

На правах рукописи

СПРЫГИН Александр Владимирович

**ЗАРАЗНЫЙ УЗЕЛКОВЫЙ ДЕРМАТИТ КРС: ГЕНОДИАГНОСТИКА И
ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПЕРЕНОСЧИКОВ НА ТЕРРИТОРИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

1.5.10

«Вирусология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Владимир – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Официальные оппоненты:

Глотова Татьяна Ивановна доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН

Сухинин Александр Александрович доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ)

Шмаров Максим Михайлович доктор биологических наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи», заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии

Ведущая организация:

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»

Защита диссертации состоится _____ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 36.1.002.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), по адресу: г. Владимир, мкр. Юрвец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.ariah.ru

Автореферат разослан « » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Животноводство является одним из активно развивающихся направлений сельского хозяйства нашей страны. Однако интенсификация животноводческой деятельности неизбежно повышает риски заноса и распространения инфекционных заболеваний, из которых наибольшую опасность в отношении экономического ущерба представляют трансграничные инфекции. Предотвращение их заноса и контроль их распространения становятся приоритетными задачами, для решения которых необходимо комплексно изучать свойства и особенности конкретных вирусов, а также разрабатывать современные средства их идентификации.

За последнее десятилетие наблюдается беспрецедентное распространение заразного узелкового дерматита КРС (ЗУД КРС) в северном и восточном направлениях от Африки, вызванное глобальным изменением климата, расширением торговых связей и региональными военными конфликтами. ЗУД КРС относится к категории особо опасных трансмиссивных болезней животных, подлежащих обязательной нотификации в международное эпизоотическое бюро (МЭБ). Возбудитель способен вызывать сезонные эпизоотии у КРС и наносить огромный экономический ущерб животноводству из-за затрат на лечение и ограничительных карантинных мер.

Клинические признаки ЗУД КРС характеризуются повышением температуры тела, образованием поражений на коже, а при генерализации инфекционного процесса – лимфаденитом, поражением конъюнктивы, слизистых оболочек органов дыхания и пищеварения [104,180,288]. Этиологическим агентом ЗУД КРС является вирус р. *Capripoxvirus*, семейства *Poxviridae*. Геном возбудителя представлен двухцепочечной ДНК, состоящей из 151 тыс. пар нуклеотидов (п.н.), кодирующих 156 генов [162]. Согласно доступным филогенетическим данным по полногеномным последовательностям изоляты вируса ЗУД КРС разделяются на кластер полевых изолятов, регистрируемых на вспышках, и кластер вакцинных штаммов, используемых в коммерческих гомологичных вакцинах, при этом геномная рекомбинация между изолятами данных кластеров является предметом дискуссий [86,198].

Эффективным способом борьбы с ЗУД КРС является вакцинация, осуществляемая, как с помощью гетерологичных вакцин (на основе вирусов оспы овец и коз), так и гомологичных вакцин на основе аттенуированного вируса ЗУД КРС типа Neethling. Вакцинные вирусы типа Neethling вызывают у вакцинированного поголовья поствакцинальные реакции, проявляющиеся в снижении удоя и появлении кожных поражений (Neethling disease), поэтому, как правило, клинически невозможно дифференцировать эти поражения от поражений, вызываемых вирулентным вирусом ЗУД КРС [124]. В связи с этим разработка методов генодиагностики, позволяющих не только проводить скрининг ЗУД КРС, но и дифференцировать вакцинные штаммы от полевых изолятов с помощью ПЦР (DIVA-стратегия), является актуальным.

В свою очередь, недостаток генетических данных по циркулирующим изолятам, а также фрагментарность знаний о трансмиссивном потенциале вируса создают трудности в разработке современных средств диагностики и профилактики.

Расширяя ареал распространения в северном направлении, ЗУД КРС проникает на территории стран с новыми ландшафтно-климатическими условиями. Распространяясь на значительные расстояния, вирус адаптируется к местным условиям и, возможно, переносчикам, что создает очаги неблагополучия, контроль за которыми

невозможен без энтомологических исследований. В контексте развития животноводства в РФ, ЗУД КРС представляет угрозу национальной безопасности, для поддержания которой требуется современная стратегия контроля, учитывающая как генетическую структуру циркулирующих изолятов, так и векторный потенциал местной энтомофауны, информация о которой отсутствует. На территории РФ за период с 2015 по 2018 гг. выявлено 437 очагов ЗУД КРС в Северо-Кавказском, Южном, Приволжском, Уральском и Сибирском федеральных округах, однако полный эпизоотологический анализ зарегистрированных вспышек, включающий не только изучение генетической структуры циркулирующих изолятов, но и анализ динамики молекулярной эволюции вируса во времени и пространстве к настоящему времени отсутствует, что не позволяет объяснить массовое распространение. Данная проблема может быть решена с помощью генодиагностики, представляющей собой совокупность методов, направленных на идентификацию инфекционного агента на генетическом уровне, как в популяции восприимчивых животных, так и насекомых-переносчиков. В связи с этим генодиагностика ЗУД КРС в сложившихся условиях является основой комплексного эпизоотического мониторинга ЗУД КРС среди восприимчивых животных, обеспечивающая необходимыми сведениями для разработки стратегии эффективного искоренения ЗУД КРС на территории РФ.

Степень разработанности проблемы

Диагностике ЗУД КРС долгое время не придавали большого значения из-за того, что ареал распространения заболевания был ограничен рядом географических стран Африки. С момента регистрации первых вспышек ЗУД КРС стремительно распространился по странам Центральной и Восточной Африки к 1956 году, а затем к 1989 году – за пределы Африканского континента до Ближнего Востока (Davies, 1982). В 2015 году вспышки ЗУД КРС были впервые зарегистрированы в России в Северо-Кавказском ФО. К 2020 г. ЗУД КРС зарегистрирован на Дальнем Востоке РФ, преодолев более 9000 км с момента первого появления. К сожалению, однозначно объяснить причины массового распространения ЗУД КРС на территории РФ пока не удалось.

Отличительной особенностью протекания ЗУД КРС является отсутствие видимых клинических признаков у 50% зараженных животных и слабовыраженный гуморальный ответ даже после переболевания, что определяет важность молекулярной диагностики как наиболее эффективного подхода для своевременного диагноза и контроля распространения заболевания.

На момент первых вспышек в РФ отечественные диагностические наборы на основе ПЦР-РВ для диагностики ЗУД КРС разработаны не были. Более того, и в международной литературе отсутствовали какие-либо данные о тест-системах ПЦР-РВ для индикации генома вируса ЗУД КРС, включая методы дифференциации полевых изолятов от вакцинных штаммов вируса ЗУД КРС. Единственным на тот момент методом, рекомендованным МЭБ, была классическая ПЦР для идентификации генома каприпоксвирусов (Ireland & Vineral, 1998), что значительным образом препятствовало проведению масштабных мониторинговых исследований для контроля распространения заболевания и ставило задачу разработки средств молекулярной диагностики ЗУД КРС в приоритет с целью максимально возможного поддержания благополучия национального агропромышленного сектора. В условиях политики импорт-замещения создание отечественных коммерчески доступных валидированных

тест-систем является актуальной задачей. Более того, недостаточное количество полногеномных последовательностей (Tulman *et al.*, 2001,2003) не позволяло провести комплексный филогенетический анализ и затрудняло поиск локусов для создания специфичных методов экспресс-диагностики.

Важным аспектом эффективной стратегии контроля распространения является изучение механизмов трансмиссии, в отношении которой нет объективных научных данных. Установлено, что факторами риска могут являться теплый влажный климат, общий выпас/водопой и введение в стадо новых животных (Ali *et al.*, 1977). Эпизоотологические данные свидетельствуют о сезонной связи вспышек ЗУД КРС и обилия популяций кровососущих членистоногих (Coetzer, 2004). Вспышки ЗУД имеют в основном сезонный характер, указывая на роль насекомых. Наиболее вероятным механизмом передачи вируса на короткие расстояния является распространение через укусы членистоногих (Carn & Kitching, 1995). В качестве потенциальных векторов в настоящее время рассматриваются такие виды членистоногих как мухи-жигалки *Stomoxys calcitrans*, комары *Aedes aegypti*, а также клещи *Amblyomma hebraeum* и *Rhipicephalus appendiculatus* [Пестова и соавт, 2019]. Важно отметить, что к настоящему времени так и не установлен механизм векторной трансмиссии, объясняющий стремительное расширение ареала к северу за последние десятилетия. Более того, отсутствует какие-либо сведения о векторной компетентности разных видов членистоногих, обитающих в северном полушарии, включая территорию РФ, что подчеркивает необходимость исследования в неблагополучных странах местной энтомофауны.

Цель и задачи исследований

Целью исследования являлась разработка и внедрение в практику комплекса методов идентификации и дифференциации возбудителя ЗУД КРС на основе анализа генома, выяснение филогенетических связей изолятов вируса ЗУД КРС, циркулирующего в РФ с 2015 года, и изучение потенциальных переносчиков вируса в различных географических и климатических зонах РФ.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. разработать скрининговую тест-систему ПЦР-РВ для выявления генома каприпоксвирусов;
2. разработать тест-систему ПЦР-РВ для выявления генома вируса ЗУД КРС;
3. разработать тест-систему ПЦР-РВ для выявления генома полевых изолятов вируса ЗУД КРС;
4. разработать тест-систему ПЦР-РВ для выявления генома вакцинных штаммов типа вируса ЗУД КРС типа Neethling;
5. провести филогенетический анализ выявленных изолятов вируса ЗУД КРС, циркулирующего в РФ в период с 2015 по 2018 гг;
6. провести энтомологические исследования и апробацию разработанных тест-систем на насекомых, собранных во время вспышек ЗУД КРС.

Научная новизна и теоретическое значение работы

В результате проведенных исследований впервые в России разработан и внедрен в лабораторную практику диагностический комплекс тест-систем на основе ПЦР-РВ для выявления генома каприпоксвирусов и вируса ЗУД КРС с последующей

дифференциацией полевых изолятов и вакцинных штаммов, включая идентификацию рекомбинантных изолятов. Показана высокая аналитическая и диагностическая чувствительность и специфичность, а также воспроизводимость разработанных тест-систем на основе ПЦР-РВ. Разработанный комплекс методов успешно прошел все этапы апробации и валидации как на референтных штаммах и полевых образцах от КРС, МРС и диких жвачных, так и в рамках международных сличительных испытаний по дифференциации каприпоксвирусов, организованных национальной референтной лабораторией ЕС Sciensano (Бельгия). На основе разработанных методов предложена схема для проведения диагностических исследований на ЗУД КРС с возможностью дифференциации вакциноподобных от полевых изолятов вируса ЗУД КРС, успешно реализуемая в рамках национального противоэпизоотического мониторинга ЗУД КРС в РФ.

Изучены молекулярно-биологические свойства изолятов вируса ЗУД КРС, выявленных на территории РФ в 2015-2018 гг. на основе локусов RPO30 и GPCR. Показано, что в 2015 г. и 2016 г. на территории РФ все вспышки были вызваны полевыми изолятами вируса ЗУД КРС, тогда как с 2017 г. начали регистрироваться вакциноподобные изоляты вируса ЗУД КРС, а в 2018 г. во всех исследованных вспышках регистрировали только рекомбинантные вакциноподобные изоляты. Полученные данные свидетельствуют о заносе извне вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС на территорию РФ.

Впервые в РФ определена полная геномная последовательность полевого штамма Dagestan/2015 ЗУД КРС (депонирована в базу данных GenBank под номером MN893760), выделенного во время первой вспышки в Р. Дагестан в 2015 г. Показана максимальная степень его родства с изолятами ЗУД КРС, выявленными в Сербии и Греции в 2015-2016 гг. Данный факт свидетельствует о том, что вспышки ЗУД КРС в РФ, Сербии и Греции в тот период были вызваны изолятами одной генетической линии.

Впервые выявлен изолят вируса ЗУД КРС, который является результатом рекомбинации в естественных условиях. Полная геномная последовательность определена и депонирована в базу данных GenBank под номером MN646674. Установлено, что в качестве доминантного родительского штамма выступает вакцинный штамм типа Neehtling, в геноме которого мозаично разбросаны участки генома кенийского KSGP-подобного полевого изолята вируса ЗУД КРС.

Разработанный метод ПЦР-РВ с анализом пиков плавления дополнительно включен в схему диагностических исследований для идентификации рекомбинантных вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС, циркулирующего в РФ.

В рамках разработки энтомологического подхода для изучения вопросов трансмиссии вируса ЗУД КРС, установлен период лёта мокрецов р. *Culicoides* в РФ как наиболее многочисленной группы кровососущих двукрылых с мая по октябрь в Смоленской области и Р.Бурятия, с апреля-мая по июль-сентябрь в Р.Крым. Установлено, что доминантными видами являются мокрецы комплекса *Obsoletus*, преобладающие внутри помещений, тогда как мокрецы комплекса *Pulicaris* преобладали внутри помещения в Смоленской области и снаружи помещения в Р.Крым. При тестировании собранных образцов мокрецов р. *Culicoides* на вспышках ЗУД КРС с помощью разработанных тест-систем, геном вируса ЗУД КРС не выявлен.

Впервые выявлено, что мухи *Musca domestica* могут быть контаминированы ДНК вируса ЗУД КРС. Вирусная ДНК присутствует как внутри насекомого, так и на поверхности экзоскелета. Впервые вирусная ДНК также выявлена в слепнях.

Научная новизна полученных результатов подтверждена 4 патентами РФ на изобретения (№2668398, №2658493, №2699195, №2714045).

Все полученные в рамках данной работы последовательности участков генома полевых и вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС депонированы в международную базу данных GenBank.

Практическое значение работы

Полученные результаты являются основой для проведения комплексных диагностических мероприятий при мониторинговых исследованиях на ЗУД КРС, что позволяет детально оценить не только пути распространения вируса в современных условиях среди восприимчивых животных, но и изучить его молекулярно-генетические характеристики. Практическая значимость работы заключается в создании схемы генодиагностики ЗУД КРС с дифференциацией на вакциноподобные и полевые изоляты вируса, а также идентификацией рекомбинантных изолятов с последующим филогенетическим анализом.

На основе полученных результатов разработаны и внедрены в лабораторную практику для проведения мониторинговых и эпизоотических исследований отечественные тест-системы ПЦР диагностики ЗУД КРС. Нормативные документы утверждены в установленном порядке:

Методические рекомендации по выявлению генома каприпоксвирусов с помощью ПЦР в режиме реального времени;

Методические рекомендации по выявлению генома каприпоксвирусов методом ПЦР-РВ в молоке;

Методические рекомендации по выявлению генома вируса заразного узелкового дерматита КРС с помощью ПЦР в режиме реального времени;

Методические рекомендации по выявлению генома полевых изолятов вируса ЗУД КРС с помощью ПЦР в режиме реального времени;

Методические рекомендации по выявлению генома вакцинного штамма вируса заразного узелкового дерматита КРС типа Neethling с помощью ПЦР в режиме реального времени;

Методические рекомендации по дифференциации ДНК вируса заразного узелкового дерматита КРС на полевые и вакциноподобные изоляты с помощью ПЦР в режиме реального времени с анализом пиков плавления высокого разрешения;

СТО 00495527-0329-2019 Тест-система для выявления генома вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;

СТО 00495527-0284-2018 Тест-система для выявления генома вируса полевых изолятов вируса ЗУД КРС методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;

СТО 00495527-0278-2018 Тест-система для выявления генома каприпоксвирусов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;

СТО 00495527-0354-2019 Тест-система для выявления генома вакцинных штаммов и вакциноподобных изолятов вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;

Показана возможность использования разработанного комплекса методов для проведения мониторинговых и научных исследований вируса ЗУД КРС.

На основе полногеномных последовательностей полевого изолята Dagestan/2015 и рекомбинантного вакциноподобного изолята Saratov/2017, а также последовательностей участков генов RPO30 и GPCR изолятов ЗУД КРС, выявленных в 2015-2018 гг, создана собственная филогенетическая база данных. Эта информация играет ключевую роль в дальнейшем изучении молекулярно-эволюционных свойств циркулирующего вируса ЗУД КРС в РФ и в мире;

На основе проведенной энтомологической работы разработан «Проект программы энтомологического надзора за переносчиками трансмиссивных инфекций сельскохозяйственных животных».

Методология и методы исследований

Для проведения исследований использовались молекулярно-биологические методы такие, как ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, ПЦР с анализом пиков высокого разрешения; биоинформатические такие, как сборка последовательностей, выравнивание и филогенетический анализ с последующим скринингом рекомбинационных событий; энтомологические методы такие, как отлов с помощью световых ловушек, ловушек-куполов, липких ловушек, и статистические методы.

Основные положения, выносимые на защиту

-Применение схемы проведения диагностических исследований на ЗУД КРС с использованием комплекса методов ПЦР-РВ для выявления генома каприпоксвирусов и дифференциации полевых и вакциноподобных изолятов позволяет не только выявить наличие и генетические характеристики возбудителя, но и определить пути заноса и распространения болезни.

-Результаты анализа полногеномной последовательности российского полевого изолята Dagestan/2015, подтверждающие родство с изолятами из стран Европы.

-Результаты анализа полногеномной последовательности вакциноподобного изолята Saratov/2017, позволяющие установить его рекомбинантное происхождение что свидетельствует о факте рекомбинаций у близкородственных каприпоксвирусов.

-Результаты изучения филогенетического родства изолятов вируса ЗУД КРС отражают молекулярно-генетические особенности эпизоотологии ЗУД КРС в период 2015-2018 гг в РФ.

-Предлагаемые подходы и приемы анализа распространения двукрылых насекомых в определенных областях РФ позволяют выявить наличие генома вируса ЗУД КРС у насекомых, отловленных во время вспышек ЗУД КРС.

Степень достоверности и апробации результатов

Результаты проведенных исследований получены с использованием стандартных методик и других нормативных документов и большого объема экспериментального материала. Степень достоверности результатов экспериментов подтверждена обработкой их статистическими методами и комиссионными испытаниями.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на международных заседаниях по проблеме ЗУД КРС: ежегодных заседаниях постоянной группы экспертов по ЗУД КРС под эгидой МЭБ GF-TADs (г. Охрид, Македония, 2018 г.; г. Афины, Греция, 2019 г.); в рамках ежегодных совещаний научного консорциума DEFEND по борьбе с ЗУД КРС в странах Европы (г. Мехелен, Бельгия, 2019 г.).

Результаты научных исследований доложены на заседаниях ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» и опубликованы в материалах международных рецензируемых журналов и научных конференций (Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе, Кострома, 2019; 12th Annual Meeting EPIZONE, Vienna, 2018; «13th Annual Meeting EPIZONE, Berlin, 2019).

Личный вклад автора в выполнение работы

Планирование исследований по теме диссертационной работы и выполнение основных научных экспериментов, а именно: проведение комплекса молекулярно-биологических и энтомологических исследований с последующей морфологической идентификацией; анализ российской и зарубежной научной литературы и нормативной документации; обобщение и анализ полученных результатов выполнены соискателем самостоятельно. Анализ рекомбинационных событий в геноме вируса Saratov/2017 проведен совместно с Antoinette Van Schalkwyk (Институт Ондерстепеорт, ЮАР). Подготовка библиотек для полногеномного секвенирования и секвенирование проведены совместно с Зиняковым Н.Г. (ФГБУ ВНИИЗЖ), за что автор выражает им искреннюю благодарность.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 20 научных работ, из них 5 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 11 – в международных рецензируемых журналах Scopus и Web of Science, 4 – в материалах международных конференций. По результатам исследований оформлено и получено 4 патента РФ на изобретения.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 350 страницах компьютерного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, список сокращений и условных обозначений, список использованных источников и приложения. Диссертация иллюстрирована 41 таблицей и 70 рисунками. Список использованной литературы включает 295 источников. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, её научную новизну и практическую значимость.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы. В качестве образцов для исследований использовали пробы биоматериала от КРС, МРС и диких животных (сыворотка крови, стабилизированная кровь, 5-10% суспензия паренхиматозных органов), референтные штаммы и полевые изоляты каприпоксвирусов, а также образцы мокрецов, мух и слепней.

2.2 Методы исследований

Выделение ДНК. Для выделения ДНК использовали «АмплиПрайм РИБО-сорб» (НекстБио, Москва) и набор DNA mini kit (Qiagen, Германия), Тризол (Invitrogen, США) для выделения, согласно инструкции производителя.

Обработка насекомых и экстракция ДНК из насекомых. Каждое насекомое отдельно промывали четыре раза в 400 мкл стерильного фосфатно-буферного раствора (ФБР) и хранили при -80°C. Первые две отмывки использовались для выявления вируса.

Далее насекомых растирали одноразовыми пестиками и подвергали обработке. ДНК из клинических образцов и насекомых была экстрагирована с использованием Qiagen DNA mini kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Выделенную ДНК хранили при -80°C . Слепней и пулы проб из 3-5 мух растирали одноразовыми пластиковыми пестиками и использовали для выделения ДНК в соответствии с рекомендациями производителя.

ПЦР в режиме реального времени. Все реакции ПЦР-РВ проводились в одну стадию с использованием фермента Taq-ДНК-полимеразы, 25 мМ р-ра хлорида магния, 10 пмоль дНТФ, двух олигонуклеотидных праймеров, флуоресцентного зонда в программируемом амплификаторе Rotor gene Q6 (Qiagen, Германия). Реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ в расчете на одну реакцию ($V = 20$ мкл) готовили в пробирке следующим образом: 7,75 мкл деионизованной воды, 5,0 мкл 5х буфера для ПЦР, 3,5 мкл 25мМ раствора MgCl_2 , 1 мкл 10 мМ раствора дНТФ, 0,5 мкл прямого и обратного праймера по 10 пмоль/мкл каждый, 1,0 мкл раствора флуоресцентного зонда по 5 пмоль/мкл, 0,25 мкл Taq-полимеразы 0,25 мкл.

Оценка аналитической специфичности. Специфичность разработанных праймеров проверяли с помощью онлайн-ресурса BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и экспериментально.

Аналитическая чувствительность и повторяемость. Аналитическую чувствительность тест-систем оценивали путем тестирования последовательных десятикратных разведений ДНК выделенного вируса. Для оценки линейности полученных результатов были проведены три повторных эксперимента. Пределом чувствительности (limit of detection, LOD) считали разведение, показавшее не менее 95% положительных результатов из 20 повторений одного разведения. Для оценки повторяемости использовали пробы с $\text{Ct} > 25$ и тестировали данный образец в 5-ти повторностях в течение 3 дней (3 запуска). Вычисляли среднее значение Ct , значение стандартного отклонения и коэффициент вариации.

Диагностическая чувствительность и специфичность. Для оценки диагностической чувствительности (ДЧ) и специфичности (ДС) использовали различные пробы (кровь, назальные смывы) от естественно зараженных животных. ДЧ считали по формуле $\text{ДЧ} = \text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО})$, где ИП - истинно положительные пробы, ЛО - ложноотрицательные пробы. ДС считали по формуле $\text{ДС} = \text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП})$, где ИО - истинно отрицательные пробы, ЛП - ложноположительные пробы. В качестве ИП и ИО считали пробы, положительные и отрицательные с помощью тест-системы на каприпоксвирусы Bowden *et al.*, 2008, соответственно.

Валидация тест-системы при тестировании проб молока. Для оценки возможности выявления ДНК каприпоксвирусов и стабильности искусственно внесенной ДНК после пастеризации пробы молока смешивали с вирусной суспензией с соотношении 1:100, затем молоко подвергали пастеризации в течение 30 мин при температуре 80°C , выделяли ДНК и тестировали пробы в течение 28 суток с 7-дневным интервалом. В качестве контроля параллельно использовали вирусную суспензию, разведенную с соотношении 1:100 в буфере TE.

Оценка стабильности ДНК вируса ЗУД КРС при различных условиях хранения. В общий объем цельной крови КРС добавили ДНК вируса ЗУД КРС штамм ВНД КРС/Дагестан/2015 с известным титром. Собранная кровь была разделена в отдельные пробирки по 200 мкл и 2,5 мл. Образцы тестировали в трехкратной

повторности при хранении на +4 С°, -20 С° и -80 С° при однократном и многократном циклах замораживания-оттаивания.

Тестирование полевых образцов. В 2015-2017 гг. было проведено 629 исследований биологического материала от КРС с клиническими признаками ЗУД КРС, 120 проб от овец с клиническими признаками оспы овец и 552 пробы от диких жвачных. Тестировали следующие образцы: стабилизированную кровь, сыворотку крови, соскобы кожи (нодулы), назальные и окулярные смывы, молоко, лимфатические узлы, легкие, трахею, селезенку и аборт плоды.

Энтомологические исследования. Для сезонного отлова мокрецов использовали ловушки аспирационного типа с УФ-светом. Ловушки работали от 18:00 до 8:00 один раз в 7-8 дней с мая по октябрь. Для одновременного отлова мокрецов внутри и снаружи помещений использовали две ловушки. Все ловушки были установлены в полутора метрах над землей и от 2 до 6 м от животных. Мокрецов идентифицировали с помощью морфологического определителя Глуховой и Мирзаевой до уровня комплекса *Obsoletus* и *Pulicaris*.

Для отлова мух и слепней использовали липкие ленты и ловушки по типу «купола» согласно общепринятым методикам. Ловушки устанавливали на расстоянии 1 м от земли и на расстоянии не более 5 м от животных. Отлов производили в течении 24-48 ч. Собранные двукрылые идентифицировали с помощью определителя Зимина Л.С. (1951).

Секвенирование. Для локусного филогенетического анализа использовали гены RPO30 и GPCR. Каждый локус секвенировали не менее 20 раз для исключения контаминации другим генотипом. ПЦР-продукты амплифицировали с последующей очисткой на колонках (Qiagen, Германия). Секвенирование проводилось в автоматическом секвенаторе (ABI Prism 3130, Applied Biosystems, США) с использованием тех же праймеров. Полученные последовательности выравнивали с использованием программы Clustal W. Дендрограммы были построены из выравниваний Clustal W с помощью метода «neighbor joining» с использованием версии программного обеспечения Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) версии 4.1. Биоинформатический анализ проводили с помощью CLC Genomics Workbench (Qiagen, Германия).

Для полногеномного секвенирования изоляты Dagestan/2015, Dagestan/2015 75 пассаж и Saratov/2017 культивировали в первичных клетках тестикул ягненка (культура клеток ТЯ). Отбор производился при проявлении цитопатического эффекта более 85% монослоя. Для высвобождения вируса в среду, инфицированный монослой клеток замораживали и размораживали три-пять раз, а затем центрифугировали при +4 °С.

Библиотеку для секвенирования получали с использованием набора ДНК Nextera XT (Illumina, США). Секвенирование проводили с использованием набора реагентов MiSeq версии 2 с секвенированием парного конца 2 × 250 п.о. на секвенаторе MiSeq (Illumina, США).

Статистическую обработку результатов работы в программе Statistica v.10 с использованием критерия Стьюдента, Крускала-Уоллиса, Манна-Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

2.3 Результаты собственных исследований

2.3.1 Разработка тест-системы для выявления генома каприпোকсвирусов

На основе выравненных доступных последовательностей идентифицирован сайт, наиболее консервативный в геноме каприпোকсвирусов – участок гена Р32, кодирующий главный каприпোকсвирусный антиген (рисунок 1). Экспериментальная оценка специфичности с гомологичными и гетерологичными вирусами показала отсутствие ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

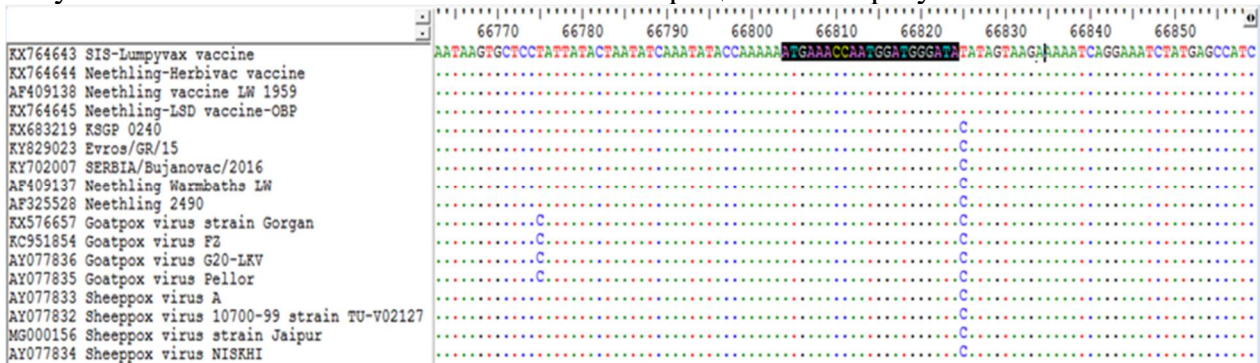
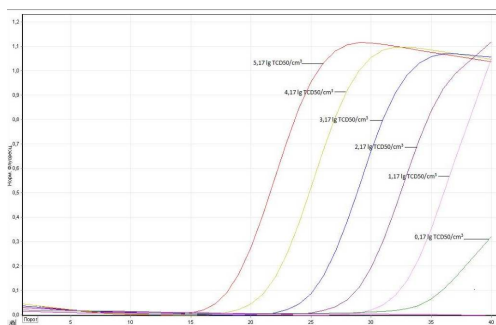


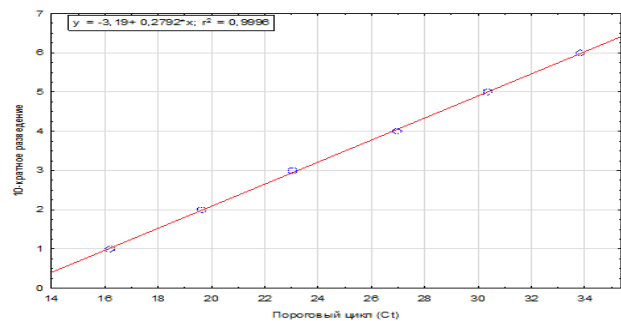
Рисунок 1 – Зона отжига зонда для выявления генома каприпোকсвирусов (выделенный участок – зонд тест-системы «КАПРИПОКС»)

На рисунке 1 показана консервативная среди всех известных каприпোকсвирусов зона отжига зонда. Для оценки чувствительности тест-системы («КАПРИПОКС») использовали ДНК вируса оспы овец штамм «Афганский» с титром $6,17 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$. Тест-система «КАПРИПОКС» (рисунок 2А) выявляла вирусную ДНК с пределом обнаружения $0,17 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ ($\text{TЦД}_{50}/\text{cm}^3$) (95%).

Для оценки эффективности амплификации тест-системы проведено тестирование 10-кратных разведений 3-х кратной повторности. На рисунке 2А показаны амплификационные кривые при тестировании 6 последовательных 10-кратных разведений от $5,17$ до $0,17 \text{ TЦД}_{50}/\text{cm}^3$. Рисунок 2Б демонстрирует результаты тестирования 10-кратных разведений в 3-х кратной повторности для оценки эффективности амплификации. Согласно полученному уравнению регрессии (в левом верхнем углу рисунка 2Б), коэффициент угла наклона составляет $0,2792$, а коэффициент детерминированности $r^2 0,9996$. На основе коэффициента угла наклона, полученного при построения графика линейной регрессии (рисунок 2Б), было получено значение эффективности амплификации (E) = 90,2%.



А



Б

Рисунок 2 – А) Оценка предела чувствительности тест-системы «ПЦР-САРР» при тестировании последовательных 10-кратных разведений. Б) Линейная регрессия результатов ПЦР-РВ при тестировании 10-кратных разведений выделенной ДНК тест-системой «КАПРИПОКС»

При этом на протяжении 6 последовательных 10-кратных разведений стандартное отклонение SD варьировало от 0,12 до 0,32.

Для оценки variability значений Ct в пределах одного запуска и между несколькими запусками проведено тестирование одной пробы в течение 3 запусков по 5-повторений каждый. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Variability значений Ct в пределах одного и 3-х запусков (5 повторностей)

Тест-система	Среднее значение Ct	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
«КАПРИПОКС» запуск 1	28,80	0,23	0,79
«КАПРИПОКС» запуск 2	29,05	0,54	1,85
«КАПРИПОКС» запуск 3	29,15	0,32	1,09

Таблица 2 показывает, что среднее значение порогового цикла Ct на протяжении 3-х запусков по 5 повторений варьировал от 28,8 до 29,15 с разбросом SD 0,23-0,54. Коэффициент вариации составлял 1,24 при максимальном допустимом значении 10. Между запусками (15 повторений) среднее значение порогового цикла Ct и SD составило 29 и 0,36, соответственно.

Учитывая возможность заражения через инфицированное молоко, необходимо рассматривать пробы молока как дополнительный объект тестирования при скрининговых исследованиях. Более того, скрининг циркуляции каприпоксвирусов посредством тестирования молока предполагает использование неинвазивного способа отбора проб, не подвергая животных стрессу как на фермах, так и в частных хозяйствах. В связи с этим проведена оценка пригодности проб молока, искусственно контаминированных каприпоксвирусом, для диагностических исследований. Результаты тестирования тест-системы ПЦР-РВ для выявления генома каприпоксвирусов при анализе проб молока показаны в таблице 2.

Таблица 2 – Значения порогового цикла (Ct) при тестировании образцов ДНК-буфера и молока, контаминированных ДНК вируса ЗУД КРС (n=3)

День эксперимента	контроль, Ct \pm SD*	молоко, Ct + SD*
0	24,63 \pm 0,23	25,16 \pm 0,22
7	24,89 \pm 0,21	24,16 \pm 0,25
14	24,02 \pm 0,16	23,8 \pm 0,29
21	26,29 \pm 0,19	24,85 \pm 0,35
28	24,69 \pm 0,17	25,85 \pm 0,35

* стандартное отклонение рассчитано на основе 3-х повторностей

Из полученных данных в таблице 2 видно, что отмечается стабильность сайта амплификации генома каприпоксвирусов на протяжении 28-дневного периода тестирования как в контрольном образце, так и в пробах молока. Значения Ct проб молока и контроля статистически не отличались друг о друга ($p > 0,05$), указывая об отсутствии влияния компонентов молока на протекание реакции.

Для апробации в 2015-2016 гг исследовано 596 проб с 330 вспышек, в 2017 г – 33 пробы из 14 вспышек. Образцами для тестирования служили, главным образом, нодулы, кровь, смывы. При параллельном тестировании на наличие генома каприпоксвирусов с помощью тест-системы ПЦР-РВ Bowden *et al.*, 2009 получено 99% совпадение с результатами «КАПРИПОКС», что свидетельствует о высокой специфичности и чувствительности тест-системы «КАПРИПОКС».

Подтвержденные положительные (истинно положительные) и отрицательные (истинно отрицательные) пробы с помощью тест-системы Bowden *et al* [89] использовали для оценки ДС и ДЧ разработанной тест-системы «КАПРИПОКС». Была использовано 100 положительных проб и 100 отрицательных проб, на основе которых рассчитывали значения ДС и ДЧ. ДЧ и ДС тест-системы «КАПРИПОКС» составили по 99%. Если результаты тестирования распределить по типам образцов, то получим, что при тестировании нодул геном вируса ЗУД КРС выявляли в 79% случаев, в крови и сыворотке – в 15 % случаев и носовых смывов – в 25 % тестированных проб.

Дополнительно тест-систему «КАПРИПОКС» апробировали на образцах биоматериала со вспышек оспы овец в период с 2016 г по 2018г, а также образцах биоматериала, отобранных от диких жвачных животных. При анализе 120 проб биологического материала от овец, положительный результат на наличие генома каприпоксвирусов был выявлен в 116 пробах (99% корреляция с методикой Bowden *et al* [89]).

При исследовании 552 проб от диких жвачных, геном каприпоксвирусов не выявлен (100% корреляция с методикой Bowden *et al* [89]).

Таким образом, разработана и запатентована отечественная скрининговая тест-система ПЦР-РВ «КАПРИПОКС» для выявления генома каприпоксвирусов (вирус ЗУД КРС, вирус оспы овец, вирус оспы коз), позволяющая проводить диагностические скрининговые исследования на наличие генома каприпоксвирусов в биоматериале от КРС, МРС и диких жвачных. Исследование проб от диких животных с помощью данной тест-системы значительно расширяет диагностические возможности и позволяет изучать возможные резервуары каприпоксвирусов в дикой природе.

2.3.2 Разработка тест-системы для выявления генома вируса ЗУД КРС

На основе выравненных последовательностей идентифицирован сайт, уникальный для вирусов ЗУД КРС – участок рамки считывания ORF044, кодирующего белок с неизвестной функцией (рисунок 3).

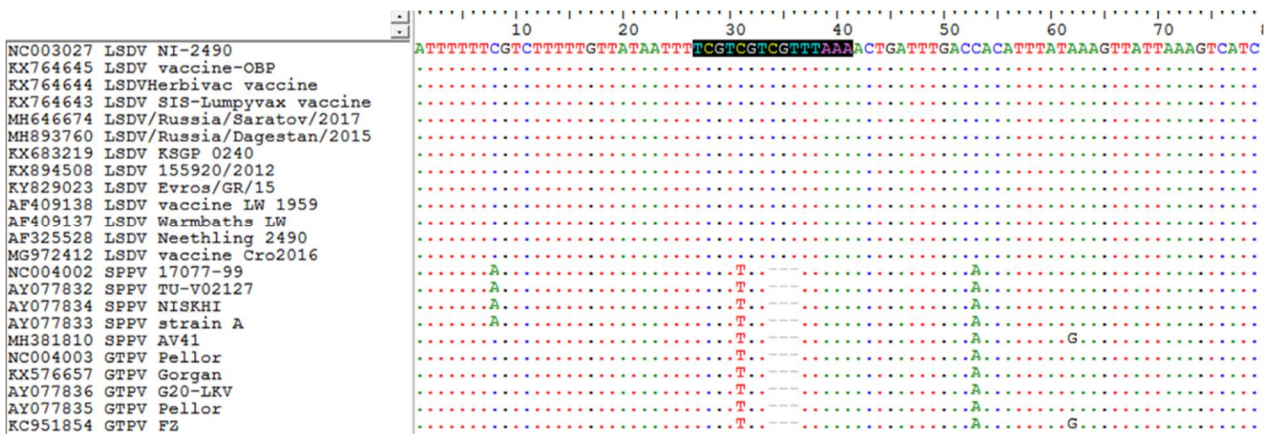
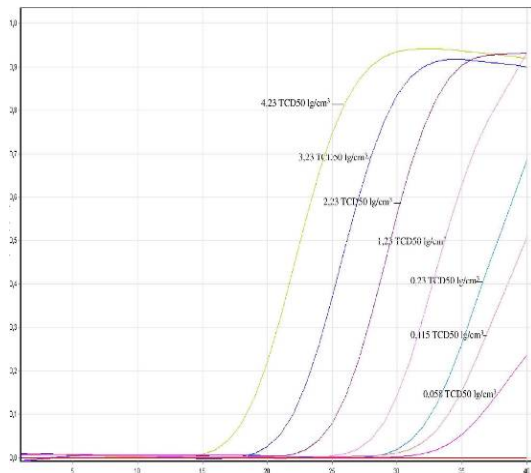


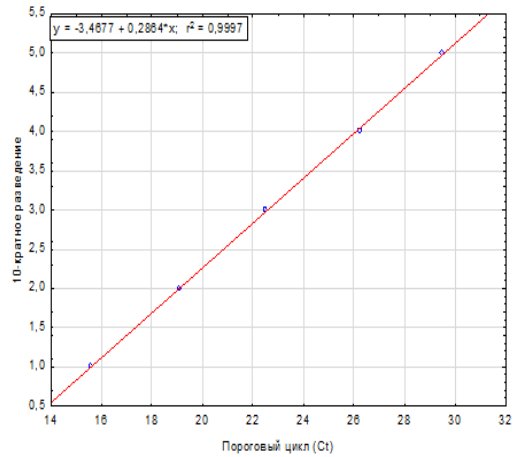
Рисунок 3 – Зона отжига зонда тест-системы для выявления генома вируса ЗУД

Экспериментальная оценка специфичности с гомологичными и гетерологичными вирусами показала отсутствие ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Как видно из рисунка 3, зонд тест-системы для выявления генома вируса ЗУД КРС нацелен на участок гена ORF044 полевых и вакцинных штаммов, где у других представителей р.*Capripoxvirus* присутствует делеция 3-х нуклеотидов, характерных для вируса оспы овец и оспы коз: зонд уникально связывается только с геномом изолятов и штаммов вируса ЗУД КРС.

Для оценки чувствительности тест-системы «ПЦР ЗУД скрининг» использовали ДНК вируса ЗУД КРС изолята Dagestan/2015 с титром $5,23 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$ для тестирования серии из 5 последовательных 10-кратных разведений и 3-х последовательных 2-кратных разведений от 5-го 10-кратного разведения ($0,5 \times 10^{-5}$, $0,25 \times 10^{-5}$ и $0,125 \times 10^{-5}$). Минимальное количество вирусной ДНК, которое может быть выявлено, составило разведение $0,25 \times 10^{-5}$ с титром $0,058 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$. На рисунке 4А показаны амплификационные кривые при тестировании последовательных разведений от 4,23 до $0,058 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$.



А



Б

Рисунок 4 – А) Оценка предела чувствительности при тестировании последовательных разведений тест-системой «ПЦР ЗУД скрининг». Б) Линейный график результатов ПЦР-РВ при тестировании 10-кратных разведений выделенной ДНК тест-системы «ПЦР ЗУД скрининг». (Уравнение регрессии и коэффициент детерминированности расположены в верхнем левом углу рисунка).

Последующее тестирование 20 проб 1-го и 2-го двукратного разведения установило предел чувствительности (LOD) $0,115 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$ (100%). Последнее двукратное разведение ($0,125 \times 10^{-5}$) с титром $0,025 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$ оказалось за пределами аналитической чувствительности (рисунок 4А). Эффективность амплификации (Е) тест-системы «ПЦР ЗУД скрининг» составила 93% при коэффициенте детерминированности r^2 0,999. SD варьировало от 0,02 до 0,16 на протяжении пяти 10-кратных разведений (рисунок 4Б). При этом значения порогового цикла Ct при тестировании 10-кратных разведениях расположены линейно согласно построенной линии регрессии (коэффициент наклона 0,2864 и коэффициент детерминированности r^2 (0,997)), что свидетельствует о стабильности получаемых результатов.

Оценку повторяемости проводили с одним образцом, который тестировали 5 раз в 3-х кратной повторности. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 демонстрирует, что среднее значение порогового цикла Ct на протяжении 3-х запусков по 5 повторений варьировал от 25,97 до 26,22 с разбросом SD 0,22-0,32. Коэффициент вариации составил <1,22 при максимально допустимом значении 10. Суммирование результатов 3-х запусков показало среднее значение порогового цикла Ct 26,11 и SD 0,29.

Таблица 3 – Вариабельность значений Ct в пределах одного запуска и 3 запусков (n=5)

Тест-система	Среднее значение Ct	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
«ПЦР ЗУД скрининг» запуск 1	25,97	0,31	1,19
«ПЦР ЗУД скрининг» запуск 2	26,22	0,22	0,83
«ПЦР ЗУД скрининг» запуск 3	26,14	0,32	1,22
Между запусками (n=15)			
«ПЦР ЗУД скрининг» 15 повторений	26,11	0,29	1,11

Апробацию тест-системы «ПЦР ЗУД скрининг» для выявления генома вируса ЗУД КРС проводили с 662 пробами биоматериала со вспышек ЗУД КРС в период с 2015 по 2017 гг, 120 образцами со вспышек оспы овец и 552 образцами патологического материала от диких жвачных животных. Со вспышек ЗУД КРС выявлено 214 положительных проб, аналогично тест-системе «КАПРИПОКС» (п.4.1). Рассчитанные ДС и ДЧ для разработанной тест-системы «ПЦР ЗУД скрининг» составили по 99%.

Таким образом, разработана и запатентована тест-система для выявления генома вируса ЗУД КРС, которая позволяет проводить специфическую диагностику ЗУД КРС в биоматериале от сельскохозяйственных и диких жвачных с высокой степенью специфичности и чувствительности.

2.3.3 Тест-система для выявления генома полевых изолятов вируса ЗУД КРС

На основе выравненных последовательностей геномов каприпоксвирусов выявлен сайт, наиболее консервативный среди полевых изолятов вируса ЗУД КРС – участок гена EEV (ORF126) (капсидный белок внеклеточного вириона) (рисунок 5).

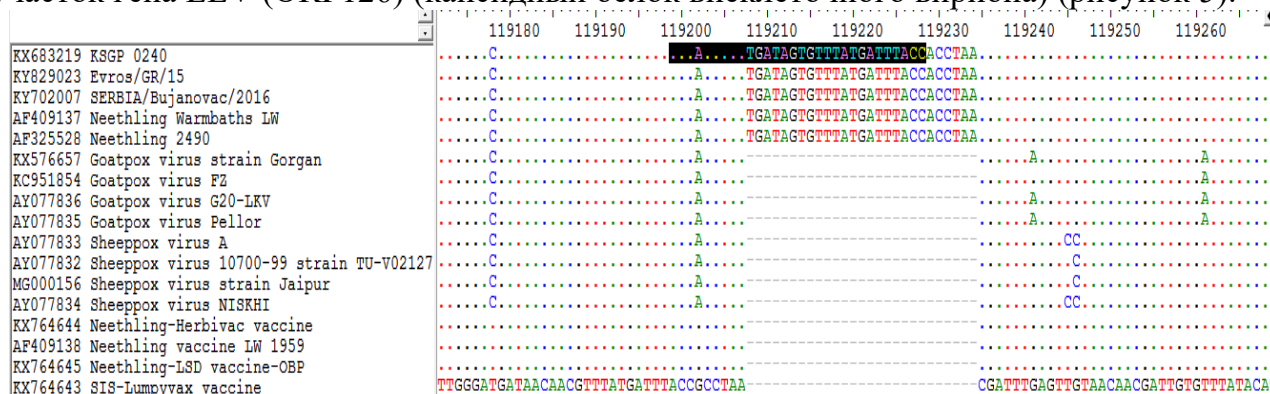


Рисунок 5 – Зона отжига зонда тест-системы «ПЦР ЗУД поле» для выявления полевых изолятов вируса ЗУД КРС

Из рисунка 5 видно, что в геноме других представителей сем. *Capripoxviridae* и вакцинных штаммов типа Neethling делетирован участок 27 п.н. в данном локусе, тогда как у полевых вирусов ЗУД КРС этот участок присутствует.

Оценка специфичности показала, что тест-система не давала ложноположительных результатов и специфично выявляла ДНК только полевых изолятов вируса ЗУД как отдельно, так и в присутствии ДНК гомологичных гетерологичных вирусов.

Аналитическую чувствительность тест-системы определяли при тестировании 10-кратных разведений вирусной ДНК (до 10^{-6}) изолята Dagestan/2015 (диагностический) с исходным титром $5,21 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$. Для статистической верификации, эксперимент провели в 3-х повторности с 10-кратными разведениями геномной ДНК для оценки линейной зависимости полученных результатов.

Из данных рисунка 6А следует, что предел чувствительности тест-системы для полевых изолятов составил $0,21 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$ (100%) (рисунок 6А).

Для оценки эффективности амплификации тест-системы проведено тестирование 10-кратных разведений выделенной ДНК в 3-х кратной повторности. На основании средних значений C_t была получена линейная регрессия со значением эффективности амплификации (E) 98,6 %. Воспроизводимость определяли с помощью величины стандартного отклонения ($\pm SD$) для каждой серии разведений, используя полученные значения C_t .

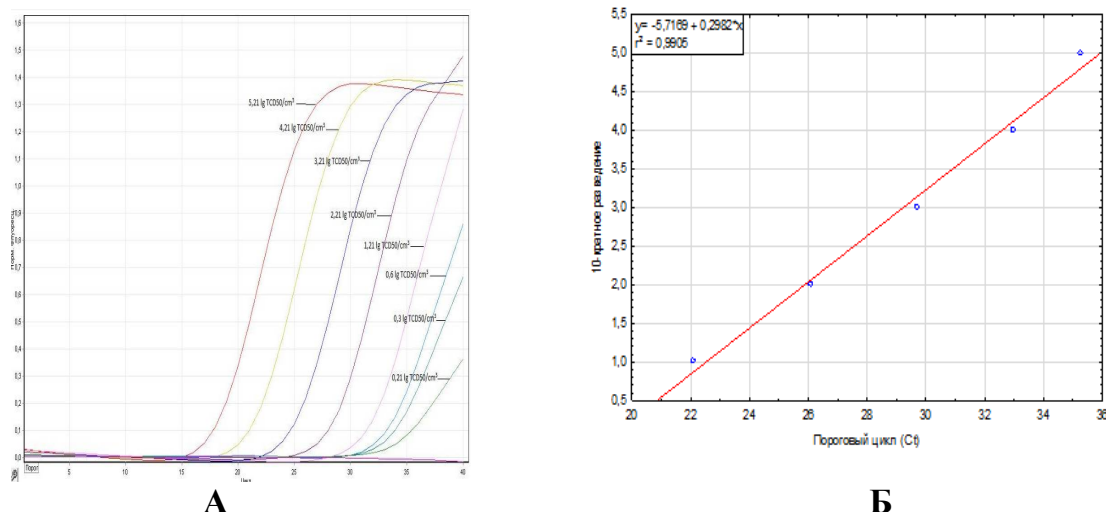


Рисунок 6 – А) Оценка предела чувствительности тест-системы «ПЦР ЗУД поле» для выявления полевых изолятов вируса ЗУД КРС при тестировании последовательных 10-кратных разведений. Б) Линейный график результатов тестирования 10-кратных разведений тест-системой «ПЦР ЗУД поле» для выявления полевых изолятов вируса ЗУД КРС (Уравнение регрессии и коэффициент детерминированности расположены в верхнем левом углу рисунка)

Стандартное отклонение SD для пяти 10-кратных разведений варьировало от 0,11 до 0,33. При этом коэффициент детерминации r^2 составил 0,990 (рисунок 6Б). На рисунке 6Б графически представлена линейная зависимость значений пороговый циклов C_t при тестировании 10-кратных разведениях, которые расположены линейно согласно построенной линии регрессии (коэффициент наклона 0,2982 и коэффициент детерминированности r^2 0,9905), что свидетельствует о стабильности получаемых результатов.

Оценку повторяемости проводили с одним образцом, который тестировали 5 раз в 3-х кратной повторности. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Вариабельность значений Ct в пределах одного запуска и 3 запусков (n=5)

Тест-система	Среднее значение Ct	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
«ПЦР ЗУД поле» запуск 1	30,01	0,43	1,43
«ПЦР ЗУД поле» запуск 2	30,76	0,41	1,33
«ПЦР ЗУД поле» запуск 3	29,93	0,16	0,53
Между запусками (n=15)			
«ПЦР ЗУД поле» 15 повторений	30,27	0,52	1,71

Результаты, представленные на таблице 4, демонстрируют, что среднее значение порогового цикла Ct на протяжении 3-х запусков по 5 повторений варьировал от 29,93 до 30,76 с разбросом SD 0,16-0,43. Коэффициент вариации составлял <1,43 при максимальном допустимом значении 10. Суммирование результатов 3-х запусков показало среднее значение порогового цикла Ct 30,27 и SD 0,52.

Апробацию тест-системы «ПЦР ЗУД поле» проводили на 629 пробах со вспышек 2015-2017 гг (596 проб, полученных в период с 2015-2016 гг (330 вспышек), и 33 пробы, полученных в 2017 г (14 вспышек из 43)). С помощью тест-системы «ПЦР ЗУД поле» показано, что геном полевых изолятов выявлен во всех пробах 2015-2016 гг (99 % корреляция с методикой Bowden et al 2009, при этом рассчитанные значения ДС и ДЧ для разработанной тест-системы «ПЦР ЗУД поле» составили 99%), тогда как в 2017 г. геном полевых изолятов выявлен только в 14 пробах (10 исследованных вспышек) из 30 положительных на геном вируса ЗУД КРС и каприпоксвирусов.

Необходимость генотипирования генома вируса ЗУД КРС в 15 пробах с остальных 4-х исследованных вспышек 2017 г мотивировало создание тест-системы ПЦР-РВ для выявления генома вакцинных штаммов.

Таким образом, создана тест-система ПЦР-РВ «ПЦР ЗУД поле» для диагностических исследований ЗУД КРС, позволяющая специфично выявлять геном полевых изолятов вируса ЗУД КРС в пробах биоматериала от КРС.

2.3.4 Разработка тест-системы для выявления генома вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС

На основе выравненных последовательностей геномов каприпоксвирусов идентифицирован сайт, наиболее консервативный среди геномов вакцинных вирусов – участок гена LSD008, в котором присутствуют уникальные замены, характерные только для вакцинных штаммов (рисунок 7). Для определения специфичности тест-системы ПЦР-РВ, были протестированы пробы с генетическим материалом гомологичных и гетерологичных вирусов. Эксперименты по специфичности были проведены индивидуально с ДНК каждого вируса и в присутствии ДНК нескольких вирусов. Для тестирования использованы ДНК референтных штаммов и изолятов гомологичных и гетерологичных вирусов.

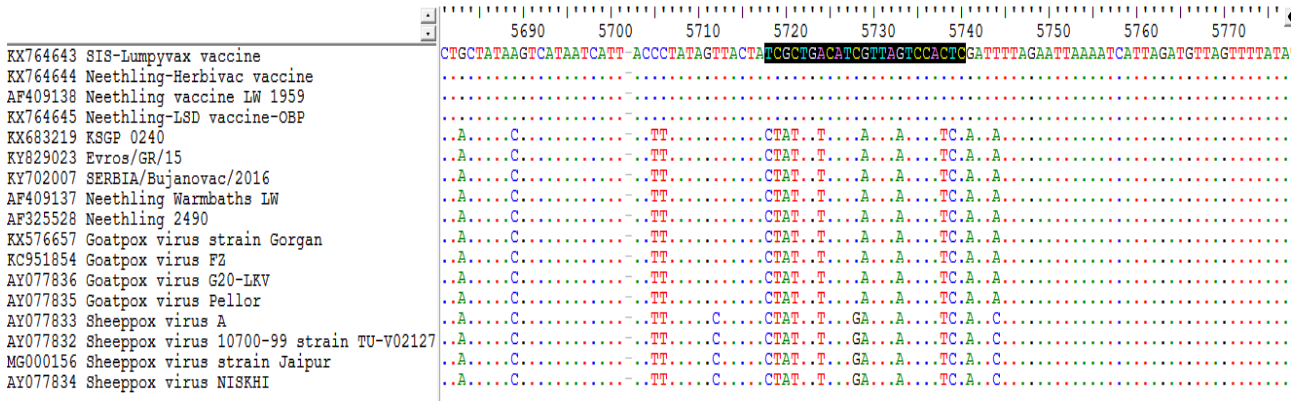


Рисунок 7 – Зона отжига зонда тест-системы «ПЦР ЗУД вак» для выявления генома вакцинных штаммов вируса ЗУД КРС

Как видно из рисунка 7 зонд тест-системы «ПЦР ЗУД вак» для выявления генома вакцинных штаммов вируса ЗУД КРС имеет 100% идентичность в зоне отжига зонда геномом коммерческих вакцинных штаммов типа Neethling. Таким образом, с помощью разработанной системы праймеров и зонда возможно выявлять геном вакцинного штамма в биоматериале от КРС, вакцинированного гомологичной вакциной типа Neethling, тогда как в случае отсутствия факта вакцинации гомологичной вакциной типа Neethling результатом будет выявление вакциноподобного изолята вируса ЗУД КРС.

Экспериментальная оценка показала отсутствие ложноположительных результатов при тестировании в присутствии ДНК вирусов вируса оспы овец и коз, а также ДНК полевых изолятов вируса ЗУД КРС.

Для оценки чувствительности тест-системы для выявления вакцинных штаммов вируса ЗУД КРС использовали ДНК вируса ЗУД КРС вакцинного штамма «Onderstepoort» с титром $5,39 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$. Тест-система выявляла вирусную ДНК с чувствительностью $0,39 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ (LOD) (рисунок 8А).

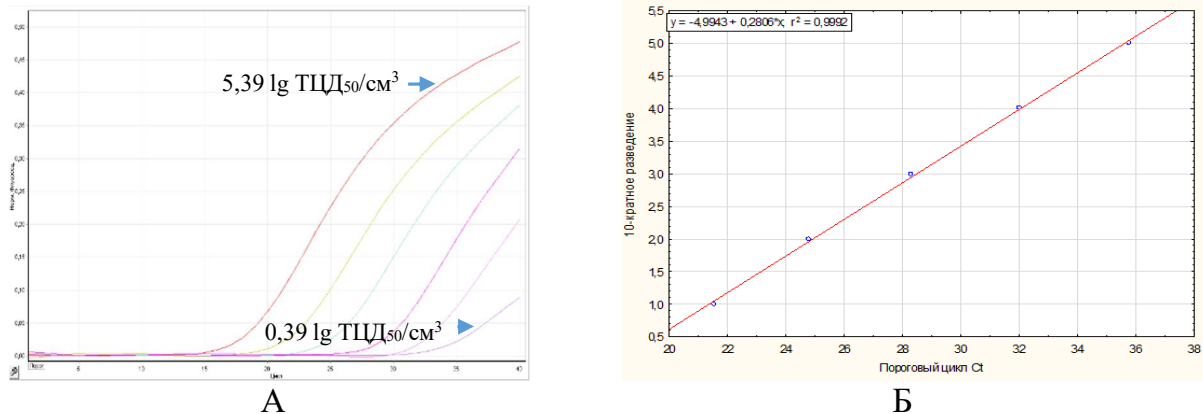


Рисунок 8 – А) Оценка предела чувствительности тест-системы для выявления генома вакцинных штаммов при тестировании последовательных 10-кратных разведений. Б) График линейной зависимости результатов ПЦР-РВ при тестировании 10-кратных разведений выделенной ДНК вакцинного штамма (Уравнение регрессии и коэффициент детерминированности расположены в верхнем левом углу рисунка).

Для оценки эффективности амплификации тест-системы проведено тестирование 10-кратных разведений выделенной ДНК в 3-х кратной повторности. Была получена линейная регрессия со значением эффективности амплификации (E) 90,08% (рисунок 8Б). Воспроизводимость тест-системы определяли с помощью

величины стандартного отклонения (SD) для каждой серии разведений, используя полученные значения Ct. SD варьировало от 0,17 до 0,38 на протяжении пяти 10-кратных разведений. Коэффициент детерминированности r^2 составил 0,992. На рисунке 8Б изображена линейная регрессия средних значений пороговых циклов Ct при тестировании 10-кратных разведениях (коэффициент наклона 0,2806 и коэффициент детерминированности r^2 0.9992, что свидетельствует о стабильности получаемых результатов. Оценку повторяемости проводили с одним образцом, который тестировали 5 раз в 3-х кратной повторности. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Вариабельность значений Ct в пределах одного запуска и 3 запусков (n=5)

Тест-система	Среднее значение Ct	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
«ПЦР ЗУД вак» запуск 1	20,89	0,21	1,00
«ПЦР ЗУД вак» запуск 2	20,77	0,18	0,86
«ПЦР ЗУД вак» запуск 3	20,87	0,11	0,52
Между запусками (n=15)			
15 повторений	20,84	0,18	0,86

Таблица 5 показывает, что среднее значение порогового цикла Ct на протяжении 3-х запусков (по 5 повторений) варьировал от 20,77 до 20,87, а SD – 0,11-0,21. Коэффициент вариации составлял <1,00 при максимальном допустимом значении 10. Суммирование результатов 3-х запусков показало среднее значение порогового цикла Ct 20,84 и SD 0,18.

При исследовании 596 проб (330 вспышек), полученных в период с 2015-2016 гг, совпадение результатов тест-системы «КАПРИПОКС», тест-системы «ПЦР ЗУД скрининг» и тест-системы «ПЦР ЗУД поле» составило 100%, тогда как положительных результатов тест-системой «ПЦР ЗУД вак» не получено.

При исследовании 33 проб (14 вспышек из 43), полученных в 2017 г, 14 проб из 10 вспышек были положительны при анализе тест-системой «КАПРИПОКС», тест-системы «ПЦР ЗУД скрининг» и тест-системы «ПЦР ЗУД поле», тогда как 15 проб с 3 вспышек (изоляты Samara/2017, Bashkortostan/2017, Orenburg/2017) были положительны при анализе тест-системой «КАПРИПОКС», «ПЦР ЗУД скрининг» и тест-системы «ПЦР ЗУД вак». Одна проба с вспышки 2017 г. (изолят Saratov/2017) была положительна только тест-системой «КАПРИПОКС» и «ПЦР ЗУД скрининг», но при этом тест-система «ПЦР ЗУД поле» и «ПЦР ЗУД вак» показали отрицательный результат.

Обобщая вышесказанное, при исследовании с помощью тест-системы «ПЦР ЗУД вак» 16 проб (4 вспышки 2017 г), положительных на ЗУД КРС, но отрицательных на геном полевых изолятов, геном вакциноподобных изолятов выявлен в 15 пробах с 3 вспышек (изоляты Samara/2017, Bashkortostan/2017, Orenburg/2017), тогда как 1 проба с одной вспышки (изолят Saratov/2017) показала отрицательный результат при генотипировании, что свидетельствовало о геномных перестройках в геноме вируса.

Таким образом, на основе разработанных тест-систем ПЦР-РВ «КАПРИПОКС» для выявления генома каприпоксвирусов (вирус ЗУД КРС, вирус оспы овец, вирус оспы коз), «ПЦР ЗУД скрининг» для выявления генома вируса ЗУД КРС, «ПЦР ЗУД поле» для выявления генома полевых изолятов вируса ЗУД КРС и «ПЦР ЗУД вак» для генома вакцинных штаммов типа Neethling вируса ЗУД КРС сформирован диагностический комплекс, позволяющий проводить исследования по индикации и

дифференциации вируса ЗУД КРС на полевые и вакциноподобные изоляты в рамках DIVA-стратегии.

2.3.5 Разработка тест-системы ПЦР в режиме реального времени для выявления и дифференциации геномов каприпоксвирусов, включая полевой и вакцинный вирусы ЗУД КРС

Для определения генотипической принадлежности изолята Saratov/2017 была поставлена задача разработки ПЦР с анализом кривой плавления продуктов амплификации (High resolution melting, HRM) с целью идентификации и дифференциации генома вируса ЗУД КРС, оспы овец и оспы коз, включая дифференциацию между вакцинным и полевым изолятами вируса ЗУД КРС. Для этого опубликованные последовательности каприпоксвирусов, доступные в GenBank, выравнивали с использованием программного обеспечения BioEdit и искали сайты содержащие уникальные нуклеотидные замены для каждого каприпоксвируса. В качестве фрагмента для амплификации и дифференциации был выбран локус LSDV010, который кодирует белок LAP/PHD-finger. Разработаны ПЦР-праймеры прямой праймер ТТCAAАТТАААСТТААСТАААААGТATG и обратный праймер GTTGTТТАAGATGGAAATGTTC, фланкирующие область от 6623 до 6733 нуклеотидов. Профили плавления считывали от 70 до 80 °С с шагом считывания 0,1 °С. При оценке специфичности пиков, были получены следующие значения температур плавления (Tm): $74,56 \pm 0,04$ °С для полевых изолятов ЗУД КРС, $74,95 \pm 0,08$ °С для вакцинного штамма LSDV, $74,24 \pm 0,06$ °С для полевых изолятов SPPV и $73,61 \pm 0,04$ °С и для полевых изолятов GTPV (рисунок 9).

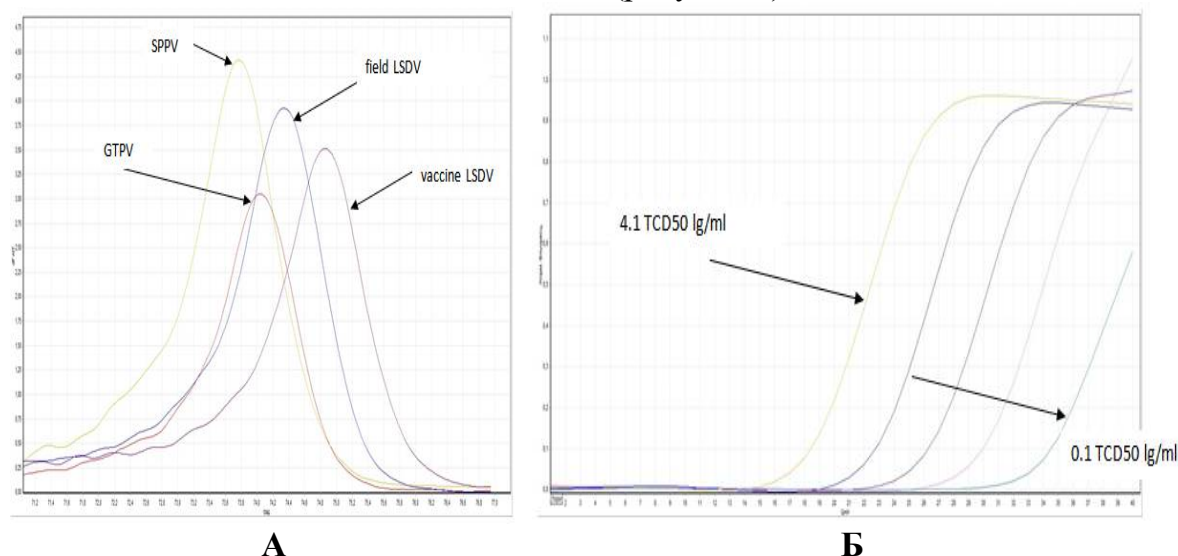


Рисунок – 9. Графики пиков для каждого вируса и амплификационные кривые. А – индивидуальные пики плавления продуктов ПЦР (полевой ЗУД КРС (field LSDV) изолят «Dagestan/2015», вакцинный ЗУД КРС (vaccine LSDV)-вакцинный штамм «Onderstepoort», оспа овец (SPPV) штамм «Афганистан», оспа коз (GTPV) штамм «Приморский»). Б – амплификационные кривые при тестировании серии из 5 последовательных 10-кратных разведений начиная с 4,1 lg ТЦД₅₀/мл

На рисунке 9А графически представлены кривые плавления продуктов амплификации. Воспроизводимость теста оценивали путем анализа панели проб, содержащих ДНК каприпоксвирусов различного географического происхождения. Tm для каждого типа вируса были следующими: $74,55 \pm 0,03$ °С для полевого ЗУД КРС,

$74,91 \pm 0,02$ °С для вакцинного ЗУД КРС, $74,29 \pm 0,03$ °С для оспы овец, $73,56 \pm 0,04$ °С для оспы коз. Результаты наглядно демонстрируют, что диапазоны значений T_m воспроизводимы и не перекрываются ($p < 0,05$). Разница в значениях T_m между полевыми изолятами и вакцинными штаммами вируса ЗУД КРС в среднем составляла $0,4$ °С, тогда как разница между изолятами вируса оспы и оспы коз составляла $0,6$ °С. ($p < 0,05$). На рисунке 9Б показана оценка чувствительности для тест-системы, предел обнаружения которой на основании кривых разведений составил $0,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. При тестировании ДНК изолята Saratov/2017 получено значение $74,90$ °С, что соответствует вакцинным вирусам ЗУД КРС.

2.3.6 Разработка тест-системы ПЦР в режиме реального времени для сайта рекомбинации в рекомбинантных изолятах вируса ЗУД КРС

Для разработки дополнительного метода ПЦР с анализом кривой плавления продуктов амплификации, способного обнаруживать и дифференцировать геномы полевых и вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС, выбрали локус ORF008, кодирующий рецептор связывания интерферона-гамма, который ранее был использован в тест-системе для выявления генома вакцинных штаммов типа Neethling вируса ЗУД КРС (п.2.3.4).

Выбраны ПЦР-праймеры прямой праймер ATGCTTGTTTCCATTCTCC и обратный праймер GCTCTTTAAASTATGTTCTTCTTTTCC, фланкирующие целевую область длиной 123 п.н., которая включает уникальные генетические замены.

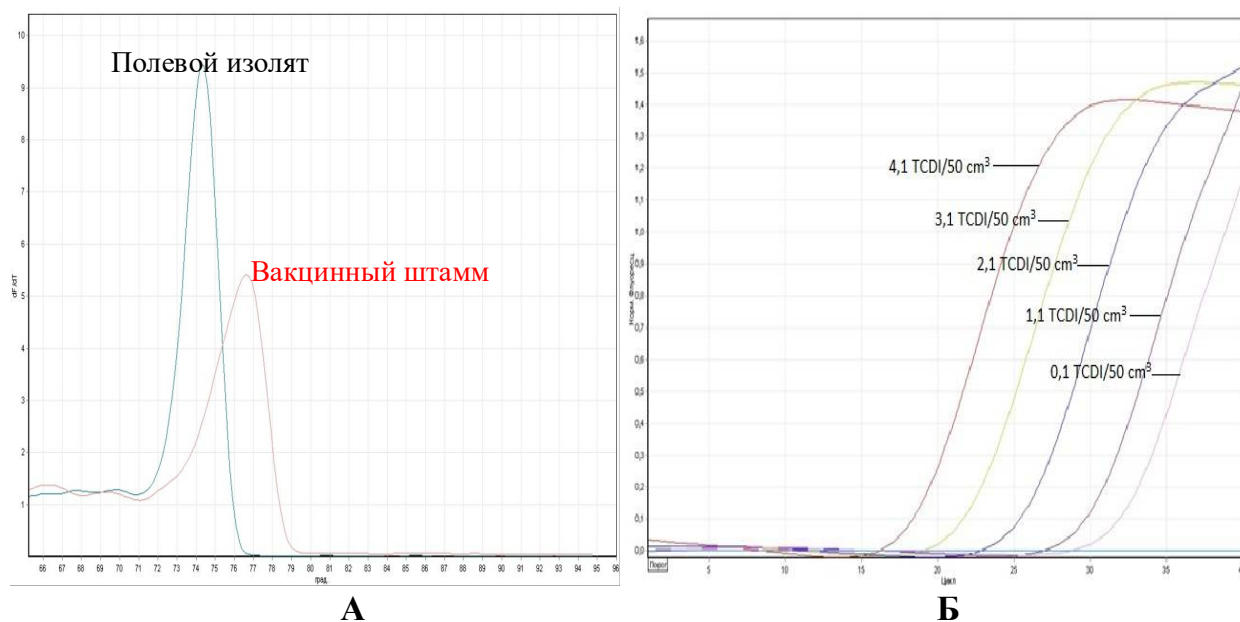


Рисунок 10 – Штамм-специфические пики плавления и оценка предела чувствительности тест-системы «ЗУД рекомбинант». А – пики плавления для изолята Dagestan/2015 и вакцинного штамма Onderstepoort. Б – Амплификационные кривые при тестировании серии пяти 10-кратных разведений вирусной ДНК

Профили плавления считывали от 60 до 80 °С с шагом $0,5$ °С. Результаты тестирования специфических пиков представлены на рисунке 10А. Рисунок 10А демонстрирует две кривые плавления для вакцинного и полевого вируса ЗУД КРС, разница температур плавления которых составляет не менее 2 °С. Пик плавления

полевой версии штамма составил $74,2 \pm 0,13$ °С, а вакцинного – $76,68 \pm 0,16$ °С ($p < 0.05$).

Предел обнаружения реакции определяли с использованием серии 10-кратных разведений геномной ДНК вируса ЗУД КРС с начальным титром от 4,10 до 0,10 lg ТЦД₅₀/см³ (Рисунок 10Б). На рисунке 10Б показана оценка чувствительности путем анализа последовательных разведений. Предел обнаружения для данной методики составил 0,1 lg ТЦД₅₀ /см³.

При тестировании ДНК изолята Saratov/2017 с помощью разработанного метода получено значение 74,25 °С, что соответствует полевым изолятам вируса ЗУД КРС. Данное наблюдение свидетельствует о присутствии «полевой версии» гена, обусловленного рекомбинацией, и объясняет причину отрицательного результата при тестировании с помощью тест-системы «ПЦР ЗУД вак» (п.2.3.4).

Поскольку тест-система «ПЦР ЗУД вак» выявляет геномы только вакцинных штаммов, с использованием дифференцирующей тест-системы «ЗУД рекомбинант» предложена схема идентификации рекомбинантных вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС (Таблица 6).

В таблице 6 представлены возможные варианты результатов типирования положительных на ЗУД КРС образцов с помощью разработанных тест-систем ПЦР-РВ. Таким образом, при работе с полевыми образцами возможны следующие варианты: вариант А – выявлен рекомбинантный изолят, вариант Б – выявлен полевой изолят, вариант В – выявлен вакцинный штамм (Таблица 6).

Таблица 6 - Таблица для идентификации рекомбинантных вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС с помощью дифференциальной диагностики

Тест-система	Результаты типирования проб, позитивных на геном вируса ЗУД КРС		
	А	Б	В
Тест-система «ЗУД ПЦР вак»	-*	-	+**
Тест-система «ЗУД ПЦР поле»	-	+	-
Метод ПЦР-РВ «ЗУД рекомбинант» с анализом пиков плавления	полевой	полевой	вакцинный
Генетический профиль вируса	Рекомбинант	Полевой	Вакцинный

*«-» - отрицательный результат, **«+» - положительный результат.

Апробацию данной схемы провели на полевых образцах 2015-2017 гг (п.2.3.5). Показано, что образцы, ранее идентифицированные как полевые имеют профиль варианта Б (100% совпадение); образцы, ранее идентифицированные как вакцинные (Samara/2017, Orenburg/2017, Bashkortostan/2017) имеют профиль варианта В (100% совпадение); изолят Saratov/2017 имеет профиль варианта А (рекомбинант).

Дальнейшая валидация данной диагностической схемы проводилась с изолятами вируса ЗУД КРС, полученными со вспышек ЗУД КРС в 2018 г, которые с помощью генетического секвенирования идентифицированы как рекомбинантные (п.2.3.12). Исследовано 89 образцов из 33 вспышек. Установлено, что все исследованные изоляты демонстрировали рекомбинантный профиль А (Таблица 6). Данные результаты

указывают на то, что во всех рекомбинантных вакциноподобных изолятах в данном локусе присутствует «полевой» сайт ORF008 (рисунок 7).

Таким образом, успешно реализована и применена схема проведения диагностических исследований по идентификации рекомбинантных вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС с помощью тест-систем ПЦР-РВ (Таблица 6). Данная схема дополняет разработанный комплекс тест-систем (п.2.3.1-п.2.3.4) и позволяет осуществлять всестороннюю генодиагностику ЗУД КРС, включая применение DIVA-стратегии и идентификацию рекомбинантных вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС с помощью ПЦР-РВ.

2.3.7. Индикация вирусной в образцах крови с различными условиями хранения

Для изучения условий оптимального хранения образцов крови, содержащей ДНК вируса ЗУД КРС, проведена оценка стабильности ДНК при различных температурных условиях хранения с использованием тест-систем «ПЦР ЗУД скрининг». Изучение влияния различных температур и процедур замораживания-размораживания на стабильность ДНК при хранении в течение 120 дней показала, что вариабельность значений порогового цикла оставалась в пределах ± 1 цикл в период исследования (таблица 7).

Таблица 7 – Сравнение показателей Ct в исходном состоянии (день 0) и на конец эксперимента (день 120) (n=3)

Условия хранения	Время хранения	
	день 0, Ct	день 120, Ct
-80°C многократное	25,56 \pm 0,26	25,66 \pm 0,09
-80°C однократное		25,03 \pm 0,78
-20°C многократное		25,69 \pm 0,88
-20°C однократное		25,74 \pm 0,99
+4°C		25,3 \pm 1,28

Для статистической обработки данных сравнивали значения порогового цикла Ct между первым и последним тестированием через парный t-критерий Стьюдента для независимых значений. Как показал анализ, статистических различий между значениями не выявлено ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии какого-либо влияния замораживания-оттаивания и температуры хранения в диапазоне от -80°C до +4°C на стабильность локуса амплификации в период хранения в течение 120 дней. Данные результаты указывают на возможность хранения проб крови, предназначенных для диагностики вируса ЗУД КРС в заданном диапазоне температур. Более того, хранение при +4°C является общедоступным, поэтому в случае длительного хранения или доставки проб, данные условия могут быть успешно соблюдены.

2.3.8 Секвенирование и анализ генома изолята Dagestan/2015

Для детального изучения филогенетических характеристик вируса ЗУД КРС, зарегистрированного впервые на территории РФ в 2015 г., и сравнения с доступными полногеномными последовательностями, проведен полногеномный анализ полевого изолята LSDV/Russia/Dagestan/2015.

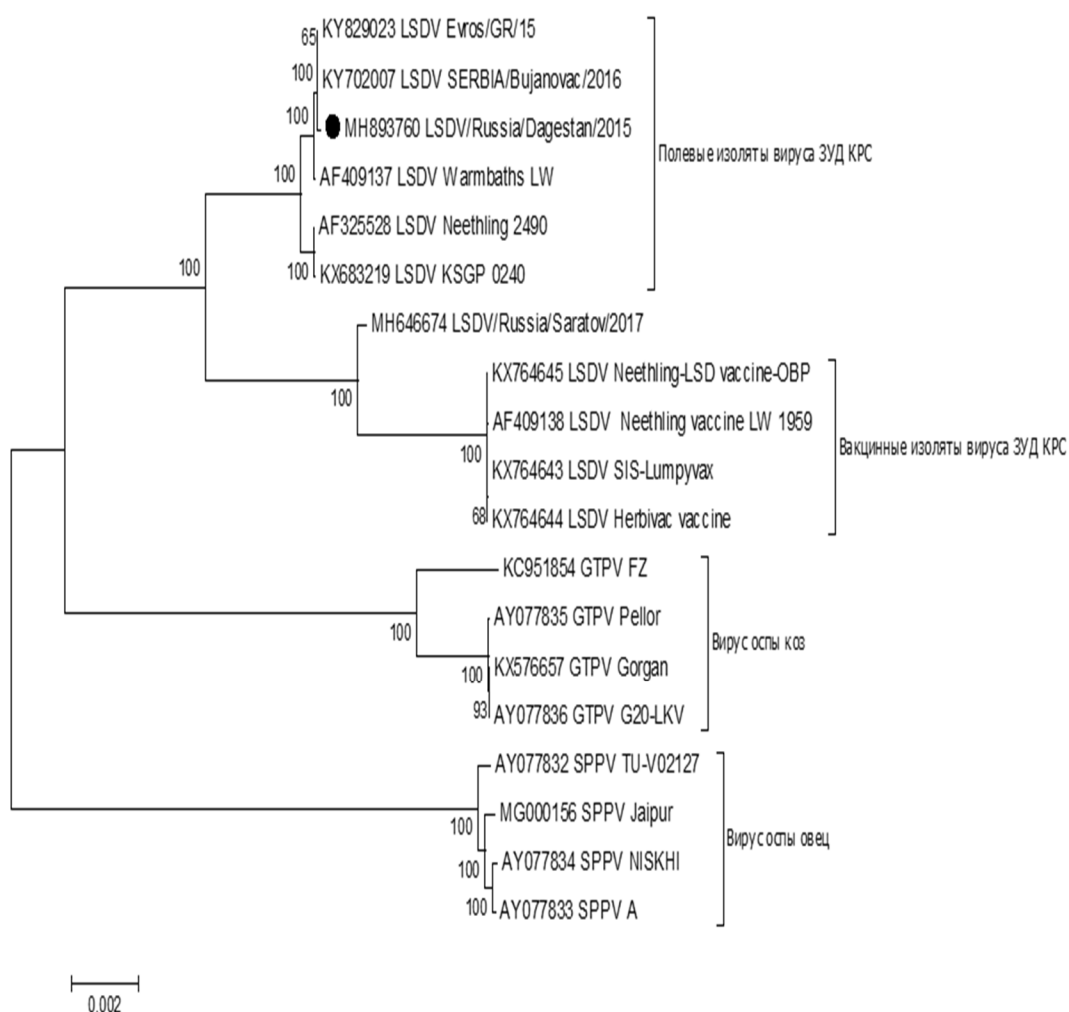


Рисунок 11 – Филогенетическое дерево, отражающее родство изолята Dagestan/2015 на основе анализа полногеномных последовательностей каприпоксвирусов

На рисунке 11 изображено филогенетическое положение изолята Dagestan/2015 среди известных каприпоксвирусов, депонированных в базе данных GenBank. Видно, что изолят Dagestan/2015 группируется в кластер полевых изолятов. Dagestan/2015 идентичен на 99,9% изолятам из Греции Evros/GR/15 (KY829023) и Сербии SERBIA/Bujanovac/2016, соответственно. Вакцинные штаммы вируса ЗУД КРС группируются отдельно в вакцинном кластере. Полученные данные указывают на родство изолятов из РФ, Сербии и Греции – на общий источник их происхождения, тогда как штамм кенийской вакцины KSGP 0240 и Ni 2490 образуют отдельный подкластер в кластере полевых изолятов. Важно отметить, что Dagestan/2015 также гомологичен на 99,9 % штамму из ЮАР Warmbaths LW (AF409137), выделенному в 2000 г. Из этого следует, что вирус ЗУД КРС не претерпел существенных изменений за 16 лет, что указывает на консервативность геномной ДНК вируса в условиях *in vivo*.

Для изучения эволюционной консервативности генома изолята Dagestan/2015 *in vitro* вирус культивировали в течение 75 пассажей на культуре клеток тестикул ягненка при постоянной температуре 37 °С. Пробоподготовку и полногеномное секвенирование проводили как описано ранее. Дендрограмма, построенная на основе полногеномного секвенирования, представлена на рисунке 12.

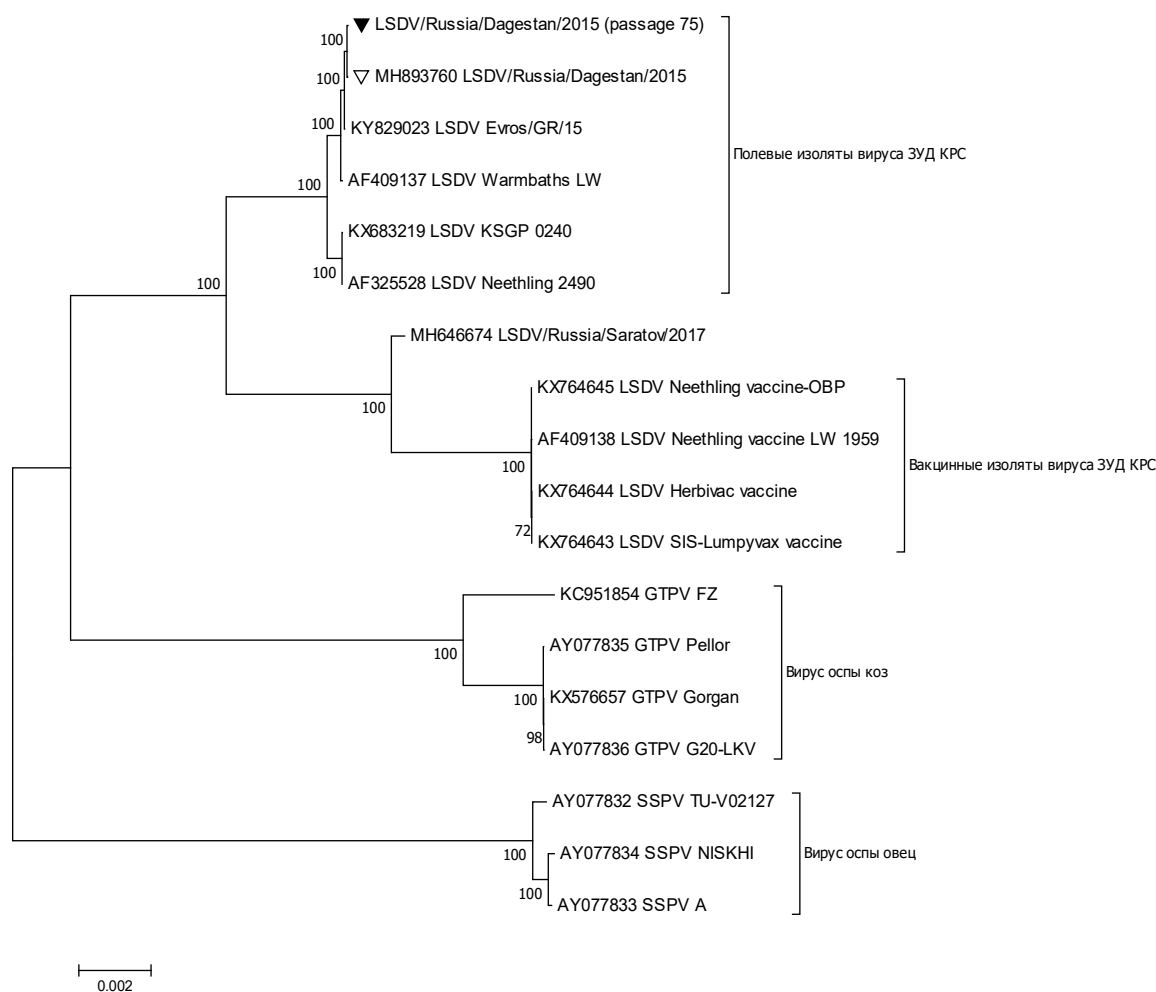


Рисунок 12 – Филогенетическое дерево, отражающее родство изолята Dagestan/2015 (passage 75) на основе анализа полногеномных последовательностей каприпоксвирусов, (светлый треугольник – исходный изолят Dagestan/2015, черный треугольник – 75-й пассаж)

Из рисунка 17 видно, что Dagestan/2015 75-й пассаж группируется с исходным изолятом Dagestan/2015 с bootstrap-значением 100%. При этом к 75 пассажиру выявлено 4 однонуклеотидных несинонимичных замены в генах ORF32 (большая субъединица поли(А) полимеразы), ORF71 (субъединица РНК полимеразы), ORF140 (Белок хозяин-специфичности RING finger), ORF152 (белок с анкириновыми повторами) и 1 синонимичная замена в ORF28 (пальмитированный белок оболочки капсида), что свидетельствует о высокой степени консервативности генома вируса на протяжении 75 пассажей в культуре клеток.

Таким образом, анализ полевого изолята Dagestan/2017 показал, что в РФ в 2015 г. первая вспышка ЗУД КРС была вызвана полевым изолятом, высокомологичным изолятам из Греции и Сербии. При культивировании изолята Dagestan/2017 в течение 75 пассажей в культуре клеток показал высокую консервативность генома *in vitro*.

2.3.9 Секвенирование и анализ полного генома изолята Saratov/2017

Для изучения рекомбинаций в геноме изолята Saratov/2017 проведено полногеномное секвенирование. Филогенетическое родство штамма Saratov/2017 с каприпоксвирусами показано на рисунке 13.

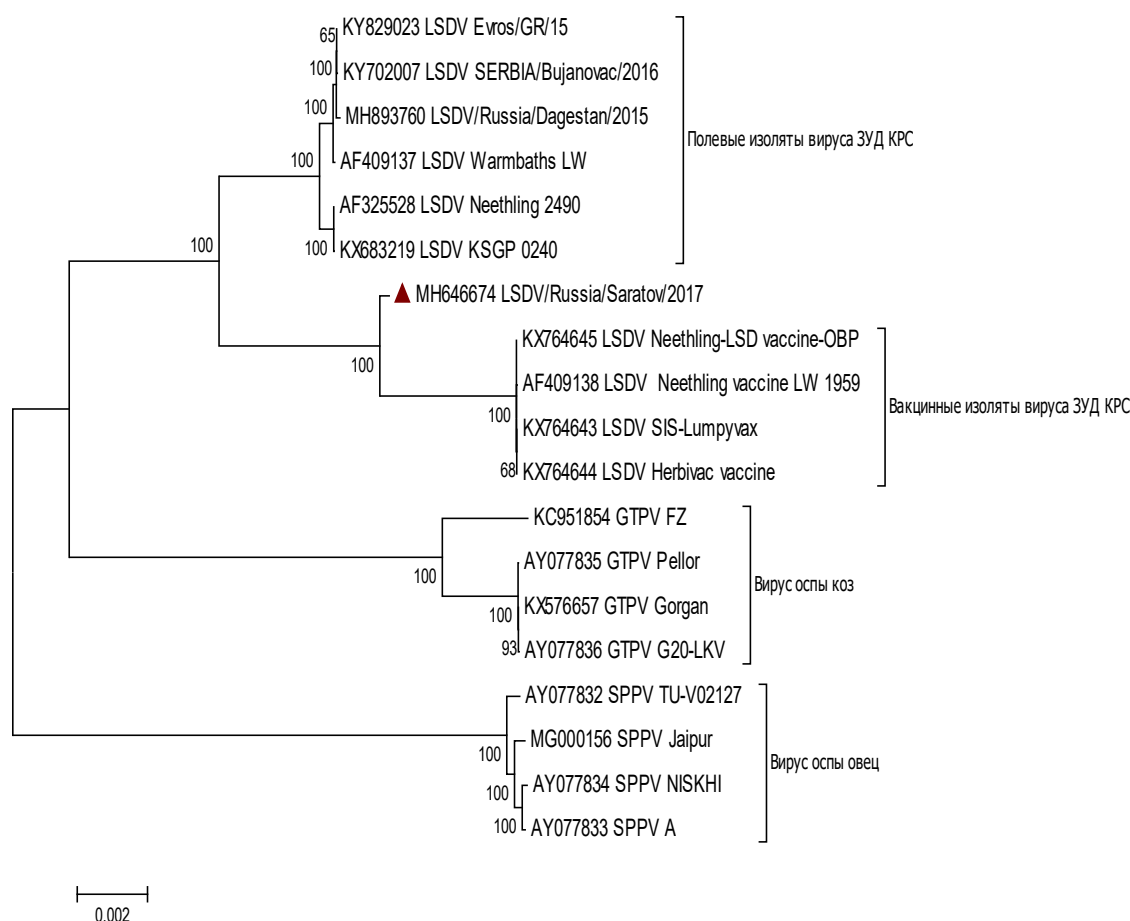


Рисунок 13 – Филогенетическое сравнение 19 геномов каприпоксовирусов. Вирусы ЗУД КРС, оспа овец и оспа коз выделены в отдельные кластеры (изолят Saratov/2017 отмечен красным треугольником)

На рисунке 13 изображена филогенетическое положение изолята Saratov/2017 на основе полногеномного секвенирования, который занимает промежуточное положение между полевыми изолятами и вакцинными штаммами. В кластерах вируса ЗУД КРС в вакцинной группе (SIS-Lumpyvax, Herbivac, OBP-вакцина и изолят Cro2016) идентичность составляет 99,9, тогда как среди вирусов в кластере полевой группы (KSGP 0240, NI-2490, RSA Warmbaths, Greece Evros/GR15 и Serbia/Bujanovac/2016) идентичность составила более 99,8% (рисунок 17). Штамм Saratov/2017 более тесно связан с вакцинными штаммами (>99,3%), чем с полевыми (>98,64%). Это указывает на то, что изолят Saratov/2017 имеет в основе геномную последовательность вакцинного штамма как доминантного родительского вируса.

С помощью программы RDP4, было выявлено в общей сложности 27 случаев рекомбинации. Saratov/2017 имеет генетическую основу вакцинного вируса с прерывистыми областями, которые имеют высокое процентное сходство с кенийским вакцинным штаммом KSGP 0240 и Neethling 2490, формирующие отдельный субкластер в кластере полевых изолятов (рисунок 13).

Точки рекомбинации обнаружены в LSD144 и LSD145, которые кодируют Kelch-подобный белок и белок анкирин, соответственно. В предсказанных случаях рекомбинации (20 и 14) участвовал ген, кодирующий второй Kelch-подобный белок (LSD019) и ген анкирина (LSD147), что привело к обмену трех аминокислот от полевых изолятов в белковую последовательность LSD019 вакцинного штамма, однако в LSD147 не произошло обмена аминокислотами. Изменениям подверглись двенадцать

белков, участвующих в транскрипции, трансляции или модификации РНК (LSD084, LSD085, LSD086, LSD087, LSD088, LSD089, LSD049, LSD051, LSD055, LSD098, LSD071 и LSD110). Наиболее значительные изменения наблюдались в двух *mutt*-мотивах белков (LSD086 и LSD087 в случае рекомбинации 5), где С-конец белков был изменен и стал аналогичным С-концу соответствующего белка полевого изолята. Изменения выявлены в генах, кодирующие факторы вирулентности и хозяинспецифичности (LSD135, LSD138, LSD008, LSD140 и LSD141). LSD135 и LSD138, кодирующие иммуноглобулиновые домены в своих структурах, содержали замены, схожие с вирусом дикого типа, в то время как в трансмембранном сегменте белка LSD138 замен не наблюдалось. Три белка, участвующие в репликации ДНК (LSD133, LSD139 и LSD082), подвергались обмену аминокислот в гликозилазном урацил-ДНК домене LSD082 и протеинкиназном домене LSD139. Двенадцать структурных белков и белков, участвующих в сборке вируса (LSD050, LSD053, LSD057, LSD060, LSD063, LSD102, LSD103, LSD104, LSD105, LSD141, LSD072 и LSD081) также подверглись рекомбинации. Важно отметить наличие сдвига рамок считывания в LSD086, LSD087, LSD134 и LSD144, где у вакцинных вирусов имеет место преждевременная терминация трансляции из-за наличия стоп-кодонов, тогда как у вируса *Saratov/2017* стоп-кодоны отсутствуют, что не препятствует трансляции полногоразмерного белка. Кроме того, сдвиг в рамке считывания наблюдается в LSD131 *Saratov/2017*, в котором также преодолен стоп-кодон и создан новый функционирующий С-терминальный конец. Каждый из этих случаев рекомбинации вируса *Saratov/2017* приводит к трансляции полноразмерного белка, как у вируса дикого типа, а не к усеченным вариантам белков, которые наблюдаются у аттенуированных вакцинных штаммов.

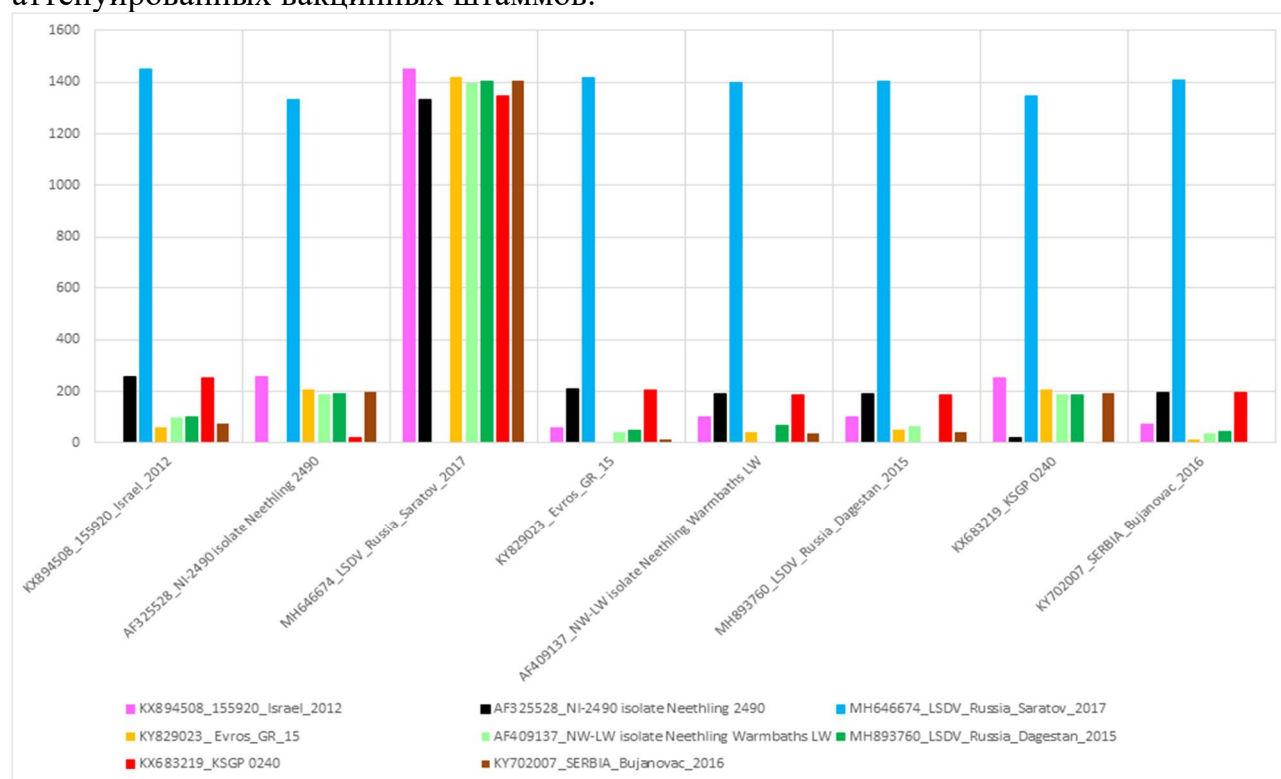


Рисунок 14 – Сравнение нуклеотидных отличий между изолятом *Saratov/2017* и полевыми изолятами

На рисунке 14 изображена гистограмма, отражающая нуклеотидные отличия между изолятом *Saratov/2017* и представителями кластера полевых изолятов. Из

рисунка 19 видно, что Saratov/2017 отличается от большинства штаммов на >1400 нуклеотидов, однако ближайшими родственными штаммами являются KSGP 0240 и NI-2490 (< 1400 п.н.), а не полевые изоляты типа Dagestan/2015 или Evros_Gr_15, что свидетельствует о том, что наиболее вероятным участником рекомбинации является NI-2490 или KSGP 0240. К тому же NI-2490 и KSGP 0240 генетически близки друг другу, в отличие от штаммов из Израиля, ЮАР, Греции и Сербии.

На рисунке 15 изображена гистограмма, отражающая нуклеотидные отличия между вакцинными штаммами и полевыми изолятами в сравнении с Saratov/2017.

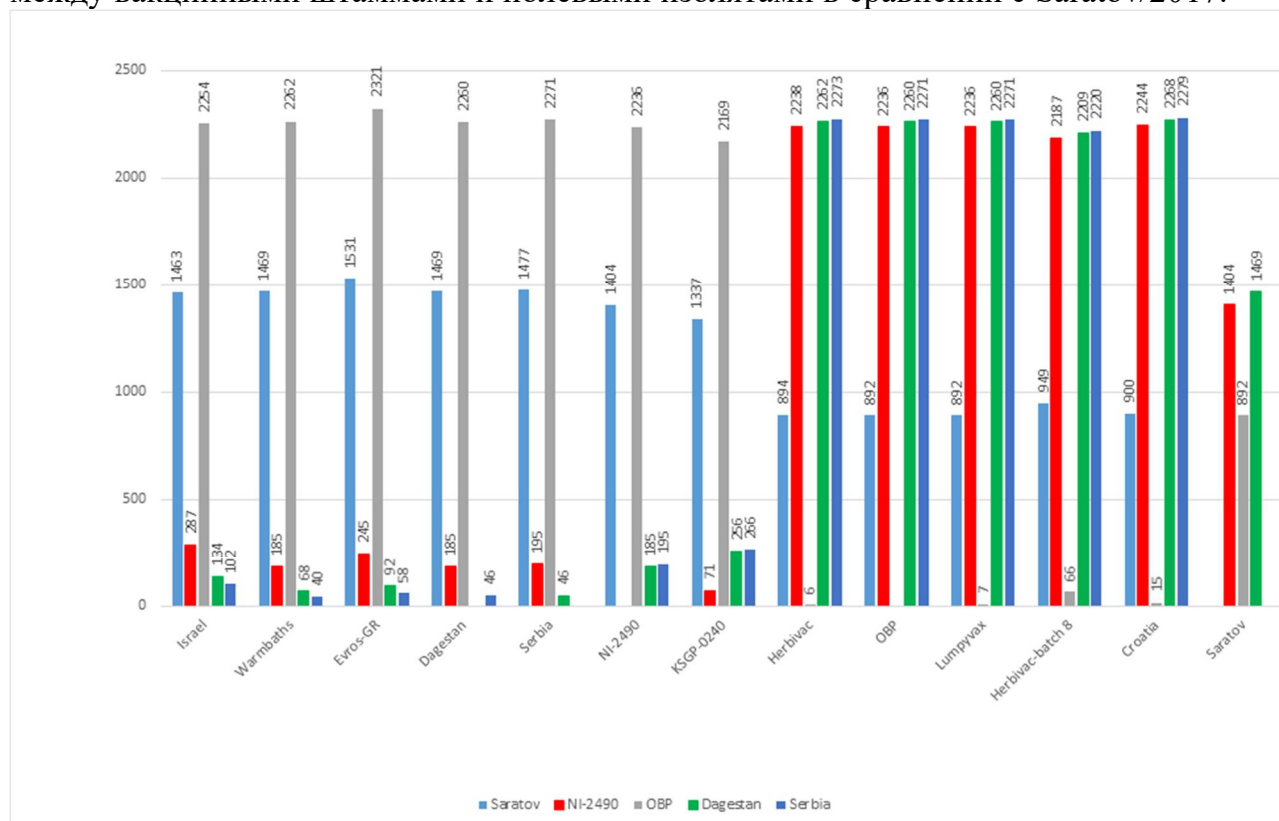


Рисунок 15 – Сравнение нуклеотидных отличий между вакцинными и полевыми вирусами

Из рисунка 15 видно, что на нуклеотидном уровне вакцинные штаммы и полевые изоляты отличаются друг от друга (>2000 п.н.). Однако Saratov/2017 имеет меньше различий с NI-2490 (или KSGP) (1404 п.н.), чем с Dagestan/2015(1459). С вакцинными штаммами выявлено 892 нуклеотидных различий.

На рисунке 16 графически представлено сравнение (similarity plot) генома штамма Saratov/2017 с вакцинным штаммом Herbivac и полевым изолятом Neethling 2490. На протяжении всего генома штамм Saratov/2017 имеет идентичность 88-100% с геномами родительских штаммов вируса ЗУД КРС. А при проведении аминокислотного анализа в белках Saratov/2017, Dagestan/2015, KSGP 0240 и Herbivac установлено, что аминокислотные замены в изоляте Saratov/2017 совпадают с заменами штамма KSGP 0240 (NI-2490) и вакцинного штамма Herbivac, но не Dagestan/2015.

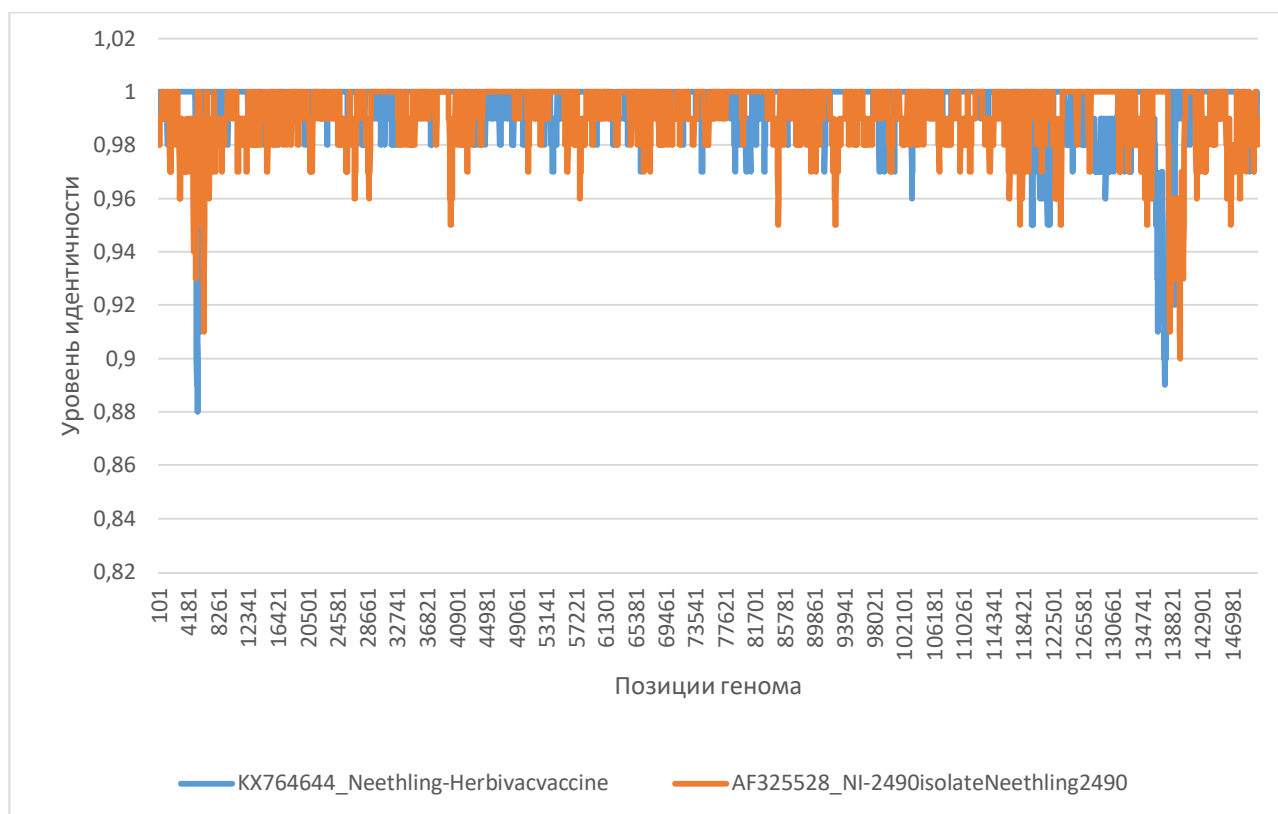


Рисунок 16 – График сходства нуклеотидных последовательностей изолята Saratov/2017 по сравнению с родительскими штаммами вакцины Herbivac и NI-2490

Таким образом, впервые идентифицирован и охарактеризован рекомбинантный вакциноподобный изолят Saratov/2017 с 27 сайтами рекомбинаций. На основе биоинформатического анализа показано, что геном изолята Saratov/2017 состоит из генома вакцинного штамма типа Neethling в качестве доминантного вируса и KSGP-подобного изолята в качестве минорного вируса. Наличие множественных рекомбинаций в геноме объясняет причину отрицательных результатов, полученных при типировании на «вакцинный» и «полевой» в п. 2.3.5. Установлено, что в локусе ORF126 (тест-система для выявления генома полевых изолятов из п.2.3.3) присутствует вакцинная версия гена, тогда как в локусе ORF008 (тест-система для выявления генома вакцинных штаммов из п.2.3.4) – полевая версия гена.

2.3.10 Филогенетический анализ изолятов ЗУД КРС, выявленных в 2015-2018 гг.

Филогенетический анализ 21 изолята вируса ЗУД КРС, полученных со вспышек ЗУД КРС в период с 2015 по 2018 гг, по генам RPO30 и GPCR показал, что изоляты, выявленные в 2015 и 2016 годах, имеют 100% идентичность с излятом Dagestan/2015 по гену RPO30 и относятся к одному кластеру полевых изолятов (рисунок 17). На рисунке 22 показана дендрограмма по гену RPO30, отражающая филогенетическое родство изолятов вируса ЗУД КРС, выявленных в период с 2015-2018 гг. Из представленных данных видно, что изоляты 2015-2016 гг и часть изолятов 2017 г группируются с полевыми изолятами, выявленными в других странах, тогда как начиная с 2017 г. регистрируются вакциноподобные изоляты Samara/2017, Bashkortostan/2017, Orenburg/2017 и Saratov/2017 (рисунок 17).

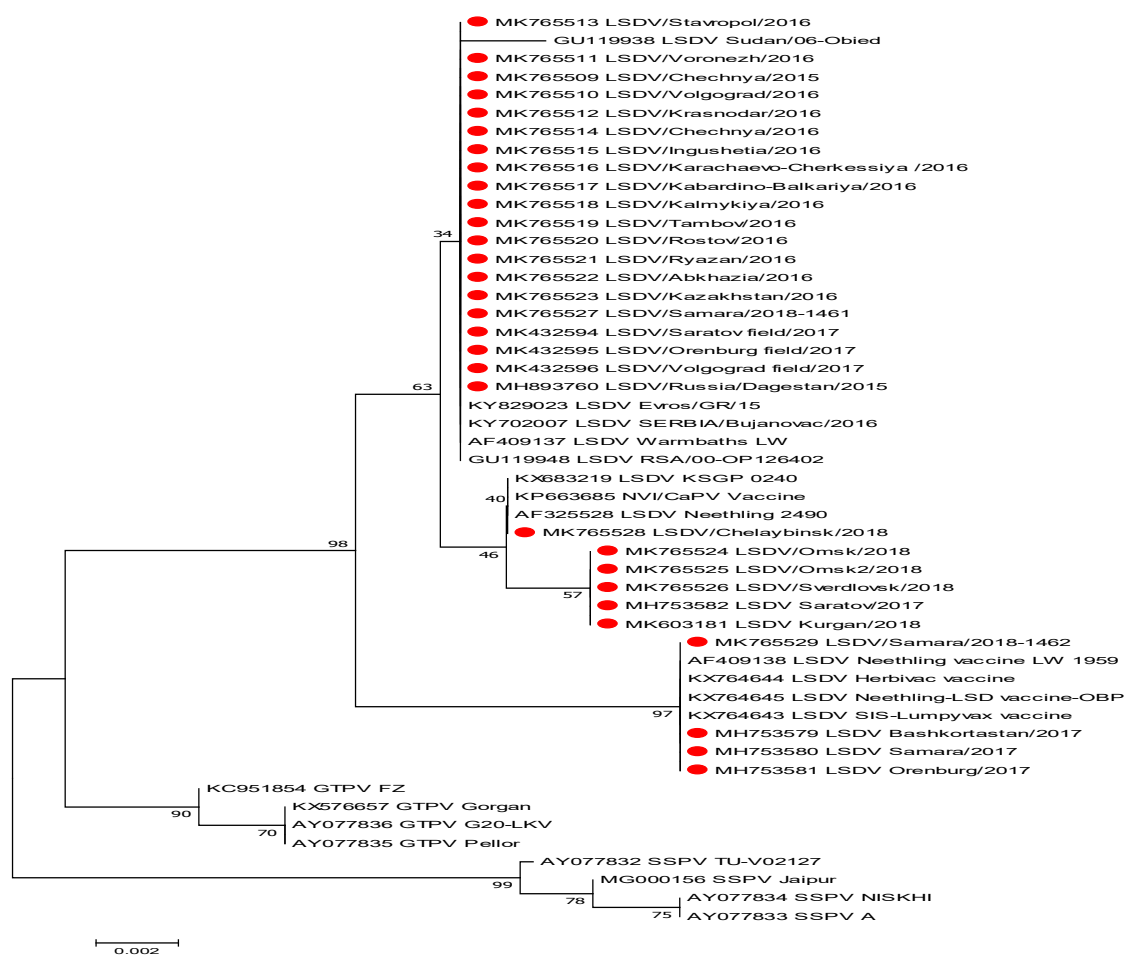


Рисунок 17 – Неукорененное филогенетическое дерево, показывающее связи между нуклеотидными последовательностями каприпоксвирусов по локусу RPO30. Российские изоляты отмечены красным

Напротив, по локусу GPCR те же изоляты были вариабельны: изоляты Chechnya/2016, Stavropol/2016, Krasnodar/2016 и Volgograd/2016 группировались отдельно от большинства полевых изолятов, хотя и относились к одной общей генетической линии полевых изолятов с 99,7% - 99,8% гомологией (рисунок 18). На рисунке 18 изображено филогенетическое дерево по локусу GPCR, показывающее филогенетическое родство изолятов вируса ЗУД КРС, выявленных в период с 2015-2018 гг. Показано, что изоляты 2015-2016 гг и часть изолятов 2017 г группируются с полевыми изолятами (Dagestan/2015-подобные), тогда как, начиная с 2017 г. регистрируются вакциноподобные изоляты Samara/2017, Bashkortostan/2017, Orenburg/2017 и Saratov/2017.

Локус GPCR этих изолятов показал сходство 99,8%-100% (замена Т на G для всех, кроме Chechnya /2015, который также включал замену А на Т). Для изолятов вируса ЗУД КРС 2018 г. установлена отдельная кластеризация для обоих изучаемых локусов.

Оба локуса (RPO30 и GPCR) нового российского полевого изолята Samara/2018-1462 были идентичны локусам вакцинных штаммов таких, как Lumpvax (рисунок 17, 18). Согласно анализу последовательности RPO30, российский полевой изолят Samara/2018-1461 имел сходство 99,5% и 99,1% с российскими полевыми штаммами Dagestan/2015 и KSGP-подобным Kurgan/2018, соответственно, что свидетельствует о циркуляции в регионе нескольких генетических вариантов вируса. Локус GPCR

изолята Samara/2018-1461 содержал CTCAGTACAATT повтор и показал 100% сходство с KSGP изолятом и изолятом Kurgan/2018.

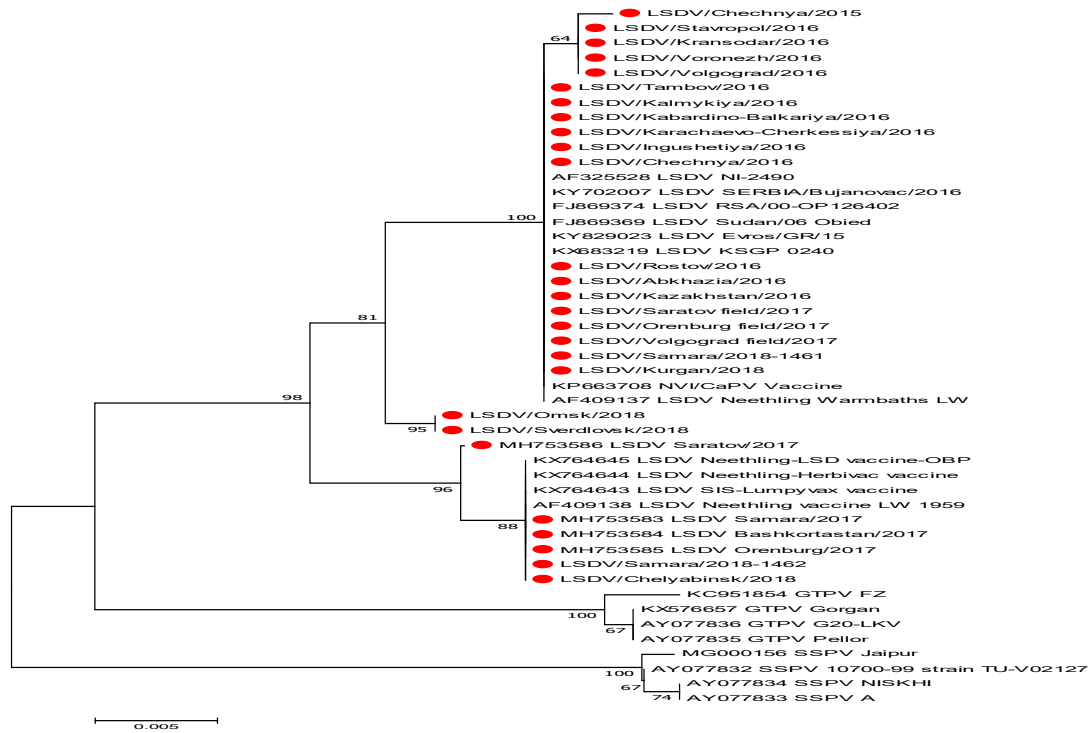


Рисунок 18 – Неукорененное филогенетическое дерево, показывающее связи между нуклеотидными последовательностями каприпоксвирусов по локусу GPCR. Российские изоляты отмечены красным

Анализ российских изолятов Omsk/2018 (оба), Sverdlovsk/2018 и Chelyabinsk/2018 продемонстрировали различную филогенетическую кластеризацию по двум анализированным генам, хотя изолят Chelyabinsk/2018 был генетически близок рекомбинантному штамму Saratov/2017 со сходством 99,6% по GPCR и сходством 99,3% по RPO30. Идентичный уровень сходства был найден между изолятом Chelyabinsk/2018 и Kurgan/2018 по локусу RPO30. Изоляты Omsk/2018 (оба) и Sverdlovsk/2018, которые в локусе GPCR содержали CTCAGTACAATT-повтор, уникальный для вакцинных и KSGP-подобных штаммов, группировались отдельно от полевых изолятов. В результате они сформировали отдельный подкластер относительно полевой группы. Кроме того, Sverdlovsk/2018 имел 99,2% и 97,7% идентичности с Saratov/2017 и Dagestan/2015, соответственно.

Учитывая полученные данные по определению первичной нуклеотидной последовательностей генов RPO30 и GPCR изолятов вируса ЗУД КРС с 2015 по 2018 гг. показан тренд по изменению генетического профиля циркулирующего вируса ЗУД КРС, который разделяется на 3 этапа. Первый этап – 2015-2016 гг., когда на территории РФ (регионы Северо-Кавказского и Южного ФО) доминировал единственный генотип вируса ЗУД КРС – полевой. Начиная с 2017 г. впервые на территории РФ регистрируются вакциноподобные изоляты вируса ЗУД КРС, включая рекомбинантный (Saratov/2017), которые циркулируют совместно с полевыми, но уже в регионах Приволжского ФО (2-й этап). С 2018 года начинается 3-й этап, когда уже доминируют вакциноподобные рекомбинантные изоляты вируса ЗУД КРС, которые регистрируются в Уральском и Сибирском ФО. Учитывая консервативность генома, распространение вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС по территории РФ носит заносной характер.

Таким образом на основе проведенных исследований по разработке диагностических тест-систем ПЦР-РВ для выявления генома каприпоксвирусов, генома вируса ЗУД КРС, генома полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса ЗУД КРС, а также изучения молекулярно-генетических характеристик циркулирующих изолятов вируса предложена схема генодиагностики ЗУД КРС (рисунок 19).

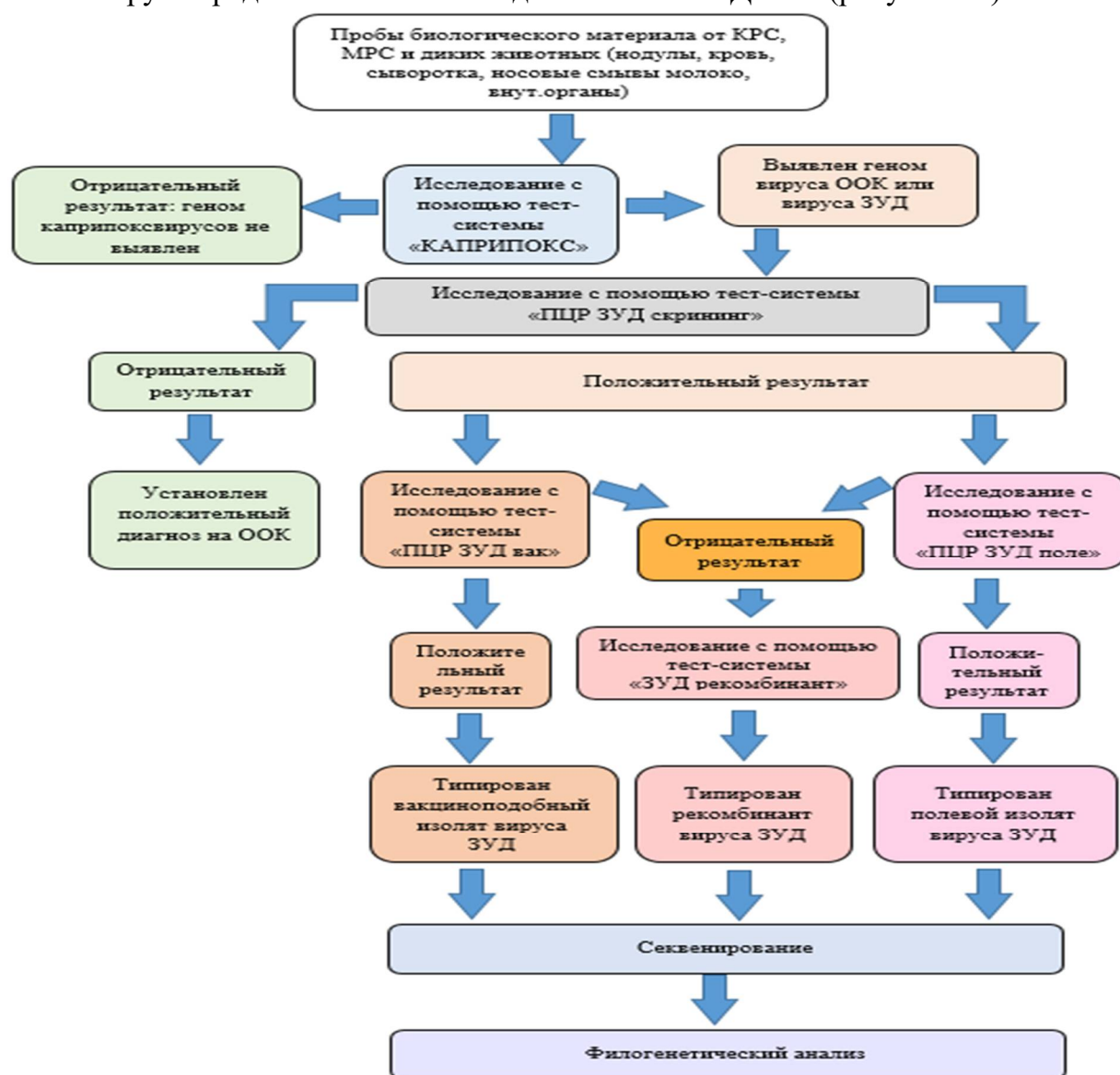


Рисунок 19 – Схема генодиагностических исследований для изучения каприпоксвирусов (ООК – оспа овец и коз)

Схема детальной генодиагностики ЗУД КРС, представленная на рисунке 19, предполагает первоначальное исследование проб от КРС с помощью тест-системы "КАПРИПОКС", которая может применяться на различных пробах биологического и патологического материалов от КРС, МРС, и диких животных. В случае получения положительного результата на наличие генома каприпоксвирусов (геномы вируса ЗУД КРС, оспу овец и оспу коз), требуется использование тест-системы «ПЦР ЗУД скрининг», которая дифференцирует геном вируса ЗУД КРС. В случае получения отрицательного результата, диагноз на ЗУД КРС считается отрицательным, при этом ставится диагноз на оспу овец или коз. Если регистрируется положительный результат, диагноз на ЗУД КРС считается установленным. Следует отметить, что обследование

на каприпоксвирусы с помощью данной схемы в районах, где циркулируют вирусы оспы овец и ЗУД КРС, позволяет исключить наличие межвидового перехода у этих близкородственных вирусов. После получения положительного результата на ЗУД КРС, пробы исследуют с помощью тест-системы «ПЦР ЗУД вак» (выявляет вакцинные штаммы) и тест-системы «ПЦР ЗУД поле» (выявляет полевые изоляты).

В случае, если получают положительный результат с помощью тест-системы «ПЦР ЗУД вак» и отрицательный с помощью тест-системы "ПЦР ЗУД поле", то результатом считается обнаружение генома вакциноподобного изолята вируса ЗУД КРС. В случае, если получен отрицательный результат с помощью тест-системы " ПЦР ЗУД вак" и положительный с помощью тест-системы «ПЦР ЗУД поле», то результатом является обнаружение генома полевого изолята вируса ЗУД КРС. В случае получения отрицательного результата с помощью дифференцирующих тест-систем пробы исследуют с помощью тест-системы «ЗУД рекомбинант», которая детектирует наличие генома рекомбинантного изолята по локусу рекомбинации. После уточнения генотипической принадлежности изолята (полевой, вакциноподобный, рекомбинантный) в дальнейшем проводится генетическое секвенирование, на основе которого осуществляется филогенетический анализ, позволяющий изучить молекулярную эпизоотоологию ЗУД КРС.

2.3.11 Разработка подхода к проведению энтомологических исследований переносчиков вируса ЗУД КРС

Основной способ передачи вируса ЗУД КРС осуществляется через кровососание членистоногими, причем трансмиссия происходит механически, тогда как данные о репликации вируса в переносчиках (биологическая трансмиссия) отсутствуют. В связи с этим главным фактором распространения инфекции от животного к животному является численность вектора. Учитывая данный факт, в качестве потенциального вектора выбраны мокрецы р. *Culicoides*, характеризующийся высокой численностью в теплое время по всей территории РФ.

Изучение активности мокрецов р. *Culicoides* с помощью УФ-ловушек провели в различных климатических зонах Российской Федерации – Смоленской области, Р.Крым и Р.Бурятия. За период исследования в Смоленской области отловлено 30762 самок из группы *Obsoletus* и 3414 самок комплекса *Pulicaris*. Небольшое количество особей *C. grisescens* Edwards выявили в конце лета. Наибольшее количество мокрецов было поймано внутри помещения по сравнению с улицей ($p \leq 0,05$) 24925 и 5837, соответственно, для мокрецов из группы *Obsoletus* и 2473 и 941, соответственно, для мокрецов группы *Pulicaris*. В конце мая количество мокрецов из группы *Obsoletus* как в помещениях, так и на открытом пространстве резко возросло. Затем последовало резкое снижение численности в середине июня. Численность мокрецов в помещении достигла второго пика к 7 июля, однако это не отразилось на отлове вне помещения. Небольшой пик численности присутствовал в обоих уловах 11 августа, после чего количество постепенно уменьшалось до нуля к середине октября.

В конце июня количество мокрецов группы *Pulicaris* как внутри, так и снаружи помещений резко сократилось, а затем резко выросло в конце июля и снова сократилось в конце августа и к середине октября достигло нуля.

В Р. Крым было отловлено 44 самки группы *Obsoletus* и 653 самок группы *Pulicaris*. Самцы в улове отсутствовали. Численность мокрецов группы *Obsoletus* была значительно больше в помещении по сравнению с улицей ($p \leq 0,05$). Несмотря на

небольшое количество всех отловленных насекомых, численность мокрецов группы *Pulicaris* была выше на открытом воздухе, чем в помещении ($p \leq 0,05$). Общее количество мокрецов группы *Obsoletus* было небольшим. Впервые они появились в середине апреля, затем увеличивали популяцию как внутри, так и снаружи помещений с середины-конца июня до начала августа, после чего отсутствовали. Число мокрецов из группы *Pulicaris* было выше, чем из группы *Obsoletus*, но динамика лета была аналогична: начало приходилось на конец апреля, максимум отмечен с конца июня до начала августа, и проявлялся спорадически до начала октября.

В улове в Р.Бурятия отсутствовали мокрецы из группы *Obsoletus*. Мокрецы *Pulicaris* впервые появились в ловушках в середине мая и их численность постепенно увеличивалась до пика в середине июня, после чего численность мокрецов оставалась низкой до второго, более высокого пика в начале августа, который охватывал период до середины сентября, затем их численность быстро уменьшилась до нуля.

Таким образом, впервые в РФ проведены исследования с помощью световой ловушки с УФ-светом. Данная методология апробирована и применена на практике для оценки динамики численности кровососущих мокрецов р.*Culicoides* на фермах климатически различных регионов РФ. Результаты показали, что наибольшая численность мокрецов установлена при обследовании в Смоленской области: в 5-150 раз больше количества особей обоих комплексов по сравнению с Р.Крым и Р.Бурятия, что связано с мягким климатом и наличием благоприятных мест выплода.

Учитывая то, что вспышки на территории ЗУД КРС на территории РФ, начиная с 2015 г, регистрируются, главным образом, в теплые летние месяцы в регионах с умеренным климатом, мы провели анализ данных по активности мокрецов Смоленской области (умеренный климат) и данных по сезонности вспышек, представив полученные результаты в графическом виде (рисунок 20).

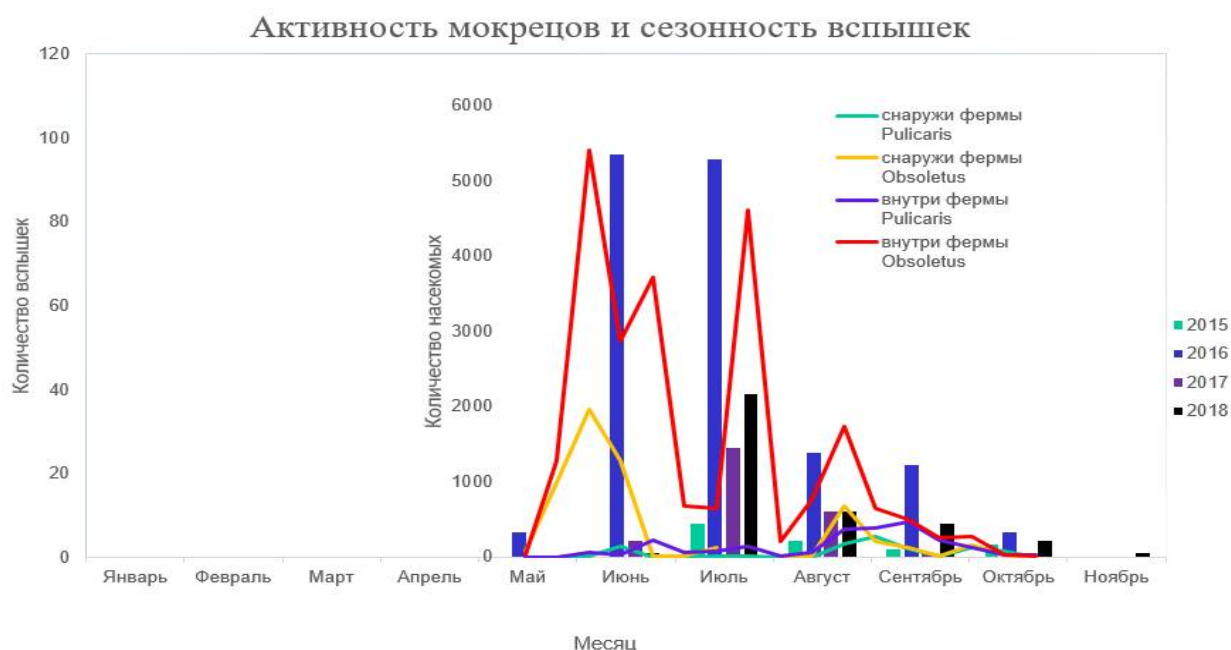


Рисунок 20 - Взаимосвязь активности мокрецов и сезонности вспышек ЗУД КРС

Из рисунка 20 видно, что пики активности мокрецов совпадают с максимальной частотой вспышек, что потенциально может указывать на участие насекомых, которые

активны в теплое время. Данная корреляция между сезонностью вспышек и активностью кровососущих членистоногих была ранее продемонстрирована зарубежными исследователями для тропического климата Африки. Принимая во внимание данное наблюдение, необходимо оценить роль насекомых непосредственно на вспышках ЗУД КРС в РФ.

Энтомологические исследования на вспышке ЗУД в Р.Башкортостан в 2017 г.

При исследовании насекомых на месте вспышки в Р.Башкортостан в 2017 г., вызванной вакциноподобным изолятом (рисунок 22, 23), в общей сложности было отловлено 34 особи осенней жигалки *Stomoxys calcitrans*, 9856 домашних мух и 21 малая комнатная муха *Fannia canicularis*. Слепни и мокрецы р.*Culicoides* в сборах отсутствовали. Осенних жигалок и малых домовых мух тестировали индивидуально, и получили отрицательные результаты. Особей домашней мухи *Musca domestica* тестировали в пулах и индивидуально. Всего было сформировано 25 пулов, состоящих из 3-5 случайно отобранных домашних мух. В 14 пулах выявлен геном вакциноподобного изолята вируса ЗУД КРС ($Ct > 25,5$). Для определения локализации вирусного генома каждую особь домашней мухи отмывали 4 раза в 400 мл ФБР. Всего исследовано 45 особей. После 4 отмывок каждое насекомое перетирали стерильным одноразовым пестиком и тестировали в ПЦР. После 1 этапа отмывки смывы с 26 мух из 45 исследованных содержали вирусную ДНК. При тестировании самих насекомых после отмывок 9 насекомых были положительными в ПЦР на геном вакциноподобного изолята вируса ЗУД КРС. Данный факт указывает на наличие вирусной ДНК внутри насекомого, что является следствием питания на пораженных участках кожи, содержащие высокие концентрации вирусных частиц.

Кровососущая осенняя жигалка *Stomoxys calcitrans*, отловленная совместно с *Musca domestica*, показала отрицательные результаты на наличие вирусной ДНК.

В результате исследования впервые установлено, что некровососущие домашние мухи *Musca domestica* являются носителем вирусной ДНК, причем вирусная ДНК обнаружено как на поверхности экзоскелета мухи, так и внутри насекомого.

Энтомологические исследования на вспышке ЗУД КРС в Курганской области в 2018 г

При энтомологическом исследовании на вспышке ЗУД КРС в Курганской области в 2018 г., вызванной вакциноподобным изолятом (рисунок 22, 23), в течение 24-часового периода отловлены единичные экземпляры мокрецов р.*Culicoides* и 39 особей слепней сем.*Tabanidae*. При тестировании с помощью ПЦР мокрецы р.*Culicoides* были отрицательны, тогда как образцы слепней (голову и брюшко каждой особи тестировали отдельно) содержали геном вакциноподобного вируса ЗУД КРС, из которых в 3 случаях геном выявлен в голове слепней, а в одном – в брюшке слепня. Таким образом, впервые показана возможность выявления ДНК вируса ЗУД КРС у слепней.

Энтомологические исследования на вспышке ЗУД КРС в Саратовской области в 2019 г

В Саратовской области во время вспышки в 2019 г., вызванной вакциноподобным изолятом вируса ЗУД КРС, собрано 34 особи осенней жигалки *Stomoxys calcitrans* и 5 особей домашних мух *Musca domestica*. Мокрецы р.*Culicoides* в

сборах отсутствовали. Все особи мухи жигалки визуально не имели крови в брюшках. При тестировании с помощью ПЦР геном вакциноподобного вируса ЗУД КРС был выявлен в кровососущих насекомых – осенних жигалках *Stomoxys calcitrans* и домашней мухе *Musca domestica*, которая не является кровососущей.

3. Заключение

3.1 Итоги выполненного исследования

1. Разработанные тест-системы ПЦР-РВ для выявления генома каприпоксвирусов (вирус ЗУД КРС, вирус оспы овец, вирус оспы коз) позволяют проводить генодиагностические исследования, включая дифференциацию полевых изолятов вируса ЗУД КРС от вакциноподобных изолятов вируса и вакцинных штаммов типа Neethling. Эффективность амплификации всех разработанных тест-систем превышает 90% с пределом обнаружения не менее 0,39 lg ТЦД₅₀/см³.

2. Для реализации DIVA-стратегии и слежения за распространением рекомбинантных вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС разработана и апробирована диагностическая схема, включающая комплексное использование тест-систем ПЦР-РВ для идентификации рекомбинантных вакциноподобных изолятов вируса ЗУД КРС с анализом пиков плавления продуктов амплификации.

3. Филогенетические исследования изолятов 2015-2018 гг. циркулирующего в РФ вируса ЗУД КРС показали, что, начиная с 2017 г. совместно с полевыми изолятами впервые выявлены вакциноподобные изоляты, а с 2018 г. регистрировали преобладание вакциноподобных изолятов во всех исследованных вспышках на территории РФ.

4. Определение полногеномной последовательности полевого изолята Dagestan/2015 подтвердило его родство с изолятами вируса ЗУД, циркулировавшего в Греции и Сербии в 2015-2016 гг. Установленная 99,9% гомология геномов всех трех изолятов указывает на их общее происхождение.

5. Геном вируса ЗУД изолята Dagestan/2015 при репликации *in vitro* сохранял высокий уровень консервативности, поскольку на протяжении 75 пассажей в культуре клеток тестикул ягненка выявлено только 5 однонуклеотидных замен, из которых 1 синонимичная и 4 несинонимичные.

6. Впервые выявлен факт генетической рекомбинации у каприпоксвирусов, определение полногеномной последовательности рекомбинантного вакциноподобного изолята Saratov/2017 и рекомбинационный анализ позволили идентифицировать 27 сайтов рекомбинации: доминантным родительским вирусом является вакцинный штамм типа Neethling, а минорным – кенийский KSGP-подобный изолят.

7. Применение разработанного методического подхода с использованием УФ-ловушек для отлова и идентификации мокрецов позволило отнести мокрецов рода *Culicoides* к потенциальным переносчикам вируса ЗУД КРС в разных климатических условиях РФ, что дополняет инструментарий эпизоотологических исследований при ЗУД КРС и определяет факторы риска распространения трансмиссивных инфекций.

8. Использование разработанных тест-систем для анализа проб насекомых позволяет проводить скрининг наличия генома вируса ЗУД КРС в целевой популяции переносчиков: впервые установлено наличие ДНК вакциноподобного изолята вируса ЗУД КРС у домашней мухи *Musca domestica* и слепней сем. *Tabanidae*, собранных во время вспышек ЗУД КРС, при этом вирусная ДНК обнаружена как на поверхности экзоскелета насекомых, так и внутри них.

3.2 Практические предложения

Создана современная схема генодиагностики вируса ЗУД КРС на основе комплекса тест-систем ПЦР-РВ и секвенирования. В лабораторную практику внедрены валидированные согласно требованиям МЭБ тест-системы:

Методические рекомендации по выявлению генома каприпоксвирусов с помощью ПЦР в режиме реального времени;

Методические рекомендации по выявлению генома каприпоксвирусов методом ПЦР-РВ в молоке;

Методические рекомендации по выявлению генома вируса заразного узелкового дерматита КРС с помощью ПЦР в режиме реального времени;

Методические рекомендации по выявлению генома полевых изолятов вируса ЗУД КРС с помощью ПЦР в режиме реального времени;

Методические рекомендации по выявлению генома вакцинного штамма вируса заразного узелкового дерматита КРС типа Neethling с помощью ПЦР в режиме реального времени;

Методические рекомендации по выявлению генома вакцинного штамма вируса заразного узелкового дерматита КРС типа Neethling с помощью ПЦР в режиме реального времени;

Методические рекомендации по дифференциации ДНК вируса заразного узелкового дерматита КРС на полевые и вакциноподобные изоляты с помощью ПЦР в режиме реального времени с анализом пиков плавления высокого разрешения

СТО 00495527-0329-2019 Тест-система для выявления генома вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени;

СТО 00495527-0284-2018 Тест-система для выявления генома вируса полевых изолятов вируса ЗУД КРС методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;

СТО 00495527-0278-2018 Тест-система для выявления генома каприпоксвирусов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;

СТО 00495527-0354-2019 Тест-система для выявления генома вакцинных штаммов и вакциноподобных изолятов вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

По результатам проведённых исследований создана уникальная коллекция генетических последовательностей рекомбинантных изолятов вируса ЗУД КРС.

Разработанный энтомологический подход по исследованию потенциальных переносчиков вируса ЗУД КРС в климатических условиях РФ лег в основу «Проекта программы энтомологического надзора за переносчиками трансмиссивных инфекций сельскохозяйственных животных» и может быть использован в дальнейших исследованиях.

3.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Результаты, полученные в ходе исследований, эффективно используются в противоэпизоотическом мониторинге ЗУД КРС, изучении филогенетических и биологических характеристик вновь выявляемых изолятов вируса ЗУД КРС, а также разработке средств специфической профилактики и контроля заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Выявление генома вируса заразного узелкового дерматита (нодулярного дерматита) КРС в полевых образцах от КРС на территории РФ / А.В. Кононов, **А.В. Спрыгин**, С.В. Кононова, А.А. Нестеров, П.В. Прутников, Е.Е. Артюхова, Е.С. Кострова, И.Н. Шумилова // Ветеринария сегодня. – 2018. – № 1. – С. 29-32. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-1-29-32>.
2. Пестова, Я.Е. Энтомологические аспекты эпизоотологии заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота (обзор) / Я.Е. Пестова, А.В. Кононов, **А.В. Спрыгин** // Ветеринария сегодня. – 2019. – № 1. – С. 16-21. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2019-1-28-16-21>
3. Разработка ПЦР в режиме реального времени для выявления возбудителя полевых изолятов вируса заразного узелкового дерматита в пробах от крупного рогатого скота / Я.Е. Пестова, Е.Е. Артюхова, Е.С. Кострова, И.Н. Шумилова, А.В. Кононов **А.В. Спрыгин** // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53, № 2. – С. 422-429. doi: 10.15389/agrobiology.2018.2.422rus.
4. Сезонная активность самок мокрецов рода *Culcioides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) в различных регионах Российской Федерации / **А.В. Спрыгин**, Г. Беллис, В.И. Павелко, М.А. Пасунькина, А.В. Кононов // Паразитология. – 2020. – Т. 54, вып. 3. – С. 231-246. doi: 10.31857/S1234567806030049
5. Тест-системы ПЦР для выявления генома каприплексвирусов и вируса заразного узелкового / **А.В. Спрыгин**, Я.Е. Пестова, Е.С. Кострова, Е.Е. Артюхова, С.В. Кононова, О.П. Бьядовская, А.В. Кононов// Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54, № 2. – С. 347-458. doi: 10.15389/agrobiology.2019.2.347rus

Публикации в изданиях, включенных в базу данных Scopus/Web of science

6. Analysis and insights into recombination signals in lumpy skin disease virus recovered in the field // **A. Sprygin**, Y. Babin, Y. Pestova, S. Kononova, D.B. Wallace, A. Van Schalkwyk, O. Byadovskaya, V. Diev, D. Lozovoy, A. Kononov // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, N 12: e0207480 doi: 10.1371/journal.pone.0207480. eCollection 2018.
7. A real time high-resolution melting PCR assay for detection and differentiation among sheep pox virus, goat pox virus, field and vaccine strains of lumpy skin disease virus // Y. Pestova, O. Byadovskaya, A. Kononov, **A. Sprygin** // Molecular and Cellular Probes. – 2018. – Vol. 41. – P. 57-60. doi: 10.1016/j.mcp.2018.08.003.
8. A screening real time PCR assay for the universal detection of lumpy skin disease virus DNA / **A. Sprygin**, O. Byadovskaya, S. Kononova, V. Zakharov, Ya. Pestova, P. Prutnikov, A. Kononov // BMC Research Notes. – 2019. – Vol. 12, N 1. – P. 371. doi: 10.1186/s13104-019-4412-z.
9. Complete genome sequence of the lumpy skin disease virus recovered from the first outbreak in the Northern Caucasus of Russia in 2015 / **A. Sprygin**, Yu. Babin, A. Pestova, S. Kononova, O. Byadovskaya, A. Kononov // Genome Announcements. – 2019. – Vol. 8: e01733-18. doi.org/10.1128/MRA.01733-18.
10. *Culicoides* biting midges (Diptera, *Ceratopogonidae*) in various climatic zones of Russia and adjacent lands / **A.V. Sprygin**, O.A. Fiodorova, Y.Y. Babin, N.P. Elatkin, B. Mathieu, M.E. England, A.V. Kononov // J. Vector Ecology. – 2014. – Vol. 39, N 2. – P. 306-315. doi: 10.1111/jvec.12105

11. Detection of vaccine lumpy skin disease virus in cattle and *Musca domestica* L. flies in an outbreak of lumpy skin disease in Russia in 2017/ **A. Sprygin**, Ya. Pestova, P. Prutnikov, A. Kononov // *Transbound Emerg Dis.* – 2018. – Vol. 65, N 5. – P. 1137-1144. doi:10.1111/tbed.12897.
12. Emergence of a new lumpy skin disease virus variant in Kurgan Oblast, Russia, in 2018 / A. Kononov, P. Prutnikov, O. Byadovskaya, S. Kononova, V. Rusaleev, Ya Pestova, **A. Sprygin** // *Archives of Virology.* – 2020. – Vol. 165, N 6. – P. 1343-1356 <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04607-5>
13. Epidemiological characterization of lumpy skin disease outbreaks in Russia in 2016 / **A. Sprygin**, E. Artyuchova, Yu. Babin, P. Prutnikov, E. Kostrova, O. Byadovskaya A. Kononov // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2018. – Vol. 65, N 6. – P. 1514-1521. doi: 10.1111/tbed.12889.
14. Evidence of recombination of vaccine strains of lumpy skin disease virus with field strains, causing disease / **A. Sprygin**, Ya. Pestova, O. Bjadovskaya, P. Prutnikov, N. Zinyakov, S. Kononova, O. Ruchnova, D. Lozovoy, I. Chvala A. Kononov // *PLOS One.* – 2020. – Vol. 15, N 5: e0232584. doi: 10.1371/journal.pone.0232584. eCollection 2020.
15. Performance of the currently available DIVA real-time PCR assays in classical and recombinant lumpy skin disease viruses. /Byadovskaya O, Pestova Y, Kononov A, Shumilova I, Kononova S, Nesterov A, Babiuk S, Sprygin A. // *Transbound Emerg Dis.* – 2020. – doi: 10.1111/tbed.13942.
16. Transmission of lumpy skin disease virus: a short review / **A. Sprygin**, Ya. Pestova, D.B. Wallace, E. Tuppurainen, A.V. Kononov // *Virus Research.* – 2019. – Vol. 269: 197637. doi: 10.1016/j.virusres.2019.05.015.

Патенты

17. Патент 2658493 Российская Федерация, МПК С12Q 1/686 (2006.01). Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченый зонд, способ и тест-система ПЦР в режиме реального времени для выявления генома каприпоксвирусов / **А.В. Спрыгин**, А.В. Кононов, О.П. Бьядовская Е.Е. Артюхова, Е.С. Кострова, А.А. Нестеров, И.Н. Шумилова; ФГБУ «ВНИИЗЖ».- № 2017130118; заявл. 24.08.2017; опубл. 21.06.2018, Бюл. № 18. - Введ. с 24.08.2017 по 24.08. 2037
18. Патент 2668398 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68 (2006.01). Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченый зонд, способ и тест-система для выявления генома полевых изолятов вируса заразного узелкового дерматита (нодулярного дерматита) КРС в реакции полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / **А.В. Спрыгин**, А.В. Кононов, О.П. Бьядовская, Е.Е. Артюхова, Е.С. Кострова, А.А. Нестеров, П.В. Прутников; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - № 2017124318; заявл. 07.07.2017; опубл. 28.09.2018, Бюл. № 28. - Введ. с 07.07. 2017
19. Патент 2699195 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68 (2006.01) Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченные зонды, способ и тест-система для дифференциации генома вакцинного штамма и полевого изолята вируса заразного узелкового дерматита КРС с дополнительной детекцией генома каприпоксвирусов с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / **А.В. Спрыгин**, А.В. Кононов, О.П. Бьядовская Я.Е. Пестова, Е.С. Кострова, А.А. Нестеров, П.В. Прутников, С.В. Коконова ФГБУ «ВНИИЗЖ». - № 2018118751; заявл.21.05.18. опубл.03.09.2019
20. Патент 2714045 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68 (2019.08) Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченый зонд, способ и тест-система

для выявления генома вируса заразного узелкового дерматита (нодулярного дерматита) КРС в реакции полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / **А. В. Спрыгин**, А.В. Кононов, О.П. Бьядовская, С. Кононова, А.А. Нестеров, И.Н. Шумилова, Я.Е. Пестова, П.В. Прутников. ФГБУ «ВНИИЗЖ»}. - № 2019111017; заявл. 11.04.2019; опубл. 11.02.2020, Бюл. № 5.

Подписано в печать 22.09.21

Формат 60x90 1/16. Усл. печ. л. 2

Тираж 80 экз.

Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных»