходимо иметь высокоэффективные диагностические препараты и средства специфической профилактики, которые в короткие сроки позволили бы идентифицировать возбудитель НД КРС и быстро купировать распространение инфекции. Это обстоятельство требует постоянного поиска новых штаммов, пригодных для изготовления средств диагностики и специфической профилактики НД КРС.

Целью настоящего исследования являлось определение иммунобиологических свойств штамма

ВНД КРС/Дагестан/2015, предлагаемого для изготовления биопрепаратов, и их контроль при диагностике и специфической профилактике НД КРС.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусный изолят, послуживший источником для получения штамма ВНД КРС/Дагестан/2015, был выделен в 2015 г. на территории Республики Дагестан от коров, больных НД КРС.

Штамм ВНД КРС/Дагестан/2015 получен путем последовательных пассажей исходного изолята в культуре клеток тестикул ягненка (ТЯ) в референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Изучение иммунобиологических свойств данного штамма, предлагаемого для диагностики и специфической профилактики НД КРС, проводили согласно программе проведения комиссионных испытаний по депонированию штамма ВНД КРС/Дагестан/2015.

Контроль отсутствия контаминации бактериями, грибами и микоплазмами проводили в соответствии с ГОСТ 28085-13 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности».

Контроль отсутствия контаминации посторонними вирусами и микоплазмами проводили методами полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Контроль биологической активности и стабильности штамма осуществляли в культуре клеток ТЯ (ЯДК-04) методом микротитрования при использовании десятикратных разведений (от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ ) вирусосодержащего материала на среде ПСП с содержанием 1–2% фетальной сыворотки КРС. Для контроля стабильности вирусосодержащий материал репродуцировали в течение пяти последовательных пассажей в культуре клеток ЯДК-04 и ТЯ. Расчет инфекционной активности проводили по методу Рида и Менча и выражали в  $Ig\ TCD_{50}/cm^3$ .

Определение специфичности и видовой принадлежности штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 проводили в реакции микронейтрализации (РМН), а также методом ПЦР и секвенирования.

Постановку РМН проводили в 96-луночных планшетах, используя штамм ВНД КРС/Дагестан/2015 в последовательных десятикратных разведениях и гипериммунную сыворотку крови кролика. В качестве контроля использовали нормальную сыворотку крови животных. Реакцию учитывали через пять-шесть суток после внесения суспензии клеток по мере развития цитопатического действия (ЦПД) вируса в контрольных лунках, не содержащих исследуемые сыворотки. Титром сыворот-

**Таблица 1**  
Биологическая активность штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 при титровании в культуре клеток ЯДК-04

№ образца	Разведение вируса						Титр вируса, $Ig\ TCD_{50}/cm^3$	Средний титр, $Ig\ TCD_{50}/cm^3$
	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$		
1	++++	++++	+++	+++	---	---	4,77	
2	++++	++++	++++	+++	---	---	5,33	
3	++++	++++	++++	+++	---	---	5,00	

«+» – наличие цитопатического действия; «-» – отсутствие цитопатического действия.

**Таблица 2**  
Стабильность штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 при репродукции в культурах клеток

№ пассажа	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	
	ЯДК-04	ТЯ
1	5,00	5,00
2	5,17	5,00
3	5,00	5,33
4	5,12	5,17
5	5,00	5,50

**Таблица 3**  
Результаты титрования штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 в присутствии специфической и нормальной сыворотки крови кролика

Разведение вируса	Специфическая сыворотка крови	Нормальная сыворотка крови
10 <sup>-1</sup>	4/4	4/4
10 <sup>-2</sup>	3/4	4/4
10 <sup>-3</sup>	1/4	4/4
10 <sup>-4</sup>	0/4	2/4
10 <sup>-5</sup>	0/4	2/4
10 <sup>-6</sup>	0/4	2/4
Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	2,05	5,00

Числитель – количество лунок, в которых наблюдали цитопатическое действие вируса; знаменатель – количество зараженных лунок.

ки считали предельное ее разведение, в котором отсутствует тормозящее ЦПД вируса.

Реакцию проводили в трех повторностях. Индекс нейтрализации (ИН) рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{ИН} = \frac{T_{AS+SN}}{T_{AS+SS}}$$

где  $T_{AS+SN}$  – титр вируса в присутствии нормальной сыворотки;

$T_{AS+SS}$  – титр вируса в присутствии специфической сыворотки.

**Таблица 4**  
Результаты исследования антигенной активности штамма ВНД КРС/Дагестан/2015

№ животного	Титр антител в РМН			
	до заражения	на 14-е сутки	на 21-е сутки	на 28-е сутки
1	<1:2	1:2	1:16	1:64
2	<1:2	1:2	1:4	1:4
3	<1:2	1:4	1:8	1:8
4	<1:2	1:8	1:8	1:8
5	<1:2	1:2	1:8	1:8

Способ заражения:

№ 1 – культуральной суспензией внутривенно; № 2, 3 – суспензией пат. материала внутрикожно; № 4, 5 – культуральной суспензией внутрикожно.

Определение специфичности проводили согласно «Методическим указаниям по обнаружению и видовой дифференциации каприплексвирусов с использованием мультиплексной полимеразной цепной реакции». При этом из вирусосодержащего материала выделяли ДНК. Методом ОТ-ПЦР амплифицировали специфический фрагмент ДНК длиной 254 пары нуклеотидов с праймерами, специфичными для вируса НД.

Дополнительно видовую принадлежность штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 подтверждали секвенированием, определяя нуклеотидную последовательность фрагмента открытой рамки считывания 026 (ОРС-026).

Антигенную активность штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 определяли на пяти быках. Для этого использовали суспензию патологического материала (узлы на коже) от клинически больных животных, а также суспензию вируса, полученную после проведения четырех пассажей в культуре клеток ТЯ с титром инфекционной активности 5,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Суспензию патологического материала готовили стандартным способом и вводили внутрикожно в области средней трети шеи первому животному в объеме 5,0 см<sup>3</sup>, второму – 10,0 см<sup>3</sup>. В дальнейшем двум другим животным вводили культуральную вирусосодержащую суспензию в области средней трети шеи с обеих сторон: первому животному по 5,0 см<sup>3</sup>, второму – по 10,0 см<sup>3</sup>. Также проводили внутривенное заражение одного животного культуральной суспензией.

До введения вируса, а также через 14, 21, 28 суток после введения вирусосодержащей суспензии у животных отбирали пробы крови для получения сыворотки, в которой определяли титр вируснейтрализующих антител. За зараженными животными наблюдали в течение 28 суток.

Вируснейтрализующую активность антител в сыворотках крови определяли в РМН. С этой целью готовили двукратные разведения испытуемых сывороток, к которым добавляли равные объемы вирусосодержащего культурального материала, содержащего 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,05 см<sup>3</sup>. Смеси вируса с сывороткой выдерживали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С в течение одного часа, после чего во все лунки планшета вносили суспензию культуры клеток ЯДК-04 и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор с содержанием 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37 °С на 96–120 ч. Результаты реакции учитывали с использованием инвертированного микроскопа, регистрируя лунки с выраженным ЦПД вируса и/или с цельным неповрежденным монослоем. При постановке РМН использовали контроли на

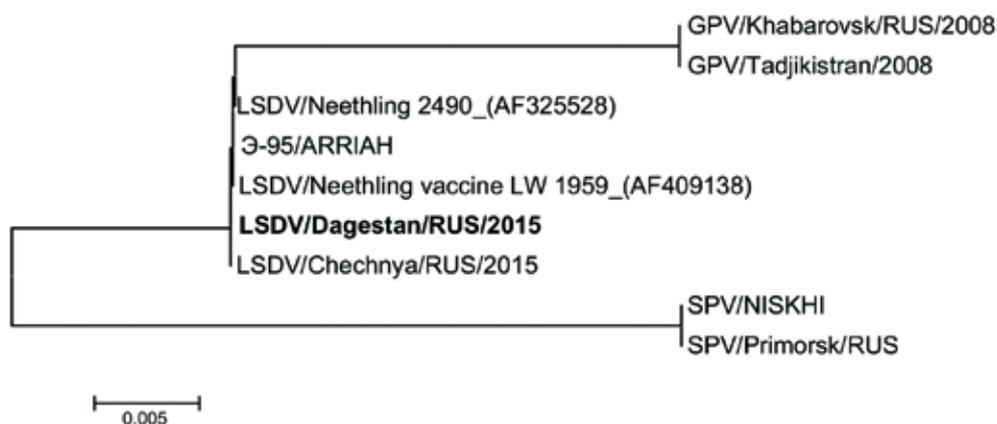


Рис. Положение штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 на филогенетическом древе каприпоксвирусов. Дендрограмма основана на сравнении нуклеотидных последовательностей фрагмента OPC-026

токсичность сывороток, культуры клеток и дозы вируса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Контроль отсутствия контаминации чужеродными вирусами и микоплазмами проводили с помощью ПЦР. Результатом проведенных исследований было подтверждение наличия в исследуемых образцах генома вируса НД КРС и отсутствия геномов вирусов оспы КРС, оспы овец, оспы коз, инфекционного ринотрахеита КРС, вирусной диареи КРС, парагриппа-3 КРС, рота-, корона-вирусных инфекций КРС и микоплазм.

Биологическая активность штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 при титровании вирусосодержащей суспензии в культуре клеток ЯДК-04 составляла  $5,03 \pm 0,23 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  (табл. 1).

Контроль стабильности штамма определяли в течение пяти последовательных пассажей в культурах клеток ЯДК-04 и ТЯ. Результаты представлены в таблице 2.

Установлено, что штамм ВНД КРС/Дагестан/2015 проявлял стабильную биологическую активность, которая находилась в пределах  $5,0-5,17 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  (ЯДК-04) и  $5,0-5,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  (ТЯ).

Определение специфичности и видовой принадлежности штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 проводили в реакции микронейтрализации (РМН) (табл. 3), а также методом ПЦР и секвенирования (рис.).

Из данных таблицы 3 видно, что цитопатический эффект вируса со специфической сывороткой крови наблюдали в разведениях вируса от  $10^{-1}$  до  $10^{-3}$ , титр вируса составлял  $2,05 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . В лунках, куда вносили вирус с нормальной сывороткой, титр вируса составлял  $5,00 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

Индекс нейтрализации составил  $2,44 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , что свидетельствует о соответствии исследуемого штамма вирусу НД КРС.

Видовую принадлежность штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 к вирусу НД подтверждали методом дифференциации каприпоксвирусов, основанным на ПЦР. Из вирусосодержащего материала выделяли ДНК. Проводили мультиплексную ПЦР с тремя парами праймеров, специфичными для ВНД, вируса оспы овец (ВОО) и вируса оспы коз (ВОК). В результате филогенетического анализа был получен специфический фрагмент ДНК длиной 254 пары нуклеотидов с праймерами, специ-

фичными для ВНД. С двумя другими парами праймеров, специфичных для ВОО и ВОК, в ПЦР был получен отрицательный результат.

Дополнительно видовую принадлежность штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 подтверждали секвенированием. Была определена нуклеотидная последовательность фрагмента OPC-026, и проведен ее сравнительный анализ. Он показал, что по первичной структуре OPC-026 штамм ВНД КРС/Дагестан/2015 идентичен изолятам и штаммам вируса НД КРС, представленным в международной базе данных GenBank и базе генетических данных ФГБУ «ВНИИЗЖ» (рис.).

При определении антигенной активности штамма ВНД КРС/Дагестан/2015 были получены следующие результаты: титр вируснейтрализующих антител в сыворотках крови КРС на 28-е сутки после заражения животных вирусосодержащим материалом находился в пределах 1:4–1:64 (табл. 4).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Штамм ВНД КРС/Дагестан/2015 обладает высокой биологической активностью, свободен от контаминации чужеродными биологическими агентами, удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к штаммам, предназначенным для изготовления средств диагностики и специфической профилактики. После изучения иммунобиологических свойств данный штамм депонирован под номером «ВНД КРС/Дагестан/2015» в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ», используемых в ветеринарии и животноводстве.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Петрова О. Н, Караулов А. К. Анализ ситуации по нодулярному дерматиту и идентификация опасности его распространения в Российской Федерации // БИО. – 2016. – № 1–2. – С. 24–29.
- Проблема нодулярного дерматита крупного рогатого скота / В. А. Мищенко, А. В. Мищенко, А. В. Конов [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2015. – № 5. – С. 3–6.
- Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of lumpy skin diseases in coves / W. S. Awad [et al.] // Trop. Anim. Health Prod. – 2010. – Vol. 42. – P. 777–783.
- Lumpy skin disease // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – 2012. – Vol. 1, Chap. 2.4.14. – P. 762–774.
- Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel, July 2006 / J. Brenner, M. Haimovitz, E. Oron [et al.] // Isr. J. Vet. Med. – 2006. – Vol. 61. – P. 73–77.
- [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary).
- <http://www.fsvps.ru/fsvps/iac/messages/2169.html>.