

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

На правах рукописи

Аноятбекова Афшона Музафарбековна

**ПОГРАНИЧНАЯ БОЛЕЗНЬ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА В
РЕСПУБЛИКЕ ТАДЖИКИСТАН. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТИПИРОВАНИЕ
ВОЗБУДИТЕЛЯ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук, профессор
Юров Константин Павлович

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
2.1. Историческая справка и современная таксономия пестивирусов	10
2.2. Пограничная болезнь мелкого рогатого скота	13
2.2.1. Клинические признаки пограничной болезни	17
2.2.2. Молекулярно-генетическая характеристика вируса пограничной болезни	18
2.2.2.1. Структура вириона. Прикрепление и проникновение пестивируса в клетку	18
2.2.2.2. Геном пестивирусов	19
2.2.2.3. Генетическое и антигенное родство возбудителя пограничной болезни с другими пестивирусами	22
2.2.3. Характеристика биотипов	25
2.2.4. Методы лабораторной диагностики пестивирусной инфекции мелкого рогатого скота	26
2.2.5. Иммунитет и вакцинопрофилактика	29
2.3. Вирусная диарея – болезнь слизистых у мелкого рогатого скота	31
2.4. Хоби вирус – Pestivirus H — Атипичный пестивирус	36
2.5. Контаминация биологических продуктов пестивирусами	37
2.6. Заключение по обзору	39
3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
3.1. Материалы и оборудование	40
3.1.1. Материал для исследования	40
3.1.2. Вирусы	41
3.1.3. Культуры клеток	41
3.1.4. Питательные среды и растворы	41
3.1.5. Коммерческие наборы	42
3.1.6. Реактивы	42
3.1.7. Буферные растворы	42
3.1.8. Лабораторная посуда	42
3.1.9. Лабораторное оборудование	43
3.2. Методы исследования	44
3.2.1. Отбор, хранение и подготовка проб	44
3.2.2. Культивирование культур клеток	45
3.2.3. Культивирование вирусов	45
3.2.4. Серологические исследования	46
3.2.4.1. Реакция иммунофлуоресценции	46

3.2.4.2. Реакция диффузионной преципитации в агаровом геле	46
3.2.5. Молекулярно-генетические методы исследования	47
3.2.5.1. Выделение РНК	47
3.2.5.2. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией	47
3.2.5.3. Электрофорез нуклеиновых кислот	51
3.2.5.4. Филогенетический анализ	51
4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	53
4.1. Выявление антител к пестивирусам в пробах сыворотки крови овец и коз с помощью реакции диффузионной преципитации в агаровом геле	55
4.2. Реакция диффузионной преципитации в агаровом геле с контрольными антигенами	59
4.3. Выделение вируса в культурах клеток	61
4.3.1. Идентификация вируса в культурах клеток методом иммунофлуоресценции	64
4.3.2. Выявление вируса в культурах клеток с помощью реакции диффузионной преципитации в агаровом геле	66
4.4. Идентификация и типирование вирусных изолятов	70
4.4.1. Выявление вируса пограничной болезни овец методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией	70
4.4.2. Определение нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ вируса пограничной болезни овец	72
4.4.3. Идентификация возбудителя вирусной диареи 3-го генотипа – Хоби вируса	76
5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	82
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	88
7. РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	89
8. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	90
9. ВЫВОДЫ	91
10. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	93
11. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	95
12. ПРИЛОЖЕНИЯ	118

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Пограничная болезнь – вирусное заболевание мелкого рогатого скота, характеризующаяся расстройством функции репродуктивной системы, абортами, рождением нежизнеспособного или слабого персистентно-инфицированного (ПИ) плода, пороками развития плода, тремором, проблемами шерстного покрова у родившихся животных [23; 26; 42; 114; 131; 139; 144]. Заболевание наносит серьезный экономический ущерб овцеводству, вызывая прямые потери мясного и молочного производства, торговли и переработки продукции животного происхождения [26; 139; 149]. Возбудитель пограничной болезни относится к роду Pestivirus семейства Flaviviridae и обозначается как Pestivirus D [116; 165]. Вирус имеет близкое антигенное и генетическое родство с вирусами классической чумы свиней и вирусной диареей-болезнью слизистых крупного рогатого скота (ВД-БС КРС), [26; 52; 144; 145; 147; 181] и представлен восьмью генотипами [153].

Для овцеводческих и козоводческих хозяйств Республики Таджикистан серьезную угрозу представляют заболевания респираторных органов и репродуктивной системы различной этиологии [2; 3; 20; 22; 32]. По заключению экспертов МЭБ, вспышки этих болезней в регионе Центральной Азии обусловлены вирусом чумы мелких жвачных животных [31; 123].

В доступной литературе данные о циркуляции пестивирусов в Республике Таджикистан крайне ограничены и основываются на сообщении З.Д. Курбонбековой (2007) об обнаружении антител к возбудителю вирусной диареи-болезни слизистых (ВД-БС) у молодняка крупного и мелкого рогатого скота [21]. В результате определённой схожести симптоматики, патологоанатомических изменений и эпизоотологических характеристик пестивирусных инфекций, под одним диагнозом могут регистрироваться болезни разной этиологии. Следовательно, изучение этиологии массовых заболеваний овец и коз, идентификация и типирование возбудителя пограничной болезни, является

актуальным направлением научных исследований и экономически важной народно-хозяйственной задачей.

Степень разработанности темы исследования. Впервые пограничная болезнь была обнаружена в 1959 году на границе Англии и Уэльса и описана L.E. Hughes и соавторами (1959) [131]. С тех пор заболевание получило широкое распространение в США, Канаде, Новой Зеландии, Китае, Индии, Японии, Австралии, Турции, Тунисе, Иране, странах ЕС и др. странах [67; 79; 115; 126; 127; 139; 144; 148; 158; 168]. Большой вклад в изучении болезни внесли такие ученые как R.M Barlow (1969), B.W Manktelow (1969), R.A. Huck (1975), T. Loken (1995), P.F. Nettleton (1998) и др., работы которых содержат фундаментальные основы описания болезни [49; 107; 131; 134; 144]. Изучению молекулярно-генетических характеристик вируса посвящены труды P. Becher и соавторов (1996, 2003 1999, 1994, 2011) M. Giangaspero (1999) и др. [51;52; 53; 54; 55; 93]. Многими исследователями предложены различные методы диагностики пограничной болезни [78; 107; 112]. S. Vilcek и D. Paton (2000) разработали метод на основе ПЦР. Праймеры, предложенные авторами, также рекомендуются МЭБ для диагностики пограничной болезни у овец и коз [176; 189]. В России изучению и характеристике вируса пограничной болезни посвящены исследования В.Ю. Луговцева (2000). Автор использовал в работе известные референтные штаммы вируса [26].

Известно, что пестивирусы являются частыми контаминантами биологических продуктов, представляющих опасность как источник инфекции [1; 33; 47; 60; 92; 94; 132]. Исследованиями F. Thabti с соавторами (2005) и T. Loken с соавторами (1991) были описаны случаи контаминации партий вакцин вирусом пограничной болезни [132; 173].

Несмотря на наличие множественных сообщений об идентификации вируса пограничной болезни в различных странах, данные о циркуляции вируса в Республике Таджикистан отсутствуют. В связи с этим, учитывая торгово-экономические связи между странами, высока вероятность распространения болезни в ранее благополучные регионы, в том числе в Республику Таджикистан.

Цель и задачи исследования. Целью нашей работы являлось выявление возбудителя пограничной болезни при массовых респираторных и репродуктивных заболеваниях мелкого рогатого скота в Республике Таджикистан, его типирование и молекулярно-генетическая характеристика. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести комплексное исследование биологического материала от овец и коз на наличие возбудителя и получить экспериментальные данные, характеризующие участие вируса пограничной болезни в этиологии массовых заболеваний овец и коз;

2. Провести определение нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ обнаруженного вируса;

3. Установить на основании полученных данных типовую принадлежность изолятов и депонировать их в GenBank;

4. Получить чувствительную культуру клеток, свободную от вирусной контаминации и перспективную для культивирования вируса пограничной болезни, а также определить культуральные характеристики (цитопатогенность) эпизоотических изолятов.

Научная новизна работы. Получены с помощью иммунологических, вирусологических, молекулярно-генетических методов новые данные, подтверждающие роль пестивирусов (Pestivirus A и D) в этиологии массовых заболеваний мелких жвачных животных в регионе.

Впервые в регионе Центральной Азии – Республике Таджикистан обнаружен и типирован возбудитель пограничной болезни овец (Pestivirus D).

Посредством определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена полипротеина (Npro) и филогенетического анализа показано, что изолят, идентифицированный в Таджикистане, относится к вирусу пограничной болезни, и представляет отдельную филогенетическую ветвь внутри генотипа 3.

Установлено, что изоляты вируса, идентифицированные нами, относятся к нецитопатогенному биотипу.

Циркуляция пестивируса подтверждена серологическими методами (реакцией иммунофлуоресценции и реакцией диффузионной преципитации в агаровом геле).

Впервые обнаружен геном Pestivirus H – Хоби-вируса – Атипичного пестивируса в составе коммерческой вирусвакцины против чумы мелких жвачных, использовавшейся для профилактической иммунизации овец и коз в Таджикистане.

Определены и депонированы нуклеотидные последовательности участков геномов обнаруженных нами вирусов в GenBank под номерами доступа KX900608.1. и KX900607.1.

Теоретическая и практическая значимость работы. Идентификация нового для Республики Таджикистан пестивируса (Pestivirus D) – возбудителя пограничной болезни овец представляет научное обоснование для разработки противоэпизоотических мероприятий против этого заболевания, а также предупреждения Хоби-вирусной инфекции. Полученные данные позволяют повысить целенаправленность и эффективность мероприятий по борьбе с чумой мелких жвачных животных, представляющей угрозу продовольственной безопасности миллионам сельских семей. Эти исследования комплементарны рекомендациям 84 Генеральной сессии МЭБ в мае 2016 г. в рамках «Глобальной стратегии контроля и искоренения чумы мелких жвачных животных» [192].

По результатам исследования разработаны методические положения «Диагностика пестивирусных инфекций овец методами молекулярно-генетического анализа», утвержденные РАН (приложение А), депонирована культура клеток тестикулов козленка (ТК-ВИЭВ) в специализированной коллекции СХЖ РККК ВИЭВ (приложение Б), депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности изолята вируса пограничной болезни овец, а также Хоби вируса под номерами доступа KX900608.1. и KX900607.1.

Методология и методы исследования. В работе использованы молекулярно-генетические (ОТ-ПЦР, определение нуклеотидной последовательности и филогенетический анализ), вирусологические

(культивирование и выделение вируса), серологические (РДП, РИФ), физико-химические (приготовление различных растворов) методы исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты экспериментальных исследований этиологической структуры массовых заболеваний мелкого рогатого скота в Республике Таджикистан, полученные путём комплексных иммунологических (серологических), вирусологических и молекулярно-генетических исследований.

2. Данные филогенетического анализа, полученные путем сравнительного исследования штаммов из Международной базы данных (INSDC) и эпизоотически актуального пестивируса, который относится к вирусу пограничной болезни и представляет отдельную филогенетическую ветвь внутри генотипа 3.

3. Данные серологических исследований, характеризующие распространенность пестивирусов в хозяйствах, неблагополучных по массовым респираторно-репродуктивным заболеваниям овец и коз, с положительным результатом от 4,5% до 73,2%.

4. Результаты молекулярно-генетического типирования Pestivirus H – Хоби-вируса, обнаруженного в составе коммерческой вирус вакцины против чумы мелких жвачных животных.

5. Методические положения по диагностике пестивирусных инфекций овец с применением методов молекулярно-генетического анализа.

Степень достоверности и апробация результатов. Все этапы исследования выполнены на сертифицированном откалиброванном оборудовании, которое обеспечивает высокую достоверность результатов. Основные положения диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на заседаниях Ученого совета и Методической комиссией ФГБНУ ВИЭВ (2014-2017 гг.), представлен (стендовый доклад) на ISV Annual Congress (Boston, Massachusetts October 2-4th, 2016).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано пять научных работ, в том числе четыре статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации,

рекомендованных для публикации научных результатов диссертации на соискание ученой степени.

Личный вклад соискателя. Все этапы работы были выполнены при непосредственном участии автора диссертационной работы. Участие соавторов отражено в совместно изданных научных публикациях.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность профессору М. Амирбекову, Т. Тиллоеву, Ш. Шодмонову, Х.Э. Нураеву – сотрудникам Национального Диагностического центра ветеринарной диагностики Республики Таджикистан, а также сотрудникам лаборатории вирусологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН к.б.н. С.В. Алексеенковой, К.А. Диас Хименес, заведующей лабораторией клеточной биотехнологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН к.б.н. Т.В. Гальнбек за оказанное содействие и помощь в выполнении нашей работы.

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность научному руководителю заведующему лабораторией вирусологии, доктору ветеринарных наук, профессору, заслуженному деятелю науки РФ, лауреату премии Совета Министров СССР, лауреату Государственной премии Республики Саха (Якутия) К.П. Юрову за научно-методическое руководство при выполнении экспериментальной работы и анализе полученных результатов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 121 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение собственных исследований, выводы, практические предложения, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список использованной литературы и приложения. Список литературы содержит 195 источников, из них 153 иностранных. Диссертация иллюстрирована 5 таблицами, 18 рисунками (в т.ч. 12 фотографиями, 2 диаграммами, 2 дендрограммами).

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Историческая справка и современная таксономия пестивирусов

Пестивирусные инфекции регистрируются во многих странах, и причиняют большой экономический ущерб мясному и молочному скотоводству, в том числе овцеводству вызывая массовые вспышки респираторных, желудочно-кишечных и репродуктивных заболеваний [7; 12; 13; 16; 28; 41]. В некоторых случаях проявляются в виде острой летальной инфекции практически со 100% смертностью больных животных [150].

Пестивирусы (Pestiviruses) представляют род вирусов в семействе Flaviviridae. Типичными представителями этого рода считались вирусы: ВД-БС генотип 1, ВД-БС генотип 2, пограничная болезнь и классическая чума свиней [8; 14; 23; 26; 34; 35; 52; 141; 147; 161; 171; 181].

Термин «пестивирус» впервые был предложен в 1973 году М.С Horzinek для описания антигенного родства между вирусом ПБ, ВД-БС вирусом КЧС [34; 106]. В 1982 году Международный комитет по таксономии вирусов принял предложенную номенклатуру и присвоил общее название «Pestiviruses» с вирусной диареей в качестве прототипа [106]. Первоначально род Pestiviruses был отнесен к семейству Togaviridae, однако последующее изучение молекулярных характеристик вирусов установило, что пестивирусы отличаются от членов этого семейства. Определением нуклеотидной последовательности штамма NADL ВД-БС КРС было определено, что в геномной организации, репликации и экспрессии генов пестивирусы схожи с семейством Flaviviridae. В связи с этим, в 1991 году пестивирусы были классифицированы как род вирусов в семействе Flaviviridae [155], который также включает в себя род Flavivirus и Hepacivirus [130; 161].

Пограничная болезнь впервые была описана в 1959 году L.E. Hughes и его коллегами. Болезнь была обнаружена на границе Англии и Уэльса, поэтому получила название «пограничная болезнь» [131]. Заболевание также известно как

«hairy shaker», «hairy fleeces» – «мохнатое руно», «мохнатые ягнята», так как еще в 1957 году у ягнят в Новой Зеландии отмечали симптом неправильно сформировавшегося руна, мышечный тремор головы и конечностей [134]. В 1972 году была определена, вирусная этиология ПБ и в этом же году вирус был отнесен к роду Pestiviruses. В 1977 году вирус ПБ изолировали в культуре клеток и с помощью метода иммунофлуоресценции был обнаружен антиген вируса ПБ в криостатических срезах [23; 26; 131]. Нецитопатогенный штамм Coos Bay 5 (CB5nc) и цитопатогенный штамм (CB5c) вируса ПБ были изолированы в 1980 году от овец с клиническими признаками характерными для ВД-БС КРС [142].

Впервые заболевание неясной этиологии у жвачных животных было описано в 1940-х годах в подострой и острой форме в Западной Канаде и названа «Х-болезнь КРС». Позже болезнь стала известна как ВД [95; 141].

F.K. Ramsey и W.H. Chivers (1953) сообщили об инфекции, которая сопровождалась низкой заболеваемостью и высокой смертностью КРС. У животных, в основном, отмечали обширное поражение желудочно-кишечного тракта. Поскольку авторы не смогли воспроизвести экспериментальную инфекцию, заболевание получило название – болезнью слизистых оболочек. Спустя несколько лет стало известно, что обе болезни вызываются одним и тем же вирусом. Следовательно, термин ВД-БС был принят как общее название болезни [141]. ЦП штамм Oregon C24V ВД впервые был выделен в 1960 г. и на его основе была предложена первая вирусвакцина против ВД-БС КРС [68].

Изначально, название пестивирусов произошло от вида животных, от которых они были изолированы [43; 147]. В последнее время появились новые виды, отличающиеся от официально классифицированных представителей: штамм H138, выделенный от жирафа в Кении более 30 лет назад [14; 52], вирус Бунгованна, изолированный от свиней в свиноводческом комплексе в Австралии [44], атипичный пестивирус (Хоби вирус), идентифицированный в Европе, Азии, Южной Америке, Китае и в др. странах [8; 14; 71; 75; 162; 163], новый генотип пестивируса у вилорогой антилопы [14; 178], обнаруженная нуклеотидная последовательность пестивирусов у норвежских крыс в Нью-Йорке [88] и летучих

мышей в Китае [193], а также других пестивирусов у разных видов животных [46; 85; 146; 156; 187; 195].

В связи с этим, еще в 1995 году Р. Becher с соавторами и S. Vilcek с соавторами (1997) предположили, что все пестивирусы не имеют строго определенных хозяев, каждый из них является патогенным для широкого круга животных. Предполагалось, что классификация пестивирусов должна основываться на таких характеристиках вируса, как экспрессия эпитопа и генетическая последовательность, а не на хозяине, от которого изолирован вирус [42; 181].

В 2017 году D.B. Smith и соавторы предложили Исследовательской группе Flaviviridae, входящей в состав Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) пересмотреть таксономию рода Pestivirus и добавить к четырем уже существующим видам еще семь новых идентифицированных пестивирусов. При этом, для наименования вирусов использовать новый формат, например, Pestivirus X [164]. Виды пестивирусов будут переименованы как Pestivirus A (ВД-БС генотип 1), Pestivirus B (ВД-БС генотип 2), Pestivirus C (вирус КЧС), Pestivirus D (вирус ПБ), Pestivirus E (пестивирус вилорога), Pestivirus F (вирус Бунгованна), Pestivirus G (пестивирус жирафа), Pestivirus H (Атипичный пестивирус – Хоби вирус – ВД генотип 3), Pestivirus I (Айдин-подобный пестивирус), Pestivirus J (крысиный пестивирус) и Pestivirus K (атипичный свиной пестивирус). Пестивирусы овец и коз, идентифицированные в Тунисе, а также пестивирус, выделенный у летучих мышей, могут представить дополнительные виды пестивирусов [164].

В феврале 2018 года Международный комитет по таксономии вирусов одобрил и ратифицировал изменения в таксономии вирусов, которые подробно перечислены в статье A.M.Q. King с соавторами. (2018) [116]. Обновленный список новых видов вирусов опубликован в марте 2018 г. Таким образом, пестивирусы представляют род вирусов в семействе Flaviviridae и подразделены на 11 видов. Виды пестивирусов обозначены в соответствии с рекомендациями D.P. Smith и соавт. (2017) [116; 164; 165].

2.2. Пограничная болезнь мелкого рогатого скота

На основании генетического анализа изолированных от овец и коз пестивирусов было определено 8 генетических групп Pestivirus D – ПБ. [153].

Вирус ПБ-1-го генотипа включает изоляты из США [168], Великобритании [181], Австралии [54] и Новой Зеландии [180]. Изоляты из Германии представляют вирус ПБ-2-го генотипа. Вирус ПБ-3-го генотипа включает изоляты из Гифхорна и Швейцарии [52]. Изолят вируса ПБ, выделенный от пиренейской серны считается 4-м генотипом [46]. Генотип 5 и 6 вируса ПБ обнаружены во Франции [79]. В Италии начиная с 1990 гг. наблюдались симптомы ПБ. Однако, изолированные вирусы были охарактеризованы как вирусы ВД-2-го генотипа [70; 89]. Проведенный в 2005 году молекулярный анализ Итальянского штамма 712/02, определил новую филогенетическую группу вируса ПБ-7-го генотипа. Вирус был обнаружен у козленка в северо-западной части Италии [89]. S. Peletto с соавторами (2015) обнаружили 8-ю генетическую группу вируса ПБ. [153]. Следовательно, вирусы ПБ-7-го и 8-го генотипа представлены изолятами из Италии. Изоляты из Турции и Туниса до сих пор не классифицированы [67; 173].

A. Rosamilia. и соавт. (2014) описали случай заражения коз ВПБ-3-го генотипа в январе 2011 года в северной Италии. Также в Италии имеется сообщение об обнаружении ВПБ генотипа 3 у КРС, приобретенных в Австрии, где скот находился рядом с овцами. Филогенетический анализ подтвердил общность происхождения обнаруженного в Италии вируса со штаммами, изолированными во Франции. В ходе исследования выяснилось, что скот был приобретен во Франции [158] .

В 1995 году в Тунисе вакцинация против оспы овец сопровождалась вспышкой ПБ с характерными клиническими признаками, высоким уровнем аборта (15-80%), многочисленными мертворождениям, рождением слабых ягнят с признаками «hairy shaker – мохнатые ягнята». Для вакцинации использовали 14 партий живых вакцин против оспы овец. При исследовании обнаружили, что 11

партий контаминированы пестивирусами. Проводя филогенетический анализ F. Thabti и соавторы (2005) предположили, что изоляты из Туниса образуют отдельную филогенетическую ветвь между вирусами ПБ и КЧС и, возможно, относятся к новому виду пестивирусов. [173].

S. Ciulli с соавторами (2015) при проведении молекулярно-генетических исследований изолятов пестивирусов от овец и коз в Сицилии, в Италии, определили, что три изолята из пяти исследованных, образуют отдельный кластер с высоким сходством с Тунисскими изолятами, которые были предложены как новый вид пестивирусов [67].

В Турции с помощью ИФА и иммуногистохимии антиген вируса ПБ был выделен во всех частях мозга овец и коз. При филогенетическом анализе было определено, что обнаруженный вирус формирует отдельный кластер между ВПБ-1 и ВПБ-6 и может считаться ВПБ нового генотипа. Проведенное исследование является первым сообщением о возникновении инфекции ПБ мелких жвачных животных в провинции Айдын и Бурдур в Турции [148].

N. Mishra и соавт. (2016) впервые в Индии изолировали и идентифицировали ВПБ у овец и коз с помощью молекулярных исследований. С помощью филогенетического анализа 5-UTR, Npro и E2 участков обнаруженный изолят был отнесен к ВПБ генотип 3. Хотя, происхождение ВПБ-3-го генотипа в Индии не изучено, предполагается, что, он может быть введен туда через торговлю овец между Индией и другими странами [139].

В 2012 году в Китае были изолированы несколько штаммов ВПБ у животных с тяжелыми признаками ВД-БС [127; 135]. В пяти регионах Цзянсу исследовали 160 проб сыворотки крови от овец и коз с помощью ИФА и ОТ-ПЦР. Культивирование НЦП вируса проводили в культуре клеток МДВК. В результате исследования от овец был выделен штамм ВПБ-3-го генотипа и назван как JSLS12-01. Считается, что это первый случай обнаружения ПБ-3-го генотипа, циркулирующего у коз на территории Китая [127].

В городе Тебриз, Иран сообщается о наличии вируса ПБ у овец с симптомами репродуктивных заболеваний. Наличие вируса, циркулирующего в

популяции овец, подтверждается молекулярными исследованиями и является первым сообщением об обнаружении вируса ПБ в Иране [114].

По данным серологических исследований, в Англии и Уэльсе 10,8% отдельных животных и 37,4% стада имеют антитела к вирусу ПБ. В Испании сероположительные взрослые овцы составляют 21% и 93% в стадах овец. Процент сероположительных к ПБ отдельных животных в Дании составляет 8,3%, Франции – 17,9% и Норвегии – 4,5%. Сероположительные животные в Австрии в среднем составили 62 % в стадах, и 29% у отдельных животных с заметной разницей по регионам. В Иране процент сероположительных животных к вирусу ПБ по результатам ИФА составило 12,8% и в РН 13,5% [114].

Изначально предполагалось, что вирус ПБ инфицирует преимущественно овец, реже коз. Однако дальнейшие исследование и изучение вируса показали, что вирусом ПБ могут быть инфицированы различные виды животных. Так, в Японии вирус ПБ был обнаружен у свиней в ходе серологического мониторинга животных на КЧС. Уровень сероположительных животных достигал 58,5% при исследовании в ИФА. Через 5 дней провели повторное исследование серотрицательных животных. В результате определили, что два сероотрицательных свиноматок из 11 положительны на КЧС. Полученные данные указывали на циркуляцию вируса на ферме. Однако, при этом у свиней не отмечались клинические признаки КЧС или иной другой инфекции. Следовательно, авторы решили исследовать свиней в РН на КЧС, ВД-БС 1-го генотипа и ВД-БС-2-го генотипа. Результаты показали, что животные отрицательны к ВД-БС-2-го генотипа, но положительны к ВД-БС 1-го генотипа и КЧС. Однако титр антител был выше при ВД-БС 1-го генотипа, чем при КЧС. Исходя из полученных результатов, все пробы были исследованы в ОТ-ПЦР с использованием праймеров общих для пестивирусов к 5'UTR участку. Положительные результаты были получены в 4-х случаях. После вскрытия у свиней изолировали в культуре клеток НЦП биотип пестивируса. Предполагалось, что данный пестивирус является ВД-БС 1-го генотипа, однако при секвенировании продуктов ОТ-ПЦР был идентифицирован вирус ПБ. Данное

сообщение было первым сообщением об обнаружении вируса ПБ у животных в Японии, так как ранее в этой стране даже у жвачных животных ПБ не диагностировалась. Источник заноса инфекции на территории страны не известен. N. Kawanishi соавторами (2014) предполагают, что инфекция вирусом ПБ в свиноводческой ферме появилась, по крайней мере, более чем за четыре месяца до ее обнаружения. Эти предположения объясняются тем, что ПИ свиньи были 4-х месячного возраста и свиноматка, скорее всего, была заражена вирусом во время супоросности [115].

В 2001-2002 гг. в популяции пиренейских серн, обитающих в Испании, Франции, Италии и Андорре, произошла вспышка ПБ, что привело к снижению численности серн на 42%. Симптомы болезни включали признаки аллопеции, гиперпигментации эпидермиса, депрессии, вялости, малоподвижности. Методом ИФА в сыворотке крови выявили сероконверсию к антигенам пестивирусов (p125 и p80). Вирус ПБ обнаружили в крови (в 100% проб), слюне (85,7%), смывах со слизистой носовой полости (100%), смывах со слизистой прямой кишки (71,4%), моче (100%), а также во всех паренхиматозных органах серн, включая селезёнку эмбриона у одной беременной серны. Вирус изолировали в культуре клеток из всех проб, кроме мочи, тонкого отдела кишечника и селезёнки эмбриона. Филогенетический анализ изолятов выявил их принадлежность к ВПБ генотипа 4. Учитывая наличие вируса в определённых пробах клинического материала, авторы исследования сделали вывод, что при заражении серн преобладает орально-назальный способ передачи вируса [42; 64].

Вирус ПБ также был обнаружен у КРС [137]. Предполагается, что совместное содержание и пастьба рогатого скота приводит к распространению пестивирусной инфекции [19; 137]. По данным ряда авторов пограничную болезнь у животных может вызвать также возбудитель вирусной диареи 1-го и 2-го генотипа [112].

2.2.1. Клинические признаки пограничной болезни

Клинические признаки при заражении изолятами вируса ПБ у животных проявляются в виде лихорадки, лейкопении, анорексии, конъюнктивита, диареи, одышки и 50% смертностью молодых ягнят. У них отмечаются симптомы поражения нервной системы, которые являются наиболее характерными особенностями ПБ. Тремор может варьировать от сильных ритмических сокращений мышц задних ног и, наоборот, до едва заметного тонкого дрожания головы, ушей и хвоста [23-27; 131; 144; 145; 149]. Кроме того, у инфицированных животных наблюдается прогнатизм и артрогрипоз с постоянным сгибанием запястья, предплюсны и колена. Зараженные ягнята обычно слабые и не способны стоять. Наиболее заметный признак у ягнят наблюдается в области руна. У таких ягнят отмечается изменение волосяного покрова, т.н. симптом мохнатого руна «hairy shaker» [149]. У инфицированных животных заболевания в основном проявляется в виде фетальной и персистентной формы инфекции.

При фетальной инфекции основным путем передачи инфекции плоду является трансплацентарная, которая также вызывает тяжелые репродуктивные нарушения у суягных овцематок [145]. Инфицирование суягных овец приводит к виремии с распространением вируса на плаценту. Проникновение вируса через плаценту приводит к гибели плода и аборт. Исход заболевания зависит от срока беременности и возраста плода. Инфицирование плода на 40-120-е сутки суягности приводит к рождению ПИ плодов, которые являются основным источником распространения вируса в популяции животных. Фетальная инфекция приводит к резорбции плода до аборта, мертворождению или рождению слабых и отстающих в росте ягнят [49; 144; 145; 146; 149]. Плод, инфицированный до формирования у него иммунной системы, выживает и рождается с персистентной виремией. У ягнят, выживших на ранней стадии беременности, вирус обнаруживается во всех органах [24; 27; 64]. Персистентная виремия овец может

быть диагностирована путем изоляции вируса из образцов крови в любое время жизни животного за исключением первых 2-х месяцев жизни. Большинство ягнят, инфицированных на поздних сроках, рождаются здоровыми, но с антителами к вирусу ПБО. У взрослых овец и новорожденных ягнят, инфицированных ПБО, болезнь протекает бессимптомно. У животных наблюдается легкая лихорадка, лейкопения, связанная с виремией, на 4-11-е сутки постинфекции, после которой в сыворотках обнаруживаются антитела [144].

2.2.2. Молекулярно-генетическая характеристика вируса пограничной болезни

2.2.2.1. Структура вириона. Прикрепление и проникновение пестивируса в клетку

Вирионы пестивирусов сферической формы. Они состоят из нуклеокапсида икосаэдрической симметрии, которые покрыты оболочкой. Размер вирионов составляет от 40 до 60 нм [18; 26; 35; 130].

Прикрепление и проникновение пестивирусов в клетку является сложным многоступенчатым процессом, который включает в себя первоначальное присоединение вирионов, взаимодействие со специфическими рецепторами, интернализацию и слияние мембран [130]. Проникновение вируса через оболочку клетки происходит в два этапа. Вирусная частица связывается с гликозаминогликанами (GAG) к поверхности клетки, которые представлены оболочечным гликопротеином Erns с последующим специфическим связыванием E2 с его рецептором CD46 [136; 161]. После прикрепления к клетке, вирус проникает в клетку через клатрин-опосредованный эндоцитоз и слияние мембран путем окисления [99]. Участок внутренней посадки рибосомы начинает кэп-

независимую трансляцию, затем полипротеин дополнительно обрабатывается клеточными и вирусными протеазами, по меньшей мере, на 12 структурных и неструктурных вирусных протеинов. Частицы пестивируса созревают во внутриклеточных везикулах и покидают клетку через экзоцитоз, однако эти процессы мало изучены [143; 161].

2.2.2.2. Геном пестивирусов

Геном пестивирусов содержит однолинейную РНК с положительной полярностью длиной 12,3 кб и одну открытую рамку считывания, фланкированную на 5' и 3' конце нетранслируемого участка (UTR), кодирующую 4 структурных (C-Erns-E1-E2) и 7 неструктурных протеинов (Npro-p7-NS2/NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B). Открытая рамка считывания содержит 4000 кодонов, которые на 5' конце фланкирует от 372 до 385 и на 3' конце от 185 до 273 нуклеотидов [8; 14; 23; 27; 35; 40; 53-56; 59; 65; 78; 83; 112; 130; 143; 155; 181]. Открытая рамка считывания транслируется как полипротеин, который обрабатывается совместно и посттрансляционно с помощью вирусных протеаз и протеаз хозяина, на структурные и неструктурные протеины [119].

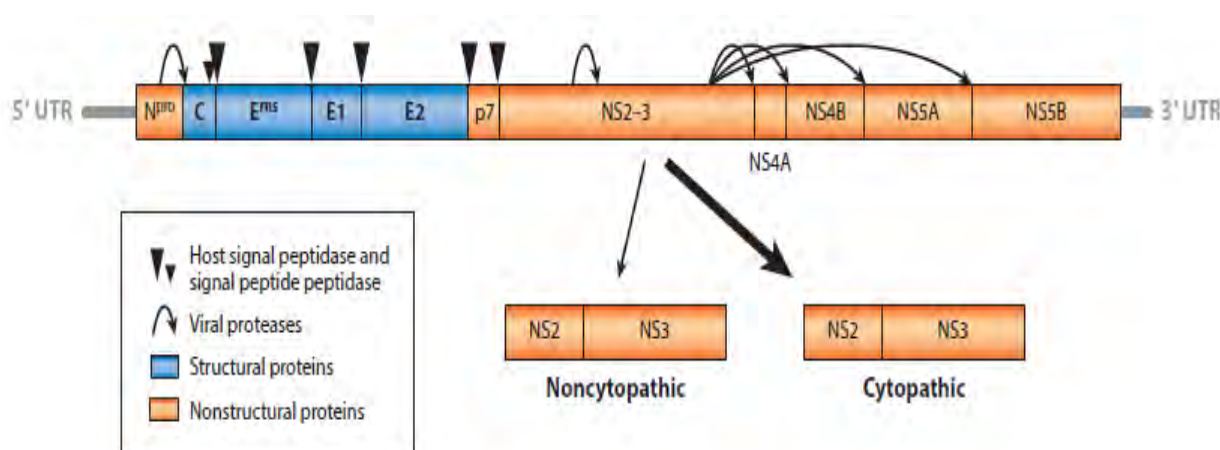


Рисунок 1 – Структура генома пестивирусов [161]

Неструктурные протеины представлены протеином Npro-p7-NS2/NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B.

Протеин Npro. Первым протеином, кодируемым открытой рамкой считывания является N терминальная аутопротеаза (Npro / p20), которая расщепляется от остаточной части вирусного полипротеина и генерирует N-конец основного белка [55; 119]. Считается, что для пестивирусов белок Npro является уникальным. В течение некоторого времени функция этого белка была неясной, кроме функции образования собственного С-конца, а также N-конца капсидного белка. Функция Npro *in vivo* состоит в блокировании продукции интерферона путем направления протеосомной деградации IRF-3 в инфицированных вирусом клетках [143]. Было показано, что белок Npro не участвует в вирусной репликации [56; 66], но играет важную роль в персистенции вируса, так как имеет способность влиять на врожденную иммунную систему хозяина [155].

Протеин p7 (7кДа) следует за структурными белками и необходим для производства инфекционного вируса, но не для репликации РНК [101; 143]. Протеин p7 имеет молекулярную массу от 6 до 7 кДа и состоит в основном из гидрофобных аминокислот, которые расположены на каждом конце протеина и участвуют в образовании ионных каналов в мембранах инфицированных клетках, так же как и белок p7 гепатита С [98; 101]. В инфицированных клетках p7 существует в виде p7 или как E2-p7 [101]. До сих пор неизвестно является ли белок p7 структурным или неструктурным белком, поскольку он не был обнаружен в очищенном вирусе [83; 98; 130].

Белки NS2/NS3 транслируются непосредственно после белка p7. Расщепление NS2/NS3 необходимо для репликации НЦП вирусов [143].

Белок NS3 (80 кДа) представляет собой многофункциональный протеин с активностью сериновой протеазы, геликазы и NTPase [55; 130]. Экспрессия белка NS3 (p80) является единственным видимым молекулярным маркером цитопатогенности [55; 144; 147]. Белок NS3 (p80) очень важен, так как считается иммуногенным белком, причем все инфицированные животные имеют высокий уровень антител против этого белка [147].

Белок NS2 (p54) содержит два внутренних сигнальных пептида, которые необходимы для транслокации белка в эндоплазматический ретикулум. Белок NS2 считается варибельным между изолятами пестивирусов, и обнаружить антитела у инфицированных животных против него нелегко [147].

Белок NS4A (10 кДа) функционирует как кофактор для активности сериновой протеазы белка NS3 и играет важную роль в морфогенезе вириона [130].

Белок NS4B (35 кДа) гидрофобный белок, который считается интегральным мембранным белком, локализованным на внутриклеточных мембранах [185].

Белки **NS5A** (58кДа) и **NS5B** (77 кДа) кодируются на конце С полипротеина и могут присутствовать в инфицированных клетках как отдельные или как нерасщепленные белки. О роли этих белков в репликации РНК вируса не известно. NS5B имеет последовательности, характерные для РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) и показывает активность полимеразы *in vitro* [171; 185].

Структурные протеины представлены, капсидным протеином С и тремя оболочечными протеинами, а именно Erns, E1 и E2.

Гликопротеин Erns (ранее известный как E0 или gp44 / 48) обладает рибонуклеазной активностью. Этот белок секретируется из инфицированных клеток в растворимой форме [159]. Считается, что секретируемый Erns предотвращает индукцию бета-интерферона путем связывания и разложения двухцепочечной РНК [108].

Гликопротеин E1 (25-33кДа). Структура и функции этого белка не изучена. Известно, что инфицированные животные не образуют антитела против этого белка. E1 часто анализировали только в контексте с гликопротеинами E2 и Erns. Белок E1 образует дисульфидно связанные гетеродимеры с E2, которые присутствуют на вирусной частице [171].

E2/gp53 (53-55кДа) имеет основные антигенные эпитопы, вызывающие гуморальный иммунный ответ. Структурный гликопротеин E2 представляет собой один из самых варибельных белков пестивирусов, который способен индуцировать вирус нейтрализующие антитела. Для пестивирусов жвачных

животных E2 является основным фактором определяющий тропизм клеточной культуры [130; 171].

Структурные протеины Erns, E2 и неструктурный протеин NS3 являются иммунодоминантными протеинами, вызывающие образование антител в ответ на пестивирусную инфекцию [112].

5'UTR и 3'UTR. Нетранслируемый участок (UTR) содержит cis-действующие элементы, которые важны для репликации РНК и экспрессии вирусного белка. 5'UTR пестивирусов способен образовать так называемую la шпильку (stem-loop), которая состоит из стеблевых последовательностей и более вариабельной области петли. Установлено, что la шпилька участвует в трансляции и репликации вирусной РНК. 3'UTR кодируется открытой рамкой считывания (ORF), которая контактирует с вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRP) [143; 171].

Разделение пестивирусов по видам и подгруппам на основе участка N^{pro} и 5'-UTR считается более достоверным и часто используется для филогенетического анализа [66; 70; 78].

Пестивирусы в ходе репликации часто подвержены мутациям в области гена вирусной РНК полимеразы. Считается, что появление мутаций в течение персистентной инфекции происходит быстрее, чем в результате множественной острой инфекции. [8; 42; 144; 147].

2.2.2.3 Генетическое и антигенное родство возбудителя пограничной болезни с другими пестивирусами

Для обнаружения антигенного сходства и различия между пестивирусами широко используются серологические анализы, в частности, перекрестная нейтрализация [52]. Еще в 1960-е годы Jack Darbyshire с помощью РДП и перекрестной реакции нейтрализации описал антигенное родство между вирусом

ВД-БС и вирусом КЧС [69]. Вирус ПБ по генетическим и антигенным характеристикам близкородственен к вирусу КЧС и вирусу ВД-БС КРС [26; 52; 54; 115; 145; 147].

Сравнительный анализ полного геномного секвенирования вируса ПБ штамма BD-31 с другими пестивирусами определил идентичность аминокислотной последовательности на 71% с вирусом ВД и на 78% с вирусом КЧС. Высокое сходство было обнаружено на 5'-UTR и NS3 участков генома. Сравнительный анализ последовательности штамма BD-31 с неполными последовательностями девяти других штаммов вируса ПБ показал их близкую гомологию с пятью, включая австралийский контрольный штамм X818 и референтный штамм UK Moredun [144].

Для определения генетического родства между разными штаммами пестивирусов было проведено молекулярное исследование штамма X818 ВПБ, изолированного в Австралии, штаммов L83/84 и R2727, изолированных в Великобритании. Результаты исследования показали, что штаммы X818 и L83/84 по антигенным свойствам отличаются от ВД. Штамм R2727 сходен с ВД. Полученные данные были также подтверждены с помощью реакции иммунопреципитации с использованием МА против гликопротеина E2. МА против gpE2 ВД хорошо реагируют со штаммом R2727 и не реагируют со штаммами X818 и L83/84. Для получения более подробных данных о взаимосвязи между тремя изолятами и других пестивирусов, авторы решили клонировать и секвенировать участки E1 и E2 генома пестивирусов. В соответствии с анализом аминокислотной последовательности участков E1 и E2 штамм R2727 показал высокую степень гомологии с ВВД, особенно со штаммом NADL. Также было отмечено, что штаммы X818 и L83/84 отличимы от вируса ВД и вируса КЧС. Интересно то, что определённая аминокислотная последовательность участков E1 и E2 штаммов X818 и L83/84 более сходна с вирусом КЧС, чем с вирусом ВД. Установлено, что на основании анализа участка p80/NS3, штамм X818 вируса ПБ имеет на 94% сходство с вирусом КЧС и на 91-92% – с вирусом ВД. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что штаммы вируса ВД-БС КРС и вируса ПБ

могут быть использованы для разработки эффективной вакцины против пестивирусной инфекции овец [54].

S. Vilcek соавторами (1997) описали генетическую характеристику 42 овечьих пестивирусов, полученных из Великобритании, Швеции и Новой Зеландии. Филогенетический анализ 5'UTR, N^{pro} и С участков показал, что в популяции овец циркулирует не менее трех генотипов пестивирусов. Подробное исследование 5'UTR участка вируса ПБ подтвердило его идентичность с вирусом ВД-1-го генотипа (57-65%), вирусом ВД-2-го генотипа (53-59%) и вирусом КЧС (72-80%) [181].

Paul Becher с коллегами (2003) для определения генетической вариабельности различных штаммов пестивирусов выбрали участки генома N^{pro} и E2. Результаты показали, что штамм PG-2, изолированный в Африке в 1990-х годах, тесно связан со штаммом H138. Кроме того, несколько новых изолированных пестивирусов от овец группируются со штаммом V60 (Reindeer-1), выделенного от оленя. Штамм Gifhorn значительно отличается от всех ранее описанных пестивирусов, включая и вируса ПБ [52].

D.J. Paton и соавторами (1995) показали, что при использовании панели из 76 МА против 9-и разных штаммов (4 референтных штамма вируса ВД, два референтных штамма вируса КЧС, три неклассифицированных пестивируса) пестивирусы могут быть подразделены на четыре основные антигенные группы [152].

Paul Becher с соавт. (2003) сравнили десять изолятов пестивирусов: ВД-1-го генотипа, вирус ВД-2-го генотипа, вирус ПБ, вирус КЧС, штаммы H138 (Giraffe1) и V60 (Reindeer-1) в перекрестной реакции нейтрализации, что позволило им определить шесть генетически разных групп пестивирусов. Для постановки реакции использовали антисыворотки, полученные путем инфицирования овец штаммами V2536 вируса ПБО-1-го генотипа, 17385 вируса ПБО-2-го генотипа, и Gifhorn вируса ПБО-3-го генотипа. Нейтрализующая активность антисывороток была определена по отношению к каждому изолированному вирусу. Результаты исследования показали, что титр нейтрализующих антител против

гетерологичной группы пестивирусов ниже, чем против вирусов гомологичной группы. Антисыворотка, полученная против вируса КЧС, ПБ-1, ПБ-2, ПБ-3, и штамма H138, слабо или не нейтрализовала вирусы ВД-1-го и ВД-2-го генотипа. Антисыворотка, полученная против штаммов X818, L83-84 и V2536 вируса ПБ-1-го генотипа; штаммов 17385 и V60 вируса ПБ-2-го генотипа, штамма Gifhorn вируса ПБ-3-го генотипа нейтрализовали гетерологичные штаммы вируса ПБ и вируса КЧС в той же степени. Кроме штамма PG-2, все остальные исследуемые штаммы пестивирусов не нейтрализовались антисывороткой, полученной против штамма H138 [52].

2.2.3. Характеристика биотипов

Изоляты пестивирусов от овец способны инфицировать культуры клеток различного происхождения [82; 143]. В зависимости от воздействия на культуру клеток, пестивирусы подразделяются на два биотипа ЦП и НЦП [55; 65; 81; 142; 143]. Заражение ЦП вирусами приводит к разрушению и гибели клеток через апоптоз [104; 124]. Напротив, НЦП пестивирусы не индуцируют макроскопические морфологические изменения в инфицированных клетках, но могут быть причиной острой и хронической инфекции у животного [113; 124; 143].

Фактически, все изоляты пестивирусов от овец и коз НЦП в культуре клеток. Однако, были описаны два ЦП изолята содержащие вставки клеточной последовательности в кодирующей NS23 участке, что привело к ее расщеплению на NS2 и NS3 [147].

При молекулярном исследовании ЦП и НЦП изолятов ПБ, было обнаружено, что в области кодирования NS2-3 (p125) участка ЦП изолятов имеются вставки клеточных последовательностей, которые отсутствуют у НЦП изолятов. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей показал, что

ЦП и НЦП вирусы почти идентичны, указывая на то, что ЦП изоляты вируса ПБ развиваются из НЦП изолятов путем рекомбинацией РНК между вирусным геномом и клеточным сиквенсом [51]. Известно, что в культуре клеток, зараженной НЦП пестивирусами продуцируется белок p125/NS2-3. В клетках зараженных ЦП пестивирусами продуцируются не только белок p125/NS2-3, но также и два белка-p54/NS2 и p80/NS3, полученных из белка p125/NS2-3 [51; 147].

2.2.4. Методы лабораторной диагностики пестивирусной инфекции мелкого рогатого скота

Диагноз на пестивирусную инфекцию ставится на основании клинических, патологических, эпизоотологических данных проявления инфекции. Окончательный диагноз ставится на основании лабораторных методов исследований, включающих изоляцию вируса в культуре клеток, а также серологические (ИФА, РН, РИФ, РДП, РСК, ИГХ) и молекулярно-генетические методы. Каждый метод исследования имеет свои преимущества и недостатки, включая высокую чувствительность, экономические затраты и время получения результата [96].

Изоляция вируса в культуре клеток. Изоляцию пестивируса в культуре клеток проводят с использованием первичных или перевиваемых культур клеток из тканей органов КРС или овец. Перед изоляцией вируса, необходимо исследовать сыворотку для роста культур клеток и саму культуру на контаминацию вирусов. Использование контаминированных компонентов приводит к ложноположительным результатам [80]. По данным В.А. Мищенко и соавторов (2014) добавления в ростовую среду заменителя сыворотки позволит получить вирусный материал свободный от вирусной контаминации и микоплазм [29]. Изоляция вирусов в культуре клеток является стандартным диагностическим

методом исследования пестивирусной инфекции. Однако из-за больших расходов и долгого ожидания результата этот метод становится менее используемым [82].

ОТ-ПЦР. ОТ-ПЦР считается наиболее чувствительным методом лабораторной диагностики, что позволяет выявить ПИ животных, контаминацию пестивирусами биопрепаратов. Для обнаружения пестивирусной инфекции МРС разработано множество методик постановки ОТ-ПЦР [58; 105; 176]. К. Willoughby с коллегами (2006) разработали методику ОТ-ПЦР в реальном времени для идентификации вируса ВД-БС 1-го и 2-го генотипа и вируса ПБО у овец [188]. По данным S. Vilcek и соавторов (2000) пестивирусы овец могут быть идентифицированы с помощью ОТ-ПЦР с использованием праймеров, которые также обнаруживают пестивирусы других видов [176]. Несмотря на то, что для диагностики пестивирусной инфекции на сегодняшний день широко используют ПЦР и разрабатывают новые методики, основная проблема стандартизации диагностических методов связана с вероятностью высокой скорости мутации в геноме вирусной РНК, которая приводит к усилению антигенных различий между штаммами полевых вирусов [96].

Серологические методы исследования. Для исследования сывороток крови МРС на наличие специфических антител на пестивирусную инфекцию из серологических методов диагностики в основном используют ИФА, РН, РИФ, РСК и РДП [80; 84; 100; 125]. С помощью РДП, РИФ и ИФА у всех пестивирусов можно обнаружить перекрестно реагирующие антитела [52; 147; 186]. В первые недели сероконверсии РДП и РН более чувствительны, чем ИФА. При длительном течении болезни (более девяти месяцев) применяют РН и ИФА. При использовании ИФА для обнаружения пестивирусов у овец необходимо проверить подготовку сыворотки крови для исследования. Так как, сыворотки или свернувшейся крови часто приводит к отрицательным результатам при диагностике ПИ животного [118].

Реакция диффузионной преципитации в геле. С помощью РДП можно обнаружить антитела ко всем штаммам пестивирусов. Сообщается, что у инфицированных овец ПБ, можно легко обнаружить антитела с помощью РДП

[107; 118]. Для постановки РДП можно использовать метод, предложенный Ouchterlony (1948г.) [107]. По данным P.D Kirkland и соавторов (2006) с помощью РДП можно провести групповое исследование животных и обнаружить антитела ко всем штаммам пестивирусов у жвачных животных и свиней [118]. Однако по данным Edwards S. (1990), при исследовании сывороток крови КРС реакция иммунопреципитации в геле имеет низкую чувствительность и более сложна в интерпретации результатов [82]. S.R Lanyon с соавторами (2012) сообщают, что поствакцинальные антитела не выявляются в РДП и поэтому маловероятно, что вакцинация будет препятствовать использованию этого теста в диагностических целях [125]. С.А. Evans и соавторы (2017) определили, что по сравнению с ИФА и РН, РДП является более чувствительным методом для диагностики ВД у МРС [84].

Иммуноферментный анализ является чувствительным, надежным тестом для диагностики пестивирусов [30; 81]. С помощью непрямого метода ИФА можно дифференцировать острую форму инфекции КРС от персистентной формы. Для постановки ИФА используют коммерческие наборы с моно- и поликлональными антителами, которые позволяют обнаружить протеины р80/NS3 и Erns (gp48) и обнаруживает комплексы антиген-антитело с фермент-конъюгированным антителом с помощью спектрофотометра. По сравнению с РН, ИФА имеет на 98% специфичности и 99% чувствительности в диагностике ВВД [76]. Для обнаружения ВПБ не рекомендуется использовать наборы ИФА предназначенные для диагностики ВД-БС КРС [149].

Метод иммунофлуоресценции и иммуногистохимии. Иммуногистохимический метод исследования позволяет обнаружить вирусный антиген в гистологических срезах и широко используется для обнаружения ПИ животных [76; 80]. Для диагностики НЦП штаммов пестивирусов широко используют РИФ. С помощью РИФ исследуют культуры клеток и различные ткани инфицированных животных [1, 38; 57; 97; 98; 172].

2.2.5. Иммуниет и вакцинопрофилактика

При пестивиральной инфекции иммунный ответ у иммунокомпетентных овец проявляется независимо от того, на какой стадии суягности произошла инфекция. Инфицированных животных уже через неделю или в некоторых случаях через 2-5 недель после заражения можно обнаружить антитела. Колостральные антитела не обеспечивают полную защиту ПИ животных от инфекции. Однако, при серологическом исследовании животных эти антитела обеспечивают ложно-отрицательный результат. Пестивирал выводится из организма животного в течение 8-10-и суток при уже сформировавшемся иммунитете [25; 26; 131].

Пестивиралы относятся к числу наиболее экономически значимых патогенов в животноводстве. Ключевым элементом в контроле заболеваний является обнаружение и уничтожение ПИ животных, непрерывный мониторинг неинфицированного стада для быстрого обнаружения реинфекции [7; 16; 161]. На сегодняшний день, создание эффективной вакцины против пестивирал, остается актуальной темой для многих исследователей. Разработано множество вакцин и дана оценка их эффективности [7; 37; 113; 120; 133]. Несмотря на наличие и широкое использование, как живых, так и инактивированных вакцин, их недостатком является отсутствие свойств маркера. Считается, что разработка эффективной и безопасной маркерной вакцины будет способствовать всемирному контролю и искоренению пестивирал. Преимущество этой вакцины также заключается в дифференциации вакцинированных от естественно инфицированных животных [113; 120]. Для профилактики ВД в РФ используют более 10 зарегистрированных вакцин [13]. По данным М.И. Гулюкина и соавт. (2013), иммунизация несколькими штаммами и НЦП штаммами вакцин являются более эффективными [16].

Считается, что для контроля ПБО следует уделять внимание не только ПИ животным, но и профилактике распространения инфекции среди восприимчивых

суягных овцематок в первой половине суягности. Однако контролировать распространение инфекции в стаде является сложной задачей, и зависит от требований фермеров относительно их методов ведения сельского хозяйства. Доказано, что совместное содержание КРС и МРС приводит к возникновению пестивирусной инфекции. Так, совместное содержание беременных коз с ПИ коровами (носителями вируса ВД-БС генотипа 1 субгенотипов e и h) приводило к рождению жизнеспособных ПИ козлят. Напротив экспериментальная инфекция овец вирусом генотипа 2 приводила к рождению жизнеспособных ПИ ягнят. Было установлено, что резервуаром вируса диареи КРС могут служить овцы и свиньи при их совместном содержании [150; 151]. Следовательно, не рекомендуется содержать животных вместе.

Для профилактики заноса ПБО, животные, прибывшие в стадо, должны находиться в карантине. Рекомендуется исследовать их на наличие ВПБ [147]. В отличие от ВД-БС, для контроля которого во всем мире были разработаны различные программы и стратегии, для ПБ подобные методы не разрабатывались [149]. А. Вгун и соавторы (1993) описали эффективность коммерческой инактивированной вакцины против ВПБ, которая была получена из НЦП штамма Aveyron и Нью-Йоркского штамма ВПБ. С целью повышения иммунитета в случае ранней суягности было рекомендовано вакцинировать молодых животных до достижения ими полового возраста [62].

Несмотря на значительные усилия, разработок вакцин, профилактических мероприятий пестивирусы продолжают вызывать серьезные потери в животноводстве, а риск реинфекции представляет собой постоянную угрозу для стран, которым удалось искоренить данный пестивирус. Трудности, связанные с контролем пестивирусов, зависят не только от торговли животными между странами, восприимчивыми к этой инфекции, но также от способности вируса вызывать персистентную инфекцию [16; 129].

2.3. Вирусная диарея – болезнь слизистых у мелкого рогатого скота

Вирусная диарея – контагиозное заболевание, характеризующееся поражением респираторного, репродуктивного и желудочно-кишечного тракта [9; 10; 11; 12; 13; 15; 16; 17; 19; 28; 35; 41; 77; 82; 95; 113; 124; 150; 155; 170].

На основе филогенетического анализа и серологических данных вирус ВД подразделен на 2 вида: ВД-1 и ВД-2, хотя последующая характеристика вирусных штаммов двух видов показала между ними антигенные различия [90; 91; 109; 113; 151; 177]. ВД-1 подразделен на 20 субгенотипов (ВД-1a, ВД-1b, ВД-1c, ВД-1d, ВД-1e, ВД-1f, ВД-1g, ВД-1h, ВД-1i, ВД-1j, ВД-1k, ВД-1l, ВД-1m, ВД-1n, ВД-1o, ВД-1p, ВД-1q, ВД-1r, ВД-1s, ВД-1t) и ВД-2 на 6 субгенотипов (ВД-2a, ВД-2b, ВД-2c, ВД-2d, ВД-2e, ВД-2f) [90; 91; 157; 166; 177]. Согласно современной классификации, ВД-БС 1-го генотипа обозначается как Pestivirus A, а ВД-БС КРС 2-го генотипа как Pestivirus B [116; 164; 165].

Клинические проявления инфекции МРС ВД-БС сходны с инфекцией ВД-БС КРС. По данным ряда авторов, различия в проявлении болезни определяются принадлежностью возбудителя к генотипу и субгенотипам. Преобладание вируса ВД-БС в этиологии инфекционных болезней овец и коз отмечены в нескольких странах на основании ретроспективной диагностики. Уровень сероположительных овец и коз при ВД-БС на 3-35% выше, чем при ПБ. У овец постнатальная инфекция ВД-БС характеризуется умеренным клиническим проявлением, пирексией и лейкопенией. В ряде случаев болезнь характеризуется абортами или рождением нежизнеспособного приплода иногда до 100%, но случаи рождения ПИ козлят встречаются гораздо реже, чем у КРС и овец. В литературе описаны случаи рождения ПИ козлят, мать которых содержали совместно с ПИ телятами, зараженными вирусом ВД-БС генотипа 1 [151].

Исследованиями многих авторов описаны обнаружение субгенотипов ВД-БС генотипа 1 в различных странах. Так, в Австрии циркулируют 5 субгенотипов ВД-1 (b, d, f, g, h), преобладающим субгенотипом является ВД-1f. В Германии

регистрируются субгенотипы ВД-1b и ВД-1 d. В США, Великобритании, Канаде широко распространен ВД-1a. Генетический анализ изолятов ВД в Словении показал, что в стране циркулирует ВД-1d и ВД-1f, в Италии циркулирует ВД-2с, в Индии собраны изоляты ВД-1b [73; 113; 121; 138; 140; 154; 157; 170; 177; 179].

А.О. Abdel-Latif соавторами (2013) при исследовании абортированных плодов от коз обнаружили ВД в Египте. Секвенированием 5'-UTR участка определили принадлежность обнаруженного вируса к ВД-1a наряду с уже обнаруженным ранее ВД-1b. ВД выращивали в культуре клеток МДВК. Проводили 5 последовательных слепых пассажей и только после 5-го пассажа проявились характерные ЦП изменения. Выделенный ВД оказался ЦП биотипа. Также в своем исследовании они описывают поражение центральной нервной системы у козленка, вызванное пестивирусом [43].

S. Swasdipan и соавторы (2001) сообщали, что в отсутствии материнского иммунитета ВД может инфицировать плод овцематки в течение четырех дней. Авторы экспериментально на 18 день суягности инфицировали девяти овцематок австралийским изолятом ВД генотип 1. Цель исследования заключалась в определении сроков диссеминации вируса в репродуктивной системе овцематки. Результаты исследования показали, что в тканях плодов уже через 100 часов после заражения обнаружена ВД с помощью ОТ-ПЦР и иммуногистохимии [169].

Проведенное серологическое исследование овец в Патагонии, в Аргентине показало, что 46,3% образцов от овец были положительны на ВД генотип 1, 13 % на ВД генотип 2 и 20,4 % положительны и на ВД генотип 1 и на ВД генотип 2, 14,8 % были отрицательны и к ВД-1 и к ВД-2 и 5,5 % показали цитотоксичность в культуре клеток. Принимая во внимание результаты серологических реакций, авторы провели исследование патологического материала от ягнят в ОТ-ПЦР. Результаты показали, что три образца, которые были сероотрицательны к ВД-1 и ВД-2, положительны в ОТ-ПЦР. Наличие сероотрицательных овец к ВД-1 и ВД-2 и положительных в ОТ-ПЦР подтверждают наличие ПИ животных. Большинство овцеводческих ферм в Патагонии практикуют совместное содержание мелких жвачных животных с КРС, что и служит источником распространения ВД в этом

регионе. Однако на ферме, где не содержится КРС, все овцы были положительны с помощью ОТ-ПЦР, указывая на циркуляцию вируса в стаде и без содержания КРС [110].

Т. Passler с коллегами (2014) воспроизвели экспериментальную инфекцию ВД-БС у беременных коз. Животных разделили на две группы по 5 коз в каждой и заразили изолятами вируса ВД-БС: первую группу – вирусом 1-го генотипа, вторую группу – вирусом 2-го генотипа. В первой группе виремию и сероконверсию обнаружили у трех из пяти коз; во второй группе – у всех животных. Уровень гуморального иммунного ответа впоследствии был выше у коз второй группы. Однако авторы опыта считают, что различные уровни виремии и сероконверсии у коз связаны, скорее, с индивидуальными свойствами штаммов, чем с различиями генотипов. У коз, зараженных вирусом ВД-БС генотипа 2, инфекция органов репродуктивной системы, проявлялась особенно ярко. Клинические признаки включали резорбцию или мумификацию эмбрионов, аборт, рождение недоразвитого приплода. Аборты наблюдали на протяжении всех триместров беременности, что послужило поводом в будущем учитывать инфекцию ВД-БС при дифференциальной диагностике абортов у коз. На развитие персистентной инфекции коз оказывает влияние срок беременности, на котором произошло заражение. Например, при заражении на 38-45 дни беременности у родившихся ПИ козлят развиваются неврологические симптомы: тремор и атаксия; при заражении на 60 день – у ПИ козлят в возрасте до одного года наблюдают исхудание и хроническую анемию. В опытах Т. Passler с соавторами (2014), ПИ козленок родился только во второй группе от козы, зараженной изолятом вируса ВД-БС генотипа 2. В крови ПИ козленка через 125 дней после заражения отсутствовали антитела к вирусу ВД-БС и присутствовали вирусные антигены ВД-БС в лейкоцитах крови и внутренних органах: тимусе и мозге, а у матери вирусные антигены обнаружили в тканях плаценты. Обнаружение антигенов проводили методами ИФА и иммуногистохимии. Интересно, что в этом опыте авторы обнаружили у ПИ козленка признак инфекции ВД-БС, характерный для ПИ телят и не характерный для коз – остеопороз трубчатых костей. Обычно

остеопороз у ПИ коз не развивается, несмотря на то, что антиген вируса ВД-БС обнаруживают в остеоцитах, остеокластах и остеобластах. Кроме этого, выяснилось, что вирусный антиген не обнаруживается в кожном выщипе уха козленка. Это подтверждает результаты исследований других авторов, утверждающих, что кожные пробы коз не пригодны для диагностики ВД-БС, так как вирусный антиген в них обнаруживают крайне редко [42; 151].

В 1982-1983 гг. от лошадей и овец с признаками хронического отравления, обусловленного техногенным загрязнением почвы, выявлены несколько изолятов вируса, которые в культуре клеток вызывали на 3-4 сутки разрушение монослоя. В сыворотке переболевших лошадей присутствовали нейтрализующие антитела к этим изолятам в титре 1:16-1:48. Эти же пробы в агаровом геле образовывали линию преципитации с культуральной жидкостью. С некоторыми сыворотками наблюдали двойную линию преципитации. Изоляты, полученные от лошадей, в перекрёстной реакции преципитации с вирусом диареи (штамм «Орегон») образовывали общую линию. Однако реакция нейтрализации с возбудителями вирусной диареи и вирусного артериита лошадей была отрицательной [39; 42].

М. Giangaspero и R. Harasawa (2004) исследовали 61 изолят от овец, КРС и некоторые контаминированные ВД-БС биологические материалы с использованием палиндромных нуклеотидных замен (PNS) на трех различных локусах – V1, V2, V3 5' UTR [90]. На основе филогенетического анализа изоляты ВД генотипа 2 были подразделены на 6 субгенотипов называемых как ВД генотип 2 субгенотип а (ВД-2а), ВД генотип 2 субгенотип b (ВД-2b), ВВД-2с, ВД-2d, ВД-2е ВД-2f [106; 107]. Вирусная диарея генотип 2 субгенотип а регистрируется во всем мире и обнаружен не только у КРС, но и у овец. Вирусная диарея генотипа 2 субгенотипа b, ВД генотипа 2 субгенотипа с и ВД генотипа 2 субгенотип d отнесены к изолятам из Южной Америке. В контаминированных биологических материалах обнаружены ВД-2а и ВД-2d [90; 93].

По данным Н. Н. Крюковым. и соавторами (1968) в Российской Федерации ВД-БС обнаружена в 1970 году в форме злокачественной вирусной диареи у телят. Авторы предполагают, что продолжительному сохранению ВВД в хозяйстве,

возможно, способствовал прямой контакт овец и свиней с телятами [19; 42]. А. Г. Глотов с соавт. (2009) впервые выделили НЦП изолят ВД генотипа 2 [10; 35]. Вирусная диарея считается широко распространенным заболеванием на территории Сибири, где у 61,33% новорожденных телят, 85,1% коров, 77,8% быков производителей выявлены вируснейтрализующие антитела к ВД-БС КРС [15]. По данным А.Е. Верховской и соавторов (2009) более 90,9 % КРС сероположительны к ВД. [7]. Более чем в 60% хозяйств различных регионов РФ обнаружены антитела к ВД-БС [41]. У быков-производителей инфицированность ВД-БС КРС снижает качество спермы и встречается в локально-тестикулярной форме [11].

В результате исследований, проведенных методом ИФА, антитела к вирусу диареи были обнаружены и в крови диких жвачных – канадских лесных бизонов, завезённых из Канады в Республику Саха (Якутия) РФ с целью сохранения вида по программе восстановления плейстоценовой мегафауны Северной Америки. В исследовании использовали авторский штамм возбудителя «LU\12» [36; 42]. Вирус имеет значительное сходство последовательности нуклеотидов с штаммом «ZM-95» (AF526381), который, по данным М. Nagai. с соавторами (2008), предположительно относится к новому отдельному субгенотипу 1m. Антитела к штамму «LU\12» обнаружены также у домашнего скота в фермерских хозяйствах Московской области [17; 36]. По данным А.Г. Глотова и соавторов (2006) у разных ПИ животных чаще выявляется субгенотип а генотипа 1 ВД-БС КРС [9].

Случаи заражения ВВД также описаны у верблюдов старого мира в 1975 году и нового мира в 1983 году [187; 195]. В более ранних работах ряда авторов описаны перекрестные иммуногенные связи пестивирусов разных видов животных. Так, венгерские ученые Magda A. с соавторами (1962) сообщали, что сыворотка к вирусу КЧС нейтрализует возбудителя вирусной диареи. L.C Coggins соавторами (1963) нашли, что эти вирусы имеют общие антигены, которые выявляются в реакции диффузионной преципитации в геле [42].

2.4. Хоби вирус – Pestivirus H – Атипичный пестивирус

По результатам филогенетического анализа идентифицированы атипичные пестивирусы, получившие название Хоби-подобные пестивирусы, Хоби вирус («HoBi-like pestivirus»), вирусная диарея 3-го генотипа и на сегодняшний день получившая обозначение как Pestivirus H. Впервые Хоби вирус был обнаружен в 2004 году в фетальной сыворотке КРС, импортированной из Бразилии. Вирус был обозначен как D32 / 00_HoBi и предложен в качестве прототипа нового вида Pestivirus, BVDV-3 [4; 8; 40; 42; 50; 71; 72; 74; 75; 160; 184].

Хоби вирус был изолирован в естественных условиях от коров, буйволов, диких свиней, жирафов, овец и коз [71; 162; 167; 184]. Предполагалось, что первый случай естественной инфекции был обнаружен у буйвола из Бразилии в конце 1990 годов [50]. Впервые естественное заражение КРС описано К Stahl. и соавторами в 2007 году в Таиланде при эпидемиологическом обследовании стада. Таиландский штамм Th/04_KhonKaen изолирован от инфицированного теленка [167]. Клинические признаки заболевания ВД-3 генотипа у МРС и КРС подобны симптоматике ВД-1 и ВД-2 [72].

Итальянские ученые N. Decaro с соавторами (2012) воспроизвели экспериментальную Хоби-вирусную инфекцию у овец и сравнили результаты с результатами заражения коров и свиней. В опыте использовали по пять молодых животных каждого вида, серонегативных к вирусу ВД-БС. Для заражения использовали штамм Хоби вируса европейского происхождения «Italy-1/10-1». В течение 28 дней после заражения оценивали следующие показатели: развитие клинических признаков, появление лейкопении, виремии, продолжительность накопления вируса в организме и сероконверсию. Инфекция телят и ягнят была продуктивной, у животных наблюдали симптомы респираторного заболевания (ринит), умеренную гипертермию, лейкопению и виремию, животные выделяли вирус в окружающую среду с истечениями из носа и фекалиями. Ретроспективным исследованием обнаружили специфические антитела к вирусу

методами ИФА и РН. В то же время, заражённые поросята не проявили клинических признаков болезни и лейкопении, вирусную РНК в клиническом материале обнаружить не удалось, однако в сыворотке крови зарегистрировали специфические вируснейтрализующие антитела. Также N. Decaro соавторами (2013) при экспериментальном заражении овец ВВД-1 и ВВД-3 учитывали перекрестную реакцию между ВВД-1 и ВВД-3 у овец [42; 74].

Н. Shi и соавторами (2016) впервые описали естественное заражение овец и коз Хоби вирусом в Центральном Китае в Хэнане. У животных наблюдались симптомы респираторного заболевания, вызванные Итальянским штаммом Хоби вируса, описанным N. Decaro с соавторами. Для того, чтобы определить связаны ли эти симптомы с Хоби вирусной инфекцией, 49 образцов сыворотки крови и 22 пробы смывов с носовой полости овец и коз были отобраны для серологических исследований и исследований с помощью ОТ-ПЦР. Серологические исследования показали уровень серопревалентности у овец и коз на 12,2%. Нуклеотидное секвенирование 5'UTR участка и филогенетический анализ подтвердили наличие Хоби вируса у животных [162].

2.5. Контаминация биологических продуктов пестивирусами

Контаминация биологических продуктов пестивирусами зарегистрирована во многих странах и является основной проблемой ветеринарной медицины и медицины в целом [94; 103].

Фетальную сыворотку КРС широко используют в качестве питательной добавки в выращивании культур клеток. Однако, по неосторожности и отсутствию контроля, многие партии фетальной сыворотки контаминированы пестивирусами [47; 60]

По мнению многих исследователей, наличие пестивирусов в культурах клеток и в эмбриональной сыворотке уже давно является основной проблемой не

только в лабораторных исследованиях, но и в производстве вакцин [1; 33; 60; 92; 103; 132]. Из-за контаминации пестивирусами вакцины против контагиозной эктимы, у коз отмечалась тяжелая вспышка репродуктивных заболеваний [132]. Клинические признаки характеризовались абортами, бесплодием или рождением слабых или мертвых козлят. У животных обнаружен высокий уровень антител к ВВД, что и послужило основанием на исследовании вакцины против контагиозной эктимы, использованной в вакцинации козьего стада. При исследовании вакцины изолирован НЦП штамм пестивируса. Исследование описано Т. Loken и соавторами (1991). Авторы отмечают, что данная контаминированная вакцина вызвала вспышку пограничной болезни у коз, которые были вакцинированы на ранних стадиях беременности. Кроме того, у овец и КРС находившимися в тесном контакте с инфицированными козами отмечалась пестивирусная инфекция [132].

Е. Falcone и соавторы (2003) изолировали НЦП штамм ВД-2 из партии вакцины против ринотрахеита КРС вызвавшей заражение трехмесячных телят [86]. В США, Японии и Европе сообщалось о контаминации вакцин для человека [94; 102; 103].

В Тунисе в 1995 году вакцинация против оспы овец сопровождалась вспышкой ПБО с характерными клиническими признаками: высоким уровнем абортов 15-80%, мертворожденных животных, рождением слабых ягнят с повреждением волосяного покрова. Для вакцинации использовали 14 серий живой вакцины против оспы овец. Контрольным исследованием обнаружили, что 11 серий вакцины контаминированы пестивирусами. Спустя 5 лет после идентификации ВПБ в составе вакцины, овечий пестивирус был обнаружен в Северной части страны, где вакцинация не проводилась [173].

Описанное выше, свидетельствует о том, что культивирование вирусов на контаминированных культурах клеток для создания вакцины представляет собой риск распространения возбудителей инфекционных заболеваний. Предполагается, что контаминация клеточных линий, эмбриональных бычьих сывороток, приготовленных в различных регионах мира, вакцин для животных и человека,

вероятно, приведут к будущему открытию дополнительных штаммов пестивируса [161].

2.6. Заключение по обзору

Из представленных в обзоре литературе данных следует, что пестивирусы относятся к одним из самых широко распространённых инфекций не только крупного, но и мелкого рогатого скота во всем мире. Учитывая антигенное и генетическое родство пестивирусов осложняется проведение дифференциальной диагностики. В странах, где ранее диагностировался тот или иной пестивирус существует вероятность обнаружения другого вида пестивируса, который может являться новым для данной местности.

Наряду с успехами создания биопрепаратов нового поколения традиционные вакцины, а также гипериммунные сыворотки остаются основным средством профилактики вирусных болезней животных. В случае недостаточного контроля биологических материалов животного происхождения используемых в производстве этих препаратов, создается потенциальная угроза распространения возбудителей пестивирусных инфекций.

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена в 2014-2017 гг. в лаборатории вирусологии ФГБНУ ВИЭВ по заданию НИР №0578-2014-0023 «Сформировать базу данных вирусов – возбудителей респираторных и лихорадочных болезней лошадей и крупного рогатого скота, в т.ч. нетипичных и малоизученных, находящихся в активной циркуляции, в т.ч. природных биоценозах для совершенствования методов диагностики» программы фундаментальных научных исследований государственных академических наук на 2013-2020 годы.

3.1. Материалы и оборудование

3.1.1. Материал для исследования

Материал для исследования был получен с помощью сотрудников Национального центра ветеринарной диагностики города Душанбе, Республики Таджикистан. Объектом исследования являлись овцеводческие и козоводческие хозяйства различного профиля 13-и районов Республики Таджикистан, в которых регистрировали респираторные, желудочно-кишечные и репродуктивные заболевания мелкого рогатого скота. Исследовали клинический (234 пробы сывороток крови, 2 пробы – выделения из половых органов), а также патологический материал от вынуждено убитых и абортированных плодов (32 пробы). Предварительная обработка материала проводилась на базе лаборатории Национального центра ветеринарной диагностики.

3.1.2. Вирусы

Референтный штамм Oregon C24V (субгенотип 1a) вируса ВД-БС КРС, персистентно-инфицированная ВД-БС КРС культура клеток MDBK, вакцинный штамм вируса чумы мелких жвачных, штамм ТК-А вируса ИРТ в виде коммерческих лиофилизированных вакцин.

3.1.3 Культуры клеток

Перевиваемые культуры клеток почки свиньи «РК-15», почки африканской зелёной мартышки «Vero», культура эпителиальных клеток почки быка «MDBK» из коллекции клеточных культур ВИЭВ, а также полученные нами первичные и субкультивируемые культуры клеток тестикулов козленка (ТК) и почки ягненка (ПЯ).

3.1.4. Питательные среды и растворы

Среда ИГЛА МЕМ (ПанЭко, Россия) с добавлением L-глутамина (ООО БиолоТ), добавлением 10% сыворотки крови КРС (Biosera, Франция) и антибиотик: амикацина по 1мг/мл (ОАО Синтез, Россия); 0,02% раствор версена (ВИЭВ); 0,25 % раствор трипсина – ЭДТА (ПанЭко,Россия); 0,15% раствор трипсина (ПанЭко, Россия). Для криоконсервации клеток использовали 10% раствора диметилсульфоксида (ДМСО) в составе криозащитной среды.

3.1.5. Коммерческие наборы

Набор реагентов для проведения обратной транскрипции «ОТ-1» (ЗАО «Синтол, Россия); набор реагентов для выделения РНК «РНК-Экстран» (ЗАО «Синтол, Россия); набор реагентов для проведения амплификации.

3.1.6. Реактивы

Кислота борная (Химмед, Россия); Трисгидроксиметиламинометан (ПанЭко, Россия); уксусная кислота (Химмед, Россия); агар Дифко (Becton Dickinson, США); агароза (Helicon, Россия); бромистый этидий (Helicon, Россия), иммерсионное масло (Химмед, Россия), ацетон (Химмед, Россия), этиловый спирт (Химмед, Россия).

3.1.7. Буферные растворы

Фосфатно-солевой буферный раствор pH 7.2, боратный буферный раствор pH 8.6, Трис-ацетатный буферный раствор pH 7.6.

3.1.8. Лабораторная посуда

Для проведения исследований использовали следующую лабораторную посуду:

- пластиковые, стерильные 6-ти, 12-ти, 24-х, 96-ти луночные культуральные планшеты (“Costar”, США)
- пластиковые чашки Петри диаметром 35, 60, 90, 150 мм (ПанЭко, Россия);
- автоматические пипетки-дозаторы, многоканальные (Nichipet, Япония) и одноканальные (Nichiryo, Япония);
- серологические стерильные пипетки объемом 5, 10, 25, 50 мл (ПанЭко, Россия);
- наконечники для автоматических пипеток различного объема с антиаэрозольными фильтрами (ПанЭко, Россия);
- пластиковые стерильные пробирки (ПанЭко, Россия);
- центрифужные пробирки (ПанЭко, Россия);
- микропробирки типа Эппендорф 0,2 мл; 0,5 мл; 1,0 мл; 1,5 мл; объема (ПанЭко, Россия);
- криопробирки (ПанЭко, Россия);
- фильтрующая насадка (ПанЭко, Россия)
- предметные и покровные стекла;
- стеклянные чашки Петри, воронки, колбы, стеклянные флаконы;
- мерные цилиндры;
- инструменты: ножницы, скальпели, пинцеты, шприцы.

3.1.9. Лабораторное оборудование

В работе использовали следующее лабораторное оборудование: центрифуга высокоскоростная MPW-260R (Польша); центрифуга MPW-251 (Польша); центрифуга MPW – 310 (Польша); водяная баня BWT-U (Biosan, Латвия); миницентрифуга (ELMI, Латвия); магнитная мешалка MSH-300 (Biosan, Латвия); шейкер качающего движения OrbitalShaker-Incubator ES-20 (Biosan, Латвия); электронные весы ElectronicBalance (Петвес, Россия), лабораторный миксер

Eppendorf-Mixer 5432 (Eppendorf, Германия); pH-метр (Аквилон, Россия); инвертированный микроскоп (OPTIKA ITALY, Италия); люминисцентный микроскоп (Axio Imager M1, ZEISS, Германия) CO₂ инкубатор (Binder, Германия); дистиллятор (ДЭ-4, Россия); шкаф с ламинарным потоком стерильного воздуха с УФ лампой (Gelaïr, Франция); ПЦР бокс с УФ лампой (ДНК-технология, Россия); УФ транслюминатор с длиной волны 312 нм (Vilber Lourmat, Франция); камера для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия); ДНК-амплификатор (ДНК-технология, Россия); термостат (Sanyo, Япония); термостат твердотельный (ДНК-технология, Россия); холодильник для банок крови на плюс 4⁰С; плюс 8⁰С (Стинол, Россия); низкотемпературный холодильник минус 70⁰С (Sanyo, Япония).

3.2. Методы исследования

3.2.1. Отбор, хранение и подготовка проб

Клинический и патологический материал для исследования перевозили в специальной стерильной ёмкости, с хладагентами. В отложенных случаях материал для исследования сохраняли при температуре минус 70⁰С. Патологический материал измельчали на гомогенизаторе, центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут. Для заражения культур клеток и серологических исследований использовали осветлённую путём низкоскоростного центрифугирования, обработанную ультразвуком 10%-ю суспензию паренхиматозных органов абортированных плодов. Для каждого исследования подготавливали аликвотную пробу. Супернатант и гомогенат тканей хранили при температуре минус 70⁰С.

3.2.2. Культивирование культур клеток

Культуры клеток культивировали на среде Игла MEM с добавлением L-глутамина, 10% сыворотки крови КРС, антибиотика (амикацин по 1 мг/мл).

Для приготовления первичной культуры клеток использовали органы 3-4-х месячных животных. Первично-трипсинизированную культуру клеток ПЯ и ТК готовили совместно с к.б.н. Т.В. Гальнбек по общепринятой методике. Монослой первичных культур клеток формировался на 3-4-е сутки.

3.2.3. Культивирование вирусов

Культивирование вируса ПБ проводили в соответствии с рекомендациями МЭБ (2012) [72]. Для этого использовали кусочки органов абортированных плодов (легкие, сердца, селезенка, печень, желудок). Супернатант измельченного патологического материала фильтровали с помощью шприцевой фильтрующей насадки через 0,45 μ М фильтр. 10%-ю вируссодержащую суспензию наносили на монослой культуры клеток и инкубировали в течение 1-1,5 часов при 37°C в термостате при атмосфере CO₂. После контакта, монослой клеток дважды промывали средой ИГЛА MEM с антибиотиком (амикацин по 1 мг/мл) и добавляли поддерживающую среду. Состав поддерживающей среды зависел от вида культуры клеток, используемой для заражения. Зараженные культуры клеток инкубировали в течение 4-6-и дней. После инкубации инфицированные культуры клеток замораживали при температуре минус 70°C и после оттаивания использовали для следующего пассажа.

3.2.4. Серологические исследования

3.2.4.1. Реакция иммунофлуоресценции

Для выявления пестивирусов НЦП биотипа использовали прямой метод постановки реакции иммунофлуоресценции (РИФ). Монослой инфицированных клеток на покровных стеклах (слайдах) промывали фосфатно-солевым буферным раствором и фиксировали в смеси спирт-эфира в равном объеме. Затем наносили специфические иммуноглобулины мышей против ВД-БС КРС, конъюгированные с ФИТЦ, в рабочем разведении и инкубировали в течение 30 минут в термостате. Иммуноглобулины мышей к ВД-БС КРС, конъюгированные с ФИТЦ, были ранее получены сотрудниками лаборатории вирусологии в.н.с., к.б.н. С.В. Алексеенковой и в.н.с., к.б.н. Г.К. Юровым (2013). Препараты просматривали в люминесцентном микроскопе. Размножение вируса в клетках культуры оценивали по наличию специфической желто-зелёной флуоресценции.

3.2.4.2. Реакция диффузионной преципитации в агаровом геле

В качестве антигена пестивируса использовали осветленный лизат культуры клеток, зараженной штаммом «ОрегонС24V (субгенотип1а)» или же персистентно-инфицированные клетки MDBK ВД-БС КРС, а также инфицированные ВПБ культуры клетки. Контролем служили вакцинный штамм ТК-А альфагерпесвируса КРС и ЧМЖ.

Постановка реакции диффузионной преципитации. С целью оптимизации РДП были апробированы несколько модификаций реакции, касавшиеся, главным образом, состава буферной смеси, pH буфера, схемы

размещения лунок агара и их диаметра. В конечном варианте использовали схему, предложенную L. Coggins для диагностики инфекционной анемии лошадей [190].

Реакцию проводили в слое 1% агара Дифко на фосфатно-солевом буферном растворе pH 7,2-7,4 в чашках Петри. Учет результатов проводили через 24-72 часа.

3.2.5. Молекулярно-генетические исследования

3.2.5.1. Выделение РНК

Вирусную РНК из образцов цельной крови, тканей выделяли с помощью набора реагентов «РНК-Экстран» фирмы ЗАО «Синтол» по методике производителя. Выделение РНК этим набором состоит из четырёх этапов:

1. Лизис клеток;
2. Разделение фаз;
3. Осаждение РНК;
4. Промывка и растворение РНК.

Полученный раствор РНК хранили при температуре минус 70⁰С.

3.2.5.2 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора реагентов «ОТ-1» фирмы ЗАО «Синтол» по методике производителя. Компоненты набора:

- Реакционная смесь;
- MMLV-RT 50ед/мкл;

- ПраймерRandom-6 15 ОЕ/ мл;
- Праймер олиго (dT) 15 15 ОЕ/мл;
- Ингибитор РНКаз, 5 ед/мкл;
- H₂O свободная от нуклеаз.

Полученную кДНК хранили при температуре минус 70⁰С. Реакцию амплификации проводили с реагентами фирмы Fermentas (Thermo Scientific Fisher), США. В состав реакционной смеси для амплификации входит:

- 10mM Tris – HCl;
- 50 mM KCl;
- 1,5 mM MgCl₂;
- 2 mM dNTP;
- 15pmol каждого праймера;
- 1,0 ЕД Taq-полимеразы;
- 3 мкл кДНК.

Праймеры и режимы проведения амплификации представлены в таблице 1 и 2. Использовали праймеры к фрагменту гена, кодирующего протеин NS3 ВД-БС КРС, к нетранслируемому участку мРНК – 5'UTR ВД-БС КРС, к генам кодирующие полипептиды N и F вируса чумы МРС в соответствии с рекомендациями МЭБ (ОИЕ, 2013) [191]. Для идентификации вируса пограничной болезни овец использовали праймеры комплементарные гену полипротеина (Npro). Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией для идентификации вируса ПБ выполняли в соответствии с рекомендациями МЭБ по методу, предложенному S.Vilchek и D. Paton (2000) [176].

Таблица 1 – Праймеры для проведения ОТ-ПЦР

Возбудитель/мишень	Прямой праймер	Обратный праймер
ВД/NS3	5'-GAT-TTC-AAG-GGG- ACT-TTT-TT-3'	5'-TAC-TAC-TTA-GTA- GGA-GAT-GT-3'
ВД/5'UTR	5'-CGA-CAC-TCC-ATT- AGT-TGA-GG-3'	5'-GTC-CAT-AAC-GCC- ACG-AAT-AG-3'
ВПБО	5'-TCG-TGG-TGA-GAT- CCC-TGA-G-3'	1. 5'-GCA-GAG-ATT-TTT- TAT-ACT-AGC-CTA-TGC- 3' 2. 5'-GCA-GAG-ATT-TTT- TAT-ACT-AGC-CTA-TGC- 3'
ВЧМЖ/ ген N	5'-GTC-TCG-GAA-ATC- GCC-TCA-CAG-ACT-3	5'-CCT-CCT-CCT-GGT- CCT-CCA-GAA-TCT-3'
ВЧМЖ/ ген F	1. 5'-AGT-ACA-AAA- GAT-TGC-TGA-TCA- CAG-T-3 2. 5'-ATC-ACA-GTG- TTA-AAG-CCT-GTA- GAG-G-3'	1. 5'-GGG-TCT-CGA-AGG- CTA-GGC-CCG-AAT-A-3' 2. 5'-GAG-ACT-GAG-TTT- GTG-ACC-TAC-AAG-C-3'

Таблица 2 – Режимы проведение ОТ-ПЦР

Возбудитель/мишень	Температурно-временный режим проведение ОТ-ПЦР		
	Денатурация	Аmplификация	Элонгация
ВПБО/ N ^{pro}	94 ⁰ C – 300 сек	94 ⁰ C – 60 сек 56 ⁰ C – 60 сек 72 ⁰ C – 60 сек } 36ц	72 ⁰ C – 420 сек
ВВД/NS3	94 ⁰ C – 120 сек	94 ⁰ C – 60 сек 55 ⁰ C – 60 сек 72 ⁰ C – 60 сек } 50 ц	72 ⁰ C – 420 сек
ВВД/5'UTR	94 ⁰ C – 300 сек	94 ⁰ C – 60 сек 56 ⁰ C – 60 сек 72 ⁰ C – 60 сек } 36 ц	72 ⁰ C – 420 сек
ВЧМЖ/ген N	95 ⁰ C – 900 сек – 1 ц	94 ⁰ C – 30 сек 60 ⁰ C – 30 сек 72 ⁰ C – 60 сек } 40 ц	72 ⁰ C – 300 сек
ВЧМЖ/ген F-1 этап	94 ⁰ C – 120 сек – 1 ц	94 ⁰ C – 60 сек 55 ⁰ C – 60 сек 72 ⁰ C – 60 сек } 35 ц	72 ⁰ C – 420 сек
ВЧМЖ/ген F-2-этап	94 ⁰ C – 180 сек - 1 ц	94 ⁰ C – 60 сек 55 ⁰ C – 60 сек 72 ⁰ C – 60 сек } 35 ц	72 ⁰ C – 600 сек

3.2.5.3 Электрофорез нуклеиновых кислот

Электрофоретический анализ продуктов амплификации проводили с помощью реагентов для проведения электрофореза:

1. Агароза (AgaroseRA, helicon, Москва, Россия)
2. 1x TAE буфер, pH 7,6 (Tris-acetat 40мМ, EDTA 1мМ)
3. Раствор бромистого этидия (0,5 мкг/мл)
4. Раствор для нанесения образца (0,25% бромфенолового синего, 30% раствор глицерина)

Результаты ОТ-ПЦР учитывали в агарозном геле (1,5%-ном) с добавлением бромида этидия в трис-боратном буферном растворе с последующей визуализацией геля на транслюминаторе. Длина волны излучения 312нм. За положительный результат принимали видимую полосу на одном уровне с положительным тест-контролем.

3.2.5.4 Филогенетический анализ

В компании ЗАО «Синтол» на генетическом анализаторе ABI Prism Genetic Analyzer 3100 («Applied Biosystems», США) выполнено определение нуклеотидных последовательностей. Локальное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью компьютерной программы «BLAST» (GenBank, INSDC). Множественное выравнивание и построение деревьев выполнены с использованием нуклеотидных последовательностей из Международной базы данных «International Nucleotide Sequence Data Collaboration» (INSDC) с помощью программ «ClustalW2» (Дублинский Университет, Ирландия), «MEGA 7.0» (Университет штата Аризона, США)

методом «присоединения соседей» со значениями «Bootstrap» на основе 1000 повторов.

Филогенетический анализ выполнен совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории вирусологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ, к.б.н. С.В. Алексеенковой.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Современная лабораторная диагностика пестивирусных инфекций основывается на комплексе методов, включающих серологические, вирусологические и молекулярно-генетические тесты. В Руководстве МЭБ по диагностике инфекционных болезней (ОИЕ, 2012) приводятся рекомендации по использованию следующих методов для диагностики пограничной болезни: выделение вируса в культуре клеток, серологический – РН, иммунохимический, и молекулярно-генетический – ОТ-ПЦР [189]. В более ранних сообщениях описана реакция диффузионной преципитации – РДП [69; 80; 107; 118]. В.С. Луговцев (2000), используя референтные, вакцинные и лабораторные штаммы пестивирусов, провел оценку диагностической ценности нескольких методов. В их числе изоляция вируса в культуре клеток, реакция нейтрализации, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция и др. Автор сделал вывод о преимуществе РН в сравнении с другими тестами [26].

В нашей работе, целью которой являлась диагностика пограничной болезни в Республике Таджикистан, обнаружение и типирование возбудителя, использовали традиционные и современные молекулярно-генетические методы.

При выполнении работы применяли методы, которые помимо специфичности, информативности, позволяли также получить воспроизводимые достоверные результаты при исследовании материала, собранного в условиях высокогорных пастбищ. Комплексные исследования, выполненные нами включали РДП с культуральным антигеном, вирусовыделение в культуре клеток, РИФ, молекулярно-генетические методы. На рисунке 2 представлена принципиальная схема исследований:

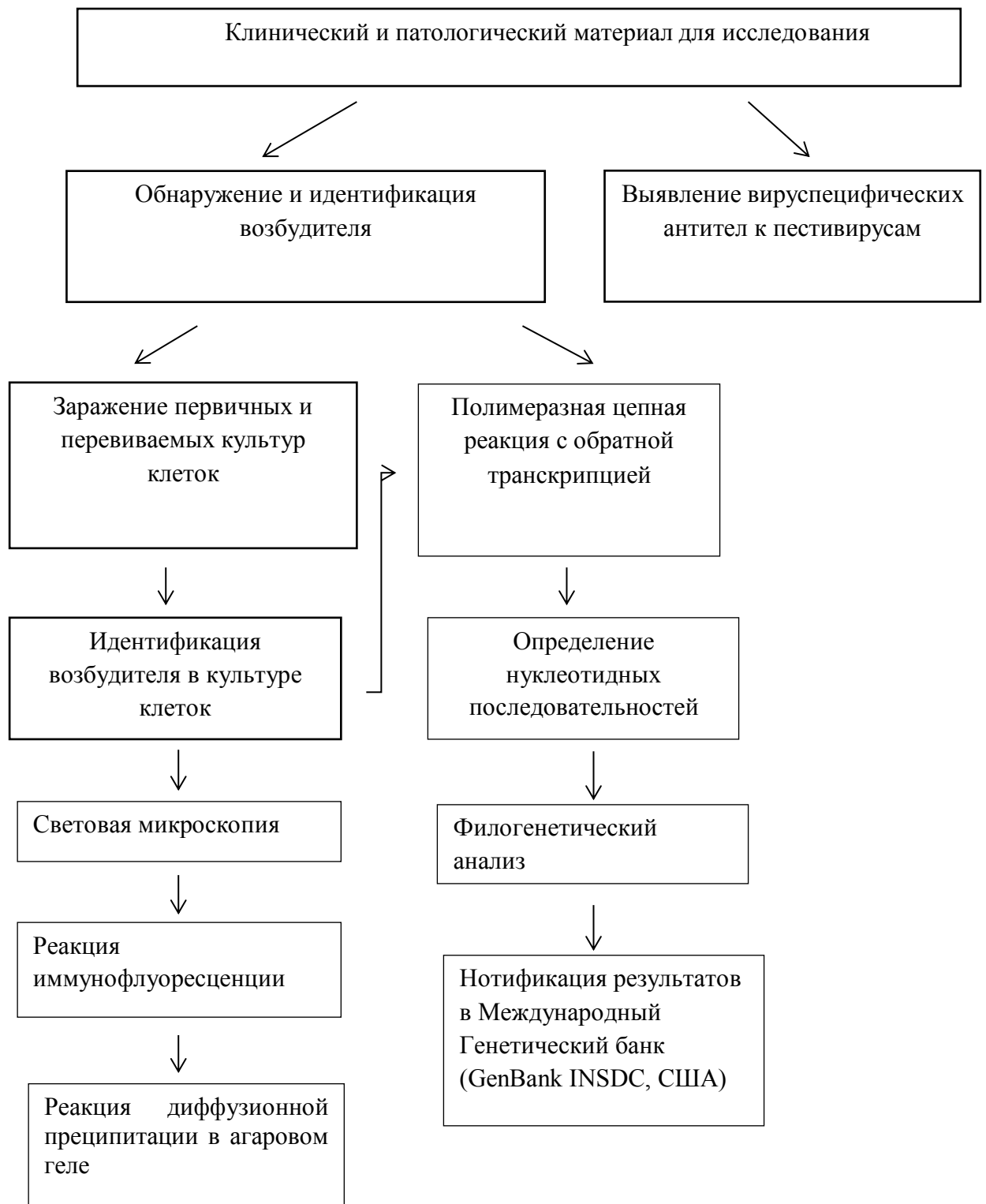


Рисунок 2 – Основные этапы экспериментальных исследований по обнаружению и идентификации возбудителя пестивиральной инфекции мелкого рогатого скота

4.1. Выявление антител к пестивирусам в пробах сыворотки крови овец и коз с помощью реакции диффузионной преципитации в агаровом геле

На начальном этапе нашей работы с целью оценки распространенности пестивирусной инфекции в овцеводческих и козоводческих хозяйствах нескольких районов РТ использовали реакцию диффузионной преципитации в агаровом геле. По данным P.D Kirkland и S.G MacKintosh (2006), с помощью РДП можно провести групповое исследование животных и обнаружить антитела ко всем штаммам пестивирусов у КРС, МРС и свиней [118]. В представленных данных в руководстве по Диагностике и вакцинации МЭБ (ОИЕ, 2012) РДП рекомендуется для диагностики пограничной болезни МЖЖ. В качестве антигена для постановки РДП с целью обнаружения антител к вирусу ПБО может быть использован штамм OregonC24V ВД-БС [190]

В нашей работе для проведения РДП в качестве антигена использовали культуральный антиген – осветлённый лизат культуры клеток ПТ, зараженной вирусом ВД-БС штамм ОрегонC24V или перевиваемой культуры клеток MDBK, персистентно-инфицированной вирусом ВД-БС КРС. Персистентная инфекция культуры клеток MDBK ВД была ранее подтверждена сотрудниками лаборатории вирусологии ВИЭВ, которые определили, что обнаруженный вирус ВД-БС в составе данной культуры клеток относится к генотипу 1 субгенотипу 1a ВД-БС КРС [1].

Исследовали пробы сыворотки крови, которые получали из хозяйств (отар), неблагополучных по респираторным и репродуктивным заболеваниям МРС. Использовали стандартную схему РДП (Л. Коггинс) [190]. В центральную лунку вносили антиген – осветленную путем центрифугирования суспензию MDBK, персистентно-инфицированной ВД-БС КРС в периферические – испытуемые пробы сыворотки. Учет результатов проводили через 24 часа (Рисунок 3).

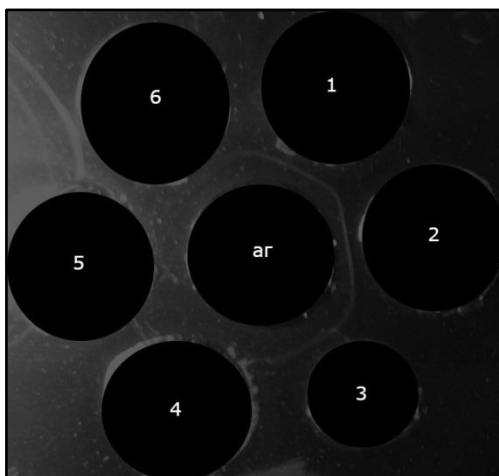


Рисунок 3 – Обнаружение антител к вирусу ВД-БС с помощью РДП: аг – антиген; лунки 1, 2, 3, 4, 5, 6 – пробы сыворотки крови МРС

На рисунке 3 видно образование четкой линии преципитации, т.е. положительная реакция, которая находится между центральной лункой и периферическими – с сыворотками от овец и коз 1, 2, 3 6. При низком титре антител в лунке 4 образуется только небольшой изгиб. Линии, образовавшиеся с пробами 6, 1, 2, 3, 4 соединяются друг с другом, что свидетельствует об идентичности антител к одному и тому же вирусному белку. Из выявленных положительных проб сывороток крови овец были отобраны образцы, которые использовали в тест-системе при последующем исследовании на пестивирусные инфекции МЖЖ в нескольких районах. В центральную лунку вносили антиген – инфицированную культуры клеток MDBK, в две диаметрально расположенные – положительную сыворотку, в остальные периферические испытуемые пробы сыворотки. Учет результатов проводили через 24 часа (Рисунок 4).

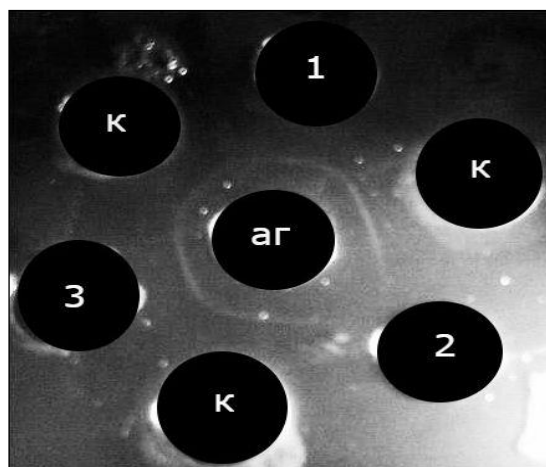


Рисунок 4 – Реакция диффузионной преципитации с сыворотками овец аг – антиген; к – контрольная положительная сыворотка; Лунки 1, 2, 3 – испытываемые пробы сыворотки крови овец

В качестве положительной контрольной сыворотки также использовали гипериммунную сыворотку к вирусу ВД-БС штамму «OregonC24V», любезно предоставленную нам сотрудниками лаборатории вирусологии ВИЭВ.

Результаты исследования показали, что среднее количество положительных проб, к общему числу исследованных составляет 27% (Рисунок 5).

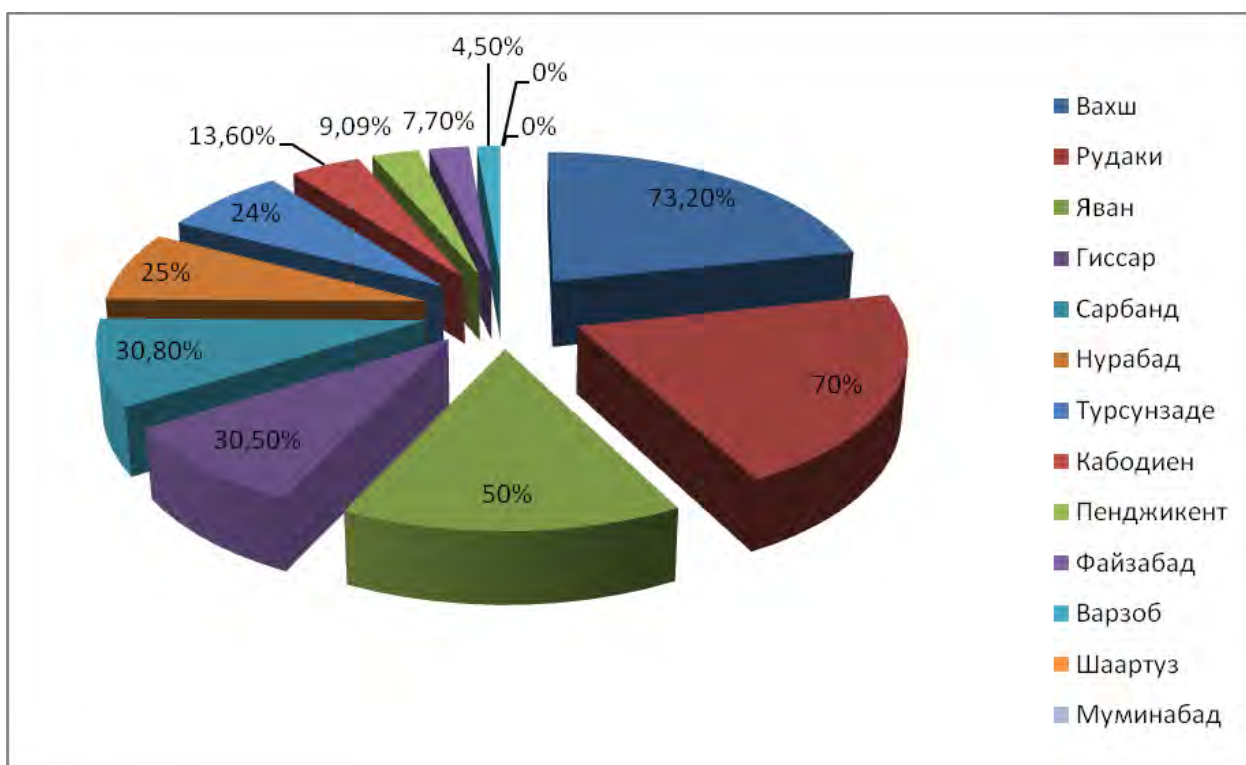


Рисунок 5 – Результаты РДП (%) на ВД-БС с пробами сывороток крови овец и коз в различных районах Республики Таджикистан

Из числа исследованных проб из различных районов РТ наибольшее число – 73,2% положительных результатов получено в районе Вахш, В районе Рудаки число положительных проб составляет 70%, в районе Явана 50%, в районе Сарбанд 30,8%, в районе Гиссар 30,5%, в районе Нурабад 25%, в районе Турсунзаде 24%, в районе Файзабад 7,7%, в районе Пенджикент 9,09%, в районе Варзоб 4,5%. В пробах сыворотки крови МРС из Муминабада и Шаартуза антитела к вирусу ВД не обнаружены.

4.2. Реакция диффузионной преципитации в агаровом геле с контрольными антигенами

Сыворотки овец и коз из 13 регионов РТ исследовали в РДП с контрольными антигенами. В качестве контрольных антигенов использовали вакцинные вирусы ИРТ КРС штамм ТК-А и вирусвакцину против ЧМЖЖ. Результаты исследования показали, что со штаммом ТК-А вируса ИРТ КРС во всех случаях получали, отрицательный результат. При использовании в качестве антигена вакцинный штамм ЧМЖЖ с некоторыми сыворотками получили положительный результат. Результаты представлены на рисунке 6.

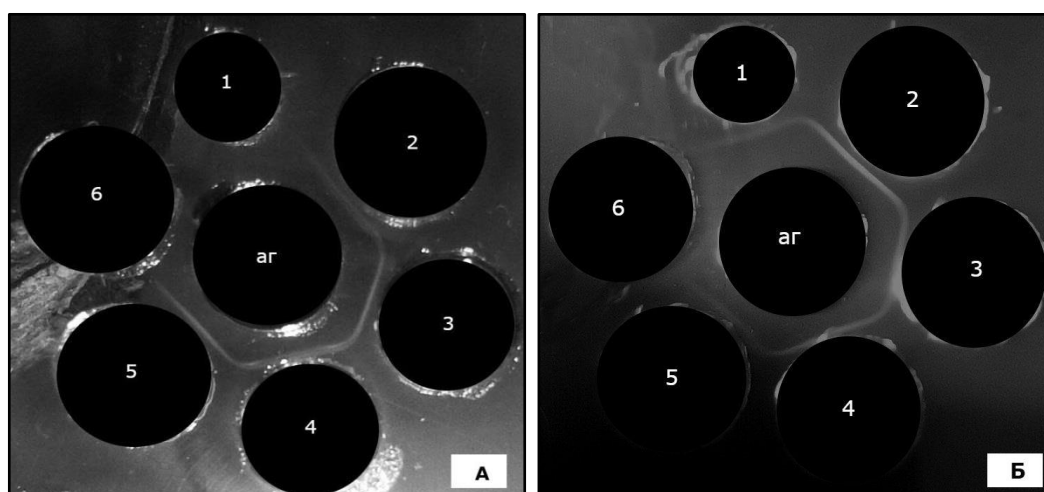


Рисунок 6 А и Б – РДП на ЧМЖ с сыворотками МРС: аг – антиген, вакцина против ЧМЖ; Лунки 1, 2, 3, 4, 5, 6 – сыворотки крови МРС.

На представленных выше рисунках видны типичные положительные результаты преципитации, полученные при исследовании полевых проб сыворотки крови с вирусом ЧМЖЖ. Линия преципитации, образующаяся между лункой с вакциной ЧМЖЖ и лункой с сывороткой, свидетельствует о наличии антител к вирусу ЧМЖЖ (поствакцинальных или постинфекционных).

Обобщенные данные исследования положительных проб крови по нескольким регионам РТ представлены на рисунке 7.

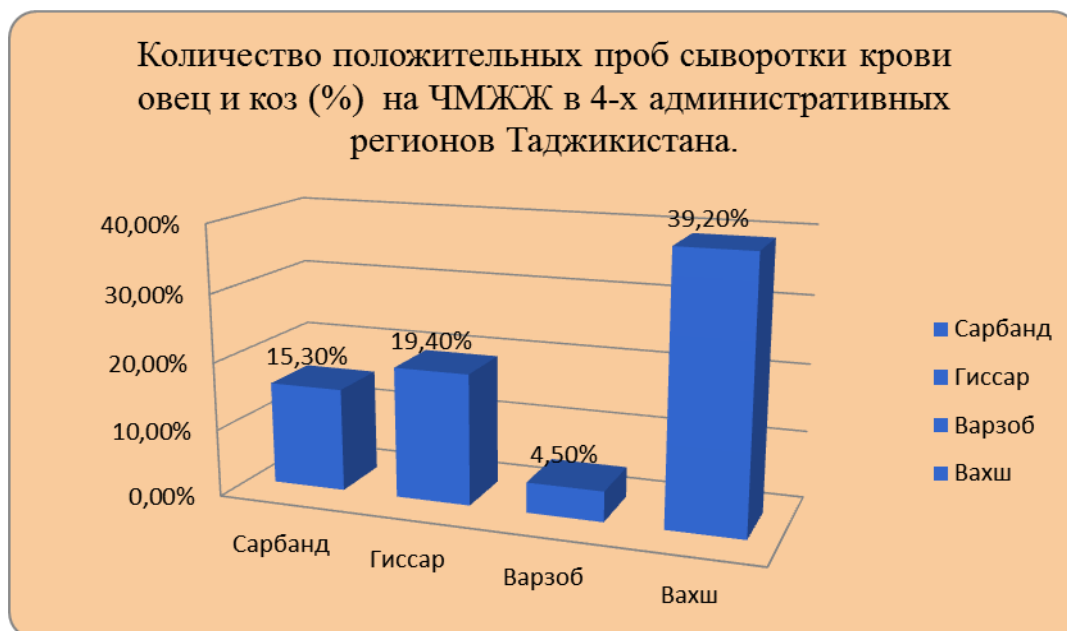


Рисунок 7 – Количество (%) положительных проб сыворотки крови овец и коз на ЧМЖЖ в четырех административных регионах Республики Таджикистан.

Таким образом, было определено, что в районе Вахш 39,2%, в районе Гиссар 19,4% и в районе Варзоб 4,5% сывороток крови имеют антитела к ВЧМЖ. В ряде случаев при исследовании проб сывороток крови овец и коз с коммерческой вирусвакциной против ЧМЖЖ образовались двойные линии преципитации (Рисунок 8).

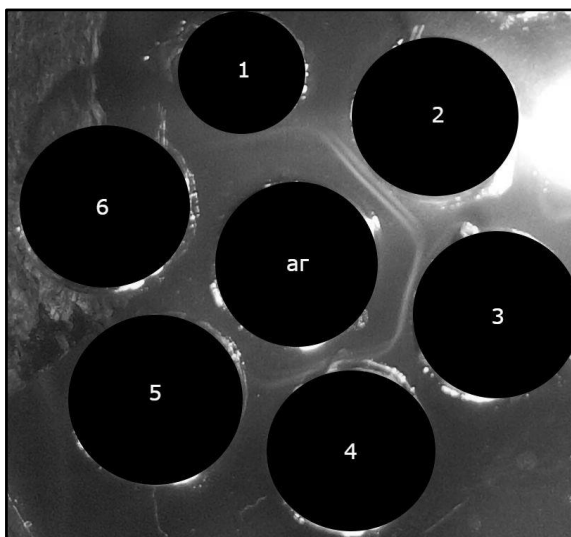


Рисунок 8 – Образование двойных линий преципитации с сыворотками овец: аг – антиген, вирусвакцина против ЧМЖ; Лунки 1, 2, 3, 4, 5, 6 – пробы сыворотки крови МРС

Указанное может являться свидетельством присутствия в исследуемом материале (вирусвакцина ЧМЖЖ) двух вирусов. Полученные на данном этапе данные мы расценивали как предварительные. Задачей последующих исследований являлось выделение вируса в культуре клеток и идентификация изолятов.

4.3. Выделение вируса в культурах клеток

Для выделения вируса использовали перевиваемые культуры клеток: РК-15, Vero, а так же первичные культуры почки ягненка (ПЯ) и тестикулов козленка (ТК), которые готовили совместно с сотрудниками лаборатории клеточных культур. Первичные и перевиваемые культуры клеток после проверки на отсутствие персистентной вирусной инфекции использовали в своих опытах.

Материалом для изоляции вируса служили: (плодные оболочки и кусочки паренхиматозных органов абортированных плодов), выделения и кровь больных животных. Кусочки органов подвергали механической гомогенизации. Для заражения культур клеток использовали 10%-ю суспензию паренхиматозных органов абортированных плодов. Использовали культуру клеток, выращенную в пластиковых или стеклянных культуральных флаконах с сформировавшимся монослоем. Культивирование вируса проводили в течение 4-6 суток с ежедневной световой микроскопией. При необходимости (существенное снижение pH) поддерживающую культуральную среду заменяли на свежую. Результаты световой микроскопии представлены на рисунках 9, 10, 11.

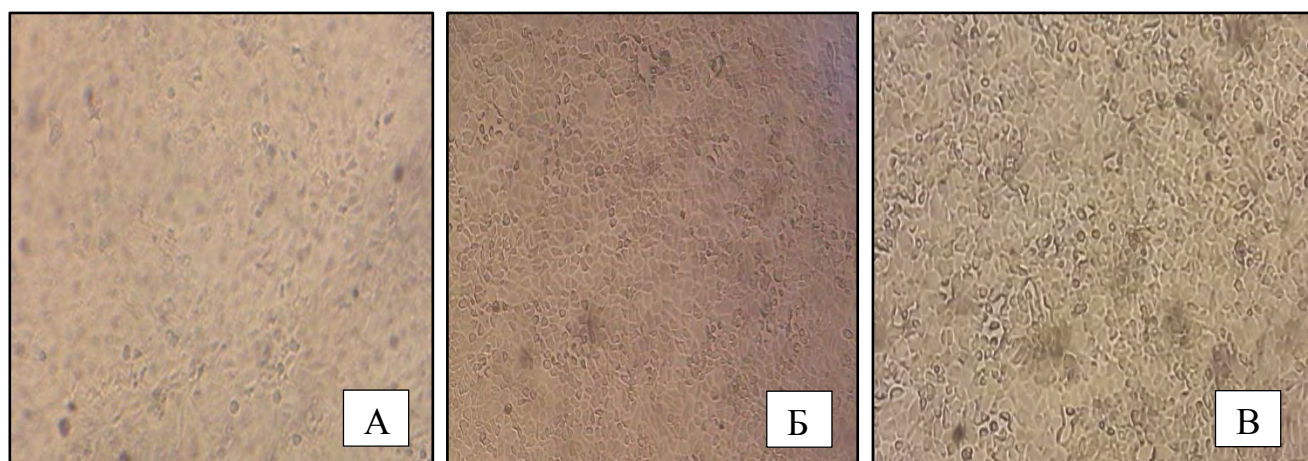


Рисунок 9 – Инфицированная культура клеток РК-15 10% суспензией легких абортированного плода овцематки, 2 пассаж. (Увеличение x200): А. Контроль клеток; Б. 72 часов после заражения; В. 96 часа после заражения

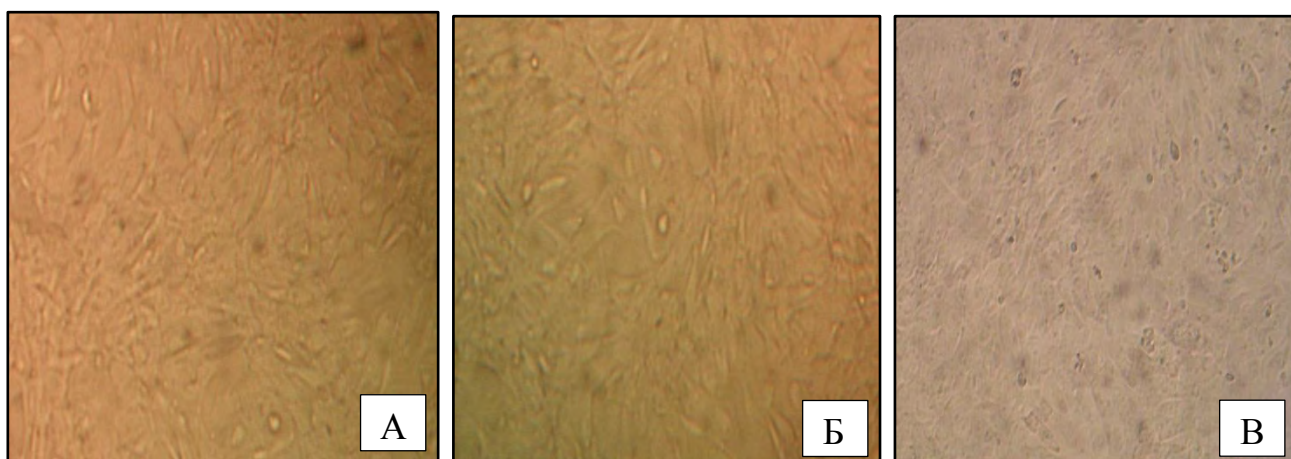


Рисунок 10 – Инфицированная культура клеток ПЯ 10% суспензией легких абортрованного плода овцематки, 2 пассаж. (Увеличение x200) А. Контроль клеток; Б. 72 часа после заражения; В. 96 часа после заражения

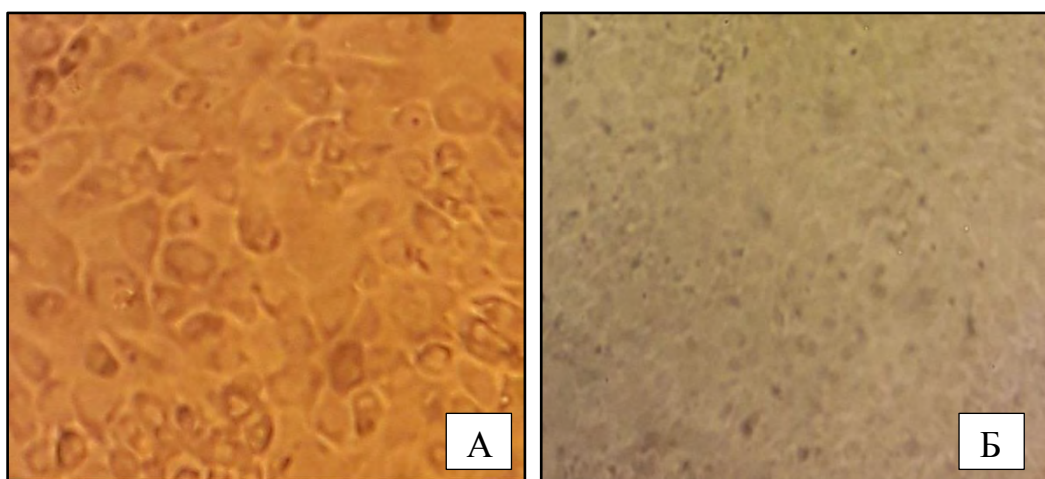


Рисунок 11 – Инфицированная культура клеток ТК 10% суспензией легких абортрованного плода овцематки, 2 пассаж (Увеличение x200). А. Контроль первичной культуры клеток ТК; Б. 96 часа после заражения

При ежедневной микроскопии зараженных культур клеток не удалось выявить достоверных изменений монослоя во всех культурах (перевиваемых и первичных). Несмотря на это, в некоторых случаях культивирование продолжали в течение 5-6 суток и в некоторых опытах количество последовательных пассажей довели до 3-5. Материал каждого пассажа, хранили при минус 70⁰С.

Отрицательные результаты (отсутствие видимых ЦП изменений) можно объяснить отсутствием в исследуемом материале вируса, либо наличием нецитопатогенных штаммов. В связи с этим, для выявления персистентной пестивирусной инфекции использовали прямой вариант РИФ с моноспецифической гипериммунной сывороткой мышей к вирусу ВД-БС, конъюгированной с ФИТЦ, а также РДП с положительными сыворотками овец.

4.3.1. Идентификация вируса в культурах клеток методом иммунофлуоресценции

Для идентификации вируса НЦП биотипа в культурах клеток применили прямой вариант РИФ. Использовали инфицированную культуру клеток, выращенную на покровных стеклах (слайдах) после 2-го и 3-го пассажа исследуемого материала от больных и павших животных. Клетки, выращенные на слайдах, фиксировали через 72 часа после внесения исследуемого материала и просматривали под люминесцентным микроскопом. В случае положительного результата РИФ, наблюдали характерное желто-зелёное свечение (Рисунок 12).

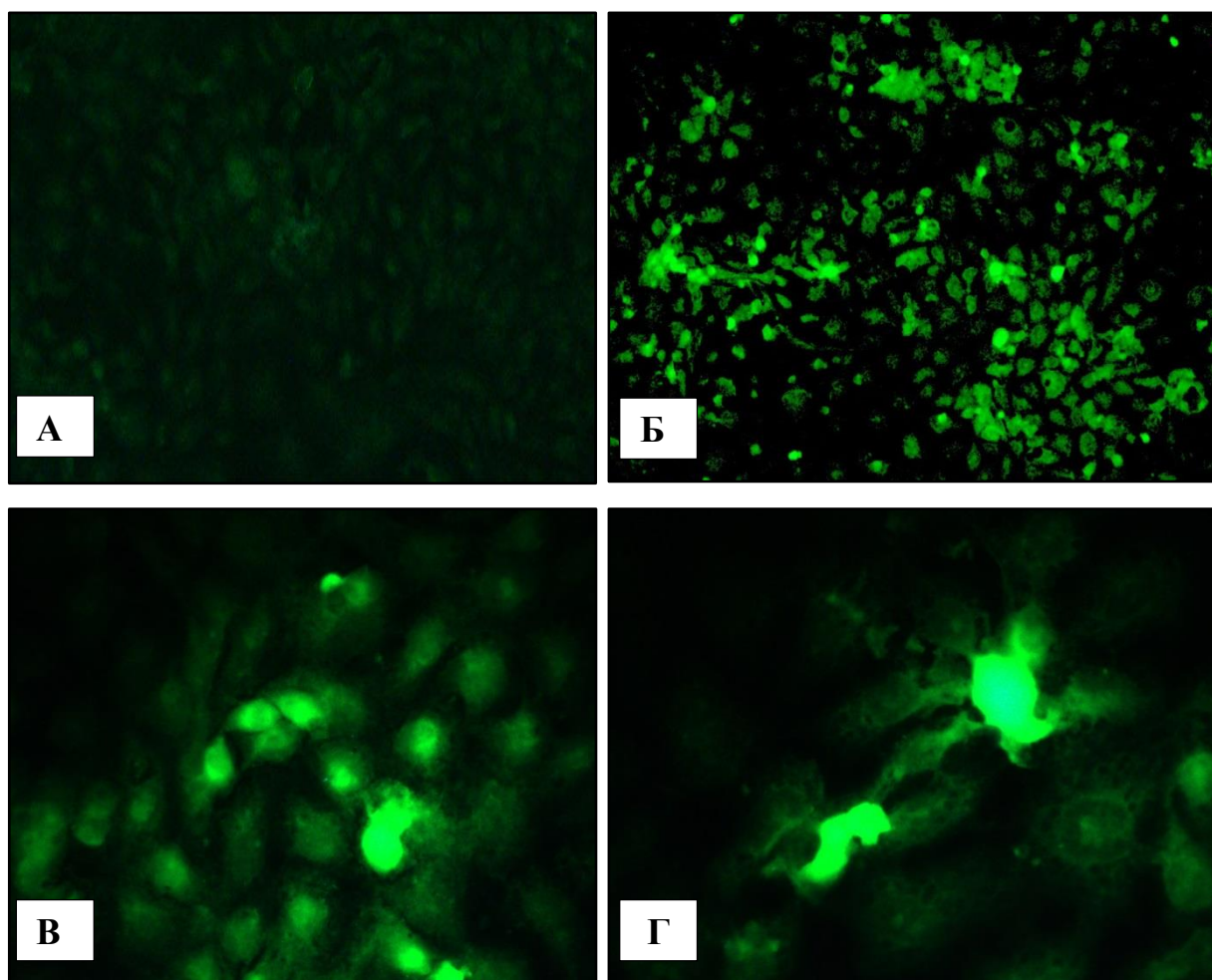


Рисунок 12 – Выявление пестивируса НЦП биотипа методом РИФ в культуре клеток РК-15 через 72 часа после инокуляции исследуемого материала – 10% суспензией легких абортированного плода – 3 пассаж. А. Увеличение x200; В. Увеличение x400; Г. Увеличение x630

Результаты РИФ позволили сделать вывод, что в культуре клеток наблюдается репродукция пестивируса. Вирусная инфекция имеет характер персистентной инфекции. Об этом свидетельствует специфическая флуоресценция в цитоплазме и ядре клеток культуры. Наиболее демонстративные результаты были получены в культурах клеток РК-15 и ПЯ.

4.3.2. Выявление вируса в культурах клеток с помощью реакции диффузионной преципитации в агаровом геле

Для выявления пестивирусов в культурах клеток с помощью РДП использовали положительную преципитирующую сыворотку овцы. Сыворотку вносили в центральную лунку, в периферические лунки добавляли лизат различных культур клеток, инфицированных исследуемым материалом (Рисунок 13 А, Б).



Рисунок 13 А – РДП с культуральной жидкостью и положительной сывороткой к пестивирусу: С – положительная, преципитирующая сыворотка к вирусу ВД-БС КРС; Лунка 1 – инфицированная культура клеток РК-15, после адсорбции патматериала (материал для заражения: гомогенат легких абортированного плода – 4-й пассаж); Лунка 2 – инфицированная культура клеток РК-15 после адсорбции патматериала (материал для заражения – гомогенат печени абортированного плода овцы, 2-й пассаж); Лунка 3 – инфицированная культура клеток ПЯ после адсорбции патматериала (материал для заражения: гомогенат легких абортированного плода, 2-й пассаж); Лунка 4 – инфицированная культура клеток РК-15, после адсорбции патматериала (материал для заражения: гомогенат легких абортированного плода – 3-й пассаж); Лунка 5 – инфицированная культура клеток

Vero после адсорбции патматериала (материал для заражения: гомогенат сердце 1-й пассаж); Лунка 6 – инфицированная культура клеток РК-15, после адсорбции патматериала (материал для заражения: гомогенат сердца абортрованного плода овцы, 4-й пассаж);



Рисунок 13 Б – РДП с культуральной жидкостью и положительной сывороткой к пестивирусу: С – положительная преципитирующая сыворотка к ВД-БС КРС; Лунка 1 – инфицированная культура клеток ПЯ, после адсорбции патматериала исследуемый патматериал (материал для заражения: гомогенат сердца абортрованного плода, 3-й пассаж вируса); Лунка 2– инфицированная культура клеток ПЯ после адсорбции патматериала (материал для заражения: гомогенат селезенки абортрованного плода, 3-й пассаж вируса); Лунка 3 – инфицированная культура клеток РК-15, после адсорбции патматериала (материал для исследования: гомогенат селезенки абортрованного плода, 4-й пассаж вируса); Лунка 4 – инфицированная культура клеток ПЯ (материал для заражения: гомогенат легких абортрованного плода, 4 пассаж); Лунка 5 – инфицированная культура клеток РК-15 после адсорбции патматериала (материал для заражения: гомогенат печени абортрованного плода, 3-й пассаж вируса); Лунка 6 – инфицированная культура клеток РК-15 после адсорбции патматериала (материал для заражения: гомогенат сердце абортрованного плода, 3-й пассаж вируса)

Представленные данные на рисунке 13 указывают на наличие в инфицированных культурах клеток пестивируса. Обобщенные данные полученных результатов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Выявление пестивируса с помощью реакции диффузионной преципитации в слепых пассажах в различных культурах клеток

Материал для исследования (10 % суспензия)	Культур а клеток	Результаты РДП				
		1 п.в	2 п.в.	3 п.в.	4 п.в.	5 п.в.
Легкие абортированного плода	ПЯ	+	+	+	+	+
Легкие абортированного плода	РК-15	+	+	+	+	+
Легкие абортированного плода	ТК	+	+	–	–	–
Легкие абортированного плода	Vero	+	+	–	–	н/п
Сердце абортированного плода	ПЯ	+	+	+	–	–
Сердце абортированного плода	РК-15	+	+	+	+	–
Сердце абортированного плода	ТК	–	–	н/п	н/п	н/п
Сердце абортированного плода	Vero	+	+	–	–	н/п
Печень абортированного плода	РК-15	+	+	+	+	+
Печень абортированного плода	ПЯ	+	+	+	+	+
Печень абортированного плода	Vero	–	–	–	н/п	н/п
Печень абортированного плода	ТК	–	–	–	н/п	н/п
Селезенка абортированного плода	РК-15	+	+	+	+	–
Селезенка абортированного плода	ПЯ	+	+	+	–	–
Желудок	РК-15	+	+	–	–	н/п
Желудок	ПЯ	–	н/п	н/п	н/п	н/п

Примечание – п.в. – пассаж вируса; «+» положительный результат; «-» отрицательный результат; н/п – не проводили

Из представленных в таблице данных следует, что эпизоотические НЦП изоляты существенно различаются по их способности размножаться *in vitro*, что отчасти, по-видимому, объясняется свойствами культуры клеток (чувствительностью). Из числа исследованных проб только в четырёх случаях в культурах РК-15 и ПЯ был получен стабильный положительный результат в 5-ти пассажах вируса. В 4-х случаях получен отрицательный результат; в восьми – наблюдалась abortивная инфекция в 1-4 пассаже. Стабильные результаты получали при использовании в качестве источника вируса материала легких и печени абортированных плодов.

В тех случаях, когда изменяли схему постановки РДП, в центральную лунку вносили положительную сыворотку овцы, а в периферические лунки – суспензию паренхиматозных органов и инфицированную культуру клеток МДВК, можно было наблюдать образование перекрещивающихся линий преципитации (Рисунок 14).



Рисунок 14 – Различие антигенов участвующих в РДП с положительной сывороткой овцы: С – сыворотка крови овцы, положительная на ВД; Лунки 1 и 4 – культура клеток MDBK, хронически инфицированная ВД-БС КРС; Лунки 2 и 6 – 10%-я суспензия печени абортированного плода овцематки; Лунка 3 – инфицированная культура клеток РК-15 после адсорбции патматериала (материал

для заражения – гомогенат печени абортированного плода, 3-й пассаж); Лунка 5 – инфицированная культура клеток РК-15 после адсорбции патматериала (материал для заражения – гомогенат печени абортированного плода, 4-й пассаж вируса)

4.4. Идентификация и типирование вирусных изолятов

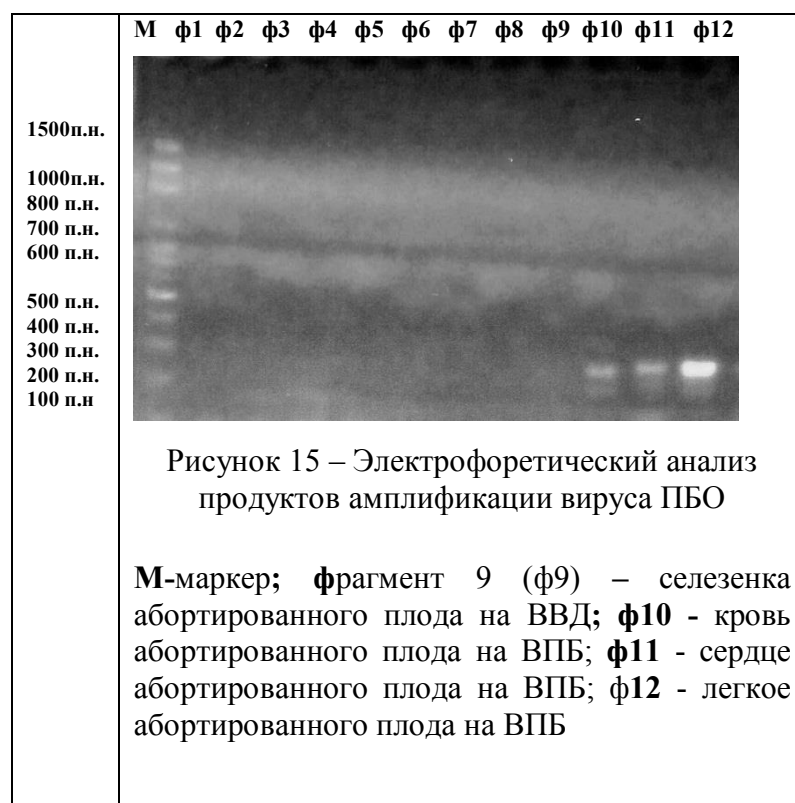
Последующее изучение и типирование возбудителей было ограничено тем, что мы не располагали моноспецифическими сыворотками к пестивирусам различных типов. В связи с этим воспользовались молекулярно-генетическими методами исследования.

4.4.1. Выявление вируса пограничной болезни овец методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Учитывая полученные положительные результаты в РИФ и РДП, клинический и патологический материал тестировали на наличие вируса ВД-БС и ЧМЖ с помощью молекулярных методов исследований. Результаты исследования показали, что в исследуемом материале отсутствуют данные возбудители. Использовали методику S. Vilcek соавт. и D.J. Paton (2000), которые предложили модификацию ОТ-ПЦР с вложенной парой праймеров («nested RT-PCR») для обнаружения и ускоренной идентификации возбудителей ПБ и ВД, позволяющую идентифицировать изоляты любого генотипа вируса ПБ и дифференцировать их от пестивирусов других видов [176]. Указанные праймеры рекомендованы МЭБ для применения в диагностических целях [189].

В результате, в патологическом материале от овец из неблагополучных хозяйств нами был обнаружен пестивирус – возбудитель ПБО. При

электрофоретическом анализе продуктов амплификации идентифицировали фрагмент ДНК длиной 225 п.н., в виде ярко выраженных полос ампликонов мишени (Рисунок 15).



Результаты, полученные с помощью ПЦР отчасти можно использовать для количественной оценки. В тканях abortированных плодов овец вирус ПБ накапливается преимущественно в легких, в наименьшей степени в сердце, печени и селезенке. Кроме того вирус можно выявить также в крови и слизистой желудка. Этот же возбудитель обнаружили в инфицированных нами культурах клеток. Следует отметить, что для обнаружения вируса ПБ в паренхиматозных органах в большинстве случаев достаточно одноэтапной ПЦР, что позволяет ускорить процесс проведения реакции.

4.4.2 Определение нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ вируса пограничной болезни овец

Для уточнения полученных результатов провели определение нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации. Результаты сравнительного исследования с помощью компьютерной программы «BLAST» нуклеотидных последовательностей исследуемого вируса и референтных штаммов базы данных INSDC показали сходство вируса, обнаруженного на территории Республики Таджикистан, с вирусом пограничной болезни. Установлено, что найденный вирус имеет сходство выравнивания нуклеотидных последовательностей с таковыми штамма вируса ПБ «297» из Словакии (гомология 91%), выделенного от овец, и штамма «АН12-01» вируса ПБ, выделенного от козы в Китае (гомология 90%). На 88% гомология составляет со штаммом «JSLS12-01» изолированного у овцы в Китае и штаммом «Gifhorn genotype 3» изолированного у свиней в Германии.

Следовательно, идентифицированный нами вирус относится к ВПБ, формирует отдельный кластер и существенно отличается от группы штаммов, отнесенных к генотипу 3 ранее (рисунок 16).

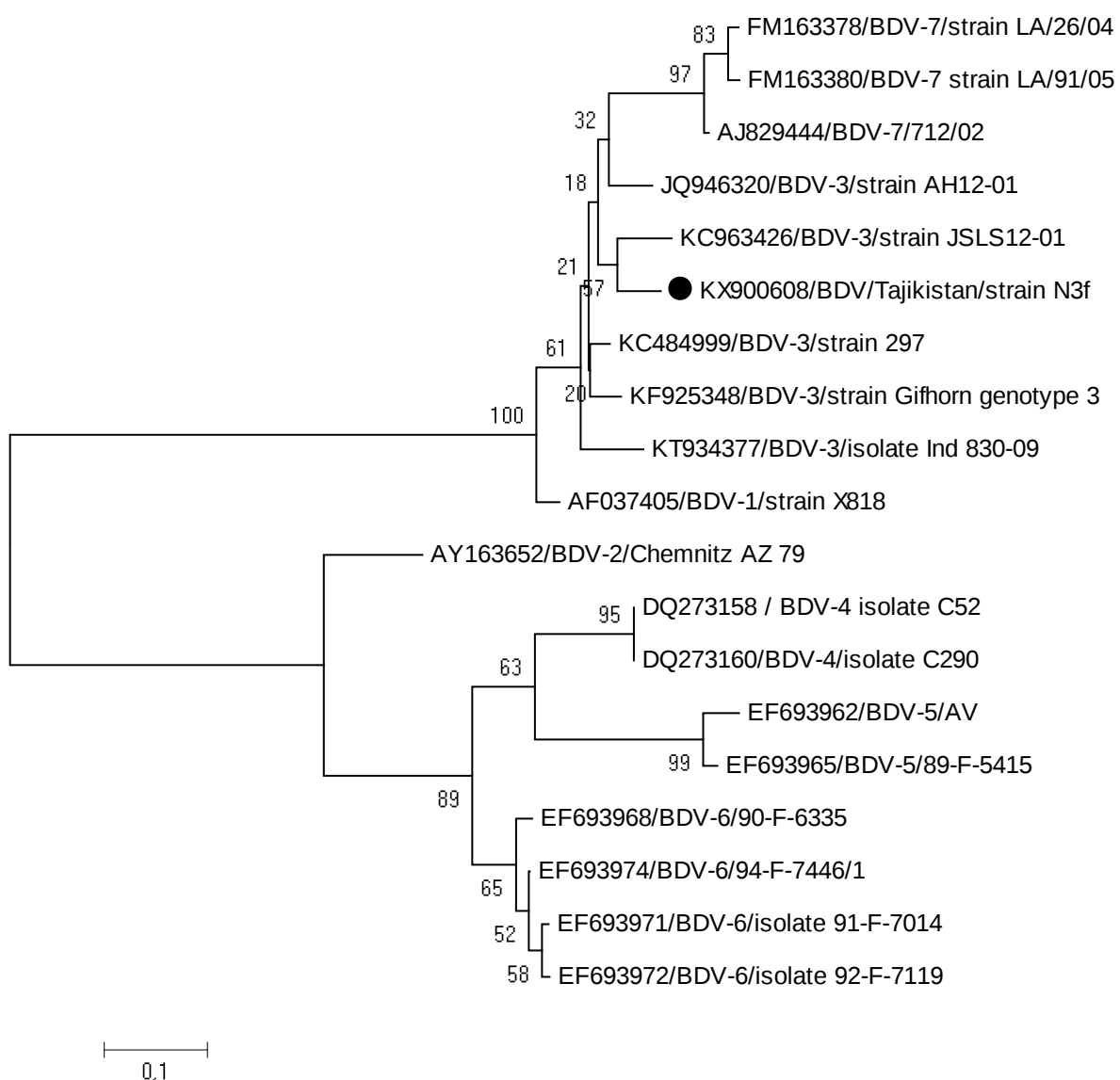


Рисунок 16 – Дендрограмма, отражающая степень филогенетического родства между Таджикским изолятом и референтными штаммами вируса пограничной болезни, основанного на анализе нуклеотидной последовательности фрагмента гена, кодирующего полипротеин (Npro)

Филогенетическое дерево сконструировано с помощью восходящего кластерного метода ближайших соседей в программе MEGA 7.0 и включает изолят ПБ, выделенный у овец в РТ и гомологичные последовательности, доступные в GenBank. Номера доступа каждой последовательности указаны в

дереве. Отображающие номера рядом с ветвями объясняют процент репликации 1000 повторов, поддерживающие каждую филогенетическую ветку. Расстояния вычислялись с использованием метода максимального композитного правдоподобия. Длина каждой пары ветвей представляет собой расстояние между парами последовательностей. Для создания филогенетического дерева использовали 19 нуклеотидных последовательностей. Характеристика использованных штаммов для построения филогенетического дерева представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Эпизоотические штаммы и изоляты вируса ПБ, использованные для создания филогенетического дерева

Вирус	Штамм	Генотип	Номер доступа	Хозяин	Страна	Год сбора	Длина п.н.
ПБ	X818	1	AF037405	Овца	-	-	12333
ПБ	Chemnitz AZ 79	2	AY163652	Овца	-	-	504
ПБ	297	3	KC484999	Овца	Словакия	2007	7195
ПБ	JSL12-01	3	KC963426	Овца Ovis aries	Китай	2012	12227
ПБ	AN12-01	3	JQ946320	Коза	Китай	2012	949
ПБ	Gifhorn genotype 3	3	KF925348	Свинья	Германия	2000	12325
ПБ	Ind 830-09	3	KT934377	Овца	Индия	2009	3582
ПБ	C52	4	DQ273158	Овца	Испания	-	504
ПБ	C290	4	DQ273160	Овца	Испания	-	504
ПБ	AV	5	EF693962	Овца	Франция	-	693
ПБ	89-F-5415	5	EF693965	Овца	Франция	1989	693

Продолжение таблицы 4 – Эпизоотические штаммы и изоляты вируса ПБ, использованные для создания филогенетического дерева

Вирус	Штамм	Генотип	Номер доступа	Хозяин	Страна	Год сбора	Длина п.н.
ПБ	90-F-6335	6	EF693968	Овца	Франция	1990	693
ПБ	94-F-7446/1	6	EF693974	Овца	Франция	1994	693
ПБ	91-F-7014	6	EF693971	Овца	Франция	1991	693
ПБ	92-F-7119	6	EF693972	Овца	Франция	1992	693
ПБ	LA/26/04	7	FM163378	Овца	Италия	-	1247
ПБ	LA/91/05	7	FM163380	Овца	Италия	-	1247
ПБ	712/02	7	AJ829444	Коза	Италия	-	1294

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена полипротеина Npro, выделенного нами вируса ПБО, депонирована в GenBank. Номер доступа KX900608.1.

Следовательно, результаты проведенных исследований подтвердили наличие в патологическом и клиническом материале возбудителя ПБО. В связи с этим, мы повторили исследования в РДП. Полученный нами культуральный изолят вируса ПБО использовали в качестве антигена для постановки РДП с положительными сыворотками овец (рисунок 17).

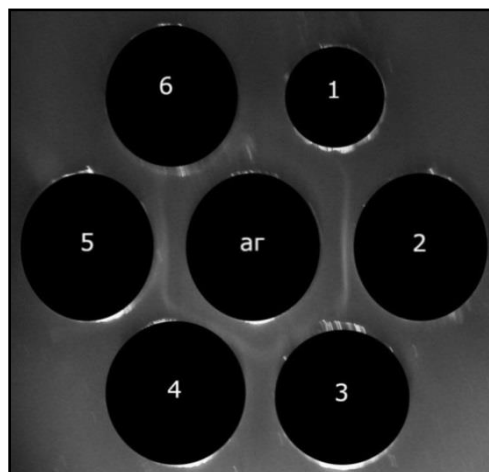


Рисунок 17 – Положительная РДП с культуральным изолятом вируса ПБО и сыворотками крови овец: аг – антиген – культуральный изолят вируса ПБО; Лунки 1, 2, 3, 4, 5, 6 – испытываемые сыворотки.

Результаты исследования показали, что положительные сыворотки с антигеном на ВД-БС (персистентно-инфицированная культура клеток MDBK), также положительны и на ПБО.

4.4.3. Идентификация возбудителя вирусной диареи 3-го генотипа

Хоби вируса

Учитывая литературные данные последних лет о контаминации биологических продуктов пестивирусами [1; 33; 60; 92; 94; 102; 103], результаты собственных исследований в РДП (Рисунок 8), мы сочли необходимым провести исследование одной из коммерческих вакцин против ЧМЖЖ, которая применялась для вакцинации овец и коз в некоторых регионах Республике Таджикистан. Полученные методом ОТ-ПЦР данные подтвердили наличие в

составе препарата вируса ЧМЖ. Сравнительный анализ с помощью компьютерной программы BLAST показал гомологию происхождения нуклеотидных последовательностей генов вирусов ЧМЖ, зарегистрированных в INSDC, и обнаруженного нами штамма. При последующем тестировании в составе той же серии вакцины были обнаружены и гены вируса ВД-БС с праймерами, фланкирующими фрагмент гена неструктурного полипептида NS3 вируса ВД-БС КРС. Было также установлено родство нуклеотидных последовательностей генов изолята ВД-БС с таковыми возбудителя ВД-БС генотипа 3 так называемого Хоби вируса – Pestivirus Н зарегистрированного в INSDC. Гомология составляет 96% со штаммом СН-КаНо/cont ВВД-3 генотипа, выделенного из контаминированной культуры клеток (Рисунок 18).

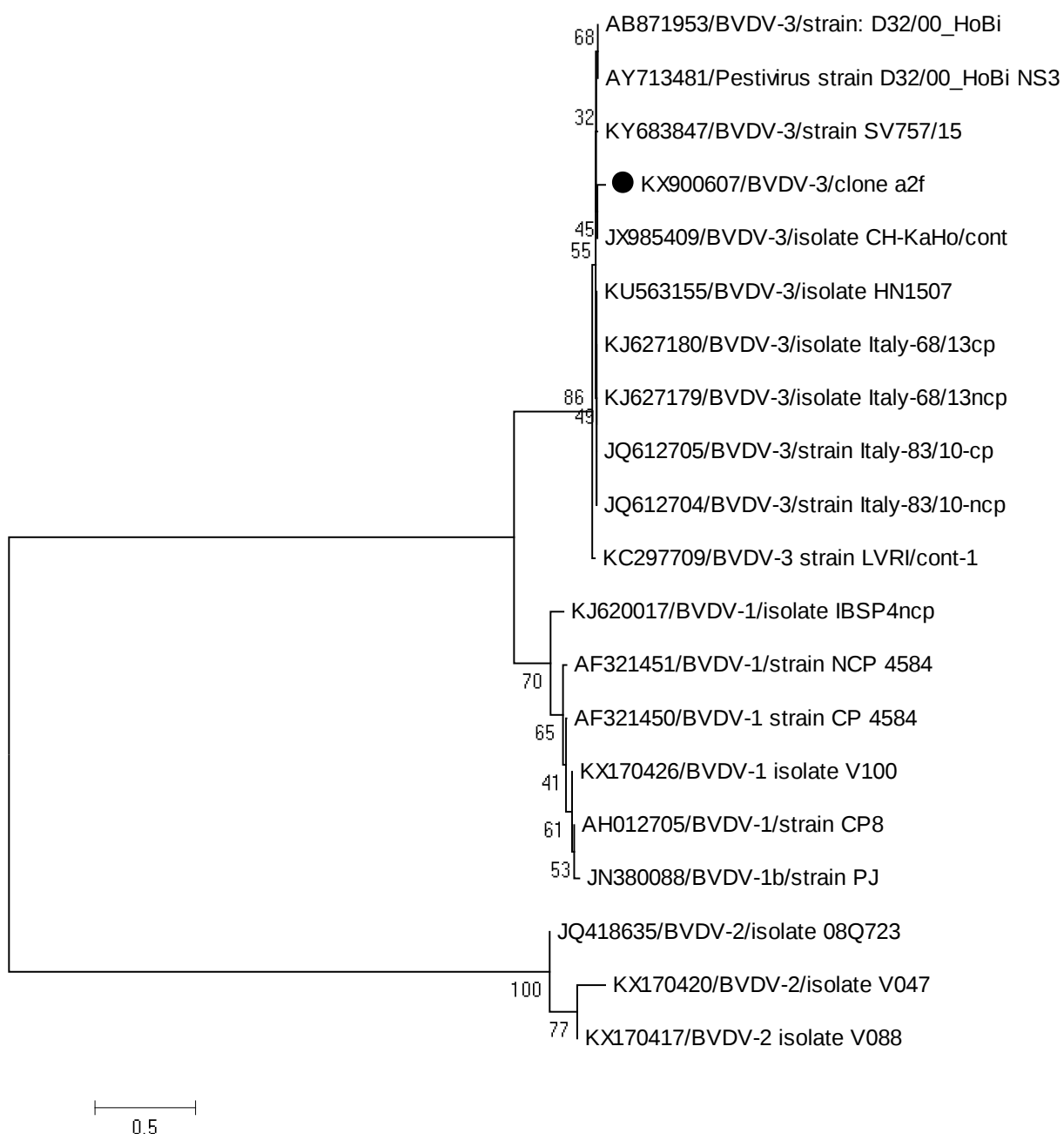


Рисунок 18 – Дендрограмма, отражающая степень филогенетического родства между новым изолятом и референтными штаммами вируса ВД-3-го генотипа (Хоби-вируса), основанного на анализе нуклеотидной последовательности фрагмента гена, кодирующего белок NS3

Филогенетическое дерево сконструировано с помощью восходящего кластерного метода ближайших соседей в программе MEGA 7.0. При филогенетическом анализе использовались 20 гомологичные нуклеотидные

последовательности доступные в GenBank и изолированный нами изолят ВД генотипа 3 в составе коммерческой вирусвакцины. Характеристика использованных штаммов для построения филогенетического дерева представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Штаммы и изоляты ВД, использованные для создания филогенетического дерева

Вир ус	Штамм	Геноти п	Номер доступа	Источник выделения	Место выделе ния	Год	Длин а п.н.
ВД	IBSP4ncp	1	KJ620017	-	Бразили я	-	12264
ВД	CP 4584	1	AF321450	-	-	-	2976
ВД	NCP 4584	1	AF321451	-	-	-	3477
ВД	V100	1	KX170426	-	Канада	1997	2049
ВД	CP8	1	AN012705	-	-	-	5834
ВД	PJ	1b	JN380088	KPC	США	-	11658
ВД	08Q723	2a	JQ418635	KPC	Южная Корея	-	11694
ВД	V047	2	KX170420	-	Канада	2009	2049

Продолжение Таблицы 5 – Штаммы и изоляты ВД, использованные для создания филогенетического дерева

Вирус	Штамм	Генотип	Номер доступа	Источник выделения	Место выделения	Год	Длина п.н.
ВД	V088	2	KX170417	-	Канада	2005	2049
ВД	D32/00_'HoBi'	3	AB871953	Bos taurus	-		12265
ВД	D32/00_'HoBi	3	AY713481	эмбриональная сыворотка теленка	Бразилия	-	2049
ВД	SV757/15	3	KY683847	Bos taurus indicus	Бразилия	2015	12280
ВД	CH-KaHo/cont	3	JX985409	Контаминированная культура клеток	-	-	12279
ВД	HN1507	3	KU563155	Capra hircus	Китай	2015	12556
ВД	Italy-68/13cp	3	KJ627180	Головной мозг теленка дикого быка (Bos taurus)	Италия	2013	12549
ВД	Italy-68/13ncp	3	KJ627179	Головной мозг теленка дикого быка (Bos taurus)	Италия	2013	12243

Продолжение Таблицы 5 – Штаммы и изоляты ВД, использованные для создания филогенетического дерева

Вирус	Штамм	Генотип	Номер доступа	Источник выделения	Место выделения	Год	Длина п.н.
ВД	Italy-83/10- сп	3	JQ612705	Легкое дикого быка (Bos taurus)	Италия	2010	12549
ВД	Italy-83/10- нсп	3	JQ612704	Легкое дикого быка (Bos taurus)	Италия	2010	12243
ВД	LVRI/cont- 1	3	KC297709	КРС	Южная Америка	2012	12282

Обнаруженные нами нуклеотидные последовательности фрагмента гена протеина NS3 вируса ВД-3-го генотипа были депонированы в GenBank под номером доступа KX900607.1.

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пестивирусы жвачных широко распространены среди домашних и диких животных. Типичная пестивирусная инфекция мелкого рогатого скота является пограничная болезнь овец. Пограничная болезнь характеризуется нарушением суягности, гибелью и выкидышем плода или же задержкой роста эмбриона, рождением ягнят с тремором или с нарушением шерстного покрова [23-26; 42; 54; 131; 144; 149]. В Таджикистане сведения о циркуляции пестивируса (ВД-БС КРС) в популяции овец и коз содержатся в единичных работах З. Курбонбековой (2007) [20; 21].

Учитывая актуальность проблемы пестивирусных инфекций, значительное количество исследований, проводимых в мире, и отсутствие данных об эпизоотической ситуации по ПБ в Республике Таджикистан (так же как и сопредельных государствах Центральной Азии), целью нашей работы являлась выявление возбудителя пограничной болезни при массовых респираторных и репродуктивных заболеваниях мелкого рогатого скота и их молекулярно-генетическая характеристика. На начальном этапе нашей работы исследования ограничили ретроспективной серологической диагностикой в нескольких административных районах республики. Использовали реакцию диффузионной преципитации в агаровом геле, которая является доступным, специфичным и воспроизводимым методом [84; 118; 125]. Известно, что в ответ на пестивирусную инфекцию у животных образуются антитела к белкам Егns, Е2 и NS3 [112; 136; 147]. Наличие общих антигенов у пестивирусов позволяет применять указанный тест для получения группового результата исследования [84]. По мнению некоторых авторов, при исследовании сыворотки крови овец для диагностики ВД с помощью ИФА, РДП и РН, реакция диффузионной преципитации в геле является более чувствительным тестом [84; 118]. Существует противоположное мнение В.А. Луговцева (2000) и Т. Loken (1995) о том, что чувствительность РДП при пестивирусных инфекциях существенно ниже других тестов [26; 81; 131]. Последнее, в нашей работе, напротив является

положительным фактом, поскольку позволяет исключить ложноположительные результаты. Используя РДП и перекрестную реакцию нейтрализации, J. Darbyshire описал антигенное родство между вирусами ВД-БС КРС и вирусом КЧС [69]. Подобные результаты были опубликованы другими авторами [52; 54; 181]. Р. Becher с соавторами (1994) описали, близкую антигенную связь некоторых изолятов вируса ПБ с вирусом ВД-БС КРС в реакции иммунопреципитации с использованием МА против гликопротеина Е2, подтвержденные молекулярными методами. Описано родство по белку NS2-3 [54].

S.R. Bolin и J.F. Ridpath (1989) проследили динамику образования преципитирующих (к полипептидам вируса – 25-115 кД) и вируснейтрализующих антител у вакцинированных против ВД-БС телят. Авторы использовали 20 штаммов ЦП и НЦП биотипов. Через 14 дней после прививки у телят обнаруживали преципитирующие антитела. РН была отрицательной со всеми пробами, но через 21 день преципитирующие и нейтрализующие антитела выявили во всех пробах [60].

В своей работе мы исследовали пробы сыворотки крови МРС из хозяйств, неблагополучных по заболеваниям овец и коз с респираторно-репродуктивным, и желудочно-кишечным синдромом. В качестве антигена применяли осветленную суспензию из лизированных, клеток MDBK, хронически инфицированную вирусом ВД-БС КРС (субтип 1а) [1] и культуру, зараженную штаммом «ОрегонС24» (субтип 1а). Антитела к пестивирусу обнаружили у овец в 11 районах Таджикистана. Обнаружение положительных проб позволило в дальнейшем использовать тест-систему, принцип которой предложил Л. Коггинс для диагностики инфекционной анемии лошадей [190]. В результате было установлено, что количество серопозитивных на пестивирусы животных в обследованном поголовье в среднем составило 27%. Кроме того, указанные результаты сравнивали с данными РДП, полученными с контрольными антигенами в качестве которых использовали гетерологичные вирусы: вакцину против ИРТ КРС из штамма ТК-А и вирусвакцину против ЧМЖЖ. При этом, во

всех случаях с вирусвакциной ИРТ получали отрицательную реакцию. Положительную РДП с некоторыми пробами сыворотки овец наблюдали, когда в качестве антигена применяли вакцинный вирус ЧМЖЖ. Считается, что ЧМЖ в Таджикистане имеет эндемический характер и, по эпизоотологическим данным, ежегодно заболевает молодняк от 4-5-и до 8-10-и месячного возраста [31]. Однако с некоторыми пробами сыворотки крови овец наблюдали образование двойных линий преципитации, что может указывать на присутствие другого возбудителя. В литературе имеются сведения о роли ко-инфекции ВЧМЖ и пестивирусов в патогенезе абортос у овец [122; 175]. По данным N. Toplu и соавторами (2012) в период с 2004 по 2010 годы в стадах в нескольких провинциях Турции были идентифицированы вспышки ЧМЖЖ и ПБ. У животных отмечались типичные клинические признаки ПБ. Симптомы ЧМЖ наблюдались только в трех стадах. С помощью иммуногистохимии в головном мозге, слизистой оболочке полости рта, кишечника и легких инфицированных животных обнаружены антигены ВЧМЖ и ВПБ. Эти же пробы были исследованы с помощью ОТ-ПЦР. Филогенетический анализ подтвердил наличие ВЧМЖ гена F и ВПБ в исследуемых образцах [175].

О. Kul и соавторы (2008) обнаружили ВЧМЖ и возбудитель ВД в пробах мертворожденных ягнят. Авторы впервые сообщили о внутриутробной инфекции ВЧМЖ, которая предположительно передалась трансплацентарно. Для проведения ОТ-ПЦР праймеры были направлены на участок ген F ВЧМЖ и NS2-3 ВД. Выбранные праймеры обнаруживают не только вирус, но способны различить ЦП от НЦП штаммов. Проведенные исследования указывают на наличие смешанной инфекции ВЧМЖ и пестивирусов у МРС и требуют дальнейшего изучения [122].

Таким образом, диагностика массовых лихорадочных респираторных и т.д., в первую очередь пестивирусных инфекций – весьма актуальная проблема, решение которой имеет существенное значение для определения средств, методов и схем предотвращения значительных экономических потерь в животноводстве.

Полученные на данном этапе результаты мы расценивали как предварительные. Задачей последующих исследований являлось выделение

вируса в культуре клеток и идентификация изолятов. Известно, что по характеру размножения в культуре клеток различают два биотипа пестивирусов: цитопатогенный и нецитопатогенный.

С целью получения культуральных изолятов пестивирусов мы использовали первичные и перевиваемые культуры клеток. Материалом для исследования служили: кровь больных животных (овец, коз), патологический материал – кусочки паренхиматозных органов. Культуры предварительно проверяли на отсутствие спонтанной контаминации пестивирусами. Во всех случаях нам не удалось наблюдать цитопатическое действие вируса *in vitro*. В связи с этим, для контроля размножения вируса использовали реакцию иммунофлуоресценции с антисывороткой к вирусу ВД-БС (шт. «ОрегонС24 (субтип1а)»), любезно предоставленной нам сотрудниками лаборатории вирусологии. Характерная желто-зелёная флуоресценция цитоплазмы клеток являлась свидетельством репродукции в них пестивируса. Дополнительным тестом, позволявшим контролировать размножение пестивируса в культуре клеток, служила РДП с положительными сыворотками овец. Из числа исследованных проб, только в четырёх случаях с культурами РК-15 и ПЯ был получен стабильный положительный результат в 5-ти пассажах. В 4-х случаях получен отрицательный результат; в восьми – наблюдалась abortивная инфекция в 1-4 пассаже.

Указанное свидетельствует, о распространении в поголовье мелкого рогатого скота, неблагополучного по желудочно-кишечным, респираторным болезням молодняка и репродуктивной патологии взрослых животных, пестивирусной инфекции овец и коз. Все изоляты не вызывали видимых изменений в культурах клеток (НЦП), что свойственно для вирулентных штаммов. Эти результаты совпадают с данными, опубликованными другими авторами, которые отмечают, что большинство полевых изолятов пестивирусов являются нецитопатогенными [12; 13; 115; 124; 135;]. В работах ряда авторов, идентификация эпизоотических изолятов и лабораторных штаммов пестивирусов, выделенных от животных различных видов, выполнена в РН с использованием моноспецифических сывороток [52; 54; 76; 186]. Не располагая

моноспецифическими сыворотками к пестивирусам различных типов, дальнейшие исследования по идентификации и типированию возбудителя проводили с использованием молекулярно-генетических методов: ОТ-ПЦР, рестриктоного и филогенетического анализа. В ОТ-ПЦР использовали методику и праймеры, предложенные S. Vilcek и D. Paton (2000) [176] для идентификации участка гена, кодирующего белок N^{pro}. Для генетической классификации пестивирусов чаще всего используют участок 5'-UTR и N-терминальную аутопротеазу (N^{pro}). Разделение пестивирусов по видам и подгруппам на основе участка N^{pro} считается более достоверным и часто используется для филогенетического анализа [66; 70; 163].

S Vilcek. и D.J. Paton (2000) предложили модификацию ОТ-ПЦР с вложенной парой праймеров (nested RT-PCR) для обнаружения вируса ПБО и ВД [176]. Однако, следует отметить, что для обнаружения вирусов ПБ и ВД в паренхиматозных органах достаточно применения одноэтапной ПЦР. Данный вариант позволяет ускорить процесс проведения ПЦР. Анализ нуклеиновых последовательностей участка N^{pro} показал общность обнаруженного нами вируса со штаммом ВПБ «297» из Словакии [126]. При филогенетическом анализе было определено, что штамм, выделенный в Таджикистане, относится к вирусу пограничной болезни и формирует отдельную филогенетическую ветвь внутри 3-го генотипа. Полученный результат может свидетельствовать о генетической разновидности обнаруженного вируса ПБО от других изолятов вируса ПБ генотипа 3. При секвенировании нуклеотидных последовательностей обнаружены нонсенс-кодоны внутри нуклеотидной последовательности вируса ПБО. Данные кодоны обусловлены естественной мутацией внутри вирусного генома пестивируса. Все мутации генома пестивирусов вызваны ошибками РНК зависимой РНК полимеразы и рекомбинациями. Мутации приводят к репликации вируса с выраженной экспрессией [8; 42; 144; 147; 164].

Учитывая результаты серологического теста (РДП) с вирусвакциной ЧМЖЖ и сыворотками овец (описанные выше), а именно, наличие в сыворотках животных преципитинов, образующих двойные и перекрещивающиеся линии

преципитации, мы провели исследования одной из коммерческих вакцин, использовавшихся в Республике Таджикистан для профилактической иммунизации овец и коз против ЧМЖЖ, на возможную контаминацию. По сообщению ряда авторов известно, что пестивирусы являются основными контаминантами фетальной сыворотки культур клеток и вакцин [1; 33; 40; 47; 60; 92; 94; 132;]. В результате проведенных нами исследований методами секвенирования и филогенетического анализа показано, что в составе вакцины помимо генома вакцинного вируса ЧМЖЖ, присутствует геном ВД-БС КРС, который идентифицирован как вирус ВД-3-го генотипа – Хоби-вируса. Новый пестивирус, обозначенный как НоВи-подобный, Хоби-вирус, ложный пестивирус, который впервые обнаружен в 2004 году в сыворотке КРС, импортированной из Бразилии. Вирус представлен 2-мя субтипами [8; 50; 71; 72; 74; 75; 160; 184]. Естественная Хоби-вирусная инфекция ассоциируется с респираторной и желудочно-кишечной патологией преимущественно молодняка и репродуктивным заболеванием половозрелых животных [71; 162; 167; 184].

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований, впервые установлено новое для Республики Таджикистан вирусное заболевание мелких жвачных животных – пограничная болезнь овец. Идентифицирован вирус пограничной болезни овец и депонирована в GenBank его нуклеотидная последовательность. Используя методы ПЦР и филогенетический анализ идентифицировали новый пестивирус – Хоби вирус, который является контаминантом коммерческой вакцины, используемой в Республике Таджикистан для профилактики ЧМЖЖ. Фрагмент нуклеотидной последовательности вируса зарегистрирован в GenBank. Вследствие определённого сходства клинического проявления, эпизоотологических данных ЧМЖЖ и пестивирусных инфекций, затрудняется дифференциальная диагностика этих заболеваний. Полученные нами новые данные изложены в работах, опубликованных в научных статьях [4; 5; 6; 40], которые необходимо принимать во внимание при реализации мероприятий по борьбе с ЧМЖЖ в Республике Таджикистан.

7. РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные нами приоритетные результаты по обнаружению, идентификации возбудителя пограничной болезни в Центрально-Азиатском регионе – Республике Таджикистан, обуславливают перспективу исследований по ряду направлений, как научного так и практического плана, а именно:

- проведение комплексного мониторинга пестивирусных инфекций, прежде всего пограничной болезни, во всех регионах Республики Таджикистан с развитым животноводством;

- сравнительное изучение биологических свойств и молекулярно-генетических характеристик новых изолятов, пестивирусов;

- выделение и селекция новых изолятов пестивирусов с целью совершенствования средств диагностики и профилактики инфекций;

- разработка рекомендаций и нормативных документов по диагностике заболевания и оздоровлению неблагополучных хозяйств, районов.

8. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании полученных результатов разработаны следующие практические предложения:

1. Методические положения «Диагностика пестивирусных инфекций овец методами молекулярно-генетического анализа», утвержденные РАН. Методические предложения предназначены для специалистов диагностических и научно-исследовательских учреждений преимущественно в зонах развитого овцеводства, преподавателей и студентов ветеринарных ВУЗов и техникумов (приложение А).

2. Депонирована в Специализированной коллекции перевиваемых соматических культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных Российской коллекции клеточных культур (СХЖ РККК ВИЭВ) при ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, диплоидная культура клеток тестикулов козленка (ТК-ВИЭВ). Предназначена для исследования вирусов МРС, КРС, пчел, выделение, накопление, изготовление диагностикумов, вакцин (Приложение Б).

3. Депонированные генетические последовательности вируса пограничной болезни овец под номером доступа KX900608.1. и вирусная диарея 3-го генотипа – Хоби-вируса под номером доступа KX900607.1., которые могут быть использованы для проведения филогенетического анализа.

9. ВЫВОДЫ

1. Проведёнными комплексными исследованиями: вирусологическими, серологическими и молекулярно-генетическими впервые в Центральной Азии – Республике Таджикистан идентифицирован возбудитель пограничной болезни овец.

2. Методам определения нуклеотидных последовательностей и филогенетического анализа установлено, что вирус, идентифицированный в Таджикистане, относится к вирусу пограничной болезни, представляет отдельную филогенетическую ветвь внутри третьего генотипа. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена, кодирующего полипротеин (Npro), имеет на 91% сходство со штаммом «297» пограничной болезни, выделенного от овец в Словакии. В GenBank депонирована нуклеотидная последовательность фрагмента гена, кодирующего полипротеин (Npro) Таджикского изолята пограничной болезни овец под номером доступа KX900608.1.

3. Серологическими исследованиями в хозяйствах, неблагополучных по массовым респираторным, желудочно-кишечным и репродуктивным заболеваниям овец и коз, обнаружены антитела к пестивирусу. Количество серологически положительных животных составило от 4,5% до 73,2%.

4. Получены культуры клеток свободные от вирусной контаминации. показано, что наиболее чувствительными к вирусу пограничной болезни овец являются первичная культура клеток почки ягненка (ПЯ) и перевиваемая культура клеток почки свиньи (РК-15).

5. Изучены культуральные свойства обнаруженных в Таджикистане изолятов вируса пограничной болезни овец. Установлено, что все изоляты вируса пограничной болезни овец, идентифицированные нами, относятся к нецитопатогенному биотипу. Отмечено, что при серийном пассировании возбудителя в культуре клеток, большая часть изолятов индуцирует abortивную инфекцию.

6. В составе коммерческой вирусвакцины против чумы мелких жвачных животных, применявшейся в Республике Таджикистан, идентифицирован геном нового пестивируса. Методами определения нуклеотидных последовательностей и филогенетического анализа показано, что вирус относится к Pestivirus Н-вирусной диареи 3-го генотипа – Хоби-вируса – атипичного пестивируса и обладает 96% идентичностью с изолятом «isolate СН-КаНо/cont» вирусной диареи генотипа 3 изолированного из контаминированной культуры клеток. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена, кодирующего NS3 ВВД-3 изолята, депонирована в GenBank, номер доступа KX900607.1.

10. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

аг – антиген

ВД – вирусная диарея

ВД-БС – вирусная диарея – болезнь слизистых

ВПБ – вирус пограничной болезни

ВКЧС – вирус классической чумы свиней

ВЧМЖЖ – вирус чумы мелких жвачных животных

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ИФА – иммуноферментный анализ

ИГХ – иммуногистохимический анализ

кДа – килодальтон

КРС – крупный рогатый скот

ЛПК – легкое плода коровы

МА – моноклональные антитела

МЖЖ – мелкие жвачные животные

МРС – мелкий рогатый скот

МЭБ – Международное эпизоотическое бюро

МДБК – перевиваемая культура клеток почки быка

Нм – нанометр

НЦП – нецитопатическое действие

ОТ-ПЦР – Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПБ – Пограничная болезнь

ПБО – Пограничная болезнь овец

ПИ – персистентная инфекция

п.н. – пар нуклеотидов

ПЯ – почка ягненка

РДП – реакция диффузионной преципитации

РИФ – реакция иммунофлюоресценции

РСК – реакция связывания комплемента

РК-15 – культура клеток почка свиньи

РН – реакция нейтрализации

РНК – рибонуклеиновая кислота

РТ – Республика Таджикистан

ТК – тестикулы козленка

ЧМЖЖ – Чума мелких жвачных животных

ЦП – цитопатическое действие

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BDV – Border disease virus

BVDV – Bovine viral diarrhea virus

FAO – Food and agriculture organization

INSDC – International nucleotide sequence database collaboration

OIE – Международное эпизоотическое бюро

Vero – культура клеток почки африканской зеленой мартышки

11. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеенкова, С.В. Проверка клеточных культур на контаминацию вирусом диареи крупного рогатого скота – необходимое условие производства биологических препаратов / С.В. Алексеенкова, Г.К. Юров, Т.В. Гальнбек, И.А. Калита, К.П. Юров // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2013. – №1. – С. 15-18.
2. Амирбеков, М. Инфекционная плевропневмония среди винторогих коз на юге Таджикистана / М.А. Амирбеков, М. Аноятбеков, А.Н. Мамадшоев, С.А. Мурватуллоев, О.М. Зиёев // Ветеринария (Таджикистан). – 2012. – №4 – 6. – С. 26-27.
3. Амирбеков, М.А. Респираторные болезни рогатого скота в условиях промышленного и отгонного животноводства Таджикистана: Этиология, профилактика и лечение: дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03 / М. Амирбеков. – Москва, 1993. – 363с.
4. Аноятбекова, А.М. Выявление нового пестивируса в Республике Таджикистан / А.М. Аноятбекова, С.В. Алексеенкова, К.П. Юров // Электронный научный журнал Apriori. Серия: естественные и технические науки. – 2016. – №3. – С. 1-8.
5. Аноятбекова, А.М. Молекулярно-эволюционный генетический анализ вируса пограничной болезни, выявленного у овец в Таджикистане / А.М. Аноятбекова, С.В. Алексеенкова, К.П. Юров // Ветеринария. – 2017. – №1. – С. 23-26.
6. Аноятбекова, А.М. Пестивирусная инфекция мелкого рогатого скота // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2018.– №2. – С. 30-35.
7. Верховская, А.Е. Особенности диагностики и профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота / А.Е. Верховская, В.А. Сергеев, Т.И. Алипер, Е.В. Иванов // Ветеринария. – 2009. – №8. – С. 3-7.

8. Глотов, А.Г. Атипичные пестивирусы крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – №4. – Т. 50. – С. 399-408.
9. Глотов, А.Г. Выделение и характеристика изолятов вируса диареи крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, Е.И. Рябчикова, А.Н. Сергеев // Вопросы вирусологии. – 2006. – Т. 51. – №1. – С. 42-44.
10. Глотов, А.Г. Выделение на территории Российской Федерации нецитопатогенного изолята 2-го генотипа вируса диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота. / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.Г. Южаков, А.Д. Забережный, Т.И. Алипер // Вопросы вирусологии. – 2009. – № 5. – С. 43-47.
11. Глотов, А.Г. Особенности проявления вирусной диареи – болезни слизистых оболочек у племенных быков / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.Ф. Шуляк // Ветеринария. – 2012. – № 12. – С. 3-6.
12. Глотов, А.Г. Патогенность изолятов различных биотипов вируса вирусной диареи – болезни слизистых оболочек для серонегативных телят / Т.И. Глотова, О.В. Семенова, С.В. Котенева, А.А. Сергеев, А.Н. Сергеев // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2015. – №1. – С. 19-22.
13. Глотов, А.Г. Патогенность нецитопатогенных изолятов вируса вирусной диареи – болезни слизистых оболочек для серонегативных телят / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, Ю.Н. Зайцев, О.В. Пьянков, А.Н. Сергеев, М.И. Гулюкин // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59. – № 4. – С. 46-49.
14. Глотов, А.Г. Пестивирусы жвачных животных / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.Ф. Шуляк // Вопросы вирусологии. – 2016. – Т. 61. – № 2. – С. 59-62.
15. Глотова, Т.И. Вирусная диарея – Болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота: распространение, особенности клинического проявления, характеристика изолятов вируса / Т.И. Глотова, А.Г. Глотов, В.А. Качанов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2005. – № 6. – С. 62-66.

16. Гулюкин, М.И. Стратегия борьбы с вирусной диареей – болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Российской Федерации / М.И. Гулюкин, К.П. Юров, А.Г. Глотов, Н.А. Донченко // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – № 6. – С. 13-18.
17. Диас Хименес, К.А. Доказательство циркуляции различных субгенотипов возбудителя вирусной диареи методом иммуноферментного анализа / К.А. Диас Хименес, С.В. Алексеенкова // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. – 2015. – Т. 78. – С. 187-192.
18. Жданов, В.М. Место вирусов в биосфере / В.М. Жданов, Д.К. Львов, А.Д. Забережный // Вопросы вирусологии. – 2012. – № S1. – С. 21-32.
19. Крюков, Н.Н. О неспецифической профилактике вирусной диареи крупного рогатого скота / Н.Н. Крюков, З.Ф. Зудилина, К.П. Юров, С.А. Жидков // Ветеринария. – 1978. – №1. – С.37-40.
20. Курбонбекова З.Д. Циркуляция вирусов парагриппа-3, вирусной диареи и хламидии у рогатого скота с респираторно-кишечной патологией в Центральных районах Таджикистана / З.Д. Курбонбекова, Я. Вазир, Т.П. Лобова., Р.В. Белоусова // Ветеринарная патология. – 2007. – № 1. – С.115-117.
21. Курбонбекова, З.Д. Эпизоотическая ситуация по респираторно-кишечным болезням молодняка крупного и мелкого рогатого скота в центральных районах Таджикистана: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / З.Д. Курбонбекова. – Москва, 2007. – 176 с.
22. Курбонмамадова, Г.К. Хламидиоз среди мелкого рогатого скота в Республике Таджикистан / Г.К. Курбонмамадова, З.Д. Курбонбекова, М.А. Аноятбеков // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел. Межд. науч. практ. конф., посвященная 50-летию со дня основания лаборатории лейкологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтомофауны. – Москва, 2011. – С. 209-211.

23. Луговцев, В.Ю. Пограничная болезнь овец / В.Ю. Луговцев, И.Ф. Вишняков // Вестник РАСХН. – 1998. – №1. – С. 79-82.
24. Луговцев, В.Ю. Пограничная болезнь овец / В.Ю. Луговцев, И.Ф. Вишняков // Вестник РАСХН. – 1998. – №2. – С. 53-58.
25. Луговцев, В.Ю. Пограничная болезнь овец / В.Ю. Луговцев, И.Ф. Вишняков // Вестник РАСХН. – 1998. – №3. – С. 64-67.
26. Луговцев, В.Ю. Разработка средств и методов лабораторной диагностики пограничной болезни овец: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / В.Ю. Луговцев. – Покров, 2000. – 153с.
27. Луговцев, В.Ю. Экспериментальная инфекция вызванная вирусом пограничной болезни овец / В.Ю. Луговцев, В.В. Куринов, И.Ф. Вишняков, // Вестник РАСХН. – 2000. – №4. – С. 77-80.
28. Мищенко, В.А. Анализ заболеваемости молодняка крупного рогатого скота молочных пород респираторными инфекциями / В.А. Мищенко, Д.К. Павлов, В.В. Думова, А.В. Мищенко, М.Ю. Киселев, А.А. Нестеров // Ветеринария Кубани. – 2008. – №6. – С. 2-4.
29. Мищенко, В.А. Оптимизация условий культивирования вирусов КРС в перевиваемых культурах клеток / Т.И. Корпусова, В.В. Думова, А.А. Пичуева, Н.В. Коропова, А.В. Кононов, Е.А. Авситидийский, А.А. Нестеров, С.В. Хлебопашникова // Ветеринария. – 2014. – №2. – С. 60-63.
30. Мникова, Л.А. Диагностика вирусной диареи крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа / Л.А. Мникова, М.М. Гоголев, С.А. Жидков // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1998. – № 3. – С. 25-27.
31. Мурватуллоев, С.А. Распространенность чумы мелких жвачных животных в Таджикистане / С.А. Мурватуллоев, М. Аноятбеков, Д.М. Шоназар, М. Амирбеков // Кишоварз. – 2011. – № 2. – С. 23-25.
32. Сатторов, И.Т. Эпизоотология, диагностика, терапия и профилактика коронавирусного энтерита телят в условиях Республики Таджикистан:

- автореф. дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03./ И.Т. Сатторов. – Москва, 1995. – 46 с.
33. Урываев, Л.В. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами / Л.В. Урываев, К.С. Ионова, А.В. Дедова, Л.В. Дедов, Т.К. Селиванова, Н.А. Парасюк, М.В. Мезенцева, Л.В. Костина, Е.А. Гущина, Р.Я. Подчерняева, Т.В. Гребенникова // Вопросы вирусологии. – 2012. – №5. – С. 15-21.
 34. Цыбанов, С.Ж. Современные достижения в изучении пестивирусов (Описание вируса и заболеваний, вызываемых ими) / С.Ж. Цыбанов, В.В. Куриннов, И.Ф. Вишняков, А.Л. Семенихин // Ветеринария. – 1995. – №3. – С. 14-18.
 35. Южаков, А.Г. Молекулярно-генетический анализ вакцинных и вирулентных штаммов пестивирусов: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06; 03.00.03. / А.Г. Южаков. – Москва, 2009. – 24с.
 36. Юров, Г.К. Антигенные свойства нецитопатогенных штаммов вируса диареи – болезни слизистых крупного рогатого скота / Г.К. Юров, С.В. Алексеенкова, К.А. Диас Хименес, М.П. Неустроев, К.П. Юров // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2013. – № 2. – С. 24-26.
 37. Юров, К.П. Вакцина "ТРИВАК" против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи – болезни слизистых оболочек и парагриппа-3 крупного рогатого скота / К.П. Юров, А.Ф. Шуляк, А.Г. Глотов, В.И. Заерко // Ветеринария. – 2015. – № 12. – С. 17-21.
 38. Юров, К.П. Вирусные заболевания крупного рогатого скота и овец в СССР (проблемы профилактики и борьбы) / К.П. Юров, Ю.Д. Караваев // Труды ВИЭВ. – 1991. – Т.69. – С. 3-8.
 39. Юров, К.П. Выделение вирусных агентов от больных лошадей и овец с подозрением на кормовой токсикоз / К.П. Юров, Н.М. Белкина // Труды ВИЭВ. – 1987. – Т.64. – С. 56-58.
 40. Юров, К.П. Новый пестивирус – Хоби вирус – контаминант вакцины против чумы мелких жвачных животных / К.П. Юров, А.М. Аноятбекова, С.В. Алексеенкова // Ветеринария. – 2016. – №10. – С. 23-26.

- 41.Юров К.П. Распространение инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота в различных регионах России / К.П. Юров, А.Ф. Шуляк, О.Г. Петрова, О.В. Майджи // Тр. ВИЭВ. – 2003. – Т.73. – С. 22-25.
- 42.Юров, К.П. Роль пестивирусов в инфекционной патологии овец и коз / К.П. Юров, А.М. Аноятбекова, К.А. Диас Хименес, С.В. Алексеенкова // Ветеринария. – 2015. – №9. – С. 3-8.
- 43.Abdel-Latif, A.O. Isolation and molecular characterization of a pestivirus from goats in Egypt / A.O. Abdel-Latif, S.M. Goyali, Y. Chander, A.S. Abdel-Moneim, S.M. Tamam, H.M. Madbouly // *Acta Veterinaria Hungarica*. – 2013. – V.61. – №.2. – P. 270-280.
- 44.Abrahante, J.E. Surveillance of Bungowannah pestivirus in the upper midwestern USA / J.E. Abrahante, J.W. Zhang, K. Rossow, J.J. Zimmerman, M.P. Murtaugh // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2014. – V.61. – P. 375-377.
- 45.Akkina, R.K. Intracellular virus-induced polypeptides of pestivirus border disease virus / R.K. Akkina, K.P. Raisch // *Virus Research*. – 1990.–№.16. – P. 95-106.
- 46.Arnal, M. A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) / M. Arnal, D. Fernandez-de-Luco, L. Riba, M. Maley, J. Gilray, K. Willoughby, S. Vilcek, P.F. Nettleton // *J. Gen. Virol.* – 2004. – V. 85. – P. 3653-3657.
- 47.Audet, S.A. Evaluation of vaccines, interferons, and cell substrates for pestivirus contamination / S.A. Audet, R.L. Crim, J. Beeler // *Biologicals*. – 2000. – V. 28. – №1. – P. 41-46.
- 48.Bankamp, B. Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly / B. Bankamp, S.M. Horikami, P.D. Thompson, M. Huber, M. Billeter, S.A. Moyer // *Virology*. – 1996. – V. 216. – P. 272-277.
- 49.Barlow, R.M. Experiments in border disease. Transmission, pathology and some serological aspects of the experimental disease / R.M. Barlow, A.C. Gardiner // *J. Comp. Path.* – 1969. –V. 79. – P. 397 – 405.

50. Bauermann, F.V. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses / F.V. Bauermann, J.F. Ridpath, R. Weiblen, E.F. Flores // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2013. – V. 25. – №1. – P. 6-15.
51. Becher, P. Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome / P. Becher, G. Meyers, A.D. Shannon, H.J. Thiel // *Journal of Virology*. – 1996. – V. 70. – №5. – P. 2992-2998.
52. Becher, P. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification / P. Becher, R.A. Ramirez, M. Orlich, S.C. Rosales, M. König, M. Schweizer, H. Stalder, H. Schirrmeyer, H.J. Thiel // *Virology*. – 2003. – V. 311. – P. 96-100.
53. Becher, P. Genetic diversity of pestiviruses: Identification of novel groups and implications for classification / P. Becher, M. Orlich, A. Kosmidou, M. König, M. Baroth, H.J. Thiel // *Virology*. – 1999. – V. 262. – P. 64-71.
54. Becher, P. Molecular characterization of border disease virus, a Pestivirus from sheep / P. Becher, A.D. Shannon, N. Tautz, H.J. Thiel // *Virology*. – 1994. – V. 198. – P. 542-551.
55. Becher, P. RNA recombination in pestiviruses. Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease / P. Becher, N. Tautz // *RNA Biology*. – 2011. – V. 8. – №2. – P. 216-224.
56. Behrens, S.E. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon / S.E. Behrens, C.W. Grassmann, H.J. Thiel, G. Meyers, N. Tautz // *J Virol*. – 1998. – V. 72. – P. 2364-2372.
57. Bezek, D.M. Immunofluorescence of bovine virus diarrhea viral antigen in white blood cells from experimentally infected immunocompetent calves / D.M. Bezek, J.C. Baker, J.B. Kaneene // *Can. J. Vet. Res.* – 1988. – V. 52. – P. 288-290.
58. Bhudevi, B. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhea virus / B. Bhudevi, D. Weinstock // *Vet. Microbiol.* – 2001. – V. 83. – P. 1-10.
59. Blome, S. New leaves in the growing tree of Pestiviruses / S. Blome, M. Beer, K. Wernike // *Advances in Virus Research*. – 2017. – V. 99. – P. 139-160.

60. Bolin, S.R. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhea virus and antibodies against bovine viral diarrhea virus / S.R. Bolin, P.J. Matthews, J.F. Ridpath // J Vet Diagn Invest. – 1991. – №3. – P. 199-203.
61. Braun, U. Sheep persistently infected with border disease readily transmit virus to calves seronegative to BVD virus / U. Braun, S.F. Reichle, C. Reichert, M. Hassig, H.P. Stalder, S. Bachofen, E. Peterhans // Veterinary microbiology. – 2014. – V.168. – P. 98-104.
62. Brun, A. Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep / A. Brun, F. Lacoste, G. Reynaud, F. Kato, B. Saint Marc // Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses. – 1993. – P. 257-259.
63. Byers, S.R. The effects of exposure of susceptible alpacas to alpacas persistently infected with bovine viral diarrhea virus / S.R. Byers, J.F. Evermann, D.S. Bradway, A.L. Grimm, J.F. Ridpath, S.M. Parish, A. Tibary, G.M. Barrington // Can Vet J. – 2011. – V. 52. – P. 263-271.
64. Cabezon, O. Border disease virus shedding and detection in naturally infected Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) / O. Cabezón, R. Rosell, R. Velarde, G. Mentaberre, E. Casas-Díaz, S. Lavín, I. Marco // J.Vet. Diagn. Invest. – 2010. – V. 22. – №5. – P. 744-747.
65. Cai, D. Genomic characterization of three bovine viral diarrhea virus isolates from cattle / D. Cai, Q. Song, J. Wang, Y. Zhu // Arch Virol. – 2016. – V.161. – №12. – P. 3589-3592.
66. Chon, S. A mutational analysis of the N-terminal protease of bovine viral diarrhea virus / S. Chon // Korean J. Vet Res. – 1999. – V. 39. – №4. – P. 772-777.
67. Ciulli, S. Evidence for Tunisian-Like pestiviruses presence in small ruminants in Italy since 2007 / S. Ciulli, G. Purpari, S. Agnello, P. Di Marco, S. Di Bella, E. Volpe, F. Mira, A.C. de Aguiar Saldanha Pinheiro, S. Vullo, A. Guercio // Transboundary and Emerging Diseases. – 2016 – V. 64. – P. 1243-1253.

68. Coggins, L. Attenuation of virus diarrhea virus (Strain Oregon C24V) for vaccine purposes / L. Coggins, J.H. Gillespie, D.S. Robson, et al // *Cornell Vet.* – 1961. – V. 51. – P. 539–545.
69. Darbyshire, J.H. A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle // J.H. Darbyshire // *Veterinary Record.* – 1960. – V. 72. – P. 331.
70. De Mia, G.M. Genetic Characterization of a caprine pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup / G.M. De Mia, I. Greiser-Wilke, F. Feliziani, M. Giammarioli, A. De Giuseppe // *J. Vet. Med. B.* – 2005. – V. 52. – P. 206-210.
71. Decaro, N. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe / N. Decaro, M.S. Lucente, V. Mari, F. Cirone, P. Cordioli, M. Camero, R. Sciarretta, M. Losurdo, E. Lorusso, C. Buonavoglia // *Emerging Infectious Diseases.* – 2011. – V. 17. – №8. – P. 1549-1552.
72. Decaro, N. Comparison of the cross-antibody response induced in sheep by inactivated bovine viral diarrhoea virus 1 and Hobi-like pestivirus / N. Decaro, V. Mari, R. Sciarretta, M.S. Lucente, M. Camero, M. Losurdo, V. Larocca, V. Colao, N. Cavaliere, A. Lovero, E. Lorusso, C. Buonavoglia // *Research in Veterinary Science.* – 2013. – V. 94. – P. 806-808.
73. Decaro, N. Evidence for circulation of bovine viral diarrhoea virus type 2c in ruminants in Southern Italy / N. Decaro, M.S. Lucente, G. Lanave, P. Gargano, V. Larocca, M. Losurdo, L. Ciambrone, P.A. Marino, A. Parisi, F. Casalnuovo, C. Buonavoglia, G. Elia // *Transboundary and Emerging Diseases.* – 2016. – V. 64. – P. 1935-1944.
74. Decaro, N. Experimental infection of cattle, sheep and pigs with 'Hobi'-like pestivirus / N. Decaro, V. Mari, M.S. Lucente, R. Sciarretta, A. Moreno, C. Armenise, M. Losurdo, M. Camero, E. Lorusso, P. Cordioli, C. Buonavoglia // *Veterinary Microbiology.* – 2012. – V. 155. – P. 165-171.
75. Decaro, N. Hobi-like pestivirus: both biotypes isolated from a diseased animal. / N. Decaro, V. Mari, P. Pinto, L.M. Stella, R. Sciarretta, F. Cirone, M.L. Colaianni, G. Elia, H.J. Thiel, C. Buonavoglia // *Journal of General Virology.* – 2012. – V. 93. – P. 1976-1983.

76. Desouky, H.M. Diagnosis of acute infection with bovine viral diarrhea virus in dairy cattle by using indirect ELISA and Immunohistochemistry technique on skin biopsy sample / H.M. Desouky, Y.A. Ghazi, A.A. Madboli, Y.G.M Abdel-Hafeiz, A.H. Soror, F.Y. Shata // *Global Veterinaria*. – 2015. – V.15. – №5. – P. 512-517.
77. Dias, R.K. Antigenic diversity of Brazilian isolates of HoBi-like pestiviruses / R.K. Dias, J.F. Cargnelutti, M.N. Weber, C.W. Canal, F.V. Bauermann, J.F. Ridpath, R. Weiblen, E.F. Flores // *Veterinary Microbiology*. – 2017. – V. 203. – P. 221-228.
78. Dubey, P. Development of a RT-PCR ELISA for simultaneous detection of BVDV-1, BVDV-2 and BDV in ruminants and its evaluation on clinical samples / P. Dubey, N. Mishra, K. Rajukumar, S.P. Behera, S. Kalaiyarasu, R.K. Nem, A. Prakash // *J. Virol. Methods*. – 2014. – V. 30. – P. 1-7.
79. Dubois, E. Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006 / E. Dubois, P. Russo, M. Prigent, R. Thiery // *Veterinary Microbiology*. – 2008. – V. 130. – P. 69-79.
80. Edmondson, M.A. Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhea virus in diagnostic samples / M.A. Edmondson, M.D. Givens, P.H. Walz, J.A. Gard, D.A. Stringfellow, R.L. Carson // *J Vet Diagn Invest*. – 2007. – V. 19. – P. 376-378.
81. Edwards, S. Antigenic differences among pestiviruses / S. Edwards, D. Paton // *Veterinary clinics of North America: Food animal practice*. – 1995. – V. 11. – №3. – P. 563-577.
82. Edwards, S. The diagnosis of bovine virus diarrhea – mucosal disease in cattle / S. Edwards // *Rey. xi. tech. Off. int. Epiz.* – 1990. – V. 9. – №1. – P. 115-130.
83. Elbers, K. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7 / K. Elbers, N. Tautz, P. Becher, et al. // *J Virol*. – 1996. – V.70. – №6. – P. 4131-4135.
84. Evans, C.A. Investigation of AGID and two commercial ELISAs for the detection of Bovine viral diarrhea virus–specific antibodies in sheep serum / C.A. Evans, S.R. Lanyon, M.P. Reiche // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2017. – V. 29. – №2. – P. 181-185.

85. Evermann, J.F. Pestiviral infection of llamas and alpacas / J.F. Evermann // Small Ruminant Research. – 2006. – № 61. – P. 201-206.
86. Falcone, E. Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus type – 2 (BVDV-2) isolated from a contaminated vaccine / E. Falcone, P. Cordioli, M. Tarantino, M. Muscillo, G. Sala, G. La Rosa, I.L. Archetti, C. Marianelli, G. Lombardi, M. Tollis // Veterinary Research Communications. – 2003. – V. 27. – P. 577-589.
87. Fernandez, M. Border Disease Virus infection of bovine placenta / M. Fernandez, U. Braun, S. Frei, M. Schweizer, M. Hilbe // Veterinary Pathology. – 2018. – V. 20. – №10. – P. 1-9.
88. Firth, C. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City / C. Firth, M. Bhat, M.A. Firth, S.H. Williams, M.J. Frye, P. Simmonds, J.M. Conte, J. Ng, J. Garcia, N.P. Bhuva, B. Lee, X. Che, P.L. Quan, W. Ian Lipkin // MBio. – 2014. – V. 5. – №5. – P. 1-16.
89. Giammarioli, M. Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group / M. Giammarioli, S.A. La Rocca, F. Steinbach, C. Casciari, G.M. De Mia // Veterinary Microbiology. – 2011. – V. 147. – P. 231-236.
90. Giangaspero, M. Characterization of genotypes among bovine viral diarrhea virus 2 strains according to palindromic nucleotide substitutions in the 5' untranslated genomic region / M. Giangaspero, R. Harasawa // Veterinaria Italiana. – 2004. – V. 40. – № 2. – P. 22-38.
91. Giangaspero, M. Genoepidemiological evaluation of bovine viral diarrhea virus 2 species based on secondary structures in the 5' Untranslated Region / M. Giangaspero, R. Harasawa, L. Weber, A. Belloli // J. Vet. Med. Sci. – 2008. – V. 70. – №6. – P. 571-580.
92. Giangaspero, M. Genotypes of pestivirus RNA detected in live virus vaccines for human use / G. Vacirca, R. Harasawa, M. Buttner, A. Panuccio, C.D. Morghen, A.

- Zanetti, A. Belloli, A. Verhulst // J. Vet. Med. Sci. – 2001. – V. 63. – №7. – P. 723-733.
93. Giangaspero, M. Ovine pestiviruses: their taxonomic status revealed by palindromic nucleotide substitutions / M. Giangaspero, R. Harasawa // Veterinary Microbiology. – 1999. – V. 70. – P.33-39.
 94. Giangaspero M. Pestivirus species potential adventitious contaminants of biological / M. Giangaspero // Products. Trop Med Surg. – 2013. – V. 153. – P. 2-4.
 95. Goens, S.D. The evolution of bovine viral diarrhea: a review / S.D. Goens // Can. Vet. J. – 2002. – V. 43. – P. 946-954.
 96. Goktuna, P.T. Evaluation of diagnostic methods for the detection of pestiviruses in clinical samples / P.T. Goktuna, K. Yesilbag // Turk J. Vet. Anim. Sci. – 2017. – V. 41. – P. 175-179.
 97. Greiser-Wilke, I. Immunofluorescence studies of biotype-specific expression of bovine viral diarrhoea virus epitopes in infected cells / I. Greiser-Wilke, K.E. Dittmar, B. Liess, V. Moennig // Journal of General Virology. – 1991. – V. 72. – P. 2015-2019.
 98. Griffin, S.D. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria / S.D. Griffin, R. Harvey, D.S. Clarke, W.S. Barclay, M. Harris, D.J. Rowlands // J Gen Virol. – 2004. – V. 85. – P. 451-461.
 99. Grummer, B. Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrindependent receptor-mediated endocytosis / B. Grummer, S. Grotha, I. Greiser-Wilke // J. Vet. Med. B. – 2004. – V. 51. – P.427-432.
 100. Gutekunst, D.E. Complement-Fixing and neutralizing antibody response to Bovine Viral Diarrhea and Hog Cholera antigens / D.E. Gutekunst, W.A Malmquist. // Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. – 1994. – V. 28. – P. 19-23.
 101. Harada, T. E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies / T. Harada, N. Tautz, H.J. Thiel // J. Virol. – 2000. – V. 74. – P.9498-9506.

102. Harasawa, R. Evidence of Pestivirus RNA in Human Virus Vaccines / R. Harasawa, T. Tomiyamo // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1994. – V. 32. – №6. – P. 1604-1605.
103. Harasawa, R. Sequence analysis of the 5' untranslated region of pestivirus RNA demonstrated in interferons for human use / R. Harasawa, T. Sasaki // *Biologicals*. – 1995. – V. 23. – P. 263-269.
104. Hoff, H.S. Induction of apoptosis and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhea virus infection / H.S. Hoff, R.O. Donis, // *Virus Research*. – 1997. – V. 49. – №1. – P. 101-113.
105. Hofmann, M.A. Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region / M.A. Hofmann, K. Brechtbühl, N. Stiuber // *Arch Virol*. – 1994. – V. 139. – P.217-229.
106. Horzinek, M.C. Pestiviruses – taxonomic perspectives / M. C. Horzinek // *Arch. Virol*. – 1991. – V. 3 – P. 1-5.
107. Huck, R.A. Border disease of sheep. Comparison of the results of serological testing using complement fixation, immunodiffusion, neutralization and immunofluorescent techniques / R.A. Huck, D.H. Evans, D.G. Woods, A.A. King, P. Stuart // *Br. vet. J.* – 1975. – V.131. – P.427-435.
108. Iqbal, M. Role for bovine viral diarrhea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA / M. Iqbal, E. Poole, S. Goodbourn, et al. // *J Virol*. – 2004. – V. 78. – №1. – P. 136-145.
109. Jackova, A. The extended genetic diversity of BVDV-1: Typing of BVDV isolates from France / A. Jackova, M. Novackova, C. Pelletier, C. Audeval, E. Gueneau, A. Haffar, E. Petit, L. Rehby, S. Vilcek // *Vet. Res. Commun*. – 2008. – V. 32. – P. 7-11.
110. Julia, S. First report of BVDV circulation in sheep in Argentina / S. Julia, M.I. Craig, L.S. Jimenez, G.B. Pinto, E.L. Weber // *Preventive Veterinary Medicine*. – 2009. – V. 90. – P. 274-277.
111. Kaiser, V. Influence of border disease virus (BDV) on serological surveillance within the bovine virus diarrhea (BVD) eradication program in Switzerland / V.

- Kaiser, L. Nebel, G. Schupbach-Regula, R.G. Zanoni, M. Schweizer // BMC Veterinary Research. – 2017. – V. 21. – P.2-13.
112. Kalaiyarasu, S. Development and evaluation of a truncated recombinant NS3 antigen- based indirect ELISA for detection of pestivirus antibodies in sheep and goat / S. Kalaiyarasu, N. Mishra, K. Rajukumar, R.K. Nema, S.P. Behera, // Journal of Immunoassay and Immunochemistry. – 2015. – V. 36. – P. 312-323.
 113. Kalaycioglu, A.T. Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) diversity and vaccination. A review / Kalaycioglu, A.T. // Veterinary Quarterly. – 2007. – V. 29. – №2. – P. 60 –67.
 114. Kaleibar, M.T. A survey on the status of the border disease virus infection in sheep with reproductive failure using cell culture and polymerase chain reaction (PCR) methods in Tabriz, Iran / M.T. Kaleibar, O. Madadgar, A. Jaliyand, H. Mohammadpour // Comparative Clinical Pathology. – 2014. – V. 23. – №5. – P. 1429-1434.
 115. Kawanishi, N. First isolation of border disease virus in Japan from a pig farm no ruminants / N. Kawanishi, S. Tsuduku, H. Shimizu, Y. Ohtani, K. Kameyama, M. Yamakawa, T. Tsutsui, K. Matsuura, S. Ohashi, T. Isobe, S. Yamada // Veterinary Microbiology. – 2014. – V. 171. – P. 210-214.
 116. King A.M.Q. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses / A.M.Q King, E.J. Lefkowitz, A.R. Mushegian, M.J. Adams, B.E. Dutilh, A.E. Gorbalenya, B. Harrach, R.L. Harrison, et al. // Archives of Virology. – [Электронный ресурс]. – 2018. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3847-1>.
 117. Kirkbride, C.A. Serologic examination of aborted ovine and bovine fetal fluids for the diagnosis of border disease, bluetongue, bovine viral diarrhea, and leptospiral infections / C.A. Kirkbride, M.W. Johnson / J Vet Diagn Invest. – 1989. – №1. – P.132-138.
 118. Kirkland, P.D. Ruminant pestivirus Infections / P.D. Kirkland, S.G. MacKintosh // Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures. – 2006. – P. 1-30.

119. Klemens, O. Characterization of the determinants of NS2-3-independent virion morphogenesis of pestiviruses / O. Klemens, D. Dubrau, N. Tautz // *Journal of Virology*. – 2015. – V. 89. – №22. – P. 11668-11680.
120. Kovacs, F. The live attenuated bovine viral diarrhoea virus components of a multivalent vaccine confer protection against fetal infection. / F. Kovacs, T. Magyar, C. Rinehart, K. Elbers, K. Schlesinger, W.C. Ohnesorge // *Veterinary Microbiology*. – 2003. – V. 96. – P. 117-131.
121. Krametter-Froetscher, R. Prevalence of antibodies to pestiviruses in goats in Austria / R. Krametter-Froetscher, A. Loitsch, H. Kohler, A. Schleiner, P. Schiefer, K. Moest, F. Golja, W. Baumgartner // *J. Vet. Med. B*. – 2006. – V. 53. – P. 48-50.
122. Kul, O. Concurrent Peste des Petits Ruminants Virus and pestivirus infection in stillborn twin lambs / O. Kul, N. Kabakci, A. Ozkul, H. Kalender, T. Atmaca // *Vet Pathol*. – 2008. – V. 45. – P.191-196.
123. Kwiatek, O. Peste des Petits Ruminants (PPR) Outbreak in Tajikistan / O. Kwiatek, C. Minet, C. Grillet, C. Hurard, E. Carlsson, B. Karimov, E. Albina, A. Diallo, G. Libeau // *J. Comp. Path.* – 2007. – V. 136. – P.111-119.
124. Lanyon, S.R. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis / S.R. Lanyon, F.I. Hill, M.P. Reichel. J. Brownlie // *The Veterinary Journal*. – 2014. – V. 199. – P.201-209.
125. Lanyon, S.R. Validation and evaluation of a commercially available ELISA for the detection of antibodies specific to bovine viral diarrhoea virus (bovine pestivirus) / S.R. Lanyon, M.L. Anderson, E. Bergmann, M.P. Reichel // *Australian Veterinary Journal*. – 2012. – V. 91. – №1-2. – P. 52-56.
126. Leskova, V. Genetic characterization of a border disease virus isolate originating from Slovakia / V. Leskova, A. Jackova, M. Vlaskova, S. Vilcek // *Acta virologica*. – 2013. – V. 57. – P. 17-25.
127. Li, W. Detection of border disease virus (BDV) in goat herds suffering diarrhoea in eastern China / W. Li, L. Mao, Y. Zhao, Y. Sun, K. He, J. Jiang // *Virol J*. – 2013. – V.10. – №80. – P.4-7.

128. Liang, D. A. replicon trans-packaging system reveals the requirement of nonstructural proteins for the assembly of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) virion / D. Liang, L. Chen, I.H. Ansari, L.H.V.G. Gil, C.L. Topliff, C.L. Kelling, et al. // *Virology*. – 2009. – V. 387. – №2. – P. 331-340.
129. Lindberga, A.L.E. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations / A.L.E. Lindberga, S. Aleniusb // *Veterinary Microbiology*. – 1999. – V. 64. – P. 197-222.
130. Lindenbach, B.D. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication / B.D. Lindenbach, H.J. Thiel, C.M. Rice // *Fields Virology*. – 2007. – №5. – P.1101-1133.
131. Loken, T. Border disease in sheep / T. Loken // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. – 1995. – V. 11. – №3. – P. 579-595.
132. Loken, T. Outbreaks of Border Disease in Goats Induced by a Pestivirus-Contaminated Orf Vaccine, with Virus Transmission to Sheep and Cattle / T. Loken, J. Krogsrud, I. Bjerkgs // *J. Comp. Path.* – 1991. – V. 104. – P. 195-209.
133. Makoschey, B. An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2 / B. Makoschey, M.G.J. Janssen, M.P. Vrijenhoek, J.H.M. Korsten, P.V.D. Marel // *Vaccine*. – 2001. – V.19. – P. 3261-3268.
134. Manktelow, B.W. Hairy shaker disease of lambs / B.W. Manktelow, W.L. Porte, K.H.C. Lewis // *New Zeland Veterinary Journal*. – 1969. – V.17. – №12. – P. 245 – 248.
135. Mao, L. Characterization of one sheep border disease virus in China / L. Mao, X. Liu, W. Li, L. Yang, W. Zhang, J. Jiang // *Virology Journal*. – 2015. – V.12. – №15. – P. 2-8.
136. Maurer, K. CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhoea Virus / K. Maurer, T. Krey, V. Moennig, T. Heinz-Jurgen, T. Rumenapf // *Journal of Virology*. – 2004. – V. 78. – №4. – P. 1792-1799.
137. Mcfadden A.M.J. The first case of a bull persistently infected with Border disease virus in New Zealand / A.M.J. McFadden, D.J. Tisdall, F.I. Hill, P. Otterson D.

- Pulford, J. Peake, C.J. Finnegan, S.A. La Rocca, T. Kok-Mun, A.M. Weir // *New Zealand Veterinary Journal*. – 2012. – V. 60. – №5. – P. 290-296.
138. Mishra, N. Genetic typing of bovine viral diarrhoea isolates from India / N. Mishra, B. Pattnaik, S. Vilcek, S.S. Patil, P. Jain, N. Swamy, S. Bhatia, H.K. Pradhan // *Veterinary Microbiology*. – 2004. – V. 104. – P. 207-212.
 139. Mishra, N. Identification and molecular characterization of border disease virus (BDV) from sheep in India / N. Mishra, K. Rajukumara, S. Vilcek, S. Kalaiyarasu, S.P. Behera, P. Dubey, R.K. Nema, V.B. Gavade, S.C. Dubey, D.D. Kulkarnia // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. – 2016. – V. 44. – P. 1-7.
 140. Mishra, N. Molecular characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolate originating from a native Indian sheep (*Ovis aries*) / N. Mishra, K. Rajukumar, S. Vilcek, A. Tiwari, J.S. Satav, S.C. Dubey // *Veterinary Microbiology*. – 2008. – V. 130. – P. 88-98.
 141. Moennig, V. Pestiviruses: a review // *Veterinary Microbiology*. – 1990. – V. 23. – P. 35-54.
 142. Neili, J.D. Complete Genome Sequences of a Cytopathic / Noncytopathic Pair of Border Disease Viruses / J.D. Neili, J.F. Ridpath // *Genome Announc.* – 2014. – V. 2. – №2. – P. 1-2.
 143. Neili, J.D. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus / J.D. Neili // *Biologicals*. – 2013. – V. 41. – №2. – P.2-7.
 144. Nettleton, P.F. Border disease of sheep and goats / P.F. Nettleton, A. Janine, J.A. Gilray, P. Russo, E. Dlisi // *Veterinary Research, BioMed Central*. – 1998. – V. 29. – № 3-4. – P. 327-340.
 145. Nettleton, P.F. Pathogenesis and epidemiology of border disease / P.F. Nettleton // *Ann. Rech. Vet.* – 1987. – V. 18. – P. 147-155.
 146. Nettleton, P.F. Pestivirus infections in ruminants other than cattle / P.F. Nettleton, // *Rev. sei. tech. Off. int. Epiz.* – 1990. – V. 9. – № 1. – P. 131-150.
 147. Nettleton, P.F. Ruminant pestiviruses / P.F. Nettleton, G. Entrican // *British Veterinary Journal*. – 1995. – V. 151. – № 6. – P. 615-642.

148. Oguzoglu, T.C. Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup / T.C. Oguzoglu, M.T. Tan, N. Toplu, A.B. Demir, S. Bilge-Dagalp, T. Karaoglu, A. Ozkul, F. Alkan, I. Burgu, L. Haas, I. Greiser-Wilke // *Veterinary Microbiology*. – 2009. – V. 135. – P. 374-379.
149. Oguzoglu, T.C. A review of Border Disease Virus infection in ruminants: Molecular characterization, pathogenesis, diagnosis and control / *Animal Health, Production and Hygiene*. – 2012. – №1. – P. 1-9.
150. Passler, T. Bovine viral diarrhea virus infections in heterologous species / T. Passler, P.H. Walz // *Animal Health Research Reviews*. – 2009. – V.11. – №2. – P. 191-205.
151. Passler, T. Experimental infection of pregnant goats with bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1 or 2 / T. Passler, K.P. Riddell, M.A. Edmondson, M.F. Chamorro, J.D. Neill, B.W. Brodersen, H.L. Walz, P.K. Galik, Y. Zhang, P.H. Walz // *Veterinary Research*. – 2014. – V. 45. – №38. – P. 2-10.
152. Paton, D.J. A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralization assays and genetic sequencing / D. J. Paton, J.J. Sands, J.P. Lowings, J.E. Smith, G. Ibata, S. Edwards // *Veterinary Research BioMed Central*. – 1995. – V. 26. – №2. – P. 92-109.
153. Peletto, S. A new genotype of border disease virus with implications for molecular diagnostics / S. Peletto, C. Caruso, F. Cerutti, P. Modesto, S. Zoppi, A. Dondo, P.L. Acutis, L. Masoero // *Arch Virol*. – 2015. – V. 161. – P. 471-477.
154. Pellerin, C. Identification a new group bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities / C. Pellerin, J.V.D. Hurk, J. Lecomte, P. Tijssen // *Virology*. – 1994. – V. 203. – P. 260-269.
155. Ridpath, J.F. Bovine viral diarrhea virus: Global status / J.F. Ridpath // *Vet. Clin. Food. Anim.* – 2010. – V. 26. – P. 105-121.
156. Ridpath, J.F. Impact of BVDV infection of white-tailed deer during second and third trimesters of pregnancy / J.F. Ridpath, J.D. Neill, C.C.L. Chase // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2012. – V. 48. – №3. – P. 758-762.

157. Ridpath, J.F. Segregation of bovine viral diarrhea virus in to genotypes / J. F. Ridpath, S.R.Bolin, E.J. Dubovi // *Virology*. – 1994. –V. 205. – P. 66-74.
158. Rosamilia, A. Detection of border disease virus (BDV) genotype 3 in Italian goat herds / A. Rosamilia, C. Grattarola, C. Caruso, S. Peletto, E. Gobbi, V. Tarello, P. Caroggio, A. Dondo, L. Masoero, P.L. Acutis // *The Veterinary Journal*. – 2014. – V. 199. – P. 446-450.
159. Rumenapf, T. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses / T. Rumenapf, G. Unger, J.H. Strauss, H.J. Thiel // *Journal of Virology*. – 1993. – V. 67. – P. 3288-3295.
160. Schirrmeier, H. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species / H. Schirrmeier, G. Strebelow, K. Depner, B. Hoffmann, M. Beer // *Journal of General Virology*. – 2004.–V. 85. –P. 3647-3652.
161. Schweizer, M. Pestiviruses / M. Schweizer, E. Peterhans // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* – 2014. – №. 2. – P. 141-163.
162. Shi, H. Identification of Natural Infections in Sheep / Goats with HoBi-like Pestiviruses in China / H. Shi, Y. Kan, L. Yao, C. Leng, Q. Tang, J. Ji, S. Sun // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2016. – V. 63. – P. 480-484.
163. Silveira, S. HoBi-like is the most prevalent ruminant pestivirus in Northeastern Brazil // S. Silveira, L.F. Baumbach, M.N. Weber, A.C.S. Mosena, M.S. Da Silva, S.P. Cibulski, M.R. Borba, R.D. Maia, V.C.S Coimbra, G.M. De Moraes, J.F. Ridpath, C.W. Canal // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2017. – V. 65. – №1. – P. 1-8.
164. Smith, D.B. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae / D.B. Smith, G. Meyers, J. Bukh, E. A. Gould, T. Monath , A.S. Muerhoff, A. Pletnev, R. Rico-Hesse, J.T. Stapleton, P. Simmonds, P. Becher // *Journal of General Virology*. – 2017. – V. 98. – P. 2106-2112.
165. Smith D.B. Proposal 2017.010S.A.v1.Pestivirus_7sp4spren. Rename four species and create seven species in the genus Pestivirus, family Flaviviridae / D.B. Smith, G. Meyers, J. Bukh, E.A. Gould, T. Monath, A.S. Muerhoff, A. Pletnev, R. Rico-Hesse,

- J.T. Stapleton, P. Simmonds, P. Becher // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://ictv.globa l/proposals-17/2017.010S.A.v1.Pestivirus_7sp4s pren.zip.
166. Soltan, M.A. Circulation of bovine viral diarrhea virus – 1 (BVDV-1) in dairy cattle and buffalo farms in Ismailia Province, Egypt / M.A. Soltan, R.P. Wilkes, M.N. Elsheery, M.M. Elhaig, M.C. Riley, M.A. Kennedy // *The Journal of infection in developing countries*. – 2015. – V. 9. – №12. – P. 1331-1337.
 167. Stahl, K. Natural infection of cattle with an atypical ‘HoBi-like pestivirus – Implications for BVD control and for the safety of biological products / K. Stahl, J. Kampa, S. Alenius, P.A. Wadman, C. Baule, S. Aliumlamai, S. Belak *Vet. Res.* – 2007. – V. 38. – P. 517-523.
 168. Sullivan, D.G. Genetic characterization of ruminant pestiviruses: sequence analysis of viral genotypes isolated from sheep / D.G. Sullivan, G.J. Chang, R. K. Akkina // *Virus Research*. – 1997. – V. 47. – P. 19-29.
 169. Swasdipan, S. Rapid Transplacental infection with Bovine Pestivirus following intranasal inoculation of ewes in early pregnancy / S. Swasdipan, H. Bielefeldt-Ohmann, N. Phillips, P.D. Kirkland, M.R. McGowa // *Vet Pathol.* – 2001. – V. 38. – P. 275-280.
 170. Tajima, M. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhea virus in Lower Saxony, Germany / M. Tajima, H.R. Frey, O. Yamato, Y. Maede, V. Moennig, H. Scholz, I. Greiser-Wilke // *Virus Research*. – 2001. – V. 76. – P 31-42.
 171. Tautz, N. The Molecular Biology of Pestiviruses / N. Tautz, B.A. Tews, G. Meyers // *Advances in Virus Research*. – 2015. – V. 93. – P. 47-160.
 172. Terpstra, S. Diagnosis of border disease by direct immunofluorescence / S Terpstra // *Veterinary Science Communications*. – 1977. – №1. – P. 75-77.
 173. Thabti, F. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep / F. Thabti, C. Letellier, S. Hammami, M. Pepin, M. Ribiere, A. Mesplede, P. Kerkhofs, P. Russo // *ArchViro.* – 2005. – V. 150. – P. 215-229.
 174. Toplak, I. Genetic typing of bovine viral diarrhea virus: most Slovenian isolates are of genotypes Id and 1f / I. Toplak, T. Sandvik, D. Barlic-Maganja, J. Grom, D.J. Paton // *Veterinary Microbiology*. – 2004. – V. 99. – P. 175-185.

175. Toplu, N. Dual infection of fetal and neonatal small ruminants with Border Disease Virus and Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV): Neuronal Tropism of PPRV as a novel finding / N. Toplu, T.C. Oguzoglu, H. Albayrak // J. Comp. Path. – 2012. – V. 146. – P. 289-297.
176. Vilcek, S. A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus / S. Vilcek, D.J. Paton // Vet. Res. – 2000. – V. 31. – P. 437-445.
177. Vilcek, S. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups / S. Vilcek, D.J. Paton, B. Durkovic, L. Strojny, G. Ibata, A. Moussa, A. Loitsch, W. Rossmanith, S. Vega, M.T. Scicluna, V. Paifi // Archives of Virology. – 2001. – V. 146. – P. 99-115.
178. Vilcek, S. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope / S. Vilcek, J.F. Ridpath, H. Van Campen, J.L. Cavender, J. Warg // Virus Research. – 2005. – V. 108. – P. 187-193.
179. Vilcek, S. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria) / S. Vilcek, I. Greiser-Wilke, B. Durkovic, W. Obritzhauser, A. Deutz, J. Kofer // Veterinary Microbiology. – 2003. – V. 91. – P. 285-291.
180. Vilcek, S. Genetic typing of pestiviruses from New Zealand / H.V. Bjorklundo, G.W. Hornert, J. Meers, S. Behikou // New Zealand Veterinary Journal. – 1998. – V. 46. – №1. – P. 35-37.
181. Vilcek, S. Molecular characterization of ovine pestiviruses / S. Vilcek, P.F. Nettleton, D.J. Paton, S. Belak // Journal of General Virology. – 1997. – V. 78. – P. 725-735.
182. Walz, P.H. Control of Bovine Viral Diarrhea Virus in ruminants / P.H. Walz, D.L. Grooms, T. Passler, J.F. Ridpath, R. Tremblay, D.L. Step, R.J. Callan, M.D. Givens // J Vet Intern Med. – 2010. – V. 24. – P.476-486.
183. Warrener, P. Pestivirus NS3 (p80) Protein Possesses RNA Helicase Activity // P. Warrener, M.S. Collett // Journal of virology. – 1995. – V. 69. – №3. – P. 1720-1726.

184. Weber, M.N. Clinical Presentation Resembling Mucosal Disease Associated with 'HoBi'-like Pestivirus in a Field Outbreak / M.N. Weber, A.C.S. Mosena, S.V.D. Simoes, L.L. Almeida, C.R.M. Pessoa, R.F. Budaszewski, T.R. Silva, J. F. Ridpath, F. Riet-Correa, D. Driemeier, C.W. Canal // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2016. – V. 63. – №1. – P. 92-100.
185. Weiskircher, E. Bovine viral diarrhea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes / E. Weiskircher, J. Aligo, G. Ning, K.V. Konan // *Virology*. – 2009. – V.6. – №185. – P. 1-15.
186. Wenswoort, G. Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against Hog Cholera virus / G. Wenswoort, C. Terpstra, E.P. De Kluijver, C. Kragten, J.C. Warnaar // *Veterinary Microbiology*. – 1989. – V. 21. – P. 9-20.
187. Wernery, U. Bovine viral diarrhea – an emerging disease in camelids. A review / U. Wernery // *American Journal of Virology*. – 2012. – V. 1. – №1. – P. 9-17.
188. Willoughby, K. Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses / K. Willoughby, B. Valdazo-González, M. Maley, J. Gilray, P.F. Nettleton // *J. Virology Methods*. – 2006. – V. 132. – № 1-2. – P. 187-194.
189. World Organisation for Animal Health (OIE). Border disease virus. Chapter 2.7.1. / *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Seventh Edition, 2012. – V. 2. – P. 957-967.
190. World Organisation for Animal Health (OIE). Equine Infectious Anaemia [Электронный ресурс] *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2013. – 2013. – Режим доступа http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.05.06_EIA.pdf
191. World Organisation for Animal Health (OIE). Peste des petits ruminants (infection with peste des petits ruminants virus) [Электронный ресурс] *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2013. – 2013. – Режим доступа

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.05.06_EI_A.pdf

192. World Organisation for Animal Health (OIE); Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) [Электронный ресурс] Peste des petits ruminants. Global Eradication Programme, 2016. – 2016. – Режим доступа: <http://www.fao.org/3/a-i6316e.pdf>
193. Wu, Z. Virome Analysis for Identification of Novel Mammalian Viruses in Bat Species from Chinese Provinces / Z. Wu, X. Ren, L. Yang, Y. Hu, J. Yang, G. He, J. Zhang, J. Dong et. al. // Journal of Virology. – 2012. – V. 86. – №20. – P. 10999-11012.
194. Yazici, Z. Molecular diagnosis and seroepidemiology of pestiviruses in sheep. / Z. Yazici, M. S. Serdar, S. O. Gumusova, H. Albayrak // Veterinarskii Arkhiv. – 2012. – V. 82. – №1. – P.35-45.
195. Yousif, A.A. Cytopathic genotype 2 bovine viral diarrhea virus in dromedary camels / A.A. Yousif, L.J. Braun, M.S. Saber, T.A. Aboellail, C.C.L. Chase // Arabian Journal of Biotechnology. – 2004. – V. 7. – P. 123-140.

12. ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

**ФГБНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ имени Я.Р.КОВАЛЕНКО**

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Секции зоотехния и
ветеринария отделения

сельскохозяйственных наук РАН,
академик РАН,

В.В. Калашников



2014 г.

**ДИАГНОСТИКА
ПЕСТИВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ОВЕЦ
МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Москва 2017

ПАСПОРТ

диплоидных клеток тестикулов козленка (ТК-ВИЭВ) передаваемых на депонирование при подаче заявки на изобретение

1. Наименование организации, где получен штамм: ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко.
2. Автор или авторский коллектив, дата получения клеточной культуры: Т.В. Гальнбек, А.Ф. Шуляк, А.М. Аноятбекова, И.В. Потапова, К.В. Кулешов, А.Г. Калинин, К.П. Юров, 2016 г.
3. Почтовый адрес заявителя: 109428, Москва, Рязанский проспект 24 к 1.
4. Видовое название штамма: клетки тестикулов козленка (ТК-ВИЭВ).
5. Причины депонирования: модель для исследования вирусов КРС, МРС, пчел; выделение, накопление, изготовление диагностикумов, вакцин.
6. Родословная получения клеточной культуры: тестикулы козленка, полученные от индивидуального организма нормальной ткани.
7. Число пассажей к моменту паспортизирования: 16 пассажей.
8. Состав питательной среды: среда 0,5% гидролизат лактальбумина и Игла МЕМ в соотношении 1:1, сыворотка эмбрионов КРС 10%.
9. Культуральные свойства: Клетки ТК-ВИЭВ выращиваются в стационарных условиях при $t\ 37^{\circ}\text{C}$. Для снятия клеток со стекла при пересевах используют смесь 0,25% трипсина и 0,02% версена в соотношении 1:7 подогретую до $t\ 37^{\circ}\text{C}$. Посевная концентрация 120-140 тыс. кл/мл. Коэффициент пересева 1:2-1:3. Срок формирования монослоя 4-6 суток культивирования и сохраняется без смены среды в течении 12 суток.
10. Описание визуальных цитологических наблюдений: Монослой представлен клетками смешанного типа – фибробласто- и эпителиоподобного типа с преобладанием клеток эпителиоподобного типа, с четко очерченными границами. Ядра круглой или овальной формы содержат 2-4 ядрышка.
11. Кариологическая характеристика: $2n=60$
12. Контроль видовой идентичности: ПЦР, кариологический
13. Способ криоконсервации: криозащитная среда – ростовая среда 50%, сыворотка эмбрионов КРС 40%, ДМСО 10%. Жизнеспособность на 0 пассаже 70-80%.

14. Контроль контаминации: бактерии, грибы, микопlasма, вирус диареи не обнаружены.
15. Чувствительность к вирусам: ВД-БС, РСВ, VSV, ВНВ-1, ВНВ-5.
16. Другие коллекции:

Зав отделом клеточной биотехнологии
и питательных сред, к.б.н.



Гальнбек Т.В.