

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 579.62

Н.С. Кожабергенов, А.И. Тагайев, М.Р. Абаева, К.Т. Султанкулова,  
Е.О. Абдураимов, А.К. Наханов, К.Д. Закарья

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,  
пгт. Гвардейский, Казахстан

## РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА КРС НА ОСНОВЕ МЕТОДА ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

**Аннотация.** В настоящее время нодулярный дерматит (НД) является одним из наиболее вредоносных и экономически значимых заболеваний КРС во многих странах, в том числе и в Казахстане. В связи с неблагоприятной обстановкой в стране по данному виду заболевания требуется быстрая диагностика данного вируса для своевременного реагирования и принятия необходимых мер. Для решения этих задач разработана тест-система на основе метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР РВ). При разработке тест-системы применены современные молекулярно-биологические методы, с помощью которых определены наиболее консервативные и специфические участки GPCR гена вируса НД. С помощью выбранных участков сконструированы и синтезированы видоспецифичные пары праймеров и зондов. Для постановки ПЦР РВ оптимизирован температурный режим и соотношения компонентов реакционной смеси. Разработанная тест-система проверена по параметрам специфичности и чувствительности с применением ДНК вирусов НД, оспы овец, оспы коз, оспы верблюдов, и плазмид со вставками фрагментов гена вируса НД. Результаты лабораторных испытаний показали, что тест-система работает специфично, а чувствительность составляет 20 аттограмм плазмидной ДНК в одной реакции, что соответствует 5 копиям молекул ДНК вируса НД.

**Ключевые слова:** диагностика, нодулярный дерматит, ПЦР в реальном времени

Н.С. Қожабергенов, А.И. Тағаев, М.Р. Абаева, К.Т. Сұлтанқұлова,  
Е.О. Абдураимов, А.К. Наханов, К.Д. Закарья

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» РМК,  
Гвардейский қтп., Қазақстан

## НАҚТЫ УАҚЫТТАҒЫ ПТР ӘДІСІ НЕГІЗІНДЕ ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ НОДУЛЯРЛЫҚ ДЕРМАТИТІ ВИРУСЫН ДИАГНОСТИКАЛАУ ҮШІН СЫНАҚ ЖҮЙЕНІ ӘЗІРЛЕУ

**Аннотация.** Нодулярлық дерматит (НД) қазіргі уақытта көптеген елдерде, соның ішінде Қазақстанда ірі қара малдың ең зиянды және экономикалық маңызды ауруларының бірі болып табылады. Аурудың бұл түріне еліміздегі қолайсыз жағдайға байланысты дер кезінде ден қою және тиісті шараларды қабылдау үшін бұл вирусты жедел баламалау қажеттігі туындайды. Бұл мәселелерді шешу үшін нақты уақыттағы полимеразды тізбекті реакция (НУ-ПТР) әдісіне негізделген сынақ жүйе жасалды. Сынақ-жүйені әзірлеу кезінде заманауи молекулалық биологиялық әдістер қолданылды, олардың көмегімен НД вирусының GPCR генінің ең консервативті және ерекше аймақтары анықталды. Таңдалған аймақтарды пайдалана отырып, түрге тән праймерлер мен зондтар жұптары құрастырылды және синтезделді. НУ-ПТР қою үшін температура режимі және реакциялық қоспа компоненттерінің арақатынасы оңтайландырылды. Әзірленген сынақ-жүйе НД вирусының, қой шешегінің, ешкі шешегінің, түйе шешегінің және НД вирусы генінің фрагменті қосылған плазмидтік ДНҚ-ны қолдану арқылы ерекшелігі мен сезімталдығы сыналды. Зертханалық сынақтардың нәтижелері сынақ-жүйенің ерекше жұмыс істейтінін көрсетті, ал сезімталдығы бір реакцияда 20 аттограмм плазмидті ДНҚ-ны құрады, бұл НД вирусының ДНҚ молекулаларының 5 көшірмесіне сәйкес келеді.

**Кілт сөздер:** диагностика, нодулярлық дерматит, нақты уақыттағы ПТР

N.S. Kozhabergenov, A.I. Tagaev, M.R. Abayeva, K.T. Sultankulova,  
E.O. Abduraimov, A.K. Nakhanov, K.D. Zakarya

RSE «Scientific Research Institute of Biological Safety Problems»,  
Gvardeysky, Kazakhstan

## DEVELOPMENT OF A REAL-TIME PCR TEST SYSTEM FOR THE DIAGNOSTICS OF BOVINE LUMPY SKIN DISEASE VIRUS

**Abstract.** Lumpy skin disease virus (LSDV) is currently one of the most harmful and economically significant diseases of cattle in many countries, including Kazakhstan. Due to the unfavorable situation in the country for this type of disease, a quick diagnosis of this virus is required for a timely response and taking the necessary measures. To solve these problems, a test system based on the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method has been developed. When developing the test system, modern molecular biological methods were used, with the help of which the most conservative and specific regions of the GPCR gene of the LSDV were determined. Using the selected regions, species-specific pairs of primers and probes were designed and synthesized. For setting RT-PCR, the temperature regime and the ratio of the components of the reaction mixture are optimized. The developed test system was tested in terms of specificity and sensitivity using DNA from LSDV, sheep pox, goat pox, camel pox viruses and plasmids with inserts of LSDV gene fragments. The results of laboratory tests

showed that the test system works specifically, and the sensitivity is 20 attograms of plasmid DNA in one reaction, which corresponds to 5 copies of the DNA molecules of the LSDV.

**Key words:** diagnostics, lumpy skin disease virus, real-time PCR.

**Введение.** Нодулярный дерматит (НД), он и узелковый дерматит, (с латинского языка *Dermatitis nodularis bovim*, с английского – *Lumpy skin disease* (LSD) заболевание крупного рогатого скота, которое характеризуется трансграничной вирусной высококонтагиозной болезнью. Патогеном болезни является ДНК содержащий оболочечный вирус, относящийся к группе Neethling, семейства *Poxviridae* рода *Capripoxvirus*. Вирус НД имеет родственную связь с вирусами оспы коз и оспы овец, которые тоже относятся к роду *Capripoxvirus*. Морфология вирионов вируса НД схожи с вирусом оспы овец, и имеют круглую форму с двойной оболочкой и плотной сердцевинной. Размер вирионов находится в пределах 320-260 нм [1-4].

Первые случаи распространения НД были зафиксированы в странах Южной и Восточной Африки – Гвинея, Мозамбик, Ботсвана, Зимбабве и ЮАР, Северной Африки – Египет, Бахрейн, Кувейт, Оман. Ближе к 60-м годам вспышки НД были зарегистрированы в Палестине, Израиле и Ливане. Позже болезнь была обнаружена в Саудовской Аравии, Турции, Иордании, Греции и Сирии [5, 6].

Первый случай вспышки НД КРС в Республике Казахстан были зарегистрированы в 2016 году в Атырауской области [4].

Геномная ДНК вируса НД имеет размер 150773 пары нуклеотидных остатков (п.н.о.) [7, 8]. Геном состоит из центрального кодирующего региона, связанного с идентичными инвертированными терминальными последовательностями размером 2400 п.н.о. Содержание G+C составляет 25,91% [7].

Геном вируса НД содержит 156 предполагаемых генов. Сравнение геномных последовательностей вируса НД и поксвирусов, относящихся к другим родам, позволило выявить 146 консервативных генов, кодирующих белки, включенные в биогенез информационных РНК, метаболизм нуклеотидов, репликацию геномной ДНК, формирование структурных белков, сборку вириона. Данные гены определяют патогенность возбудителей для соответствующих чувствительных хозяев [8].

В центральном геномном кодирующем регионе гены представителей рода *Capripoxvirus* характеризуются высокой степенью гомологии с генами других известных поксвирусов млекопитающих (в среднем 65 %). Уровень гомологии инвертированных участков ниже (в среднем 43%). Тем не менее, большинство из выявленных различий также касаются генов, определяющих уровень вирулентности и круг чувствительных хозяев [9].

Геном вируса НД содержит четыре аномальных гена, вероятно, полученных от естественных хозяев вируса в ходе эволюции [10]. В качестве прототипного штамма вируса НД в настоящее время рассматривают штамм Ismailiya 88, выделенный в 1988 г. в Египте [11].

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов кодирующих G-белок хемокинового рецептора (GPCR) штаммов и изолятов вируса НД, построенное методом максимального правдоподобия с использованием модели Кимура, свидетельствует о наличии 27 варибельных сайтов, в которых имеется 18 синонимичных и 14 несинонимичных нуклеотидных замен (всего 32) [12].

Важное значение данного заболевания требует значительного надзора и контроля со стороны ветеринарных служб, лабораторий, ведомств, министерства сельского хозяйства Республики Казахстан. Данное заболевание наносит существенный ущерб для животноводческого сектора: уменьшение поголовья скота, объемов продукции животноводства, продуктивность воспроизведения. Соответственно, является угрозой качеству

генетических ресурсов; запрет на производство, переработку и экспорт продукции животноводства [13-16].

Для постановки диагноза в лабораторных условиях отбирают биоптаты кожи, стабилизированную ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) кровь, сыворотку крови, мазки со слизистых оболочек. Поскольку, проведение серологических методов исследования продлевают время диагностирования НД, в целях получения быстрого диагноза используются молекулярно-генетические методы – полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР в режиме реального времени [5, 6]

На сегодняшний день метод ПЦР имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами диагностирования. Данный метод имеет следующие преимущества: прямое обнаружение ДНК вируса, высокая специфичность и чувствительность, простота проведения исследования, экономия времени на проведение анализа.

Широкое распространение вируса НД КРС на территории нашей страны требует применения высокочувствительных качественных методов диагностики, позволяющих в кратчайшие сроки подтверждать диагноз с целью применения мер для предотвращения и борьбы с данным заболеванием.

**Материалы и методы исследования.** Поиск нуклеотидных последовательностей для подбора специфических праймеров, осуществляли в международной базе данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей вирусных геномов было выполнено с использованием программного обеспечения Mega версия 1.1. Проверку специфичности подобранных олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Последовательность праймеров и зондов проверяли на комплементарность, образование димеров и другие параметры на онлайн-калькуляторе на сайте <http://bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>.

Синтез сконструированных зондов и праймеров производился под заказ в фирме Синтол, Россия.

В качестве объекта исследования в работе были использованы ДНК штаммов вакцинного вируса НД «Neethling-RIBSP», оспы овец «НИСХИ» и «Румынский», оспы коз «Gorgan» и «G20-LKV», оспы верблюдов «KM-40», «KM-70» и «M-96».

ДНК вирусов экстрагировали из вируса содержащего материала в условиях лаборатории BSL-2 набором QIAamp Viral DNA Mini Kit (50) фирмы Qiagen в соответствии с инструкцией производителя. Качество и концентрацию полученных ДНК вирусов проверяли на спектрофотометре Nano Drop 2000.

Для получения положительного контроля для диагностического набора продукты амплификации вируса нодулярного дерматита клонировали в плазмиду pGEM-T Easy Vector с использованием набора Promega pGEM-T. Размер плазмидной ДНК без вставки составляет 3015 пар оснований. Полученные лигазные смеси использовали для последующей химической трансформации компетентных клеток *Escherichia coli*. Отбор колоний, содержащих целевой фрагмент, проведен методом сине-белой селекции. Отобранные клоны перенесены в жидкую среду LB и инкубированы при 37°C в течение 16 часов. Из полученных культур выделены плазмиды с применением метода щелочного лизиса.

ПЦР проводили с использованием градиентного термоциклера Mastercycler X50s, Eppendorf. ПЦР в режиме реального времени проводили на термоциклере Rotor-Gene Q, Qiagen.

Результаты амплификации ПЦР выявляли с помощью метода гель-электрофореза и гель документирующей системы BioRad. Электрофорез проводили при силе тока 400 mA в 2% агарозном геле в буфере TAE с добавлением SYBR Safe DNA gel stain, Invitrogen. Для

оценки молекулярного веса фрагментов использовали маркеры молекулярного веса ДНК на 50 и 100 bp, New England Biolabs.

Результаты ПЦР в реальном времени выявляли и анализировали в программном обеспечении Rotor-Gene Q версии 1.8.187.5.

**Результаты и обсуждение.** В наших работах по подбору специфических праймеров и зондов, мы исследовали ген GPCR, поскольку именно в данном участке генома имеются наибольшее количество специфических сайтов для дифференциации вируса НД от других видов каприпоксвирусов и микроорганизмов. Поиск нуклеотидных последовательностей исследованных генов проводили в международной базе данных GenBank. Всего для анализа нуклеотидных последовательностей из генетической базы данных GenBank отобрано 61 изолятов вируса НД, 29 изолятов вируса оспы овец, и 18 изолятов вируса оспы коз. Все три вида вирусов относятся к роду *Capripoxvirus* и по нуклеотидным последовательностям геномов имеют очень высокую степень гомологии между видами.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы Mega v.11. На основе результатов множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей определены участки генов, которые специфичны только для вируса нодулярного дерматита.

Праймеры подбирали таким образом, чтобы они обладали 100%-ной комплементарностью по отношению к сайту-мишени, температура плавления была в диапазоне 55-60°C, абсолютно отсутствовала внутренняя гомология, превышающая 3 нуклеотидные пары, содержание GC в праймере был между 45% и 55%, не укладывался во вторичную структуру, температура плавления которой была бы эквивалентна или выше температуры плавления праймера.

Подбор праймеров и зондов проводили с учетом указанных выше условий, и проверяли с помощью программы для расчёта свойств олигонуклеотидов на сайте <http://bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>.

Сконструированные праймеры и зонды были проверены на специфичность с использованием программы BLAST на сайте <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Для дальнейших работ были выбраны олигонуклеотиды, показывающие 100% специфичность с соответствующим возбудителем (таблице 1).

Таблица 1 – Параметры праймеров и зонда

Наименование праймера и зонда	Последовательность 5' – 3'	Tm	GC%	Размер продукта, п.н.
ND_1_F	GATGATGGTGTGGATACT	52	4	320
ND_1 зонд	FAM- AGTTTTGGACTGATTACTTTA TATTCCGACT-BHQ1	64	0	
ND_1_R	CGT TTT GTC CTT ATC GGC AT	55	5	

Оптимальную температуру отжига праймеров подбирали индивидуально с постановкой градиентной ПЦР при температурах отжига 50; 52,5; 55; 57,5; 60; 62,5°C с применением стандартного соотношения компонентов реакционной смеси коммерческого набора, и с конечной концентрацией праймеров в 400 нМ. Денатурацию проводили при 98°C в течение 30 секунд, амплифицировали ДНК в течение 35 циклов при денатурации 98°C – 15 секунд, отжига – 20 секунд, и элонгации 72°C – 45 секунд. Финальную элонгацию проводили при 72°C в течение 10 минут.

Результаты градиентной ПЦР показали, что пара праймеров ND\_1\_F и ND\_1\_R, которые по результатам проведенных опытов показали наилучший результат по параметрам специфичности, хорошо нарабатывает ПЦР-продукт при всех выбранных температурах отжига, но наиболее эффективно в диапазоне 50-57,5°C (см. рисунок 1).

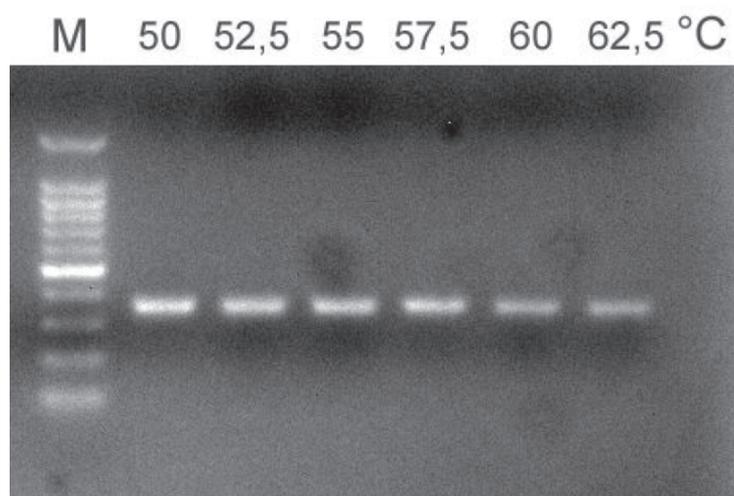


Рисунок 1 – Подбор температуры отжига праймеров с применением градиентной постановки ПЦР

Стандартными концентрациями праймеров для постановки ПЦР в реальном времени являются концентрации 0,2 – 0,45  $\mu\text{M}$  (200 – 450 нМ) на мкл реакционной смеси. Нами были опробованы концентрации от 100 нМ до 800 нМ (рисунок 2).

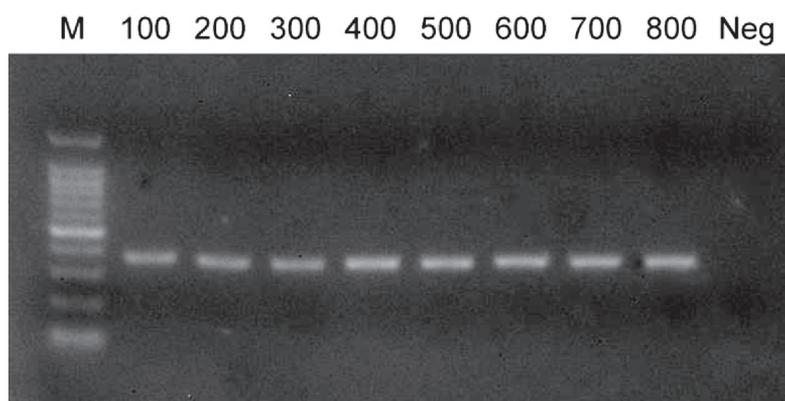


Рисунок 2 – Оптимизация концентраций праймеров

Результаты ПЦР показали, что наработка специфических продуктов происходит при всех выбранных концентрациях праймеров, но тем не менее, наиболее насыщенные ампликоны образуются при концентрациях 400 нМ и выше. Исходя из полученных экспериментальных данных, в дальнейших исследованиях были использованы концентрации праймеров в пределах 400-500 нМ.

Ионы Mg служат кофактором в полимеразной активности. Они также взаимодействуют с другими компонентами реакционной смеси, формируют комплексы с дНТФ и стабилизируют кДНК, увеличивают температуру плавления. Таким образом, каждый ПЦР эксперимент требует оптимизации концентрации ионов Mg. Слишком низкая концентрация магния может приводить к низкой эффективности амплификации, а слишком высокая концентрация приводит к образованию неспецифических продуктов.

Рекомендуемая концентрация  $\text{MgCl}_2$  составляет 1-4 мМ, однако оптимальная концентрация определяется экспериментально. В наших экспериментах мы использовали конечную концентрацию  $\text{MgCl}_2$  от 0,25 до 4 мМ (рисунок 3).

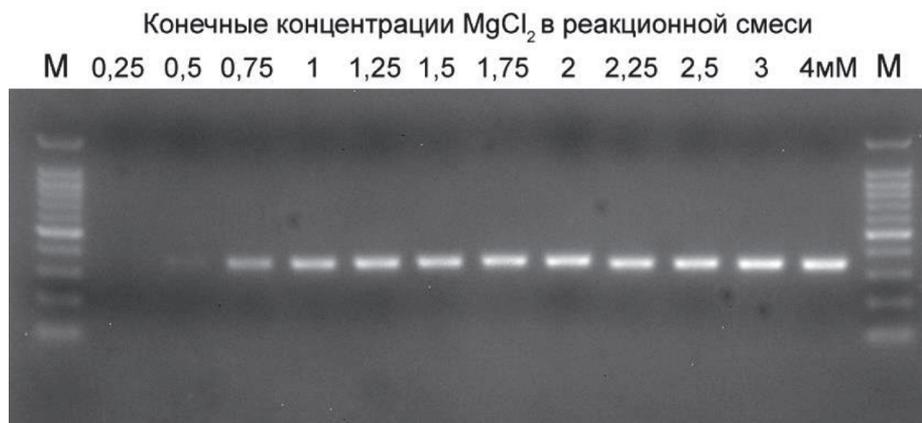


Рисунок 3 – Оптимизация концентрации  $MgCl_2$

Из полученных данных видно, что амплификация специфичного продукта наблюдается при концентрациях от 0,75 до 4 мМ. Для дальнейших исследований выбрана конечная концентрация 2,5 мМ  $MgCl_2$ .

При подборе оптимальных концентраций флуоресцентных зондов использованы концентрации – 50, 100, 150, 200 и 250 нМ. Результаты ПЦР РВ анализа показали, что все зонды хорошо работают при концентрациях 150 -250 нМ (см. рисунок 4).

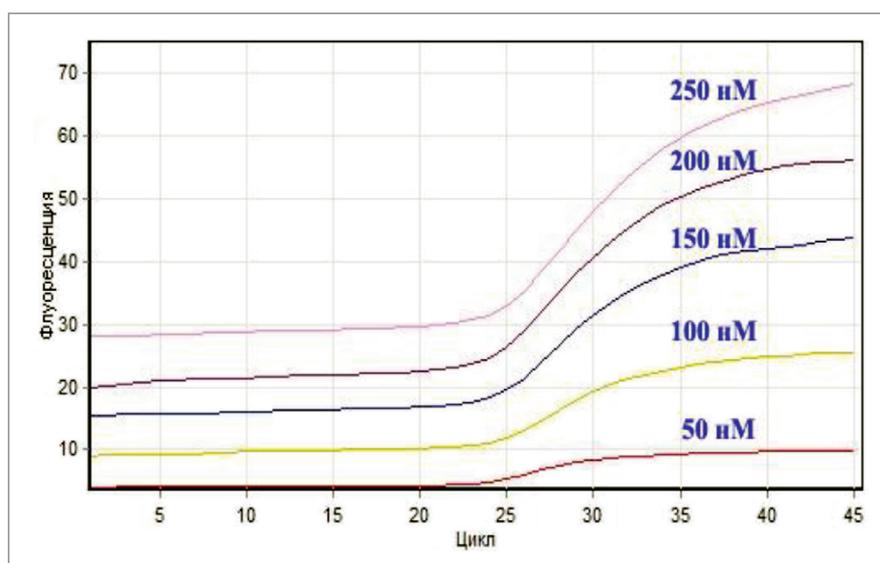


Рисунок 4 – Оптимизация концентраций флуоресцентных зондов

Таким образом, в ходе проведения исследовательских работ по оптимизации компонентного состава ПЦР РВ смеси были определены оптимальные концентрации, параметры которых соответствуют следующим значениям: 0,25 мкл Q5® HF ДНК-полимеразы, 5 мкл буфера для Q5® ДНК-полимеразы (5X), 0,5 мкл 10 мМ dNTP, по 1 мкл 10  $\mu$ М каждого праймера, 1 мкл 5  $\mu$ М специфического зонда, 1 мкл вирусного ДНК, до 25 мкл доводим очищенной водой.

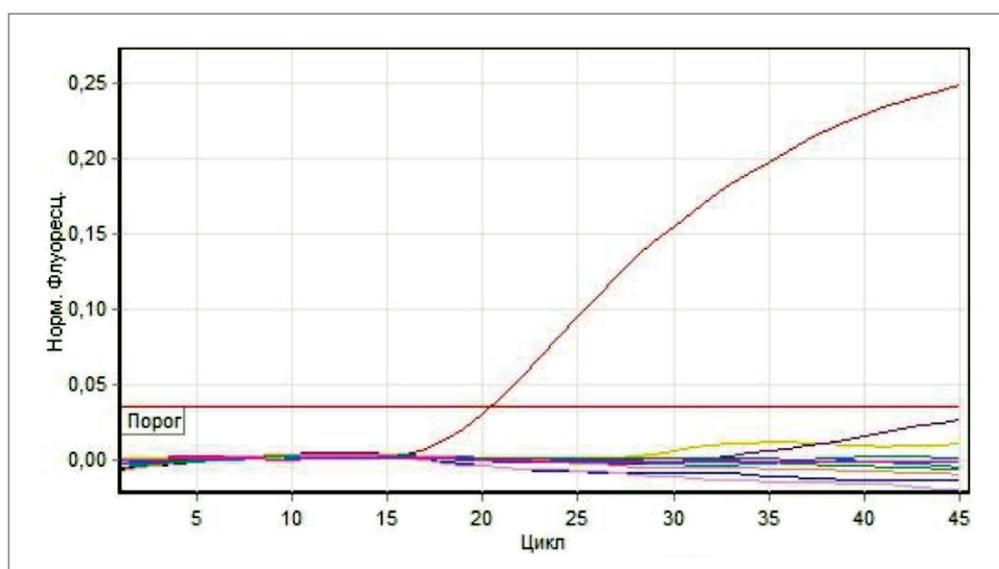
*Определение специфичности ПЦР в режиме реального времени для выявления вируса НД КРС.* На данном этапе исследований разработанные праймеры и зонды для диагностики вируса НД проверена по параметрам специфичности с применением ДНК вирусов НД, оспы овец, оспы коз, оспы верблюдов. При постановке ПЦР РВ в качестве положительных контролей (ПК) использованы сконструированные плазмидные ДНК со вставками

фрагментов GPCR гена вируса НД. В качестве отрицательного контроля (ОК) использована деионизированная вода. Программа с температурно-временными параметрами ПЦР в реальном времени показана в таблице 2.

Таблица 2 – Программа для ПЦР РВ анализа

Шаг	Температура	Время		Количество циклов
1	98 °С	30 с		1
2	98 °С	15 сек		45
	57 °С	20 с	Детекция сигнала FAM	

Результаты ПЦР в реальном времени показали (рисунок 5), что разработанные наборы праймеров и зондов работают специфично с ДНК вируса НД.



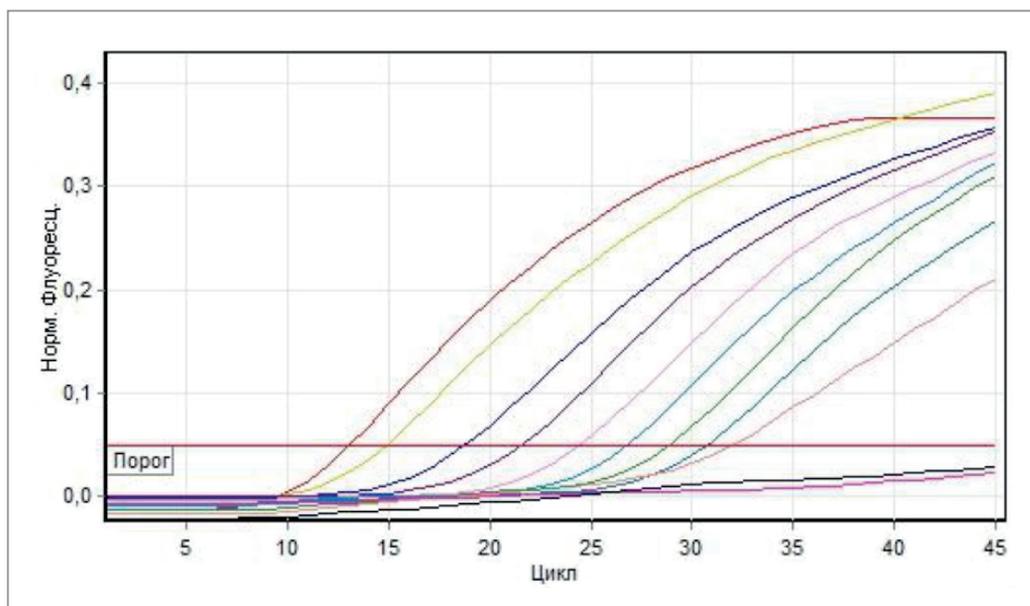
№	Имя	Тип	СТ
1	НД, штамм "Neethling-RIBSP"	Образец	20,41
2	ОО, штамм "НИСХИ"	Образец	
3	ОО, штамм "Румынский"	Образец	
4	ОК, штамм "Gorgan"	Образец	
5	ОК, штамм "G20-LKV"	Образец	
6	ОВ, штамм "KM-40"	Образец	
7	ОВ, штамм "KM-70"	Образец	
8	ОВ, штамм "M-96"	Образец	
9	Negative control	Отрицательный. контроль	

Рисунок 5 – Определение специфичности праймеров и зондов

При определении чувствительности наборов праймеров и зонда были приготовлены серии из 10-ти кратных разведений плазмидной ДНК со вставками фрагментов GPCR гена вируса НД с концентрациями от 2 нанограмм до 2 аттограмм в реакционной смеси. Размер плазмиды pGEM-T EasyVector со вставкой составляет порядка 3500 п.о. При расчете на калькуляторе нуклеиновых кислот можно определить, что 2 аттограмм плазмидной

ДНК со вставкой содержит 1 копию молекулы ДНК вируса НД. Постановку ПЦР РВ проводили по оптимизированным условиям реакции.

Результаты исследования показали, что чувствительность наборов праймеров и зондов для диагностики вируса НД методом ПЦР в реальном времени составила 20 аттограмм в одной реакции, что составляет 5 копий молекул ДНК вируса НД (см. рисунок 6). Этот показатель является эффективным и приемлемым для использования их в диагностических наборах.



№	Концентрация ДНК в реакционной смеси	Тип	СТ	Конц. Расч. (Копии молекул ДНК)
1	2 ng	Образец	13,05	530226282
2	200 pg	Образец	14,87	53022628
3	20 pg	Образец	18,78	5302263
4	2 pg	Образец	21,59	530226
5	200 fg	Образец	24,43	53023
6	20 fg	Образец	26,79	5302
7	2 fg	Образец	28,88	530
8	200 ag	Образец	30,73	53
9	20 ag	Образец	32,01	5
10	2 ag	Образец		1
11		Отрицательный контроль		

Рисунок 6 – Количественные данные флуоресценции при определении чувствительности ПЦР РВ набора

Из полученных количественных данных анализа следует, что разработанная тест-система для диагностики нодулярного дерматита КРС методом ПЦР в режиме реального времени работает специфично и высокочувствительно.

**Заключение.** В результате проведения лабораторных исследований разработанная тест-система для диагностики НД на основе метода ПЦР РВ проверена по параметрам специфичности и чувствительности с применением ДНК различных вирусов и серийных

разведенный плазмидной ДНК, содержащий фрагмент GPCR гена НД. Результаты исследований показали, что разработанная тест-система на основе ПЦР в реальном времени работает высокоспецифично. Определены параметры чувствительности разработанной тест-системы для диагностики НД. Аналитическая чувствительность ПЦР РВ тест-системы составила 5 копий молекул ДНК вируса НД, что является показателем высокой чувствительности.

Работа выполнена в рамках научно-технической программы: «Биологическая безопасность Республики Казахстан: оценка угроз, научно-технические основы их предупреждения и ликвидации».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мищенко А.В., Мищенко В.А., Шевкопляс В. Н., Джаилиди Г.А., Дресвянникова С.Г., Черных О.Ю., Кононов А.В. Акбаев Р.М. Экологические особенности нодулярного дерматита крупного рогатого скота // Ветеринария Кубани. – 2017. – №5. – С. 22.
2. Roberts H. Lumpy skin disease in Turkey (Europeanside) Preliminary outbreak assessment. – URL: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/437163/roa-lumpy-skin-turkey-201506.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/437163/roa-lumpy-skin-turkey-201506.pdf) (accessed date: 18.04.16).
3. Семакина В.П., Жильцова М.В., Саввин А.В., Акимова Т.П. Распространение заразного узелкового дерматита (Нодулярного дерматита) крупного рогатого скота в мире // Ветеринария сегодня. – 2017. – №3 (22). – С. 13.
4. Gunenkov V.V. Lumpy skin disease in cattle // Collection of scientific papers of VGNKI. – 2005. – Vol.66. – P. 46-54.
5. Коновалов М.Г., Шевченко А.А. Профилактика нодулярного дерматита в Краснодарском крае // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Перспективы производства продуктов питания нового поколения». – 2017. – С. 15.
6. Енгашев С., Смирнов Д., Алиев М. Нодулярный дерматит крупного рогатого скота // Ветеринария. – 2017. – С. 26-27.
7. Lubinga J.C., Tuppurainen E.S., Coetzer J.A., Stoltz W.H., Venter E.H. Evidence of lumpy skin disease virus over-wintering by transstadial persistence in *Amblyomma hebraeum* and transovarial persistence in *Rhipicephalus decoloratus* ticks // Exp. Appl. Acarol. – 2014. – P. 77-90. DOI: 10.1007/s10493-013-9721-7.
8. Santhamani R., Yogisharadhya R., Venkatesan G., Shivachandra S.B., Randey A.B., Ramakrishnan M.A. Molecular characterization of Indian sheeppox and goatpox viruses based on RPO30 and GPCR genes // Virus genes. 2014. – P. 286-91. DOI 10.1007/s11262-014-1095-3.
9. Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Kutish G.F., Rock D.L. Genome of lumpy skin disease virus // J. Virol. 2001. – P. 7122-30. DOI: 10.1128/JVI.75.15.7122-7130.2001.
10. Monier A., Claverie J.M., Ogata H. Horizontal gene transfer and nucleotide compositional anomaly in large DNA viruses // BMC Genomics. – 2007. – P. 1-17. DOI: 10.1186/1471-2164-8-456.
11. Amin A.A., Ehab El-Nahas, Abd-Elbaset El-Mashed. Pathological and Virological Studies on an Outbreak of Lumpy Skin Disease among Cattle in Kalubia Governorate-Egypt // Journal of Advanced Veterinary Research. – 2015. – P. 165-75.
12. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. – 2016. – P. 1870-4. DOI: 10.1093/molbev/msw054.
13. Beard P.M. Lumpy skin disease: a direct threat to Europe // Vet. Ec. – 2016. – Vol. 28. – P. 557-558.
14. Пестова Я.Е., Артюхова Е.Е., Кострова Е.Е., Шумилова И.Н., Кононов А.В., Спрыгин А.В. Разработка ПЦР в режиме реального времени для выявления полевых изолятов вируса заразного узелкового дерматита в пробах от крупного рогатого скота // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53 (2). – С. 422-429.
15. Кодекс здоровья наземных животных МЭБ. Гл. 1.2. Критерии включения болезней, инфекций и инфеетаций в список МЭБ // Париж, 2014. – Т. 1. – 23 изд. – С. 5.
16. Lumpy skin disease are not detected in the territory of the country // Ekho –broadsheet. – URL: <http://www.echo.az/article.php> (accessed date: 18.04.16).