УДК 619:578:57.083.224 doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1265rus

ПЕРМИССИВНОСТЬ КУЛЬТУР КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ВИРУСА НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА

В.И. БАЛЫШЕВА, С.П. ЖИВОДЕРОВ, Е.Ю. ПИВОВА, Н.К. БОБРОВСКАЯ, А.В. ЖИВОДЕРОВА, Л.И. АНИСИМОВА, С.Д. КУШНИР, Т.Р. УСАДОВ, С.Г. ЮРКОВ, Н.И. САЛЬНИКОВ, А.В. ЛУНИЦИН

Нодулярный дерматит крупного рогатого скота (НД, заразный узелковый дерматит, кожная бугорчатка, узелковая экзантема, dermatitis nodulares, lumpy skin disease) — трансмиссивная вирусная высококонтагиозная трансграничная эмерджентная болезнь. В 2015 году она была занесена в Республику Дагестан из Азербайджана. В 2016 году заболевание обнаружили в Краснодарском крае, затем еще в 6 областях Российской Федерации. Болезнь приводит к снижению молочной продуктивности до 50 %, потере живой массы тела, абортам и мертворождения, повреждению шкуры, нарушению воспроизводительной функции у больных особей (вплоть до полной потери фертильности у быков) и гибели животных от секундарных инфекций. Нодулярный дерматит вызывает ДНК-содержащий вирус рода *Capripoxvirus* (подсемейство *Chordopoxvirinae*, семейства *Poxviridae*). Выделение и идентификация вируса, изготовление вакцинных и диагностических препаратов во многом зависят от удачного выбора системы культивирования. Целью нашей работы было изучение культуральных свойств изолята вируса нодулярного дерматита и оптимизация условий получения вирусосодержащего материала в наиболее перспективных клеточных культурах. Вирус выделяли из проб органов (печень, легкие, селезенка, лимфатические узлы и пораженная подкожная клетчатка) от вынужденно убитых быков калмыцкой породы (хозяйства Волгоградской области, 2016 год) с характерными проявлениями клинических признаков НД. Для выделения вируса готовили 10 % суспензию образцов и вносили в культуральные флаконы (по 3 флакона для каждой культуры) со сформировавшимся монослоем клеток тестикул козленка (ТК), перевиваемыми линиями клеток почек теленка (MDBK) и кролика (RK-13/2-03). В третьем пассаже титр вируса, полученного в клетках MDBK и RK-13/2-03, составлял 4,67-5,00 lg ТЦД$_{50}$/см^3. В вирусосодержащем культуральном материале выявляли геном вируса НД методом ПЦР. Полученный штамм вируса НД был депонирован в Государственную коллекцию микроорганизмов Всероссийского НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии под номером 3161. В работе с этим штаммом вируса НД также определяли пермиссивность культур клеток кожи эмбриона лося (КЭЛ/07), почки африканской зеленной мартышки (CV-1, VERO), гибридной линии клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ ТК$^-$) × спленоцитов селезенки свиньи (A_4C_2/9к), почек овцы (ПО), кролика (RK-13/2-03) и теленка (Taurus-1). Установлено, что к вирусу чувствительны перевиваемые клеточные линии гомологичного (MDBK, Taurus-1, КЭЛ/07, ПО) и гетерологичного происхождения (RK-13/2-03, VERO, CV-1, A_4C_2/9к, СПЭВ). Впервые выявлено, что вирус НД размножается в клетках диких животных (лося), а также установлена возможность его культивирования в перевиваемых гетерологичных клеточных культурах RK-13/2-03 и A4C2/9к. Длительность культивирования вируса до проявления 95-100 % ЦПД зависела от клеточного субстрата и множественности заражения. В культурах клеток MDBK и VERO она составляла 48 ч, в Taurus-1, ПО, RK-13/2-03, CV-1 максимальные деструктивные изменения клеточного монослоя наблюдали через 48-96 ч после инфицирования. При оптимальной множественности заражения, составляющей 0,001-0,00001 ТЦД$_{50}$/кл и культивировании в поддерживающей среде, содержащей 2-5 % сыворотки крупного рогатого скота, титр вируса, полученного в культурах клеток ПО и VERO, составлял 6,0-6,8 lg ТЦД$_{50}$/см^3, в клетках RK-13/2-03 − 5,8-6,6 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Таким образом, наиболее перспективным представляется использование для накопления вируса НД клональной перевиваемой линии клеток почки кролика RK-13/2-03.

Ключевые слова: вирус нодулярного дерматита, перевиваемые культуры клеток, культура клеток кожи эмбриона лося, CV-1, VERO, MDBK, Taurus-1, цитопатическое действие.

Нодулярный дерматит крупного рогатого скота (НД) продолжает причинять значительный экономический ущерб животноводству во многих странах. В России болезнь была занесена в Республику Дагестан из Азербайджана в 2015 году (1, 2). Тогда же вспышки заболевания регистрировали в Чеченской Республике и Республике Северная Осетия — Алания. В 2016 году его обнаружили в Краснодарском крае, затем еще в шести областях Российской Федерации (3, 4). Нодулярный дерматит (заразный

узелковый дерматит, кожная бугорчатка, узелковая экзантема, dermatitis nodulares, lumpy skin disease) — трансмиссивная вирусная высококонтагиозная трансграничная эмерджентная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, узелками на коже, язвенными поражениями на слизистых оболочках и внутренних органах, истощением, увеличением лимфатических узлов и отеком кожи. НД КРС вызывает ДНК-содержащий вирус рода *Capripoxvirus* (lumpy skin disease virus, LSDV, подсемейство *Chordopoxvirinae*, семейства *Poxviridae*) (5-7). Болезнь приводит к снижению молочной продуктивности до 50 %, потере живой массы тела, абортам и мертворождению, повреждению шкуры, нарушению воспроизводительной функции у больных животных, вплоть до полной потери фертильности у быков, гибели животных от секундарных инфекций (8-10). Единственный эффективный способ борьбы с НД в регионах, где болезнь эндемична, — это вакцинация (11, 12). Для специфической профилактики нодулярного дерматита используют вирус-вакцину из аттенуированного гомологичного штамма Neethling или вакцины из гетерологичных аттенуированных штаммов вирусов оспы овец или оспы коз (13-15).

Для культивирования LSDV перспективны перевиваемые линии клеток. Они обеспечивают получение больших объемов однородного вирусосодержащего материала, который применяется при исследовании биологических, молекулярно-генетических свойств вируса, а также используется в качестве лабораторной модели для изучения его эволюции, разработки средств диагностики и специфической профилактики (16, 17). Успех разработки вакцинных и диагностических препаратов во многом зависит от удачного выбора системы культивирования. Поэтому первоначально необходимо определить чувствительность клеточных культур и степень их пермиссивности. При выборе клеточных систем мы опирались на видовую принадлежность культур (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus*), клеточный и тканевой тропизм вируса (dermis), а также на данные литературы по использованию для этих целей клеточных линий гомологичного (культуры клеток тестикул ягненка LT, тестикул плода теленка FBT, почки теленка MDBK и др.) (19-21) и гетерологичного происхождения (9).

А.В. Кононов с соавт. (22) установили, что в клетках гомологичного происхождения — субкультуре тестикул ягненка (ТЯ) и перевиваемой культуре клеток гонады козы (ЯДК-04) LSDV, выделенный из патологического материала, который был получен на территории Республики Дагестан в 2015 году, накапливался в титрах 4,5-5,5 lg $ТЦД_{50}/см^3$. Однако в некоторых случаях возникает необходимость в вирусном сырье, произведенном в гетерологичной клеточной системе, в частности при накоплении вирусного антигена для получения специфических сывороток. Использование гетерологичных клеточных систем культивирования позволяет исключить появление фоновых антител на гомологичные тканевые антигены, что затрудняет применение сывороток в диагностических исследованиях или требует дополнительных процедур по очистке антигена.

В представленной работе впервые выявлено, что вирус нодулярного дерматита размножается в клетках диких животных (лося) и установлена эффективность перевиваемых гетерологичных клеточных культур — RK-13/2-03 и A4C2/9к при его культивировании.

Нашей целью было изучение культуральных свойств изолята вируса нодулярного дерматита и оптимизация условий получения вирусосодержащего материала в наиболее перспективных клеточных культурах.

Методика. Пробы органов (печень, легкие, селезенка, лимфатические узлы) и пораженной подкожной клетчатки были получены от вынужденно убитых быков калмыцкой породы (хозяйства Волгоградской обла-

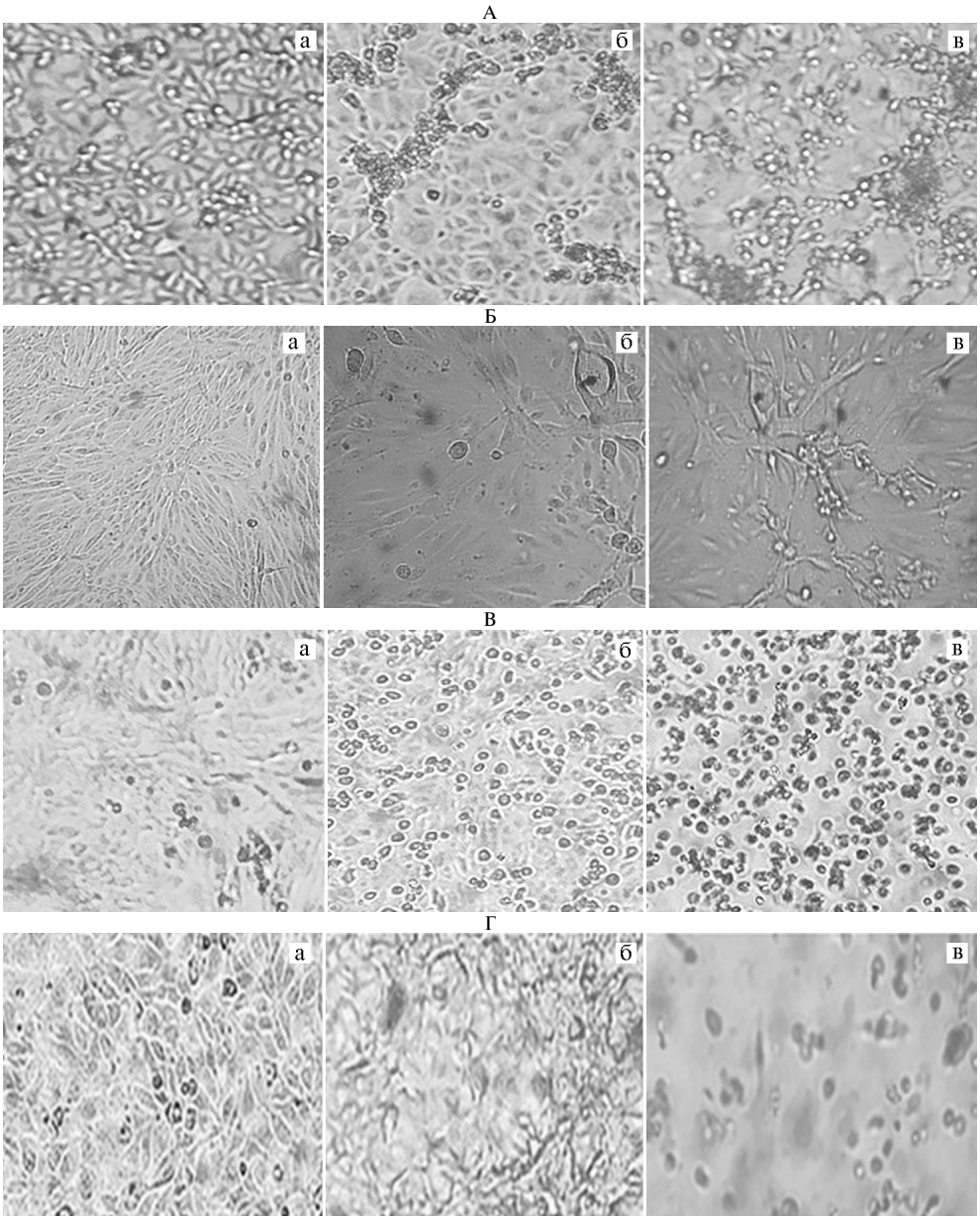
сти, 2016 год) с характерными проявлениями клинических признаков НД. Из проб готовили 10 % суспензию в среде Игла (MEM; «Sigma», США, «HyClone», США) с добавлением антибиотиков (пенициллин и стрептомицина по 200-1000 ЕД на 1 мл, нистатина 20 ЕД на 1 мл). После осветления центрифугированием при 2000 об/мин суспензию вносили в культуральные флаконы со сформировавшимся монослоем клеток. На этом этапе для выделения вируса использовали первичную культуру клеток тестикул козленка (ТК), а также перевиваемые линии клеток почки теленка (MDBK) и почки кролика (RK-13/2-03) (получены из коллекции клеточных культур ФИЦВиМ) (23). Через 1 ч после адсорбции суспензию удаляли, вносили поддерживающую среду, содержащую 2 % сыворотки КРС, и инкубировали в течение 5-6 сут при 37±0,5 °С. Флаконы с культурой клеток замораживали и хранили при –40±0,5 °С, затем культуральную жидкость оттаивали при комнатной температуре. На монослой клеток помещали 1 см^3 культуральной жидкости и проводили следующий пассаж до появления характерных признаков цитопатического действия вируса (ЦПД). Состояние монослоя клеток для определения ЦПД вируса оценивали при просмотре культуральных флаконов под инвертированным микроскопом Olympus CKX31 («Olympus Co.», Япония).

При адаптации вируса к гомологичным и гетерологичным линиям клеток применяли метод серийного пассирования. Культуры клеток кожи эмбриона лося *Alces alces* (КЭЛ/07), почки африканской зеленной мартышки (CV-1, VERO), почки эмбриона свиньи (ППК-66б), внутривидовой гибридной линии клетки почки эмбриона свиньи (СПЭВ ТК$^-$) × спленоциты селезенки свиньи (А4С2/9к), почки овцы (ПО), почки теленка (Taurus-1) выращивали в среде Игла с 10 % фетальной сыворотки КРС. При образовании сплошного монослоя (24 ч) из культуральных флаконов удаляли ростовую среду и вносили вирус со множественностью заражения 0,1-0,00001 ТЦД$_{50}$/кл. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч при 37,0±0,5 °С. После этого вносили поддерживающую среду, содержащую 2 % фетальной сыворотки КРС. Инфицированную культуру клеток инкубировали при 37,0±0,5 °С в течение 5 сут или до наступления 90-100 % ЦПД вируса. Затем культуру клеток и культуральную жидкость замораживали при –50,0±0,5 °С. При следующем пассаже культуры клеток инфицировали размороженной вирусосодержащей суспензией. О пермиссивности культур клеток судили по наличию цитопатических изменений в монослое и изменению титра вируса в процессе пассирования. Инфекционную активность вируса определяли титрованием в 1-2- суточных культурах перевиваемых линий клеток VERO или ПО, выращенных в 96-луночных микропланшетах. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД$_{50}$/см^3 (24).

Нуклеиновые кислоты выделяли с использованием набора «РИБОсорб» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Вирусную геномную ДНК выявляли по методике T.R. Bowden с соавт. (25) с олигонуклеотидными праймерами CaPV 074 F1 (5′-AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA-3′), CaPV 074 R1 (5′-AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA-3′) и гибридизационным зондом CaPV-074P1 (5′-6FAM-TGG CTC ATA GAT TTC CT-MGB-NFQ-3′). Реакционная смесь включала 10 пмоль каждого праймера, 3 пмоль флуоресцентного зонда (ЗАО «Синтол», Россия), 2,5 мкл 10× ДНК-буфера, 10 ммоль смеси dNTPs и 1,5 ед. активности рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы («Thermo Fisher Scientific», США). ПЦР в реальном времени проводили на детектирующем термоциклере Rotor Gene 6000 («Corbette Research», Австралия) по следующей программе: предварительная денатурация в течение 10 мин при 95 °С; 45 циклов амплфикации (15 с при 95 °С, 1 мин при 60 °С) (25).

Данные обрабатывали методами вариационной статистики. В таблице приведены средние значения (*M*) и стандартные ошибки средних (±SEM).

Результаты. Для выделения LSDV вирусосодержащий материал вно-



Цитопатическое действие вируса нодулярного дерматита крупного рогатого скота в перевиваемых линиях клеток почки кролика RK-13/2-03 (А)**, кожи эмбриона лося КЭЛ/07** (Б)**, почки африканской зеленной мартышки VERO** (В)**, почки овцы ПО** (Г)**:** а — контрольная культура клеток, б, в — культура клеток на 2-е и 3-и сут (для клеток ПО — на 4-е сут) после заражения (увеличение ×150, микроскоп Olympus CKX31, «Olympus Co.», Япония).

сили в культуральные флаконы (по 3 флакона для каждой культуры) со сформировавшимся монослоем клеток TK, MDBK и RK-13/2-03. В 1-м пассаже изменений в культуре не было, начиная со 2-го пассажа выявлялись незначительные изменения морфологии клеток, их округление. В 3-м пассаже наблюдали характерное цитопатическое действие вируса в культуре клеток MDBK и RK-13/2-03 (рис., А), инфицированных первоначально суспензией ткани печени: на 2-е сут инкубации в зараженной культуре кле-

ток RK-13/2-03 образовывались тяжи, на 3-и сут клетки округлялись, в то время как в контрольной культуре таких изменений не выявляли. Аналогичные изменения происходили в культуре клеток MDBK. Титр вируса в клетках MDBK и RK-13/2-03 составлял 4,67-5,00 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Полученный штамм (депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов ФИЦВиМ под номером 3161) далее использовался в работе. При инфицировании перевиваемой культуры КЭЛ/07 наблюдали аналогичные изменения (см. рис., Б) (накопление вируса — 4,5-5,5 lg ТЦД$_{50}$/см^3). В первичной культуре клеток ТК в 3-м пассаже инфекционная активность вируса была несколько ниже — 3,5 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Для адаптации штамма к перевиваемым линиям клеток и определения чувствительных к нему культур использовали линии гомологичного и гетерологичного происхождения: MDBK, Taurus-1, ПО, CV-1, VERO, RK-13/2-03, A_4C_2/9к, СПЭВ.

Характер ЦПД в разных культурах клеток был неодинаковым. Так, в RK-13/2-03 (см. рис., А) проявление ЦПД вируса было сходным с таковым при его репродукции в культуре клеток ПО (см. рис., Г): через 48 ч после заражения здесь регистрировали формирование тяжей из веретенообразных клеток, а через 72 ч — округление и отслоение инфицированных клеток от подложки с лизисом и деструкцию клеточного монослоя. В инфицированной культуре VERO (см. рис., В) наблюдалось нарастающее округление клеток, формирование включений, не свойственных нормальным (неинфицированным) клеткам, с последующим лизисом и отслоением. Инфекционная активность вируса в этих культуральных системах также различалась. Максимальные титры наблюдали в культурах клеток Taurus-1 и A_4C_2/9к — 7,00 lgТЦД$_{50}$/см^3, а также VERO и RK-13/2-03 — 6,67 lgТЦД$_{50}$/см^3 (табл. 1).

1. Накопление вируса нодулярного дерматита в разных перевиваемых культурах клеток

Культура клеток	Пассаж	Длительность культивирования, ч	Титр вируса, lg ТЦД$_{50}$/см^3
Гомологичные культуры клеток			
MDBK	4-6-й	48	4,67-5,67
Taurus-1	4-6-й	48-72	6,00-7,00
КЭЛ/07	4-6-й	72	4,5-5,50
ТК	3-й	144	3,50-4,50
ПО	4-й	120	4,67
	5-10-й	72-96	6,0-6,33
	11-й	48	6,50
Гетерологичные культуры клеток			
RK-13/2-03	4-7-й	48-72	5,00-6,67
VERO	4-9-й	48	5,00-6,67
CV-1	4-11-й	48-72	5,00-6,67
СПЭВ	4-6-й	48-72	4,50-5,50
A_4C_2/9к	4-й	48-72	6,00-7,00

Видовую принадлежность вируса, накапливаемого в культурах клеток, подтвердили выявлением генома LSDV методом ПЦР в режиме реального времени. Для RK-13 (8-й пассаж) значение Ct составило 11,79, для Taurus-1 (4-й пассаж) — 11,91, A_4C_2/9К (3-й пассаж) и A_4C_2/9К (3-й пассаж, разведение 10^{-5}) — соответственно 18,45 и 35,82 (положительными считаются образцы при Ct $\leq$ 40).

Время проявления 95-100 % ЦПД зависело от системы культивирования и составило для MDBK и VERO 48 ч (см. табл. 1). В клетках Taurus-1, ПО, RK-13/2-03, CV-1 срок 100 % ЦПД не был постоянным (от 48 до 96 ч).

При определении оптимальной множественности заражения вирусом культур клеток RK-13/2-03,VERO и ПО (табл. 2) ростовую питательную среду меняли на поддерживающую и инкубировали до полной деструкции клеточного монослоя. При множественности 0,1-0,01 ТЦД$_{50}$/кл. ЦПД проявлялось на 2-е сут инкубирования. При 0,001-0,00001 ТЦД$_{50}$/кл. титр вируса увеличивался на 1,50 lg ТЦД$_{50}$/см^3, сроки наступления полной

деструкции монослоя составляли до 3-5 сут. Был получен вирусосодержащий материал в культурах клеток ПО и VERO с инфекционным титром 6,2-6,8 lg ТЦД$_{50}$/см^3, а в клетках RK-13 — 5,8-6,6 lg ТЦД$_{50}$/см^3. Для оптимизации содержания фетальной сыворотки КРС клетки ПО, инфицированные вирусом, инкубировали в поддерживающей среде без сыворотки и при добавлении 2; 5 и 10 % сыворотки КРС. Наибольший титр вируса наблюдали при 2-5 % сыворотки КРС — 6,67 lg ТЦД$_{50}$/см^3 против 5,5 и 6,0 lg ТЦД$_{50}$/см^3 соответственно в бессывороточной среде и среде с 10 % сыворотки.

2. Накопление вируса нодулярного дерматита (lg ТЦД$_{50}$/см^3) **в перевиваемых культурах клеток в зависимости от множественности заражения** (n = 3, $M \pm m$)

Культура клеток	Множественность заражения (ТЦД$_{50}$/кл)					
	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001
ПО	5,3±0,13	6,0±0,19	6,2±0,23	6,7±0,12	6,7±0,23	6,0±0,12
RK-13/2-03	4,7±0,21	4,7±0,00	5,8±0,20	6,0±0,00	6,6±0,18	3,5±0,17
VERO	5,5±0,15	6,0±0,17	6,5±0,26	6,7±0,15	6,8±0,26	6,3±0,17

Разработка эффективных профилактических и диагностических препаратов при вирусных болезнях зависит от качества вирусосодержащего материала, который, как правило, получают в высокопродуктивных клеточных системах с использованием эффективных методов выращивания вирусов. В литературе имеются сведения о культивировании LSDV в клеточных культурах гомологичного происхождения, таких как почки и тестикулы ягнят и телят, а также в дерме кожи телят, с проявлением характерного цитопатического действия и в гетерологичных культурах — клетках почки и кожи плода кролика, VERO. Инфекционная активность таких культуральных вирусосодержащих материалов — 4-6 lg ТЦД$_{50}$/см^3 (9, 22, 26). Однако большинство из них представляют собой первичные культуры клеток. В настоящей работе мы исследовали более технологичные чувствительные перевиваемые линии клеток. Также мы показали пермиссивность клеток (КЭЛ/07), полученных от лося, относящегося к отряду парнокопытных представителей дикой природы. Имеются сообщения об экспериментальном заражении азиатского буйвола, антилопы и жирафа, в результате которого отмечены клинические признаки проявления нодулярного дерматита (27, 28). Учитывая это, а также трансмиссивный путь передачи вируса, следует обратить внимание на возможность циркуляции возбудителя болезни среди дикой фауны и формирования энзоотических очагов инфекции в средней полосе России.

Таким образом, к вирусу нодулярного дерматита чувствительны перевиваемые клеточные линии как гомологичного, так и гетерологичного происхождения. При оптимальной множественности заражения 0,001-0,00001 ТЦД$_{50}$/кл. и культивировании в поддерживающей среде с 2-5 % сыворотки КРС, титр вируса в культурах клеток ПО и VERO составлял 6,2-6,8 lg ТЦД$_{50}$/см^3, в клетках RK-13/2-03 — 5,8-6,6 lg ТЦД$_{50}$/см^3. При разработке вакцинных и диагностических препаратов отдают предпочтение клеткам гетерологичного происхождения, которые не чувствительны к патогенам вирусной и прионной природы целевых животных (крупный и мелкий рогатый скот), включая возбудителей медленных инфекций. По результатам наших исследований наиболее перспективным представляется использование для накопления вируса нодулярного дерматита клональной перевиваемой линии клеток почки кролика RK-13/2-03

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии,
601125 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1,

Поступила в редакцию 29 июля 2017 года

e-mail: balyvi@yandex.ru, nikolai.salnikov2010@yandex.ru,
usadov.tr@mail.ru, zhivoderov-serg@mail.ru, lunicyn@mail.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2017, V. 52, № 6, pp. 1265-1272

PERMISSIVITY OF VARIOUS CELL CULTURES TO LUMPY SKIN DISEASE VIRUS

V.I. Balysheva, S.P. Zhivodeorov, E.Yu. Pivova, N.K. Bobrovskaya, A.V. Zhivodeorova, L.I. Anisimova, S.D. Kushnir, T.R. Usadov, S.G. Yurkov, N.I. Salnikov, A.V. Lunitsin

Federal Research Center for Virology and Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 1, ul. Akademika Bakuleva, pos. Vol'ginskii, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601125 Russia, e-mail balyvi@yandex.ru (ccorresponding author), nikolai.salnikov2010@yandex.ru, usadov.tr@mail.ru, zhivoderov-serg@mail.ru, lunicyn@mail.ru
ORCID:
Balysheva V.I. orcid.org/0000-0003-0687-2734
Pivova E.Yu. orcid.org/0000-0003-4831-0852
Zhivodeorova A.V. orcid.org/0000-0002-3146-8795
Kushnir S.D. orcid.org/0000-0002-5523-9022
Salnikov N.I. orcid.org/0000-0002-0481-3872
Zhivodeorov S.P. orcid.org/0000-0002-4919-3080
Bobrovskaya N.K. orcid.org/0000-0002-1014-6711
Anisimova L.I. orcid.org/0000-0002-4617-1337
Usadov T.R orcid.org/0000-0003-33102-1931
Lunitsin A.V. orcid.org/0000-0002-5043-446X
The authors declare no conflict of interests
Received July 29, 2017
doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1265eng

Abstract

Lumpy skin disease (LSD) is a transmissible and highly contagious transboundary emergent bovine viral disease that has become especially important for the Russian Federation since 2015 when it entered the Republic of Dagestan from Azerbaijan. In 2016, the infection was found in the Krasnodar Territory and later on in six more regions of the Russian Federation. The infection causes up to 50 % drops in milk productivity, body weight loss, abortions or stillbirths, skin damage, and reproductive disorders in affected livestock up to including a complete loss of bovine fertility and animal deaths due to secondary infections. LSD is caused by a DNA virus of family *Poxviridae*, genus *Capripoxvirus*. The virus isolation, identification and vaccine or diagnostic preparation construction largely depends on the adequate culture system used. This research was aimed at characterization of the cultural properties of an LSD virus isolate detected in internal organ (lung, spleen and lymph nodes) or affected subcutaneous tissue samples from Volgograd region of Russia. In order to isolate the virus, a goatling testicle primary culture (GT), a calf kidney (MDBK) and a rabbit kidney (RK-13/2-03) continuous cell lines were used. In passage 3, the virus titer obtained in cells MDBK and RK-13/2-03 was 4.67 to 5.00 lg $TCID_{50}/cm^3$. Using PCR analysis, a LSD virus genome was detected in the virus-containing culture medium. The obtained LSD virus strain was deposited to the State Collection of Microorganisms of the Federal Research Center for Virology and Microbiology, # 3161. Also, the permissivity of some other cell lines including elk embryo skin (KEL/07), African green monkey kidney (CV-1) and VERO cells, a hybrid line of porcine embryo kidney cells (SPEV TK^-) × porcine spleen splenocytes (A_4C_2/9k), and sheep kidney (ShK), rabbit kidney (RK-13/2-03) and calf kidney (Taurus-1) cells to this LSD virus strain were determined. We found that some continuous cell lines of both homologous (MDBK, Taurus-1, KEL/07, ShK) and heterologous (RK-13/2-03, VERO, CV-1, A_4C_2/9k, SPEV) origin were sensitive to the LSD virus. This work has revealed for the first time ever that LSD virus can proliferate in cells of wildlife species like elk. Also, permissivity of some heterologous continuous cells, RK-13/2-03 and A4C2/9k, to LSD virus was revealed for the first time. The virus culture period until 95 to 100 % CPE depended on the cell substrate selected and the multiplicity of infection. Thus, for MDBK or VERO cells it was 48 hours, and for Taurus-1, SkK, RK-13/2-03 or CV-1 the maximal destructive alterations in the cell monolayers were observed within 48 to 96 hours post infection. With an optimal multiplicity of infection of 0.001-0.00001 $TCID_{50}$ per cell and 2-5 % cattle serum in the maintenance medium the LSDV titers were 6.0 to 6.8 lg $TCID_{50}/cm^3$in the ShK and VERO cells, and 5.8 to 6.6 lg $TCID_{50}/cm^3$ for RK-13/2-03.

Keywords: lumpy skin disease virus, continuous cell lines, embryonic elk skin cell culture, CV-1, VERO, MDBK, Taurus-1, cytopathic effects.

REFERENCES

1. *Lumpy skin disease, Russia*. Information received on 03/09/2015. Available http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapEventSummary&reportid=18582. Accessed December 25, 2017.
2. Krivonos R.A., Dzhailidi G.A., Mishchenko A.V., Mishchenko V.A., Chernykh O.Yu., Shevkoplyas V.N., Dresvyannikova S.G., Kolomiets D.V., Tikhonov S.V. *Veterinariya segodnya*, 2017, 20(1): 38-44 (in Russ.).
3. Buller R.M., Arif B.M., Black D.N., Dumbell K.R., Esposito J.J., Lefkowitz E.J., McFadden G., Moss B., Mercer A.A., Moyer R.W., Skinner M.A.,

Tripathy D.N. *Poxviridae. Virus taxonomy: eight report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press, Oxford, 2005: 117-133.
4. Esposito J.J., Fenner F. Poxviruses. In: *Fields virology.* B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, R.M. Chanock, J.L. Melnick, T.P. Monathy, B. Roizman, S.E. Straus (eds.). 4th ed. Philadelphia, 2001: 2885-2921.
5. Body M.K., Singh K.P., Hussain M.H., Al-Rawahi A., Al-Maawali M., Al-Lamki K., Al-Habsy S. Clinico-histopathological findings and PCR based diagnosis of lumpy skin disease in the Sultanate of Oman. *Pakistan Veterinary Journal*, 2012, 32(2): 206-210.
6. Samuilenko A.Ya., Solov'eva B.V., Nepoklonova E.A., Voronina E.S. *Infektsionnaya patologiya zhivotnykh. Tom 1* [Aimal infectous pathology]. Moscow, 2006: 782-786 (in Russ.).
7. Mishchenko V.A., Mishchenko A.V., Kononov A.V., Shevkoplyas V.N., Dzhailidi G.A., Dresvyannikova S.G., Chernykh O.Yu. *Veterinariya Kubani*, 2015, 5: 3-6 (in Russ.).
8. Mishchenko A.V., Karaulov A.K., Mishchenko V.A. *Veterinariya*, 2016, 4: 3-6 (in Russ.).
9. *Lumpy skin disease. Chapter 2.4.14. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE. V. 1.* Paris, 2012: 762-774.
10. Tuppurainen E.S.M., Oura C.A.L. Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2012, 59(1): 40-48 (doi: 10.1111/j.1865-1682.2011.01242.x).
11. Şevik M., Avci O., Doğan M., İnce Ö.B. Serum biochemistry of lumpy skin disease virus-infected cattle. *BioMed Res. Int.*, 2016, 2016: Article ID 6257984 (doi: 10.1155/2016/6257984).
12. Watanabe T.T.N., Moeller R.B. Jr., Crossley B.M., Blanchard P.C. Outbreaks of bovine herpesvirus 2 infections in calves causing ear and facial skin lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2017, 29(5): 686-690 (doi: 10.1177/1040638717704480).
13. Chernykh O.Yu., Mishchenko A.V., Mishchenko V.A., Shevkoplyas O.Yu. *Veterinariya Kubani*, 2016, 3: 3-5 (in Russ.).
14. Gari G., Abie G., Gizaw D., Wubete A., Kidane M., Asgedom H., Bayissa B., Ayelet G., Oura C.A., Roger F., Tuppurainen E. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus. *Vaccine*, 2015, 33(28): 3256-3261 (doi: 10.1016/j.vaccine.2015.01.035).
15. Carn V.M. Control of capripoxvirus infections. *Vaccin*e, 1993, 11(13): 1275-1279.
16. Menasherow S., Rubinstein-Giuni M., Kovtunenko A., Eyngor Y., Fridgut O., Rotenberg D., Khinich Y., Stram Y. Development of an assay to differentiate between virulent and vaccine strains of lumpy skin disease virus (LSDV). *J. Virol. Methods*, 2014, 199: 95-101 (doi: 10.1016/j.jviromet.2013.12.013).
17. Tuppurainen E.S., Pearson C.R., Bachanek-Bankowska K., Knowles N.J., Amareen S., Frost L., Henstock M.R., Lamien C.E., Diallo A., Mertens P.P. Characterization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus. *Antivir. Res.*, 2014, 109: 1-6 (doi: 10.1016/j.antiviral.2014.06.009).
18. *LSD. Chapter 2.4.13 Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.* OIE, Paris, 2016.
19. Babiuk S., Bowden T.R., Parkyn G., Dalman B., Manning L., Neufeld J., Embury-Hyatt C., Copps J., Boyle D.B. Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2008, 55(7): 299-307 (doi: 10.1111/j.1865-1682.2008.01024.x).
20. El-Nahas E.M., El-Habbaa A.S., El-bagoury G.F., Radwan M.E. Isolation and identification of lumpy skin disease virus from naturally infected buffaloes. *Egypt Global Veterinaria*, 2011, 7(3): 234-237.
21. Kara P.D., Afonso C.L., Wallace D.B., Kutish G.F., Abolnik C., Lu Z., Vreede F.T., Taljaard L.C., Zsak A., Viljoen G.J., Rock D.L. Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of lumpy skin disease virus. *Arch. Virol.*, 2003, 148: 1335-1356 (doi: 10.1007/s00705-003-0102-0).
22. Kononov A.V., Konova S.V., Shumilova I.N., Nesterov A.N., Diev V.I., YAshin R.V., Mishchenko A.V. Veterinariya segodnya, 2016, 3(8): 8-13 (in Russ.).
23. *Katalog kollektsii kletochnykh kul'tur GNU VNIIVViM Rossel'khozakademii* [VNIIVViM RAAS Cell Culture Collection Catalog,]. Pokrov, 2010: 89 (in Russ.).
24. Syurin V.N., Belousova R.V., Fomina N.V. *Veterinarnaya virusologiya* [Veterinary virology]. Moscow, 1992 (in Russ.).
25. Bowden T.R., Babiuk S.L., Parkyn G.R., Copps J.S., Boyle D.B. Capripoxvirus tissue tropism and shedding: a quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, 2008, 371: 380-393 (doi: 10.1016/j.virol.2007.10.002).
26. Osuagwuh U.I. *Semen quality and the excretion of lumpy skin disease virus in semen following vaccination and experimental challenge of vaccinated bulls. MSc dissertation.* Pretoria, 2006.
27. Ryabikina O.A., Diev V.I., Kukushkina M.S. *Aktual'nye voprosy veterinarnoi biologii*, 2015, 4(28): 45-52 (in Russ.).
28. Abdulqa H.Y., Rahman H.S., Dyary H.O., Othman H.H. Lumpy skin disease. *Reproductive Immunology: Open Access*, 2016, 1(4): 25.