СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2016, том 51, № 6, с. 853-860

Ветеринарная вирусология, микробиология, паразитология

УДК 619:578:57.083.2 doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.853rus

ПЕРМИССИВНОСТЬ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК СИНОВИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ ЯГНЕНКА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА БОЛЕЗНИ АКАБАНЕ

Е.А. БАЛАШОВА, Е.И. БАРЫШНИКОВА, В.М. ЛЫСКА, О.Л. КОЛБАСОВА, А.В. ЛУНИЦИН, Д.В. КОЛБАСОВ

В связи с многообразием и разносторонностью экономических и туристических связей с ближним и дальним зарубежьем не исключен случайный, а иногда и целенаправленный занос на территорию Российской Федерации возбудителей экзотических инфекций, в том числе болезни Акабане. Болезнь Акабане — вирусная трансмиссивная инфекция, периодические вспышки которой сопровождаются абортами, рождением мертвых, недоношенных или имеющих врожденные уродства (артрогрипоз, водянка головного мозга) телят, ягнят и козлят. Вирус болезни Акабане может персистировать как в организме животных, так и in vitro в перевиваемых культурах клеток. Во Всероссийском НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии была изучена чувствительность перевиваемой культуры клеток почки африканской зеленой мартышки (CV-1) к вирусу болезни Акабане. В этой культуре вирус болезни Акабане вызывал цитопатические изменения, выражающиеся в округлении клеток с цитолизом и отслоением клеточного монослоя через 48 ч после заражения. В представляемой работе впервые показано, что вирус болезни Акабане индуцирует цитоморфологические изменения в первичной диплоидной культуре клеток синовиальной мембраны ягненка, полученной по оригинальной методике, и эта культура пригодна для его накопления в титре, достаточном для проведения исследований и диагностики. Ранее сообщалось, что культура клеток синовиальной мембраны ягненка чувствительна к лентивирусам мелких жвачных: вирусу артрита-энцефалита коз и вирусу Visna Maedi овец. Культуру клеток получали методом выращивания тканевых эксплантатов синовиальной мембраны ягненка. Монослой клеток заражали вирусом болезни Акабане. Цитопатическое действие вируса болезни Акабане регистрировали на 4-е сут после заражения. Оно характеризовалось образованием симпластов, которые за счет слияния инфицированных клеток увеличивались в размере на 5-6-е сут. Активность вируса болезни Акабане штамма B8935 составила 5,0±0,25 lg ТЦД$_{50}$/см^3, штамма P — 6,0±0,25 lg ТЦД$_{50}$/см^3. До трех пассажей, а также после замораживания первичная культура клеток сохраняла вируспродуцирующую активность, а вирус болезни Акабане — инфекционные свойства. Клетки синовиальной мембраны ягненка можно пересевать повторно при культивировании, а избыток диплоидной культуры, как и перевиваемые клетки, — консервировать замораживанием, восстанавливая по мере необходимости. При этом целесообразно использовать штамм диплоидных клеток синовиальной мембраны ягненка. Еще одно преимущество получаемой самостоятельно первичной культуры клеток синовиальной мембраны ягненка по сравнению с клеточными линиями обезьян в том, что последние служат источником вируса герпеса B.

Ключевые слова: культура клеток синовиальной мембраны ягненка, вирус болезни Акабане, *Orthobunyavirus*.

В связи с расширением экономических связей России с ближним и дальним зарубежьем и развитием туризма возможно случайное проникновение возбудителей экзотических инфекций на территорию нашей страны. Кроме того, из-за проявлений международного терроризма реальную угрозу представляет биологический терроризм — целенаправленный занос возбудителей опасных инфекций. К их числу относится вирус болезни Акабане — трансмиссивное заболевание, периодические вспышки которого сопровождаются абортами, рождением мертвых, недоношенных или имеющих врожденные уродства (артрогрипоз, водянка головного мозга) телят (1-4), ягнят и козлят (5). Антитела к вирусу болезни Акабане обнаружены у буйволов, лошадей, верблюдов, свиней, обезьян (6-8). Описано энцефалитное действие вируса болезни Акабане на мышей, хомячков, морских свинок и куриные эмбрионы (9, 10). Вирус не оказывает патологического воздействия на организм человека, но в Японии у нескольких человек были обнаружены задерживающие гемагглютинацию антитела к вирусу Акабане (11). Инфекционный агент заболевания относится к роду *Orthobunyavirus* се-

мейства *Bunyaviridae* серологической группы Симбу, в которую входят вирусы болезней Айно, Шамонда, Шмалленберга (12).

Вирус болезни Акабане передается через клещей и комаров, что обеспечивает формирование стойких природных очагов в суровых климатических условиях и создает возможность расширения круга позвоночных хозяев. Длительное сохранение вирусной популяции в восприимчивых позвоночных способствует быстрому распространению болезни среди диких и домашних животных в благоприятный для кровососущих насекомых климатический период (13). Вирус болезни Акабане выделен от животных на территории Японии (14, 15), Израиля (16), Кореи (17-19), Австралии (20), Турции (21), на Кипре (22), в Сирии (23), Судане (24), Кении (25). Широкое распространение, высокая контагиозность и причиняемый экономический ущерб — причины, по которым необходимо изучение и контроль этого патогена. Основной лабораторной моделью при исследовании вирусов животных служат перевиваемые культуры клеток, а в их отсутствие — первичные культуры.

Вирус болезни Акабане способен персистировать как в организме животных, так и in vitro в перевиваемых культурах клеток. В разное время в ряде зарубежных работ сообщалось, что к вирусу болезни Акабане чувствительны перевиваемые культуры клеток легких хомячка (HmLu-1), почки африканской зеленой мартышки (Vero), почки новорожденного сирийского хомячка (BHK-21-W12), почки свиньи (PK-15), почки кролика (RK-13), почки эмбриона теленка (BEK) (26-28).

В Российской Федерации исследования вируса болезни Акабане, проводились только во Всероссийском НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ). Была охарактеризована морфология этого патогена (29), разработан метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для выявления генома вируса болезни Акабане (30), изучена чувствительность к вирусу у культуры клеток Vero (31) и почки африканской зеленой мартышки CV-1 (32).

В российских коллекциях имеются перевиваемые культуры клеток, чувствительные к вирусу Акабане. Однако в качестве альтернативы важно располагать чувствительными первичными культурами клеток (с доказательством их преимуществ или выявлением недостатков), которые могут быть получены в любой оборудованной лаборатории. Во ВНИИВВиМ запатентован и депонирован (33) штамм диплоидных клеток синовиальной мембраны ягненка *Ovis aries*, который используется для создания первичной культуры. Отмечается, что эта культура стабильна по биологическим характеристикам (33) и на ранних пассажах чувствительна (как и субкультуры) к лентивирусам мелких жвачных — вирусу артрита-энцефалита коз и вирусу Visna Maedi овец (33, 34).

В представляемой работе впервые показано, что вирус болезни Акабане вызывает цитоморфологические изменения в диплоидной культуре клеток синовиальной мембраны ягненка, полученной по разработанной ранее методике (34). Эта культура пригодна для накопления вируса в титре, достаточном для проведения исследований и диагностики.

Мы оценили первичную культуру клеток синовиальной мембраны ягненка в качестве лабораторной модели для накопления и титрования вируса болезни Акабане.

Методика. Вирус болезни Акабане (штаммы B8935 и P) получен из Государственной коллекции микроорганизмов ВНИИВВиМ. Донором ткани для первичной культуры клеток синовиальной мембраны был 3-суточный ягненок (выращен в секторе подготовки подопытных животных ВНИИВВиМ).

При культивировании использовали минимальную среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM, «HyClone Laboratories, Inc.», США) с двойным набором аминокислот и витаминов, фетальную сыворотку крови крупного рогато скота (КРС) («HyClone Laboratories, Inc.», США), антибиотики (натриевая соль бензилпенициллина — 150 ЕД/см^3, гентамицин — 100 мкг/см^3) и диспергирующий раствор — смесь 0,02 % раствора версена («Sigma», США) и 0,25 % раствора трипсина («Sigma», США) в соотношении 2:1, подогретый до 37 °С.

Для получения культуры клеток применяли метод выращивания растущих тканевых эксплантатов (34). В асептических условиях отбирали скакательные и запястные суставы, удаляли кожный покров и обрабатывали 96 % спиртом в течение 15-30 с. Изолированную синовиальную мембрану переносили в чашку Петри с питательной средой DMEM, содержащей 2 % фетальную сыворотку КРС и антибиотики, механически измельчали на фрагменты размером 1-2 мм, затем трижды отмывали средой того же состава. Эксплантаты помещали в культуральные флаконы с питательной средой DMEM с 10 % фетальной сыворотки КРС и набором антибиотиков и инкубировали в атмосфере с содержанием CO_2 до 5 % при 38 °С при относительной влажности воздуха 90 %. При пересеве первичной культуры получили диплоидные клетки синовиальной мембраны ягненка, которые использовали в исследованиях.

Культуру клеток синовиальной мембраны ягненка инокулировали вирусосодержащей культуральной жидкостью из перевиваемой культуры клеток CV-1 с инфекционной активностью $10^{4,0}$ lg ТЦД$_{50}$/см^3 в разведении 1:100 (уровень культуральной жидкости над монослоем — 3-4 мм). До использования инокулят хранили при –60±0,5 °С. Вирус болезни Акабане культивировали без адсорбции на клетках и смены питательной среды по общепринятым методикам. Контролем служила интактная культура клеток синовиальной мембраны ягненка. Инфицированную и интактную культуры клеток синовиальной мембраны ягненка инкубировали в термостате при 37±0,5 °С в течение 8 сут, ежедневно просматривая.

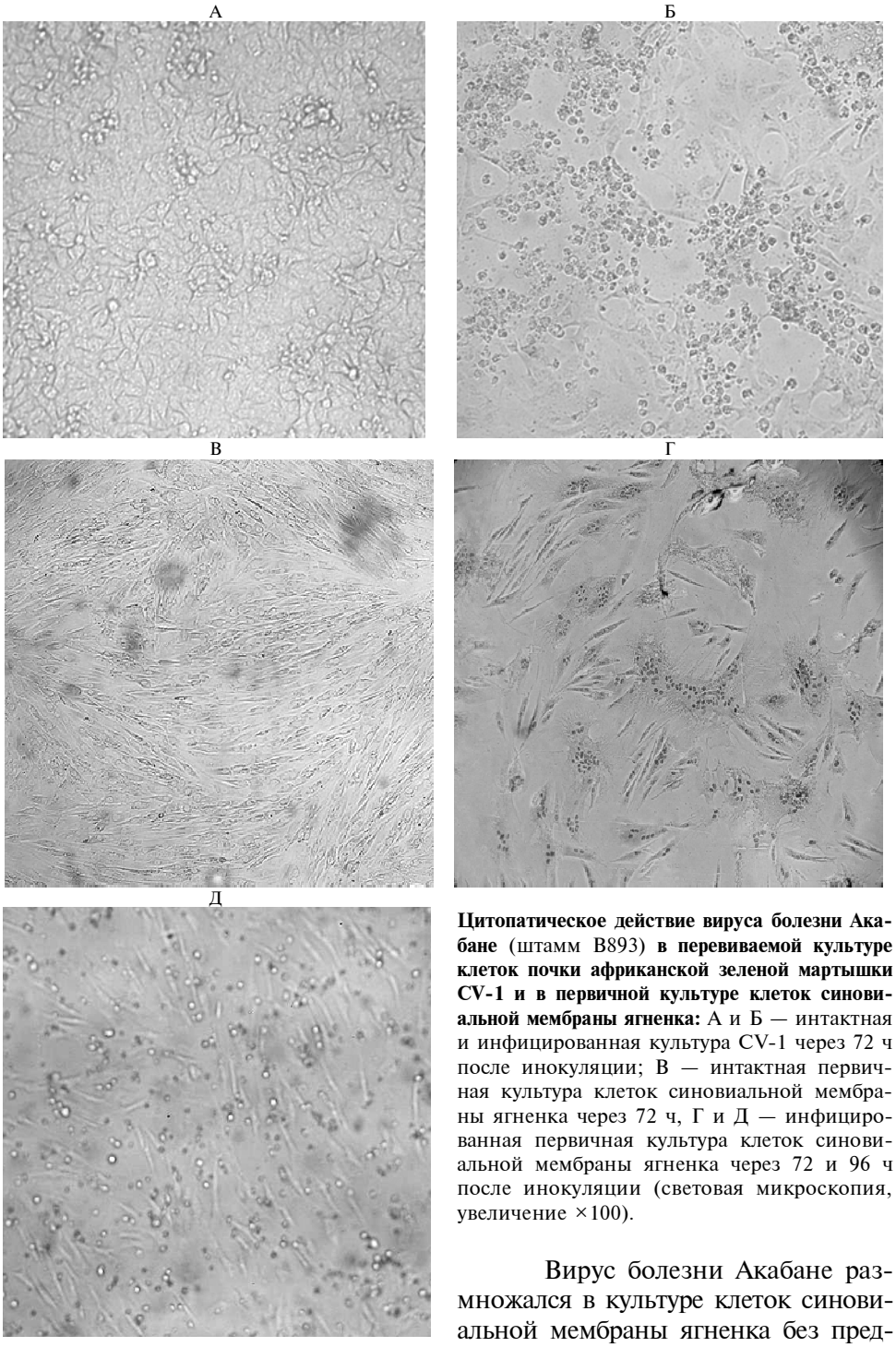
При титровании (в 3 повторностях) вируса болезни Акабане культуру клеток синовиальной мембраны ягненка выращивали в 96-луночных полистироловых планшетах. В каждую лунку вносили по 150 мкл вирусосодержащей (разведения от 1:10 до 1:10 000 000) поддерживающей среды DMEM и помещали в инкубатор с содержанием углекислого газа CO_2 5 % и относительной влажностью 90 %. Для сравнения чувствительности также использовали культуры Vero и CV-1 (получены из Коллекции культур клеток ВНИИВВиМ).

Статистическая обработка данных включала определение среднего и среднего отклонения.

Результаты. В перевиваемых культурах клеток Vero (31), а также CV-1 (рис., А, Б) вирус болезни Акабане вызывал цитопатические изменения, выражающиеся в округлении клеток с последующим цитолизом и отслоением клеточного монослоя через 48 ч после заражения. В культуре клеток синовиальной мембраны ягненка также происходили цитоморфологические трансформации (см. рис., В-Д).

Клеточная популяция синовиальной мембраны ягненка при субкультивировании превращалась из первичной культуры в клеточную субкультуру. На 6-е сут культивирования мы наблюдали обширные клеточные колонии, которые, сливаясь между собой, превращались в конфлюентный монослой. Клетки формировали ярко выраженные разнонаправленные потоки и тяжи, характерные для культур фибробластоподобного типа (см.

рис., В). Как оказалось, культура клеток синовиальной мембраны ягненка жизнеспособна и не подвержена морфологическим изменениям.



Цитопатическое действие вируса болезни Акабане (штамм В893) **в перевиваемой культуре клеток почки африканской зеленой мартышки CV-1 и в первичной культуре клеток синовиальной мембраны ягненка:** А и Б — интактная и инфицированная культура CV-1 через 72 ч после инокуляции; В — интактная первичная культура клеток синовиальной мембраны ягненка через 72 ч, Г и Д — инфицированная первичная культура клеток синовиальной мембраны ягненка через 72 и 96 ч после инокуляции (световая микроскопия, увеличение ×100).

Вирус болезни Акабане размножался в культуре клеток синовиальной мембраны ягненка без предварительной адаптации. В инфицированной культуре (в отличие от интактной) мы обнаружили значительные цитопатические изменения структуры. Культура не утрачивала чувствительности к вирусу болезни Акабане до 12 пассажа (срок наблюдения).

Явное цитопатическое действие вируса болезни Акабане в зараженной первичной культуре, выражающееся в округлении клеток с образованием симпластов, регистрировали через 72 ч после заражения (см. рис., Г). Часть клеток увеличивалась в размерах и разрушалась, происходило образование «окон» с последующим расширением межклеточного пространства. Выход частиц из пораженных клеток, вероятно, осуществлялся посредством эндоцитоза и клеточного лизиса. За счет слияния симпластов их размеры увеличивались через 96-120 ч. Через 120-144 ч наблюдали прогрессирующее отслоение клеток от стенок, после чего большая часть монослоя разрушалась. В интактной культуре подобные изменения не регистрировали.

При наступлении 80-90 % цитопатического действия в культуре клеток синовиальной мембраны ягненка через 96-120 ч (см. рис., Д) вирусосодержащую культуральную жидкость замораживали при –60±0,5 °С для выхода внутриклеточного вируса после размораживания. Размороженную культуральную жидкость титровали в 96-луночных полистероловых планшетах (табл.). Таким образом, после трех последовательных пассажей вируса болезни Акабане в культуре клеток синовиальной мембраны ягненка вирусосодержащий материал в случае штамма Р имел инфекционную активность 5,0±0,05 lg ТЦД$_{50}$/см^3, штамма В8935 — 6,0±0,05 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Следовательно, до трех пассажей (срок наблюдения) первичная культура клеток сохраняла вируспродуцирующую активность, а вирус болезни Акабане — инфекционные свойства. Цитоморфологические изменения в культуре клеток синовиальной мембраны ягненка служат техническим тестом для получения качественных результатов при оценке активности вируса болезни Акабане титрованием.

Динамика цитопатического действия вируса болезни Акабане в первичной культуре клеток синовиальной мембраны ягненка

Разведение вируса	1-е сут	2-е сут	3-и сут	4-е сут	5-е сут	6-е сут	7-е сут	8-е сут
Штамм Р								
1:10	–	–	+	+	+	+	+	+
1:100	–	–	–	+	+	+	+	+
1:1000	–	–	–	–	+	+	+	+
1:10 000	–	–	–	–	+	+	+	+
1:100 000	–	–	–	–	–	+	+	+
1:1 000 000	–	–	–	–	–	–	–	–
1:10 000 000	–	–	–	–	–	–	–	–
Штамм В8935								
1:10	–	–	+	+	+	+	+	+
1:100	–	–	+	+	+	+	+	+
1:1000	–	–	–	+	+	+	+	+
1:10 000	–	–	–	–	+	+	+	+
1:100 000	–	–	–	–	–	+	+	+
1:1 000 000	–	–	–	–	–	+	+	+
1:10 000 000	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание. «+» — наличие, «–» — отсутствие действия. Титрование выполняли в 3 повторностях.

Мы сравнили чувствительность культур клеток Vero, CV-1 и синовиальной мембраны ягненка к вирусу болезни Акабане и получили следующие показатели вирусной активности, которые различались незначительно, — соответственно 5,85±0,05; 5,8±0,09 и 6,0±0,05 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Следовательно, можно констатировать, что все перечисленные культуры пригодны в качестве лабораторной модели для работы с вирусом болезни Акабане. Однако преимущество первичной диплоидной культуры клеток в том, что она наиболее чувствительна, ее получают в специализированной лаборатории самостоятельно из доступной донорской ткани, то есть не требуется обращаться в музей культур. Клетки синовиальной мембраны ягненка можно пересевать повторно при культивировании, а избыток диплоид-

ной культуры, как и перевиваемые клетки, — консервировать замораживанием, восстанавливая по мере необходимости. Целесообразно использовать штамм диплоидных клеток синовиальной мембраны ягненка, а не собственно первичную культуру, так как физиологическое состояние диплоидных линий лучше. Предпочтение перевиваемым клеточным линиям обычно отдается из соображений сохранения животных-доноров, снижения затрат и возможности управления качеством клеток. Однако в случае клеток обезьян, например, надо учитывать острый недостаток этих животных, их дороговизну и тот факт, что они служат источником потенциальной инфекционной опасности как носители вируса герпеса В.

Культура клеток синовиальной мембраны ягненка близка к клеткам одного из видов животных с естественной восприимчивостью к патогену, поэтому в последующем она может быть использована для аттенуации и получения живой вакцины. Кроме того, следует изучить пригодность этой культуры для первичного выделения вируса из патологического материала: первичные культуры клеток более чувствительны и лучше подходят для подобных целей.

Итак, культуру клеток синовиальной мембраны ягненка как пермиссивную в отношении вируса болезни Акабане можно использовать наряду с клеточными линиями Vero и CV-1 для получения культурального антигена при постановке серологических реакций с целью диагностики заболевания. Вирус болезни Акабане вызывает характерный цитопатический эффект в инфицированном монослое указанных культур, все они могут служить лабораторной моделью для изучения, накопления и титрования вируса, а полученное на их основе вирусное сырье — использоваться в вирусологических и молекулярно-генетических исследованиях. В то же время преимущество предложенной первичной диплоидной культуры клеток в большей чувствительности и доступности для самостоятельного получения. Ее можно пересевать, а избыток консервировать замораживанием, восстанавливая по мере необходимости.

ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии,
601125 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1,
e-mail: balashowa.l@yandex.ru

Поступила в редакцию 31 июля 2016 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2016, V. 51, № 6, pp. 853-860

PERMISSIVITY OF LAMB SYNOVIAL MEMBRANE CELL CULTURE FOR AKABANE DISEASE VIRUS

E.A. Balashova, E.I. Baryshnickova, V.M. Lyska, O.L. Kolbasova, A.V. Lunitsin, D.V. Kolbasov

All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 1, ul. Akademika Bakuleva, pos. Vol'ginskii, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601125 Russia, e-mail balashowa.l@yandex.ru
Received July 31, 2016 doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.853eng

Abstract

Presently, due to the variety and diversity of economic and tourist ties of Russia, episodes of accidental or maybe purposeful (i.e., biological terrorism) entry of exotic infectious pathogens including Akabane disease to the Russian Federation should not be excluded. Akabane disease is a viral transmissible infection. Its recurrent outbreaks are characterized by abortions, still or premature births, or malformations (e.g., arthrogryposis and/or hydrocephaly) for calves, lambs and kids. Akabane disease virus can persist both in animal body and in vitro (e.g., in continuous cell lines). A study of the sensitivity of African green monkey kidney cell line to Akabane virus carried out earlier showed that Akabane virus caused definite cytopathic changes resulting in cell rounding followed by cytolysis and detachment of the cell monolayer within 48 hours post infection. In this paper we first

reported on the cytomorphological changes caused by Akabane virus in the primary lamb synovial membrane diploid cell culture (LSMCC) prepared according to an earlier developed procedure, and on a suitability of this culture for the virus accumulation in titers sufficient for study and making diagnosis. It has been formerly determined that the lamb synovial membrane cell culture is sensitive to small ruminant lentiviruses like caprine arthritis encephalitis virus or Visna-Maedi virus in sheep. LSMCC was prepared using a method for tissue explant culture. On day 4 post inoculation of the cell monolayer with Akabane virus the cytopathic effect appeared which manifested as formation of symplasts that grew larger due to their fusion on day 5 to 6. The Akabane virus activity was 6.0±0.05 lg $TCID_{50}/cm^3$ for strain V8935, and 5.0±0.05 lg $TCID_{50}/cm^3$ for strain P. As many as three passages and also the primary cell culture (after freezing) kept the virus-producing activity, and the Akabane virus retained its infective properties. The lamb synovial membrane cells can be re-cultured, and excessive diploid culture can be frozen to preserve and thawed as required. It is expedient to use a strain of diploid lamb synovial membrane cells deposited and patented earlier. One more advantage of the primary LSMCC as compared to monkey cell lines is that the latter ones may be a source of simian herpes B virus.

Keywords: lamb synovial membrane cell culture, Akabane disease, *Orthobunyavirus*.

REFERENCES

1. Omori T., Inaba Y., Kurogi H., Miura Y., Nobuto K., Motumoto M. Viral abortion arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle in Japan 1972-1974. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1974, 81: 447-458.
2. Kono R., Hirata M., Kaji M., Goto Y., Ikeda S., Yanase T., Kato T., Tanaka S., Tsutsui T., Imada T., Yamakawa M. Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan. *Vet Res.*, 2008, 13: 4-20.
3. Oem J.K., Yoon H.J., Kim H.R., Roh I.S., Lee K.H., Lee O.S., Bae Y.C. Genetic and pathogenic characterization of Akabane viruses isolated from cattle with encephalomyelitis in Korea. *Vet. Microbiol.*, 2012, 158(3-4): 259-266 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.017).
4. Della-Porta A., Murray M., Cybinski D. Congenital bovine epizootic artrogryposis and hydranencephaly in Australia. Distribution of antibodies to Akabane virus in Australian cattle after the 1974 epixootic. *Aust. Vet. J.*, 1976, 52: 496-501 (doi: 10.1111/j.1751-0813.1976.tb06983.x).
5. Kalmar E., Peleg B., Savir D. Arthogryposis-hydranencephaly syndrome in newborn cattle, sheep and goats. Serological survey for antibodies against the Akabane virus. *Ref. Vet.*, 1975, 32: 47-54.
6. Al-Busaidy S.M., Hamblin C., Taylor V. Neutralising antibodies to Akabane virus in free-living wild animals in Africa. *Tropical Animal Health and Production*, 1987, 19: 197-202.
7. Al-Busaidy S.M., Mellor P.S., Taylor W.P. Prevalence of neutralizing antibodies to Akabane virus in Arabian Peninsula. *Vet. Microbiol.*, 1988, 17(2): 141-149.
8. Oya A. *Annual reports of WHO Regional Reference Center for Arbovirus.* National Institute of Health, Tokyo, 1971.
9. Nakajima Y., Takahashi E., Konno S. Encephalomyelitis in mice experimentally infected with Akabane virus. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Japan)*, 1979, 19: 47-52.
10. Miah A., Spradbrow P. The growth of Akabane virus in chicken embryos. *Research in Veterinary Science*, 1978, 25: 253-254.
11. Nakamura T., Matsuyama T., Okuno T., Oya A. Arbovirus antibody survey. *Igaku no Ayumi (in Japanese)*, 1967, 60: 72-73.
12. Nikitina E.G., Sal'nikov N.I., Balashova E.A., Tsybanov S.Zh., Kolbasov D.V. Akabane and Schmallenberg diseases: similarities and differences. *Agricultural Biology*, 2013, 4: 48-52 (doi: 10.15389/agrobiology.2013.4.48eng) (in Engl.).
13. Matumoto M., Inaba Y. Akabane disease and Akabane virus. *Kitasato Arch. Exp. Med.*, 1980, 53(1-2): 1-21.
14. Kato T., Shirafuji H., Tanaka S., Sato M., Yamakawa M., Tsuda T., Yanase T. Bovine arboviruses in *Culicoides* biting midges and sentinel cattle in Southern Japan from 2003 to 2013. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2015, 63(6): 160-172.
15. Motumoto M., Oya A., Ogata T., Kobayashi I., Nakamure T., Takahashi H., Kitacka M. Isolation of arbor viruses from mosquitoes collected at live-stook pens in Gumma Prefecture in 1959. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 1960, 13: 191-198.
16. Brinner J., Tsuda T., Yadin H., Chai D., Stram Y., Kato T. Serological and clinical evidence of a teratogenic Simbu serogroup virus infection of cattle in Israel 2001-2003. *Veterinaria Italiana*, 2004, 40(3): 119-123.
17. Yang D.K., Kim B.H., Kweon C.H., Nah J.J., Kim H.J., Lee K.W., Yang Y.J., Mun K.W. Serosurveillance for Japanese encephalitis, Akabane, and Aino viruses for Thoroughbred horses in Korea. *J. Vet. Sci.*, 2008, 9(4): 381-385.
18. Oem J.K., Kim Y.H., Kim S.H., Lee M.H., Lee K.K. Serological characteristics of affected cattle during an outbreak of bovine enzootic encephalomyelitis caused by Akabane virus.

Trop. Anim. Health Prod., 2014, 46: 261-263.
19. Oem J.K., Lee K.H., Kim H.R., Bae Y.C., Chung J.Y., Lee O.S., Roh I.S. Bovin epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus infection in Korea. *J. Comp. Pathol.*, 2012, 147(2-3): 101-105 (doi: 10.1016/j.jcpa.2012.01.013).
20. Murray M.D. Akabane epizoonotis in New South Wales: evidence for the long-distance dispersal of the biting midge *Culicoides brevitarsis*. *Australian Veterinary Journal*, 1987, 64(10): 305-308.
21. Yilmaz H., Hoffmann B., Turan N., Cizmecigil U.Y., Richt J.A., Van der Poel W.H. Detection and partial sequencing of Schmallenberg virus in cattle and sheep in Turkey. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2014, 14: 223-225.
22. Sellers R., Herniman K. Neutralising antibodies to Akabane virus in ruminants in Ciprus (transmitted by *Culicoides* midges). *Trop. Anim. Health Prod.*, 1981, 13(1): 57-60.
23. Sellers R., Pedgley D. Possible windborne spread to western Turkey of bluetongue virus in 1977 and of Akabane virus in 1979. *Journal of Hygiene*, 1995, 1: 149-158.
24. Elhassan A.M., Mansour M.E., Shamon A.A., EI Hussein A.M. A serological survey of Akabane virus infection in cattle in Sudan. *ISRN Veterinary Science*, 2014: Article ID 123904 (doi: 10.1155/2014/123904).
25. Metselaar D., Robin Y. Akabane virus isolated in Kenya. *Vet. Rec.*, 1976, 99(5): 86 (doi: 10.1136/vr.99.5.86-a).
26. Anderson A.A., Campbell C.H. Experimental placental transfer of Akabane of virus in the hamster. *Am. J. Vet. Res.*, 1978, 39: 301-304.
27. Kurogi H., Inaba Y., Takahashi H., Sato K., Akashi H., Satoda K., Omori T. An attenuated strain of Akabane virus: a candidate for live virus vaccine. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)*, 1979, 19(1-2): 12-22.
28. Kurogi H., Inaba Y., Takahashi H., Sato K., Omori T., Miura Y., Goto Y.M., Fujiwara Y., Hatano Y., Kodama K., Fukuyama S., Sasaki N., Matumoto M. Epizootik congenital artrogryposis-hydranencephaly syndrom in cattle of Akabane virus from affected fetuses. *Arch. Virol.*, 1976, 51: 67-74.
29. Malakhova M.S., Balashova E.A. *Tezisy konferentsii «Voprosy veterinarnoi virusologii, mikrobiologii i epizootologii»* [Proc. Conf. «Veterinary virology, microbiology and epizootology»]. Pokrov, 1990: 83-84 (in Russ.).
30. Nikitina E.G., Sal'nikov N.I., Katorkin S.A., Balashova E.A., Tsybanov S.Zh., Kolbasov D.V., Lunitsin A.V. Detection of Akabane virus genome in organs and blood of experimentally infected cavies. *Agricultural Biology*, 2014, 6: 67-72 (doi: 10.15389/agrobiology.2014.6.67eng) (in Engl.).
31. Kotova O.Yu., Khan E.O., Kushnir S.D., Ponomarev V.N., Yurkov S.D., Balashova E.A. *Nauchnyi zhurnal KubGau (Krasnodar)*, 2012, 83(09). Available http://www.ej.kubagro.ru/2012/09/pdf/52.pdf. No date (in Russ.).
32. Kotova O.Yu., Suvorova Yu.A., Kushnir S.D., Yurkov S.G., Balashova E.A. *Veterinariya*, 2015, 3: 57-59 (in Russ.).
33. Baryshnikova E.I., Kolbasova O.L. *Shtamm diploidnykh kletok sinovial'noi membrany yagnenka Ovis aries, ispol'zuemyi dlya virusologicheskikh issledovanii. Pat. RF 2507255. GNU NIIVViM Rossel'khozakademii. Zayavl. 23.07.2012. Opubl. 20.02.2014* [A strain of diploid cells of lamb *Ovis aries* synovial membrane for virological research. Patent RF 2507255. GNU NIIVViM RAS. Appl. July 23, 2012. Publ. February 20, 2014] (in Russ.).
34. Sidel'nikov G.D., Kolbasova O.L., Zhigaleva O.N., Tsybanov S.Zh., Kolbasov D.V. *Veterinariya*, 2009, 4: 52-55 (in Russ.).