

# КУЛЬТУРАЛЬНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЯ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ВЫДЕЛЕННОГО НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2015 ГОДУ

А.В. Кононов<sup>1</sup>, С.В. Коконова<sup>2</sup>, И.Н. Шумилова<sup>3</sup>, А.А. Нестеров<sup>4</sup>,  
А.В. Шишков<sup>5</sup>, В.И. Диев<sup>6</sup>, Р.В. Яшин<sup>7</sup>, А.В. Мищенко<sup>8</sup>

<sup>1</sup> заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kononov@arriah.ru

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

<sup>3</sup> ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mail@arriah.ru

<sup>4</sup> младший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: nesterov@arriah.ru

<sup>5</sup> младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shishkov@arriah.ru

<sup>6</sup> доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: diev@arriah.ru

<sup>7</sup> заведующий виварным комплексом, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: yashin@arriah.ru

<sup>8</sup> заместитель директора, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир e-mail: mischenko@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

В статье представлены данные по изучению свойств вируса нодулярного дерматита, адаптированного к культурам клеток гонады козы и тестикул ягненка. Экспериментальное заражение крупного рогатого скота полученным штаммом вируса нодулярного дерматита вызывает генерализованную форму инфекции.

Ключевые слова: вирус нодулярного дерматита, культура клеток, инфекционная активность, патологический материал, подкожная клетчатка, клинические признаки, генерализация.

## ВВЕДЕНИЕ

Нодулярный дерматит (заразный узелковый дерматит) — контагиозная вирусная инфекция, характеризующаяся повышением температуры тела, появлением бугорков на коже, слизистых оболочках внутренних органов, увеличением лимфатических узлов, отеками подкожной клетчатки [1, 3].

В настоящее время нодулярный дерматит имеет широкое распространение в странах Африканского континента, Ближнего Востока, в Турции, Ираке, Азербайджане. Отмечено появление заболевания в Греции, Сербии, Болгарии, Македонии [10].

Первая вспышка нодулярного дерматита крупного рогатого скота (НД КРС) в Российской Федерации была выявлена в июле 2015 г. в Республике Дагестан. К концу 2015 г. в РФ зарегистрировано 17 очагов болезни в 3 субъектах: в Республике Дагестан (11 очагов), Чеченской Республике (4 очага) и Республике Северная Осетия (2 очага).

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 36 645 животных [4, 9].

Болезнь наносит значительный экономический ущерб в скотоводстве, так как вызывает существенное снижение удоя молока, потерю живой массы тела. У стельных животных отмечают аборт, быки могут стать временно или постоянно бесплодными.

При генерализованной форме болезни на теле животного появляются нодулы (бугры, узелки) диаметром 2–7 см, особенно на голове, шее, вымени и в промежности. На отдельных участках тела происходит слияние узелков и образование язв. Пораженные участки кожи болезненны [3].

Источником инфекции являются больные животные, переболевшие и скрытые вирусоносители. Вирус выделяется через пораженные кожные покровы, слюной, истечениями из носовой полости и глаз, спермой, молоком. Согласно «Кодексу здоровья наземных животных» МЭБ, инкубационный период при НД КРС определен в 28 дней [1].

Для специфической профилактики НД КРС используют гомологичную или гетерологичную аттенуированную вирус-вакцину из вируса оспы овец и/или оспы коз.

Для выделения и культивирования вируса НД КРС используют культуру тестикулярной и почечной ткани телят и овец, фетальные культуры клеток почки и кожи кролика, линии клеток взрослой мартышки и линии клеток почки сирийского хомячка. Также применяют куриные эмбрионы, в которых вирус размножается в теле эмбриона и на хорионаллантоисной оболочке, образуя оспины. Основным проявлением цитопатического действия вируса на чувствительных клетках является округление клеток и отторжение пораженных участков монослоя от стекла. Через 72–96 ч монослой клеток почти полностью разрушается [8].

Установлена возможность воспроизведения инфекции при экспериментальном заражении естественно восприимчивых к НД животных путем введения им вирусосодержащего материала, полученного из подкожной клетчатки, подгрудка, семенников больных животных и на перевиваемой культуре клеток гонады козы. При этом заболевание в основном протекает в тяжелой форме с наличием характерных клинических признаков [2].

По данным литературных источников, для проведения лабораторных исследований биологических свойств возбудителя НД используют экспериментальное заражение естественно восприимчивых животных. Часть авторов рекомендует проводить заражение путем подкожного введения инфекционного агента [1, 2, 5, 6], в то время как другие используют внутривенный путь введения вируса [7, 8].

При этом необходимо отметить, что по причине вариабельности ответной реакции КРС на экспериментальное заражение НД у контрольных животных может не наблюдаться генерализованной формы болезни, хотя может быть сильная местная реакция [1].

Целью настоящей работы было исследование возможности адаптации вируса НД КРС к линиям перевиваемых культур клеток, определение степени накопления вируса в данных клеточных системах, а также

изучение вирулентных свойств полученного штамма для крупного рогатого скота.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Патологический материал был получен на территории Республики Дагестан в 2015 г. Материал отбирали от больного НД КРС из мест поражения кожи. Для адаптации вируса НД к культурам клеток (КК) использовали 10% суспензию, приготовленную из полученного патологического материала, и перевиваемые КК: ЯДК-04 (перевиваемая линия КК гонады козы), ТЯ (субкультура тестикул ягненка) и ТК (субкультура клеток тестикул козленка).

Монослойную КК заражали с адсорбцией вируса на клетках в течение 1 ч при (37±1)°С, с последующим внесением поддерживающей среды ПСП с добавлением 1–2% сыворотки крови КРС. Предварительно КК отмывали от ростовой среды раствором Хенкса. Сбор вируса проводили при появлении цитопатического действия (ЦПД) на 80–90% площади монослоя. Полученный вирус хранили при температуре минус (80±1)°С.

Репродуктивную способность вируса оценивали по времени ЦПД, интенсивности его развития и накоплению. Определение инфекционной активности вируса НД осуществляли путем микротитрования в КК ЯДК-04 общепринятым методом. Титр вируса высчитали по методу Рида и Менча и выражали в Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Изучение биологических свойств возбудителя и клинических признаков НД КРС проводили путем введения вирусосодержащего материала 12 головам КРС (быки черно-пестрой породы весом 270–300 кг) в различных дозах заражения. Для этого использовали суспензию патологического материала от клинически больных животных, а также суспензию вируса, полученную после проведения 4 пассажей на КК ТЯ с титром инфекционной активности 5,0 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Животных разделили на три группы. Животным 1 группы вводили внутривенно очищенную культуральную жидкость в объеме 2 см<sup>3</sup>, 2 группы — подкожно в области средней трети шеи в объеме 10 см<sup>3</sup>, 3 группы — суспензию патологического материала в объеме 10 см<sup>3</sup>, подкожно в область средней трети шеи.

За зараженными животными вели наблюдение в течение 28 суток. При этом ежедневно проводилась термометрия и регистрация клинических признаков данного заболевания, а также отбор проб биоматериала (стабилизированная кровь и выделения из носовой полости).

На 29 сутки после заражения была произведена эвтаназия животных для дальнейшего исследования патологических изменений внутренних органов, подкожных поражений и отбора проб биологического материала.

Специфичность заболевания животных НД КРС подтверждали постановкой и исследованиями проб биоматериала методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и вирусовыделения на КК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований изучали чувствительность КК к вирусу НД КРС, результаты адаптации вируса НД КРС к КК представлены в таблице.

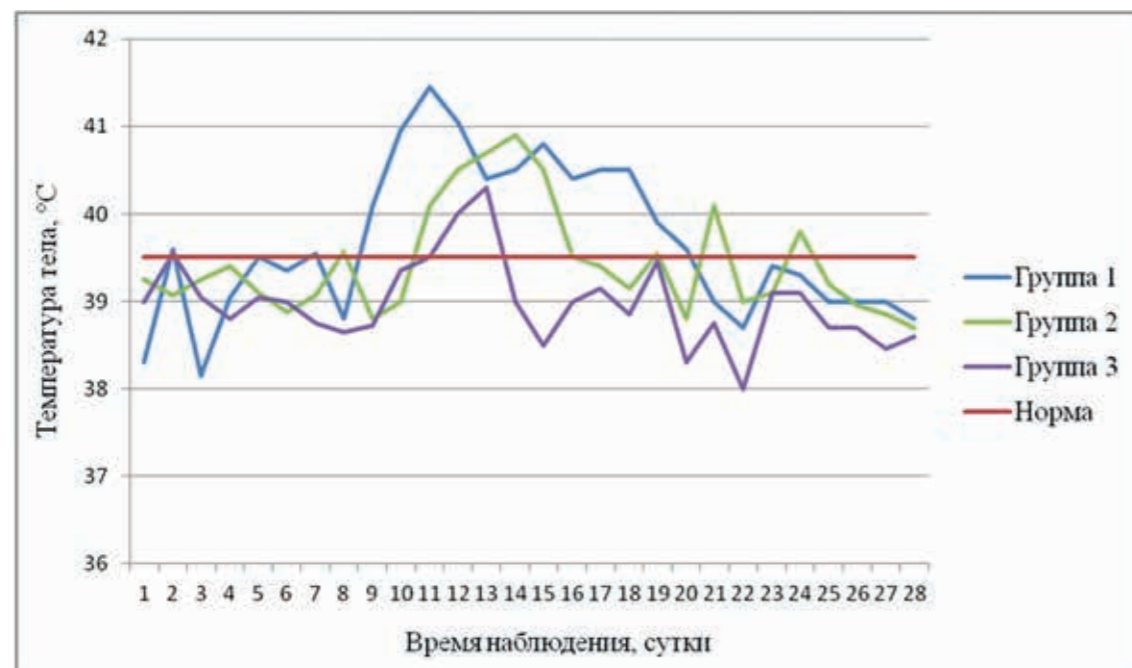
Из данных таблицы видно, что наиболее чувствительными системами для культивирования вируса НД КРС являются КК ЯДК-04 и ТЯ. Заражение 24–48-часо-

**Таблица**  
Результаты адаптации вируса нодулярного дерматита КРС к культурам клеток

Культура клеток	Кол-во пассажей	Время культивирования, ч	Титр инфекционной активности, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>
ЯДК-04	1	144-168	3,0
	2	120	4,0
	3	72	4,0
	4	48	4,5
	5-13	48	5,0
ТЯ	1	168	3,5
	2-4	48	4,0
	5	48	4,5
	6	48	5,5
	7-9	48	5,0
	10	72	5,0
	11-13	72	4,5
ТК	1	168	1,5
	2	120	отр.
	3	120	отр.

вой КК вирусосодержащей суспензией, приготовленной из патологического материала, вызывало специфическую дегенерацию клеток монослоя в виде их округления, частичного отслоения от стекла и по-

Рис. 1. Изменение температуры тела животных (среднее по группам)



явления крупных конгломератов. При этом на уровне 2-3 пассажей вирус вызывал ЦПД на площади 70-80% уже через 48-72 ч культивирования. Титр вируса был в пределах 4,0 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. К 5-6 пассажу инфекционная активность вируса увеличилась до 5,0-5,5 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

После проведения 9 пассажа в КК ТЯ сроки специфической дегенерации клеток увеличились до 72 ч, выявлялось некоторое снижение титра инфекционной активности вируса до 4,0-4,5 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

В КК ЯДК-04 активность вируса НД КРС в течение 5-11 пассажей находилась на одном уровне и составляла 5,0 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

КК ТК оказалась непригодной для получения вирусной суспензии.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что КК ЯДК-04 и ТЯ являются чувствительной и эффективной системой для получения суспензии с высокой концентрацией вируса и могут быть использованы для проведения дальнейших исследований.

Результаты исследований послужили основанием для депонирования штамма вируса НД КРС в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») под регистрационным номером (ссылкой) «ВНД/Дагестан/2015 (диагностический)».

Следующей целью исследований являлось изучение клинических признаков НД, возникающих у естественно восприимчивых животных при введении вирусосодержащего материала, приготовленного на основе полученного штамма.

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что у животных 1 группы на 9 сутки после заражения было отмечено повышение температуры тела до 40,0°C и выше, через 11 суток температура снижалась до верхней границы нормы. Одновременно с развитием гипертермии у животных наблюдали появление серьезных истечений из носовой полости и первых клинических признаков инфекции (угнетение, отказ от корма).

У животных 2 и 3 групп повышение температуры тела до 40,9 и 40,3°C регистрировали на 11 и 12 сутки после заражения соответственно (рис. 1).

На 9-10 сутки после заражения у животных 1 группы отмечали проявление розеол размером от 0,5 до 2,5 см круглой, овальной или неправильной формы в области промежности, на внутренней поверхности бедер, отечность мошонки, единичные уплотнения (рис. 2). Необходимо отметить, что при проявлении первых клинических признаков инфекции у животных 1 группы отмечалось повышение температуры тела и серозные выделения из носовой полости. При исследовании проб смывов из носовой полости методом ПЦР был выявлен геном вируса НД КРС. Период виремии составлял 9-18 суток с момента заражения животных.

На 11-12 сутки на всем теле животных (круп, задние конечности, в области спины и на голове) было отмечено появление уплотнений и небольших нодул размером от 0,5 до 2 см, отеков в области запястных и локтевых суставов.

На 14 сутки количество нодул увеличилось в 2-3 раза. Они были круглой, овальной и неправильной формы (размер от 1 до 4 см) и локализовались по всему телу. В отдельных местах нодулы объединялись и образовывали конгломераты размером до 5-6 см. Конъюнктив глаза была гиперемирована. Поверхностные лимфатические узлы (предлопаточный, подчелюстной, подколенный и в области паха) были увеличены примерно в 1,5 раза. Животные были угнетены, отказывались от корма.

На 20 сутки было отмечено снижение температуры тела до 39,0°C. На месте образования первых нодул в области морды, мошонки и внутренней поверхности бедра происходило образование струпуев (рис. 3).

В результате патологоанатомического вскрытия животных было установлено: множественные поражения

в подкожной клетчатке в области крупа, поясничной области и спины, характеризующиеся образованием изъязвлений различного диаметра (рис. 4); заглочные, поверхностные шейные и лимфатические узлы коленной складки были увеличены и гиперемированы (рис. 5); на слизистой оболочке пищевода и трахеи имелись незначительные изъязвления до 0,5 см (рис. 6, 7).

У животных 2 группы на 5 сутки после заражения на месте введения образовывались болезненные уплотнения в области подкожной клетчатки размером 7-8 см, при этом на 14 сутки их размер увеличивался до 12-13 см. Поверхностные лимфатические узлы также были увеличены. На 18 сутки уплотнения на месте введения уменьшались до 6-8 см без развития характерных клинических признаков инфекции до конца наблюдения.

При патологоанатомическом вскрытии животных 2 группы было выявлено увеличение заглочных, поверхностных шейных лимфатических узлов. На слизистой оболочке трахеи имелись множественные кровоизлияния (рис. 8). На месте введения вирусосодержащей суспензии отмечены участки поражения ткани с признаками некроза (рис. 9). В области головы и предгрудинной области подкожная клетчатка была отечна.

У животных 3 группы на 6-7 сутки после заражения на месте введения образовывались уплотнения в области подкожной клетчатки размером 5-6 см, на 14 сутки их размер увеличивался до 10-11 см. Поверхностные лимфатические узлы также были увеличены. На 18 сутки уплотнения на месте введения уменьшались до 6-8 см без развития характерных клинических признаков инфекции до конца наблюдения.

При патологоанатомическом вскрытии животных третьей группы было выявлено увеличение заглочных, поверхностных шейных лимфатических узлов. На

Рис. 2. Отечность мошонки, розеола в области мошонки и промежности размером от 0,5 до 2,5 см



Рис. 3. Множественные уплотнения, струпея в области головы

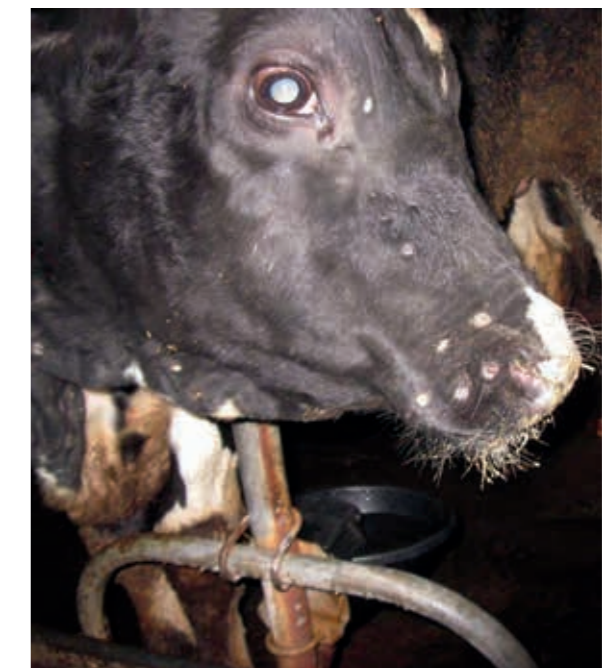






Рис. 4. Множественные изъязвления в области спины и поясницы

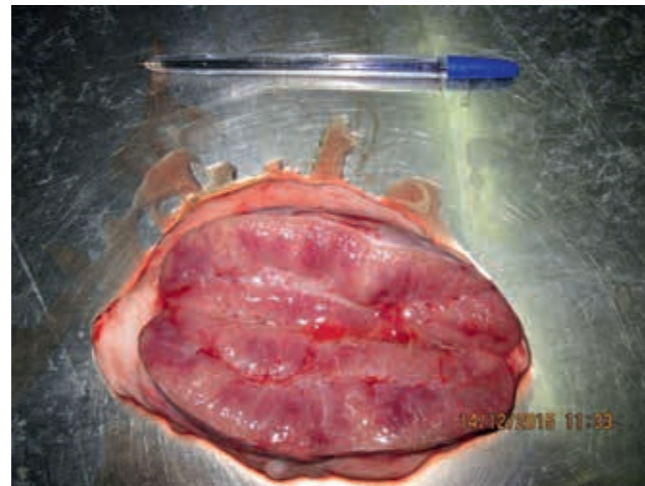


Рис. 5. Поражение поверхностного шейного лимфатического узла



Рис. 6. Поражения слизистой оболочки пищевода



Рис. 7. Поражения слизистой оболочки трахеи

слизистой оболочке пищевода имелись незначительные изъязвления до 0,4 см (рис. 10). На месте введения вирусосодержащей суспензии были отмечены участки поражения ткани с признаками некроза (рис. 11).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что перевиваемая линия культуры клеток гонады козы (ЯДК-04) и субкультура тестикул ягненка (ТЯ) оказались чувствительной и эффективной системой для получения вирусной суспензии с высокой концентрацией вируса и могут быть использованы для проведения дальнейших исследований.

При заражении естественно восприимчивых животных вирусосодержащим материалом воспроизведена генерализованная форма инфекции. Специфичность заболевания животных подтверждена ПЦР-

исследованиями биоматериала и методом вирусовыделения.

Штамм «ВНД/Дагестан/2015» был депонирован в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») под регистрационным номером (ссылкой) «ВНД/Дагестан/2015 (диагностический)».

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кодекс здоровья наземных животных. Т. 1–2 / МЭБ. — 24-е изд. — Paris, France, 2015. — 763 с.
2. Нодулярный дерматит (бугорчатка), клинические признаки при экспериментальном заражении крупного рогатого скота / О.А. Косарева, М.С. Кукушкина, А.В. Константинов [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. — 2010. — Т. 8. — С. 73–84.



Рис. 8. Множественные кровоизлияния на слизистой оболочке трахеи

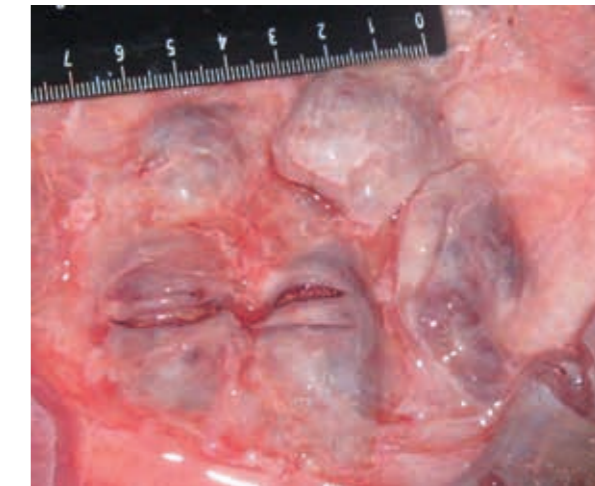


Рис. 9. Поражение на месте введения суспензии вируса



Рис. 10. Поражения слизистой оболочки пищевода



Рис. 11. Поражение на месте введения суспензии вируса

3. Проблема нодулярного дерматита крупного рогатого скота: научное издание / В.А. Мищенко, А.В. Мищенко, А.В. Кононов [и др.] // Ветеринария Кубани. — 2015. — № 5. — С. 3–6.

4. Прогноз по нодулярному дерматиту крупного рогатого скота в Российской Федерации на 2016 год: научное издание / А.К. Караулов, В.А. Мищенко, В.М. Гуленкин [и др.] // Прогнозы по ряду болезней животных в Российской Федерации на 2016 год / ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2016. — С. 126–148.

5. Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel / J. Brenner, M. Haimovitz, E. Oron [et al.] // Israel J. Vet. Med. — 2006. — Vol. 61. — P. 3–4.

6. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus* male ticks /

E.S. Tuppurainen, J.C. Lubinga, W.H. Stoltz [et al.] // Epidemiol. Infect. — 2013a. — Vol. 141. — P. 425–430.

7. 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.

8. Tuppurainen E.S., Venter E.H., Coetzer J.A. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques // Onder. J. Vet. Res. — 2005. — Vol. 72. — P. 153–64.

9. <http://www.fsvps.ru/fsvps/iac/messages/2169.html>.

10. [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immssummary](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immssummary).



# CULTURAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF LUMPY SKIN DISEASE AGENT ISOLATED IN THE RUSSIAN FEDERATION IN 2015

A.V. Kononov<sup>1</sup>, S.V. Kononova<sup>2</sup>, I.N. Shumilova<sup>3</sup>, A.A. Nesterov<sup>4</sup>, A.V. Shishkov<sup>5</sup>, V.I. Diye<sup>6</sup>, R.V. Yashin<sup>7</sup>, A.V. Mischenko<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kononov@arriah.ru

<sup>2</sup> Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kononova@arriah.ru

<sup>3</sup> Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mail@arriah.ru

<sup>4</sup> Junior Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: nesterov@arriah.ru

<sup>5</sup> Junior Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shishkov@arriah.ru

<sup>6</sup> Doctor of Sciences, Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: diev@arriah.ru

<sup>7</sup> Head of Animal Facilities, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: yashin@arriah.ru

<sup>8</sup> Deputy Director, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mischenko@arriah.ru

## SUMMARY

The paper presents data on studied properties of lumpy skin disease virus adapted to goat gonad and lamb testicle cell cultures. Experimental infection of cattle with the obtained strain of lumpy skin disease virus induces systemic infection.

Key words: lumpy skin disease virus, cell culture, infectivity, pathological material, subcutis, clinical signs, generalization.

## INTRODUCTION

Lumpy skin disease (LSD) is a contagious viral infection characterized by rise in the body temperature, nodules on skin, internal organ mucous membranes, enlargement of lymph nodes and subcutis edema [1, 3].

Currently LSD is widely spread in the African countries, Middle East, Turkey, Iraq and Azerbaijan. The disease has been also registered in Greece, Serbia, Bulgaria and Macedonia [10].

The first LSD outbreak in cattle in the Russian Federation was reported in July 2015 in the Republic of Dagestan. By the end of 2015 17 outbreaks of the disease were registered in the RF in three administrative subjects: Republic of Dagestan (11 outbreaks), Chechen Republic (four outbreaks) and Republic of North Ossetia (two outbreaks).

On May 25, 2016 LSD was registered in Russia again in the Krasnodar Krai. 15 LSD outbreaks were detected in the Republic of Dagestan on farms, where 36,645 animals were kept [4, 9].

The disease causes significant economic losses in animal production as milk yields and live weight of animals

reduce greatly. Pregnant cattle may abort and bulls may become sterile temporarily or permanently.

When the disease is systemic nodules (lumps under the skin, 2-7 cm in diameter) appear on the animal body, especially on the head, neck, udder and in the perineum. Some nodules may fuse and form ulcers. The affected skin is painful [3].

The source of infection is diseased animals, and convalescent or latent virus carriers. The virus is shed through affected skin, with saliva, nasal and ocular discharge, semen and milk. In accordance with the OIE Terrestrial Animal Health Code LSD incubation period is 28 days [1].

For LSD specific prevention homologous or heterologous attenuated virus vaccine based on sheep and/or goat pox virus is used.

For the purposes of LSD virus isolation and culture the following cell/tissue cultures can be used: testicle and kidney tissue cultures of calves and lambs, kidney and skin cell cultures of rabbit fetuses, marmoset cell line and golden hamster kidney cell line. Chicken embryonated eggs can also be used; the virus grows in the embryo body and on chorioallantoic membrane producing pox lesions. The major feature of virus cytopathic effect in sensitive cells is rounding of cells and detachment of affected monolayer parts from the glass surface. In 72-96 hours the cell monolayer is almost totally destructed [8].

It is possible to reproduce infection by experimental infection of LSD naturally susceptible animals with virus-containing material derived from subcutis, dewlap and testicles of diseased animals and using goat gonad continuous cell line. In this case the disease is usually severe with specific clinical signs [2].

Based on the published data experimental infection of naturally susceptible animals is used for laboratory test-

ing of LSD agent biological properties. While some authors recommend to infect animals by subcutaneous injection of the infectious agent [1, 2, 5, 6], the others use intravenous inoculation of the virus [7, 8].

It should be noted that due to variability of cattle response to infection with LSD virus, control animals may not demonstrate systemic disease, though the local reaction may be strong [1].

The aim of the study was to analyze the potential of LSD virus adaptation to continuous cell line cultures, to determine the levels of virus accumulation in the mentioned cell systems and to examine virulent properties of the obtained strain in relation to cattle.

## MATERIALS AND METHODS

Pathological material was obtained in the Republic of Dagestan in 2015 from skin lesions of an LSD affected animal. To adapt LSD virus to cell cultures 10% suspension prepared from pathological material and continuous cell lines (YaDK-04 – goat gonad continuous cell line; TYa – lamb testicle subculture and TK – kid testicle cell subculture) was used.

Cell culture monolayer was inoculated and virus was absorbed to cells for an hour at 37±1°C, then semisynthetic nutrient medium with 1-2% cattle sera was added. Before that cell culture was washed with Hank's solution to remove growth medium. Virus was harvested when cytopathic effect (CE) was seen in 80-90% of monolayer surface area. The harvested virus was stored at minus 80±1°C.

Virus reproductivity was evaluated by time of CPE appearance, virus growth intensity and accumulation rate. LSD virus infectivity was determined by microtitrating in YaDK-04 cell culture using a standard procedure. Virus titre was calculated using Reed and Muench method and expressed in lg TCD<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>.

LSD virus biological properties and clinical signs were studied by inoculation of virus-containing material to 12 cattle (black-pied bulls, 270-300 kg of weight). For this purpose the suspension of pathological material from clinically diseased animals and viral suspension obtained from four passages in TYa cell culture with infectivity titre of 5.0 lg TCD<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup> was used.

The animals were divided into three groups. Group 1 animals were inoculated intravenously with purified culture fluid in the amount of 2 cm<sup>3</sup>, Group 2 animals were inoculated subcutaneously into the middle third of the neck at the dose of 10 cm<sup>3</sup> and Group 3 animals were inoculated subcutaneously into the middle third of the neck with pathological material suspension at the dose of 10 cm<sup>3</sup>.

Infected animals were observed for 28 days. Every day the body temperature and clinical signs were recorded and samples of biological material were taken (stabilized blood and nasal discharge).

On Day 29 post inoculation the animals were euthanized for further examination of pathological lesions of internal organs, subcutaneous lesions and sample collection.

Samples of biological material were tested with PCR and virus isolation in cell culture to confirm LSD infection.

## RESULTS AND DISCUSSION

At the first stage cell culture sensitivity to LSD virus was studied. The results of LSD virus adaptation to cell culture are shown in the table below.

The table shows that the most sensitive cell cultures to LSD virus culture are YaDK-04 and TYa. When 24-48 hour

cell culture was inoculated with virus containing suspension prepared from pathological material it induced specific degeneration of monolayer cells manifesting in cell rounding, partial detachment from the glass surface and formation of large cell clusters. At passages 2-3 the virus caused CPE in 70-80% of the area already in 48-72 hours of culturing. Virus titre was within the range of 4.0 lg TCD<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>. By passage 5-6 the infectivity increased up to 5.0-5.5 lg TCD<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>.

After passage 8 in TYa cell culture the duration of specific cell degeneration increased up to 72 hours and virus infectivity titre fell down to 4.0-4.5 lg TCD<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>.

In YaDK cell culture LSD virus activity remained on the same level during passages 5-11 and was 5.0 lg TCD<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>.

TK cell culture turned out to be unfit for virus suspension preparation.

Thus, it was established that YaDK-04 and TYa cell cultures are sensitive and effective systems for the preparation of highly concentrated virus suspension and can be used for further research.

Test results served as a basis for LSD virus depositing in the Microorganism Strain Collection of the FGBI «Federal Centre for Animal Health» with «VND/Dagestan/2015 (diagnostic)» reference number.

The next target of the research was to study LSD clinical signs in naturally susceptible animals when inoculated with virus-containing material prepared based on the isolated strain.

Figure 1 shows that Group 1 animals demonstrated rise in the body temperature up to 40.0°C and higher on day 9 post inoculation and in 11 days the temperature decreased down to upper normal level. In parallel to hyperthermia

Table  
Lumpy skin disease virus adaptation to cell culture

Cell culture	No. of passages	Time of culture process, hours	Infectivity titre, lg TCD <sub>50</sub> /cm <sup>3</sup>
YaDK-04	1	144-168	3.0
	2	120	4.0
	3	72	4.0
	4	48	4.5
	5-13	48	5.0
TYa	1	168	3.5
	2-4	48	4.0
	5	48	4.5
	6	48	5.5
	7-9	48	5.0
	10	72	5.0
TK	11-13	72	4.5
	1	168	1.5
	2	120	отр.
	3	120	отр.



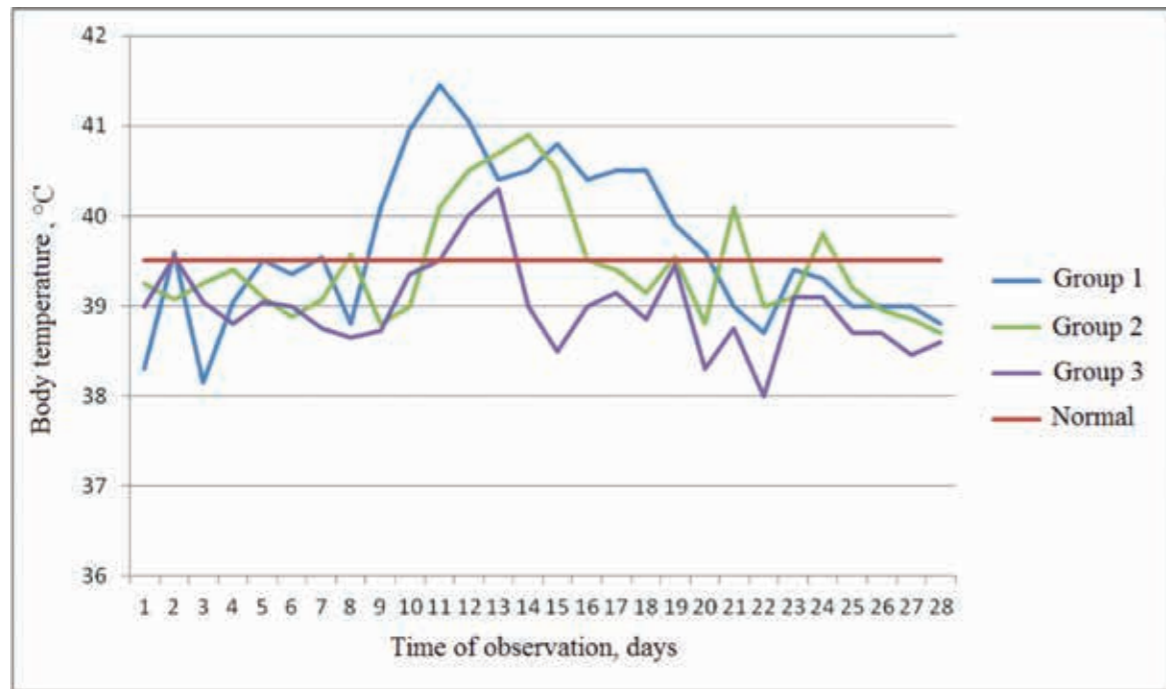


Fig. 1. Changes in animal body temperatures (average values by groups)

animals suffered from nasal serous discharge and initial clinical signs of infection (depression, anorexia).

Animals from Groups 2 and 3 rise in body temperature up to 40.9 and 40.3°C was registered on days 11 and 12 post inoculation, respectively (Fig. 1).

Scrotal edema, sporadic clumps and roseolas, 0.5 to 2.5 cm in diameter, of round or irregular forms were observed in the perineum and on internal parts of thighs of animals from Group 1 (Fig. 2). It should be noted that when first clinical signs of infection were manifested Group 1 ani-

Fig. 2. Scrotal edema, 0.5-2.5 cm roseolas on scrotum and in perineum



mals also demonstrated fever and nasal serous discharges. LSD virus genome was detected in nasal swabs by PCR. Viremia lasted for 9-18 days post infection.

On days 11-12 clumps and small nodules, 0.5 to 2 cm in diameter, were found on the whole body of animals (rump, hind limbs, back and head) as well as edemas of carpal and elbow joints.

On day 14 the number of nodules increased by 2-3 times. They were round, oval or irregular in form (1-4 cm in size) and distributed all over the body. In some places the nod-

Fig. 3. Numerous clumps and scabs on the head

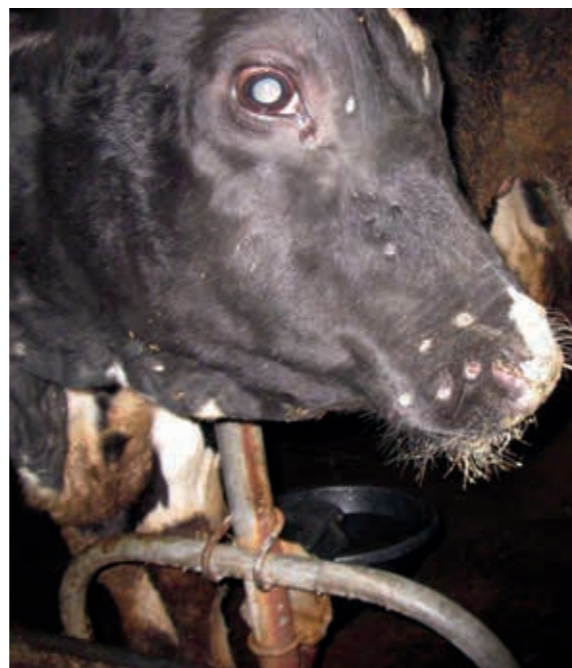


Fig. 4. Numerous ulcers of back and loin



Fig. 5. Affected superficial cervical lymph node



Fig. 6. Lesions of esophagus mucosal membrane



Fig. 7. Lesions of tracheal mucosal membrane

ules fused and formed plaques, 5-6 cm in size. The conjunctivitis was hyperemic. Superficial lymph nodes (prescapular, submandibular, popliteal and inguinal) were enlarged by 1.5 times. Animals were depressed and refused from feeding.

On day 20 the temperature decreased down to 39.0°C. The initial nodules on the head, in the perineum and on internal parts of thighs formed a hardened crust (Fig. 3).

The necropsy of animals demonstrated the following post-mortem findings: numerous subcutis lesions of rump, loin and back characterized by ulcers of different size (Fig. 4); retropharyngeal, superficial cervical and popliteal lymph nodes were enlarged and hyperemic (Fig. 5); insignificant ulcers on esophagus and tracheal mucosal membranes up to 0.5 cm in size (Fig. 6, 7).

Painful clumps, 7-8 cm in diameter were formed in subcutis at the injection site of Group 2 animals on day 5 post infection and on day 14 their size increased up to 12-13 cm. Superficial lymph nodes were also enlarged. On day 18 the clumps became smaller (6-8 cm in diameter) and no specific clinical signs of infection were manifested till the end of observation period.

Postmortem findings included enlargement of retropharyngeal and superficial cervical lymph nodes. Numerous hemorrhages were detected on the tracheal mucosal membrane (Fig. 8). At the site where virus-contain-

ing suspension was injected necrotized tissue was found (Fig. 9). Subcutis of the head and dewlap was edematic.

Clumps, 5-6 cm in diameter were formed in subcutis at the inoculation site of Group 3 animals on days 6-7 post infection and on day 14 their size increased up to 10-11 cm. Superficial lymph nodes were also enlarged. On day 18 the clumps became smaller (6-8 cm in diameter) and no specific clinical signs of infection were manifested till the end of observation period.

The necropsy of the animals from Group 3 revealed enlargement of retropharyngeal and superficial cervical lymph nodes. Small ulcers (up to 0.4 cm) were found on the esophagus mucosal membrane (Fig. 10). At the site where virus-containing suspension was injected necrotized tissue was found (Fig. 11).

### CONCLUSION

The study results demonstrate that goat gonad continuous cell line (YaDK-04) and subculture of lamb testicles (TYa) are sensitive and effective systems for the preparation of highly concentrated virus suspension and can be used for further researches.

Infection of naturally susceptible animals with virus-containing suspension reproduces systemic infection. The disease was confirmed by PCR and virus isolation.





Fig. 8. Numerous hemorrhages in tracheal mucosal membrane

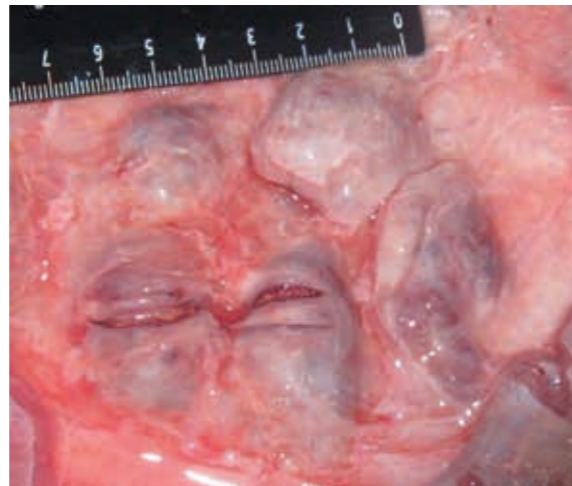


Fig. 9. Lesions at the site of virus suspension injection

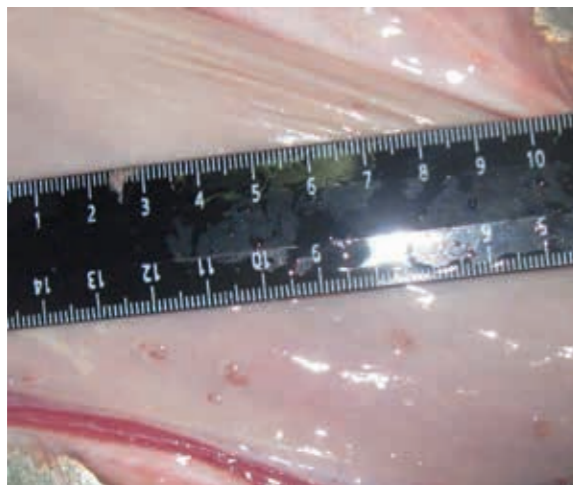


Fig. 10. Lesions of esophagus mucosal membrane



Fig. 11. Lesions at the site of virus suspension injection

«VND/Dagestan/2015» strain was deposited in the Microorganism Strain Collection of the FGBl «Federal Centre for Animal Health» (FGBl «ARRIAH») with «VND/Dagestan/2015 (diagnostic)» reference number.

#### REFERENCES

1. Terrestrial Animal Health Code. V. 1-2 / OIE. - 24<sup>th</sup> ed. - Paris, France, 2015. - 763 p.
2. Lumpy skin disease, clinical signs of experimentally infected cattle / O.A. Kosareva, M.S. Kukushkina, A.V. Konstantinov [et al.] // Proceedings of the Federal Centre for Animal Health. - 2010. - Vol. 8. - P. 73-84.
3. Lumpy skin disease problem: scientific publication / V.A. Mischenko, A.V. Mischenko, A.V. Kononov [et al.] // Veterinariya Kubani. - 2015. - № 5. - P. 3-6.
4. Forecast for lumpy skin disease in the Russian Federation for 2016: scientific publication / A.K. Karaulov, V.A. Mischenko, V.M. Gulenkin [et al.] // Forecasts for some animal diseases in the Russian Federation for 2016 / FGBl «ARRIAH». - Vladimir, 2016. - P. 126-148.

5. Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel / J. Brenner, M. Haimovitz, E. Oron [et al.] // Israel J. Vet. Med. - 2006. - Vol. 61. - P. 3-4.

6. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus* male ticks / E.S. Tuppurainen, J.C. Lubinga, W.H. Stoltz [et al.] // Epidemiol. Infect. - 2013a. - Vol. 141. - P. 425-430.

7. 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.

8. Tuppurainen E.S., Venter E.H., Coetzer J.A. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques // Onder. J. Vet. Res. - 2005. - Vol. 72. - P. 153-64.

9. <http://www.fsvps.ru/fsvps/iac/messages/2169.html>.

10. [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary).

УДК 619:616.98:578.835.2:578.835.1:616-076

## АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ КВАЛИФИКАЦИОННЫХ СЛИЧИТЕЛЬНЫХ ИСПЫТАНИЙ, ПРОВЕДЕННЫХ РЕФЕРЕНТНОЙ ЛАБОРАТОРИЕЙ ДИАГНОСТИКИ ЯЩУРА ФГБУ «ВНИИЗЖ» В 2013–2015 ГГ.

Н.Н. Луговская<sup>1</sup>, С.Р. Кременчугская<sup>2</sup>

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

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

#### РЕЗЮМЕ

Проанализированы результаты международных межлабораторных квалификационных сличительных испытаний по диагностике ящура, проведенных референтной лабораторией диагностики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2013–2015 гг. В испытаниях принимали участие 10 лабораторий из 7 стран СНГ, в том числе из Республики Казахстан, Республики Армения, Республики Молдова, Республики Беларусь, Азербайджанской Республики, Республики Таджикистан, Кыргызской Республики, и 5 лабораторий ФГБУ «ВНИИЗЖ».

**Ключевые слова:** межлабораторные сличительные испытания, лабораторная диагностика, ящур, иммуноферментный анализ.

#### ВВЕДЕНИЕ

Обязательным требованием к диагностическим лабораторным исследованиям является достоверность получаемых результатов. Поэтому неперемное условие надежной аналитической работы диагностических лабораторий — контроль качества проводимых исследований, в том числе и в исследованиях на ящур. Рекомендации Международной организации стандартизации (ISO) предусматривают условия обеспечения качества всех этапов лабораторного тестирования [2, 3]. С этой целью Всемирная референтная лаборатория (ВРЛ) ФАО/МЭБ по ящуру (IAH, Pirbright, UK) проводит ежегодное квалификационное тестирование для референтных лабораторий.

Являясь Региональной референтной лабораторией МЭБ по ящуру и Референтным центром ФАО по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии, ФГБУ «ВНИИЗЖ» также принимает активное участие в подобных мероприятиях. Это позволяет совершенствовать применяющиеся в лабораторной практике диагностические тест-системы, повышать качество мониторинговых исследований на ящур [1, 2, 4, 5].

Также одной из задач Региональной референтной лаборатории МЭБ по ящуру является обеспечение готовности лабораторий, входящих в зону курирования, к проведению диагностических мероприятий в случае угрозы и/или возникновения ящура, к быстрой и до-

стоверной идентификации и дифференциации инфекционного агента, вызывающего везикулярный синдром у восприимчивых животных, а также к проведению оценки иммунного статуса поголовья, вакцинированного против ящура.

Для этой цели в период с декабря 2013 г. по апрель 2014 г. были проведены первые квалификационные межлабораторные сличительные испытания по диагностике ящура (МСИ–2013/2014). В испытаниях приняли участие 20 операторов из 5 лабораторий стран ближнего зарубежья, включая Казахстан, Кыргызстан, Армению, Азербайджан, Молдову, и 5 лабораторий ФГБУ «ВНИИЗЖ». С октября по декабрь 2015 г. сличительные испытания по диагностике ящура были проведены второй раз (МСИ–2015) и охватили 9 лабораторий из 6 стран СНГ, в том числе Казахстан, Кыргызстан, Армению, Молдову, Белоруссию и Таджикистан.

В данной статье представлен анализ результатов проведенных испытаний.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Диагностические тесты.** В работе использовали диагностические наборы производства ФГБУ «ВНИИЗЖ»: «Набор для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным анализом», «Набор для определения противоящурных антител в сыворотке крови животных в иммуноферментном анализе», «Набор для иммуноферментной диагностики везикулярной болезни свиней». Реакцию проводили согласно инструкциям к наборам.

Также для подтверждения результатов иммуноферментного анализа (ИФА) зарубежные участники использовали набор реактивов для проведения полимеразной цепной реакции RT-PCR «FMD» (Tetracore, USA), FMDV Antigen Detection ELISA (IZSLER, Brescia, Italy & IAH, Pirbright, UK), SPCE for Antibodies to FMDV (IZSLER, Brescia, Italy), FMDV ELISA KIT for detection of Antigens Serotypes O, A, C, Asia1 (IAH, Pirbright, UK), FMDV NS Ab ELISA (ID-VET, France), набор для выявления антигена вируса ящура методом РСК (биофабрика «Алтын-Тамыр», Кыргызская Республика). Постановку реакций осуществляли согласно рекомендациям производителей.