



Ministry of agriculture and rural development
Veterinary services and animal health
State of Israel
Kimron Veterinary Institute, Virology division



Lumpy skin disease

LSD

Dr. Yevgeny Khinich

Head of State Laboratory for Vaccine Control
Acting Head Virology division

vaccine@moag.gov.il

Tbilisi, Nov.2015



**Управление ветеринарии
Ветеринарный институт
им.проф. А.Кимрона**

Нодулярный Дерматит

(LSD)

д-р Евгений Хинич

**Зав.лаб.по проверке ветеринарных вакцин
И.О.Зав.отделом вирусологии вет. ин-та**

vaccine@moag.gov.il

Тбилиси, ноябрь 2015



План изложения лекций

I. Методы лабораторной диагностики:

- ✓ *Отбор материала для лабораторной диагностики*
- ✓ *Идентификация ДНК вируса ВД (LSD)*
- ✓ *Выделение и репродукция вируса ВД (LSD) на культуре клеток*
- ✓ *Другие методы лабораторной диагностики*

II. Профилактика заболевания с помощью прерывания путей передачи вируса кровососущими насекомыми и вакцинации восприимчивого поголовья:

1. *Роль членистоногих в передаче вируса нодулярного дерматита*
2. *Вакцины и их применение*

Нодулярный Дерматит (LSD)

Lumpy Skin Disease (англ.), Knopvelsieckte, Exanthema Nodularis bovis, Dermatoze nodulaire (франц.), Knochenschlag des Rindes (нем.), Pseudo-urticaria (итал), *кожная бугорчатка, узелковый дерматит, кожно-узелковая сыпь, болезнь кожного отека у буйволов, лоскутная болезнь кожи, вирусная, заразная бугорчатка кожи, узелковая экзантема КРС.*

Нодулярный Дерматит ***(LSD)***

Нодулярный дерматит относится к особо опасным инфекциям КРС

Нодулярный дерматит - болезнь КРС (поражает в том числе буйволов и зебу), характеризующаяся лихорадкой, поражением лимфатической системы, отеками подкожной клетчатки и внутренних органов, образованием кожных узлов (бугров), поражением глаз и слизистых оболочек дыхательного и пищеварительного трактов

Нодулярный Дерматит

LSD

Наличие узлов сопровождается лимфаденитом и повышением температуры тела. У молочных коров еще до клинического проявления симптомов отмечается снижение молочной продуктивности и появляются водянистые истечения из глаз, вялость. Животные отказываются от корма, быстро истощаются.



Numerous skin papules.

[Source: KVI, Dr. Y. Brenner]



*Клинически – патогномоничным симптомом является появление на коже **бугорков размером от 0.5 до 5см, рассеянных по всему телу в количестве от единичных до нескольких сотен. Близко-расположенные из них могут сливаться***



Лимфоузлы увеличиваются, легко прощупываются на бедрах и особенно в предлопаточной области. Поверхностные лимфоузлы иногда имеют вид припухлостей.

У лактирующих коров может поражаться вымя (увеличивается в объеме с появлением узелков)

Cow, flank. Multiple skin papules and a markedly enlarged prefemoral lymph node.

Source: KVI,
dr. Y. Brenner

Perineum and udder. Multiple skin macules and papules



Нодулярный Дерматит

LSD

При **тяжелом** течении болезни поражаются *ротовая полость, органы дыхания и пищеварения*. Как следствие, изо рта выделяется густая тягучая слюна, из носа — гнойная слизь зловонного запаха. *Водянистое истечение из глаз* сменяется слизистым, при подсыхании, образуются корочки. *На веках появляются эрозии и изъязвления*. Иногда наблюдается *конъюнктивит, роговица мутнеет*, что может привести к частичной или полной слепоте. *Изъязвления, появляющиеся в дыхательных путях, вызывают сильный отек, и животное гибнет от удушья. Отеки в области подгрудка и конечностей.*



Нодулярный Дерматит ***LSD***



Source: Dr. B. Sharir

Больные коровы *не приходят в охоту*. У быков наступает временная *половая стерильность*. Больные животные быстро *худеют, портится шкура* (после дубления кожи на местах узлов остаются чашеобразные углубления и дыры). По краям бугорков эпидермис отделяется, а в центре ткань некротизируется и образуется характерная впадина, окаймленная валиком из грануляционной ткани размером 1—3 мм. Через 1—3 неделю после появления бугорка некротизированную ткань можно удалить в виде пробки (секвестра) или, подсыхая, она отпадает сама.

Нодулярный Дерматит

LSD

Несеквестрированные узелки затвердевают и остаются многие месяцы. При асептическом течении впадина быстро заполняется грануляционной тканью и зарастает волосом несколько другого цвета. При осложнении (вторичная инфекция) в глубоких слоях кожи и подкожной клетчатки появляется отек.

Постановка диагноза на нодулярный дерматит крупного рогатого скота

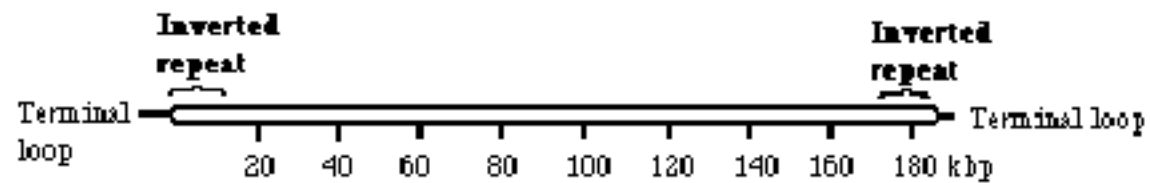
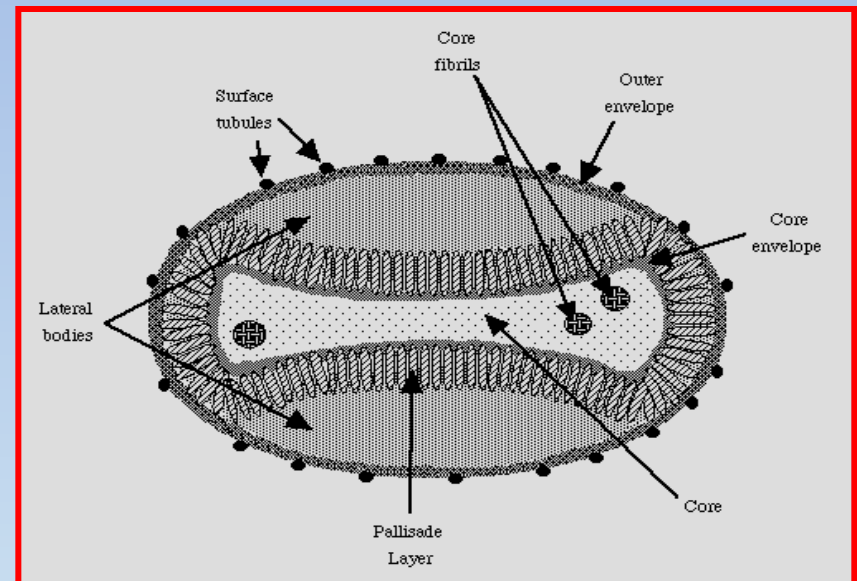
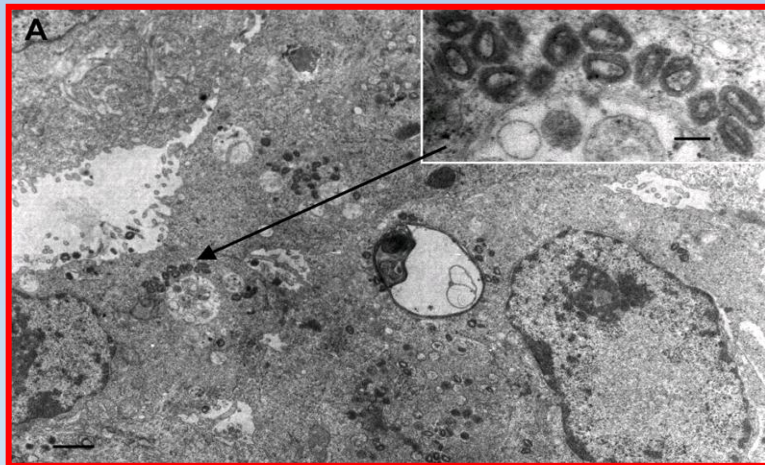
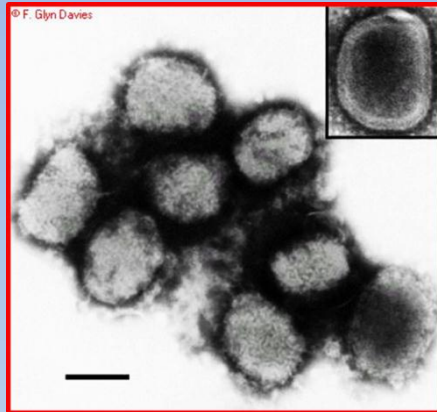
Комплексный метод включает:

- Эпизоотологическое (эпидемиологическое) обследование в сочетании с клинической картиной
- лабораторное подтверждение наличия источника возбудителя инфекции (Идентификация возбудителя)

Лабораторное подтверждение нодулярного дерматита у крупного рогатого скота (LSD)

- Идентификация возбудителя инфекции с помощью методов молекулярной биологии
- Электронная микроскопия (наличие типичных саргірох вирионов в материале – биопсии)
- Гистология
- Изоляция вируса на культуре клеток с последующей идентификацией в ПЦР
- Реакция иммунодиффузии (РИД)
- Реакция VNT (virus neutralization)

Pox Virus



brick-shaped virions, about 320x270x200 nm •
in size, with a genome of linear non-
segmented double-stranded DNA
(approximately 150 kilobases). The capsid
contains irregularly arranged surface tubules
and a layer of lipid that is not a true envelope.

Таксономия вируса НД кр.рог.скота (LSDV)

- International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) вирус оспы относится к роду 00.058.1.04 *Capripoxvirus*, принадлежащему к подсемейству 00.058.1 Chordopoxvirinae семейства 00.058 *Poxviridae*
- Род Capripoxvirus включает **вирус оспы овец (ВОО)**, **вирус оспы коз (ВОК)** и **вирус кожной бугорчатки КРС** (вирус нодулярного дерматита) .Представители рода близкородственны.
- ВОК является близкородственным ВОО, но таксономически самостоятельным видом. ВОО и ВОК не обладают четко выраженной хозяйской специфичностью: несмотря на то что обычно вирусы вызывают наиболее выраженное заболевание либо у овец, либо у коз, некоторые штаммы патогенны для обоих видов животных-хозяев

Table 1: Genera within the *Poxviridae* family

Genus	Viruses
<i>Capripoxvirus</i>	Sheeppox, goatpox, lumpy skin disease viruses
<i>Orthopoxvirus</i>	Buffalopox, camelpox, cowpox, vaccinia, ectromelia, monkeypox, rabbitpox, raccoonpox, taterapox, variola and volepox viruses
<i>Parapoxvirus</i>	Pseudocowpox, bovine papular stomatitis, contagious pustular dermatitis (orf), squirrel parapox viruses and parapoxvirus of red deer
<i>Suipoxvirus</i>	Swinepox virus
<i>Avipoxvirus</i>	Fowlpox, canarypox, juncopox, pigeonpox, quailpox, sparrowpox, starlingpox, turkeypox, mynahpox and pcittacinepox viruses
<i>Leporipoxvirus</i>	Hare fibroma, myxoma, rabbit (Shope) fibroma, and squirrel fibroma viruses
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum</i> virus
<i>Yatapoxvirus</i>	Yaba and tanapox viruses

Строение и функции ДНК

ДНК — полимер, мономерами которой являются дезоксирибонуклеотиды.

Молекула ДНК образована двумя полинуклеотидными цепями, спирально закрученными друг около друга и вместе вокруг воображаемой оси, т.е. представляет собой двойную спираль

Мономер ДНК — нуклеотид (дезоксирибонуклеотид) — состоит из остатков трех веществ:

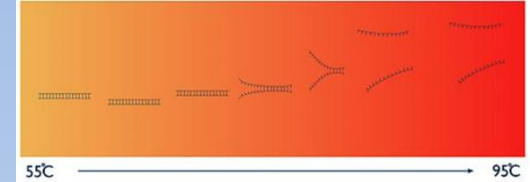
- 1) азотистого основания
- 2) пятиуглеродного моносахарида (пентозы)
- 3) фосфорной кислоты.

Азотистые основания нуклеиновых кислот относятся к классам пиримидинов и пуринов. Комплементарные комплексы *аденин – тимин* и *гуанин – цитозин*

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Ход реакции



Обычно при проведении ПЦР выполняется 30—35 циклов, каждый из которых состоит из трёх стадий

1. Денатурация (*Denaturation , DNA melting*)

Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °С

2. Отжиг (*Annealing*)

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется **отжигом**

3. Элонгация (*Extension/elongation step*)

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве *затравки*.

ПЦР в реальном времени

или количественная ПЦР , *Real-time PCR*, Quantitative PCR - *qPCR*

Принцип ПЦР в реальном времени заключается в детекции ПЦР-продукта по мере его накопления с помощью **высокоспецифичных флуоресцентных зондов**:

- во время элонгации и отжига флуоресценция усиливается с каждым новым циклом.
- сила сигнала говорит о первоначальном количестве интересующей молекулы
- используется для непосредственного наблюдения за измерением количества конкретного ПЦР продукта в каждом цикле реакции. В этом методе используют **флуоресцентно-меченые праймеры или ДНК-зонды** для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления;
- или используется флуоресцентный **интеркалирующий краситель *Sybr Green I***, который связывается с двухцепочечной ДНК. В ходе амплификации краситель SYBR Green I встраивается в малую бороздку ДНК ПЦР продуктов и испускает более сильный по сравнению с несвязанным красителем флуоресцентный сигнал при облучении синим лазером. Максимум поглощения для SYBR Green I находится при длине волны 494 нм.

Максимум испускания для SYBR Green I находится при длине волны 521 нм (зелёный)

Вариант ПЦР с функцией HRM (High Resolution Melting)

В основе данного подхода лежит гетеродуплексный анализ с использованием *интеркалирующих красителей и последующим плавлением ампликонов в одной пробирке.*

Генотипирование производится автоматически, на основе анализа форм кривых, с применением специализированного программного обеспечения в интерпретации форм кривых с применением математических методов анализа полученных результатов.

Разница температур плавления для различных генотипов (в тех случаях когда она должна быть) должна составлять более $0,1^{\circ}\text{C}$, что делает систему устойчивой, позволяя проводить надежное автоматическое генотипирование и оставляя возможность для визуальной интерпретации результатов

T_m — температура, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с олигонуклеотидным праймером.

Усредненная формула подсчета T_m для короткого олигонуклеотида (и для длинных ДНК фрагментов), с учетом концентрации ионов K⁺ и DMSO:

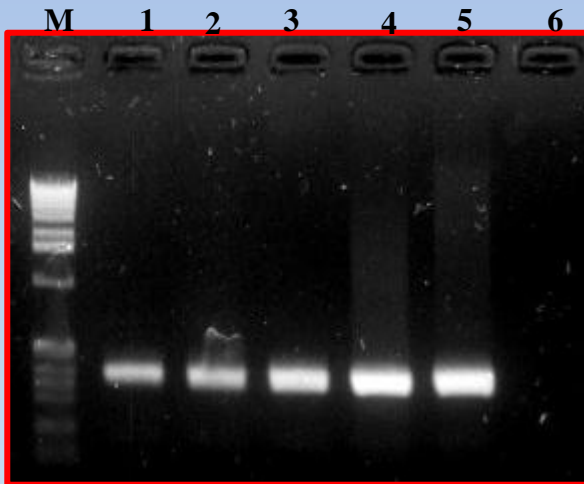
где L — количество нуклеотидов в праймере,

K⁺ — молярная концентрация ионов калия,

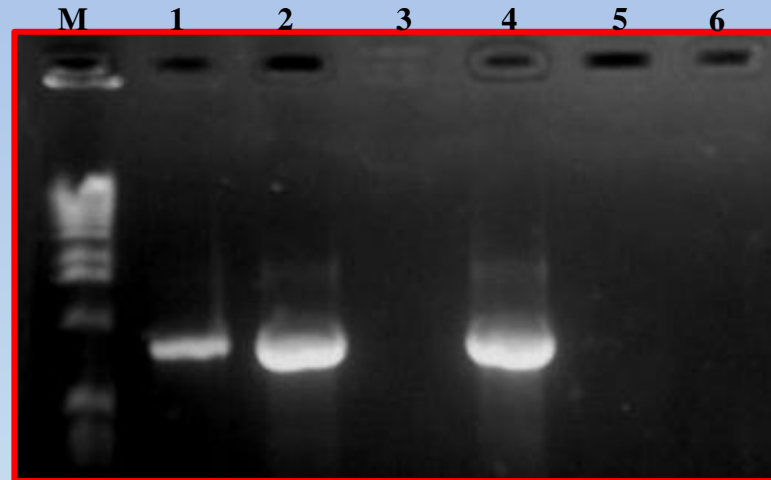
G+C — *сумма всех гуанинов и цитозинов*

The first 2012 LSDV detection

Capripox primers



LSDV specific primers



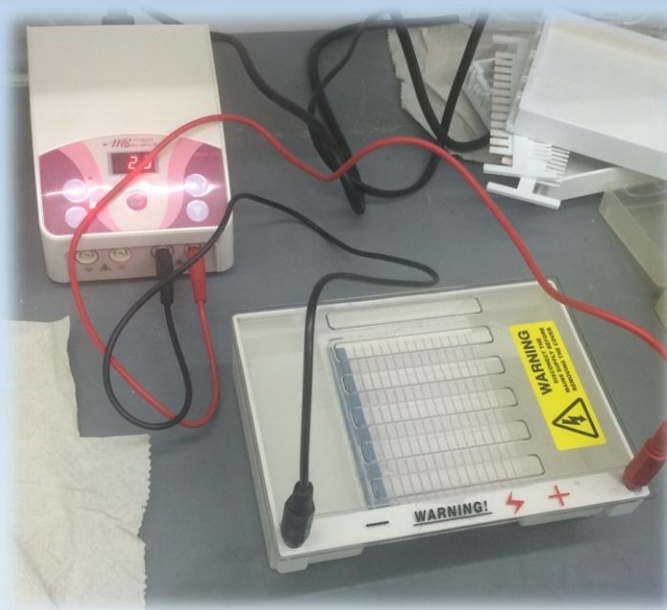
N 1 & N 2: samples LSDV pos.

N 3: Control pos. Sh.Pox.

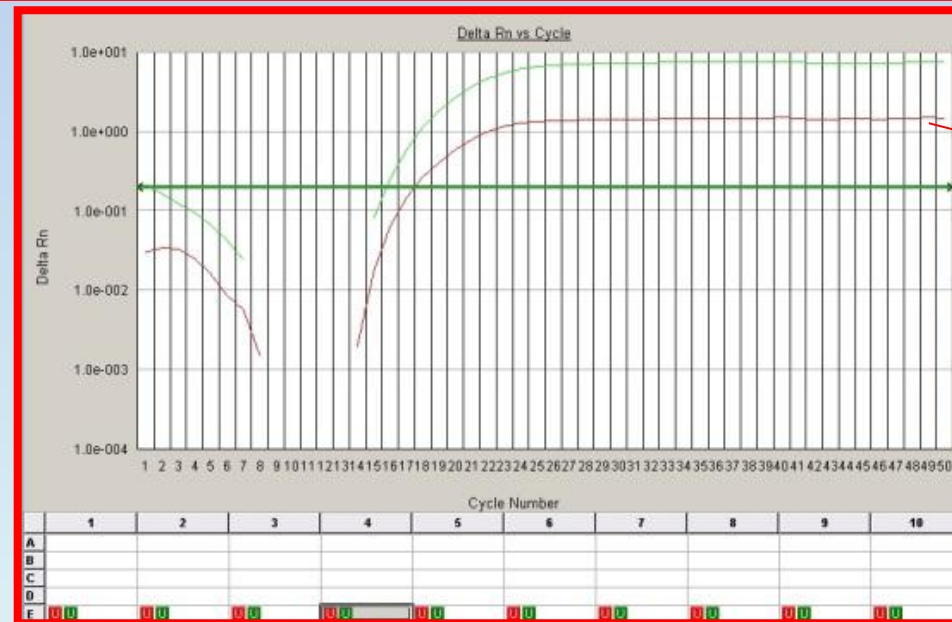
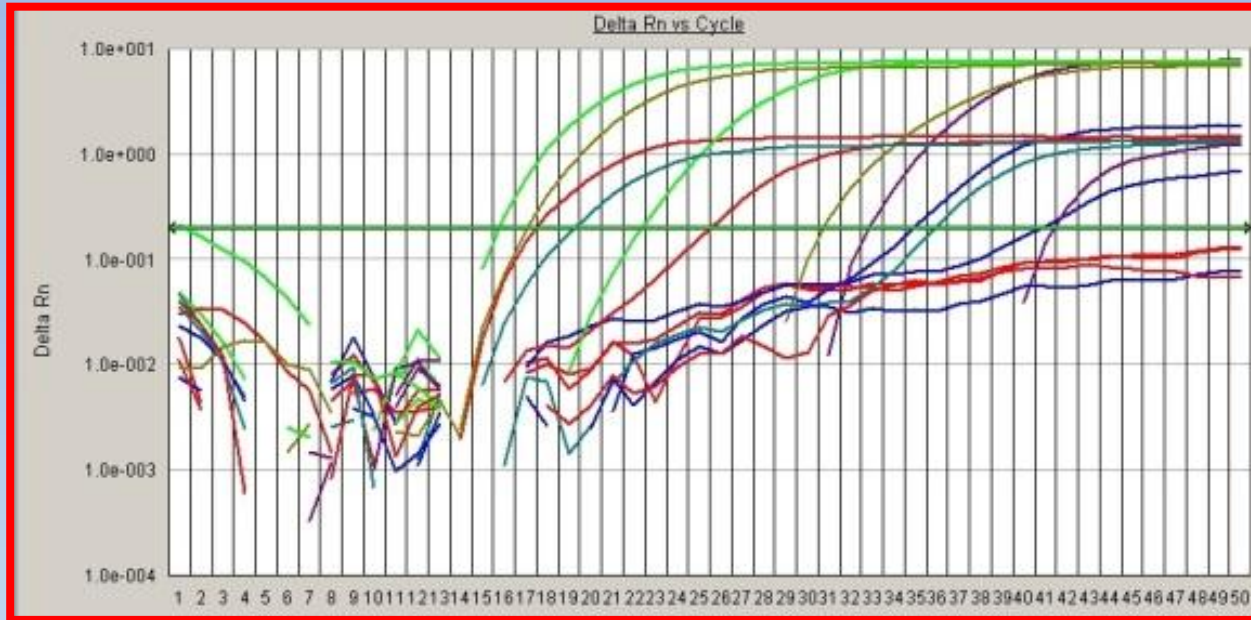
N 4: Control pos. LSDV

N 5: Control pos. Sh.Pox (DNA)

N 6: Control neg.



Detection LSD Virus DNA by QPCR

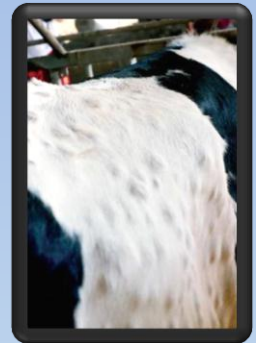


LSD

Capripox

DIVA - (Marker)

Differentiating
Infected from
Vaccinated
Animals



DIVA

(Differentiating Infected from Vaccinated Animals)

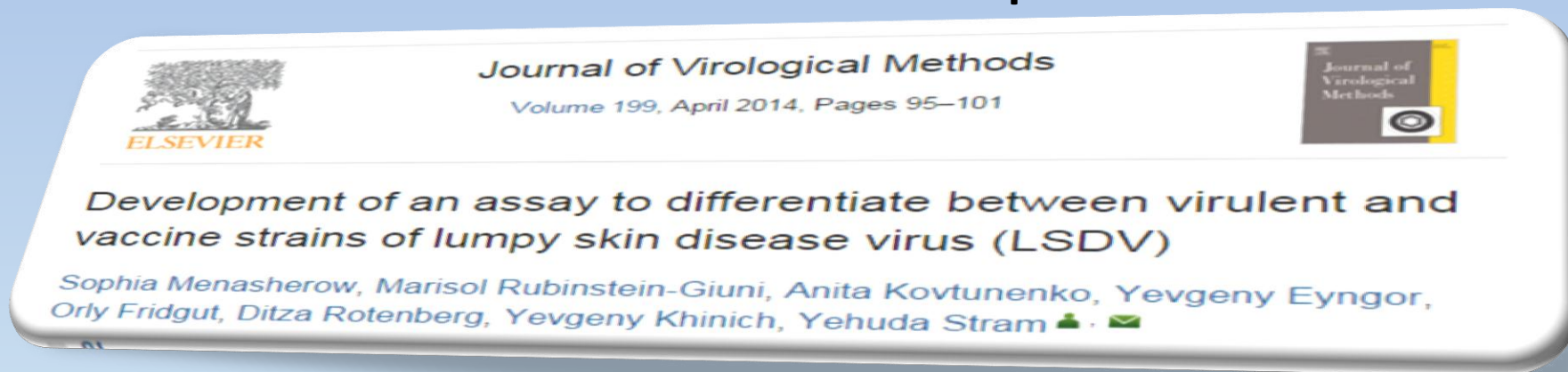
Development of a strategy using a vaccine containing a heterologous vaccine for the control of LSD :

It is not possible to differentiate between infected and vaccinated animals using the currently available tests (Tuppurainen and Oura, 2012)

Метод DIVA предусматривает использование гетерологичной вакцины, что позволяет и облегчает дифференциальную диагностику заболевания

Molecular Assay can differentiation between the virulent isolates from the vaccine strain (Neethling)

Методы ПЦР позволяющие диагностировать заболевание вызванное полевым штаммом и поствакцинальные осложнения при использовании гетерологичной и гомологичной вакцин



Система основана на различных методах ПЦР:
Установлено, что в гене LSDV126 вириона EEV (extracellular enveloped virions - EEV gene) вакцинного штамма и в вирусах оспы коз и овец **на 27 оснований меньше, чем в вирулентном (полевом) вирусе.**

Методы ПЦР позволяющие диагностировать заболевание вызванное полевым штаммом и поствакцинальные осложнения при использовании гетерологичной и гомологичной вакцин

- **ПЦР (PCR)** - для индикации и видовой дифференциации каприпоксвирусов в результате анализа полных нуклеотидных последовательностей генома каприпоксвирусов, представленных в базе данных GenBank. (sequence and phylogenetic analysis)
- **Градиент температур ПЦР** позволяет использование праймеров, идентичных вакцинному штамму, но различных по конечным нуклеотидам 3'к вирулентным вирусам
- **PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ - RFLP)** - способ исследования геномной ДНК, путем разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путем гель-электрофореза (ДНК электрофореза). **Энзим MboI** позволяет провести рестрикцию уникального сайта, который имеется только в вакцинном вирусе
- Вариант ПЦР с функцией HRM (High Resolution Melting)
- Все тесты (виды ПЦР)- позволяют отдифференцировать полевой вирус от вакцинных штаммов

Homology analysis Neethling-vaccine-Israeli isolates

```

LSD-2127      AGGTGAAGAAAATTTAATTTGGGACGATAACAACGTTTATGATTTACCACCTAATGATAG 193
LSD-1112      AGGTGAAGAAAATTTAATTTGGGACGATAACAACGTTTATGATTTACCACCTAATGATAG 192
LSD2101       AGGTGAAGAAAATTTAATTTGGGACGATAACAACGTTTATGATTTACCACCTAATGATAG 193
MDBK-LSD      AGGTGAAGAAAATTTAATTTGGGACGATAACAACGTTTATGATTTACCACCTAATGATAG 195
LSD-1021      AGGTGAAGAAAATTTAATTTGGGACGATAACAACGTTTATGATTTACCACCTAATGATAG 240
vacc-Contig   AGGTGAAGAAAATTTAATTTGGGATGATAACAACGTTTATGATTTACCG----- 182
                *****

LSD-2127      TGTTTATGATTTACCACCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 253
LSD-1112      TGTTTATGATTTACCACCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 252
LSD2101       TGTTTATGATTTACCACCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 253
MDBK-LSD      TGTTTATGATTTACCACCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 255
LSD-1021      TGTTTATGATTTACCACCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 300
vacc-Contig   -----CCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 226
                *****

LSD-2127      CGAGTCAAACCTATTATAAATTGTTGTTAAAAATTTTAACATGAAAAATAAAATATTTAGGT 373
LSD-1112      CGAGTCAAACCTATTATAAATTGTTGTTAAAAATTTTAACATGAAAAATAAAATATTTAGGT 372
LSD2101       CGAGTCAAACCTATTATAAATTGTTGTTAAAAATTTTAACATGAAAAATAAAATATTTAGGT 373
MDBK-LSD      CGAGTCAAACCTATTATAAATTGTTGTTAAAAATTTTAACATGAAAAATAAAATATTTAGGT 375
LSD-1021      CGAGTCAAACCTATTATAAATTGTTGTTAAAAATTTTAACATGAAAAATAAAATATTTAGGT 420
vacc-Contig   CGAGTCAAACCTATTATAAATTGTTGTTAAATTTTAAACATGAAAAATAAAATATTCAGAT 346
                *****

LSD-2127      CGATTCCGTTTTTTTGATATTATTAATAAATAAAAACGCAAGTTTTAGATTACTTTGTATGA 433
LSD-1112      CGATTCCGTTTTTTTGATATTATTAATAAATAAAAACGCAAGTTTTAGATTACTTTGTATGA 432
LSD2101       CGATTCCGTTTTTTTGATATTATTAATAAATAAAAACGCAAGTTTTAGATTACTTTGTATGA 433
MDBK-LSD      CGATTCCGTTTTTTTGATATCATTAAATAAATAAAAACGCAAGTTTTAGATTACTTTGTATGA 435
LSD-1021      CGATTCCGTTTTTTTGATATTATTAATAAATAAAAACGCAAGTTTTAGATTACTTTGTATGA 480
vacc-Contig   CGATTCCGTTTTTTTGATATCATTAAATAAATAAAAACGCAAGTTTTAGATTACTTTGTATGA 406
                *****

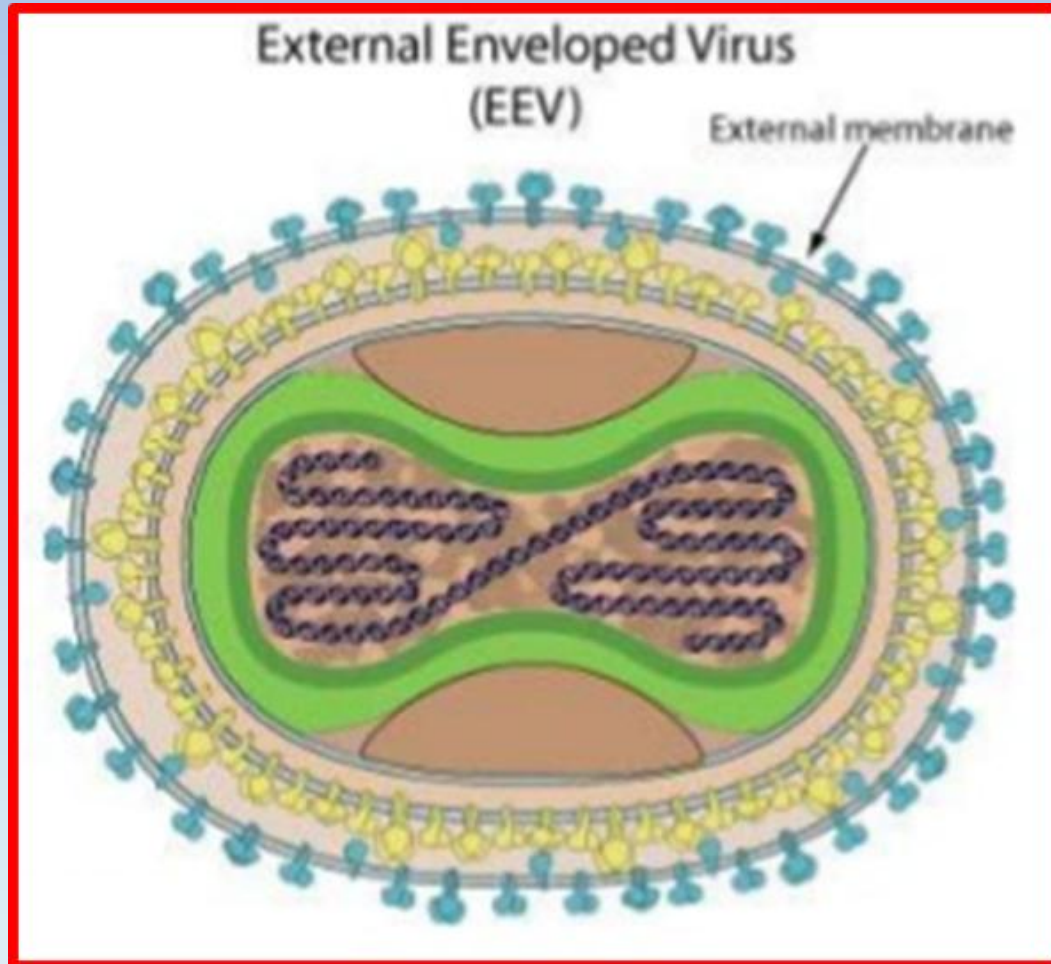
LSD-2127      AATCAGCAAAAAAAGGTGGGGTAATGGTTATTTTAAATAAAGCTACAAAAATAAAAAAAG 673
LSD-1112      AATCAGCAAAAAAAGGTGGGGTAATGGTTATTTTAAATAAAGCTACAAAAATAAAAAAAG 672
LSD2101       AATCAGCAAAAAAAGGTGGGGTAATGGTTATTTTAAATAAAGCTACAAAAATAAAAAAAG 673
MDBK-LSD      AATCAGCAAAAAAAGGTGGGGTAATGGTTATTTTAAATAAAGCTACAAAAATAAAAAAAG 675
LSD-1021      AATCAGCAAAAAAAGGTGGGGTAATGGTTATTTTAAATAAAGCTACAAAAATAAAAAAAG 720
vacc-Contig   AATCGGCAAAAAAAGGTGGGGTAATGGTTATTTTAAATAAAGCTACAAAAATAAAAAAAG 646
                ****
    
```

Blast Analysis Neethling-vaccine VS virulent isolate

Query	26218	aagaaaaTG TAGAGATTGTTGAAATTAAACGTTGTGATAATGAATTAATTGAAGAAGGTA	26277
Sbjct	116388	AAGAAAATGTAGAGATTGTTGAAATTAAACGTTGTGATAATGAATTAATTGAAGAAAGTA	116447
Query	26278	ATAATAACGTTTTAGAAAATGGATGTACCACAAATACAGGTGAAGAAAATTTAATTTGGG	26337
Sbjct	116448	ATAATAACGTTTTAGAAAATGGATGTACCACAAATACAGGTGAAGAAAATTTAATTTGGG	116507
Query	26338	ATGATAACAACGTTTATGATTTACCGCCTAACGATT-TGAGT-TG-T--A--AC--AACG	26388
Sbjct	116508	ACGATAACAACGTTTATGATTTACCACCTAATGATAGTGTTTATGATTTACCACCTAACG	116567
Query	26389	ATT-G--T-GT-----TT-----ATACATTACCGGACGACAATGTTTCAAACATAG	26430
Sbjct	116568	ATTTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACCGGATGACAATGTTTCAAACATAG	116627
Query	26431	AGGAAAAAATAACTAAGTTAATGCACAAAAATAATTCCGAGTCAAAC TATTATAATTGTT	26490
Sbjct	116628	AGGAAAAAATAACTAAGTTAATGCACAAAAATAATTCCGAGTCAAAC TATTATAATTGTT	116687
Query	26491	GTTAAATTTTTTAAACATGAAAAATAAAATATTCAGATCGATTCCGTTTTTTGATATCATT	26550
Sbjct	116688	GTTAAAAATTTTTAACATGAAAAATAAAATATTTAGGTCGATTCCGTTTTTTGATATCATT	116747

LSDV126

EEV virus form has an important role
in cell-to-cell
and long range spread of the virus



LSDV Neethling vaccine & LSDV virulent strains

EEV gene

```

LSD-2127      AGGTGAAGAAAAATTTAATTTGGGACGATAACAACGTTTATGATTACCACCTAATGATAG 193
LSD-1112      AGGTGAAGAAAAATTTAATTTGGGACGATAACAACGTTTATGATTACCACCTAATGATAG 192
LSD2101       AGGTGAAGAAAAATTTAATTTGGGACGATAACAACGTTTATGATTACCACCTAATGATAG 193
MDBK-LSD      AGGTGAAGAAAAATTTAATTTGGGACGATAACAACGTTTATGATTACCACCTAATGATAG 195
LSD-1021      AGGTGAAGAAAAATTTAATTTGGGACGATAACAACGTTTATGATTACCACCTAATGATAG 240
vacc-Contig    AGGTGAAGAAAAATTTAATTTGGGATGATAACAACGTTTATGATTACCG----- 182
*****
LSD-2127      TGTTTATGATTACCACCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 253
LSD-1112      TGTTTATGATTACCACCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 252
LSD2101       TGTTTATGATTACCACCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 253
MDBK-LSD      TGTTTATGATTACCACCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 255
LSD-1021      TGTTTATGATTACCACCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 300
vacc-Contig    -----CCTAACGATTGAGTTGTAACAACGATTGTGTTTATACATTACC 226
*****
  
```

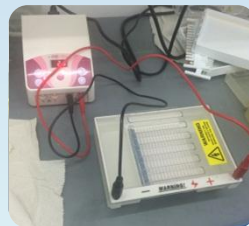
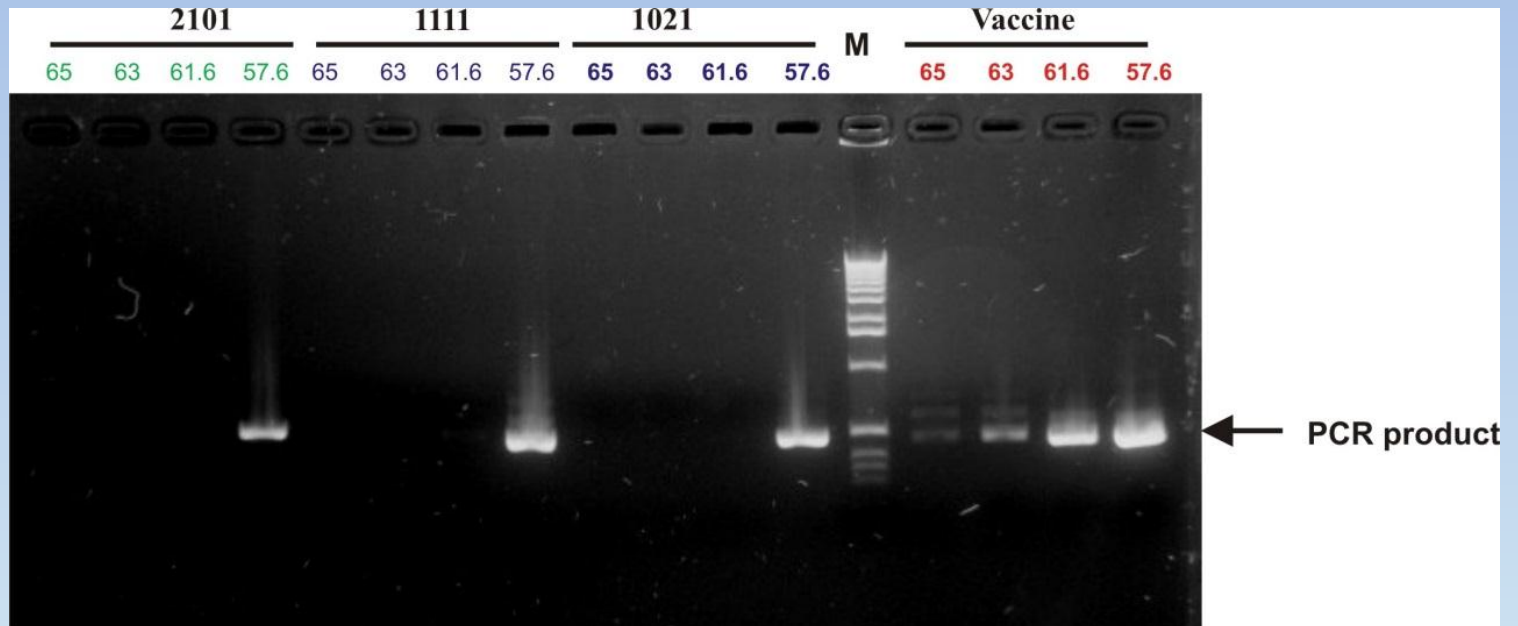
EEV glycoprotein

```

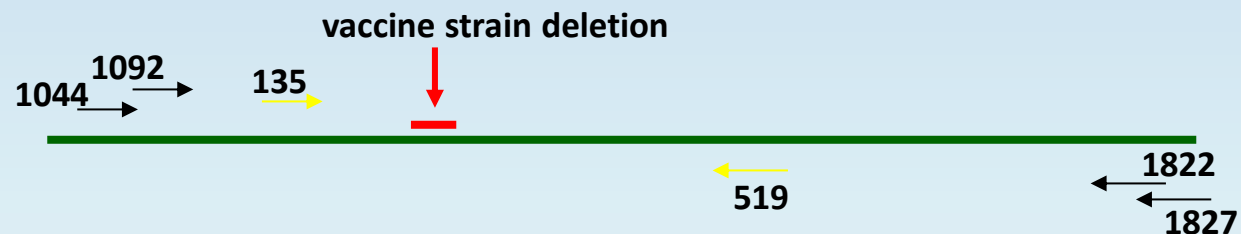
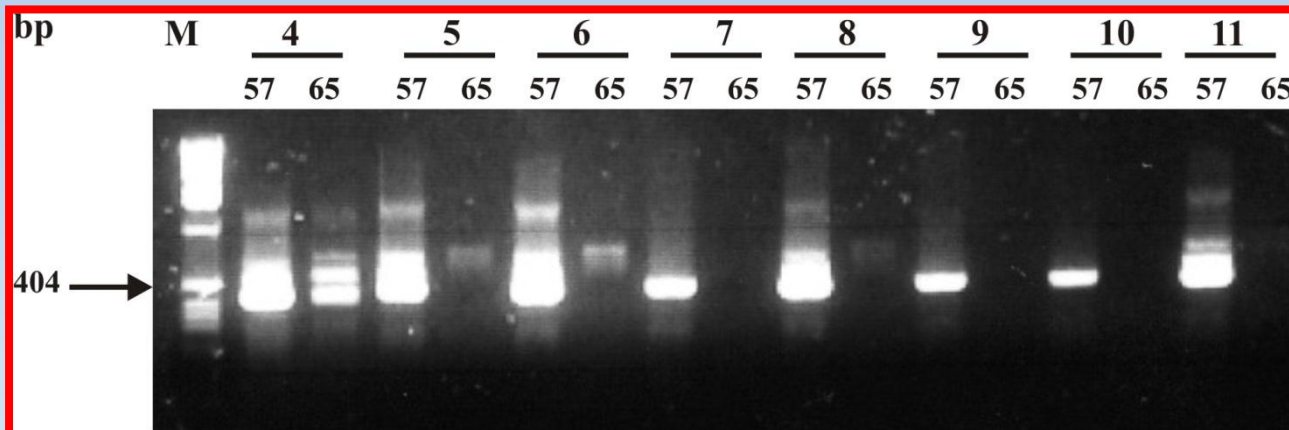
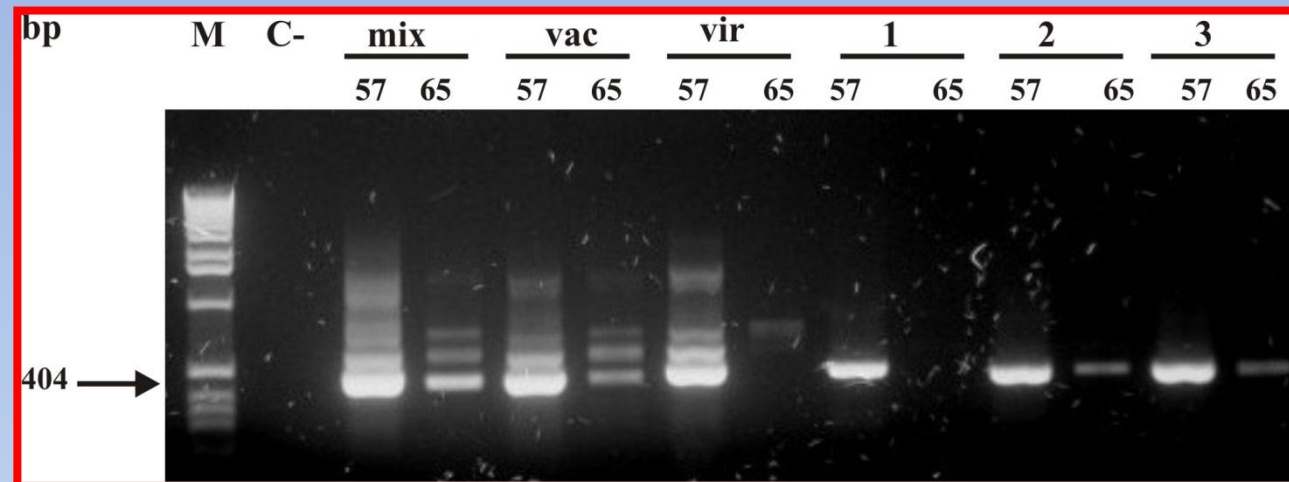
LSD-2013a     NNNVLENGCCTTNTGEENLIWDDNNVYDLPPNDSVYDLPPNDLSCNNDCVY 97
LSD-2013b     NNNVLENGCCTTNTGEENLIWDDNNVYDLPPNDSVYDLPPNDLSCNNDCVY 81
LSD-2013c     NNNVLENGCCTTNTGEENLIWDDNNVYDLPPNDSVYDLPPNDLSCNNDCVY 81
LSD-2013d     NNNVLENGCCTTNTGEENLIWDDNNVYDLPPNDSVYDLPPNDLSCNNDCVY 81
LSD-2006      NNNVLENGCCTTNTGEENLIWDDNNVYDLPPNDSVYDLPPNDLSCNNDCVY 82
LSDV-NI-2490  NNNVLENGCCTTNTGEENLIWDDNNVYDLPPNDSVYDLPPNDLSCNNDCVY 150
LSD-vacc      NNNVLENGCCTTNTGEENLIWDDNNVYDLPPND-----LSCNNDCVY 72
Sheeppox     NNNVLENGFTTNTGEENLIWDDNNVYDLPPND-----LSSNNDCVY 141
Goatpox      NNNVLENGCCTTNTGEENLIWDDNNVYDLPPND-----LSCNNDCDY 141
Neethling-vacc NNNVLENGCCTTNTGEENLIWDDNNVYDLPPND-----LSCNNDCVY 141
*****
  
```

Y	D	L	P	N
Tyrosine	Asparatic acid	Leucine	Phenilalanine	Asparaganin

Temperature gradient analysis



Temperature gradient analysis



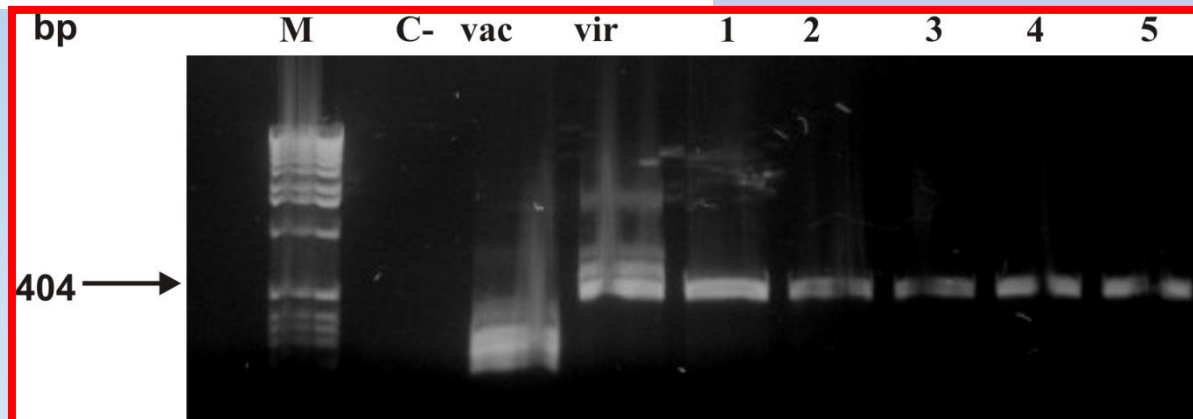
Mbol digest

Description

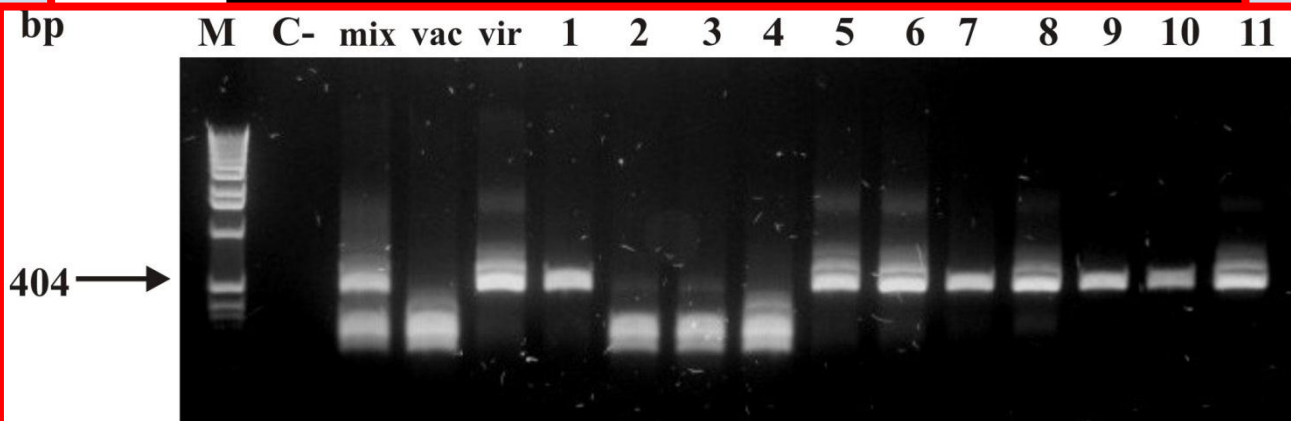
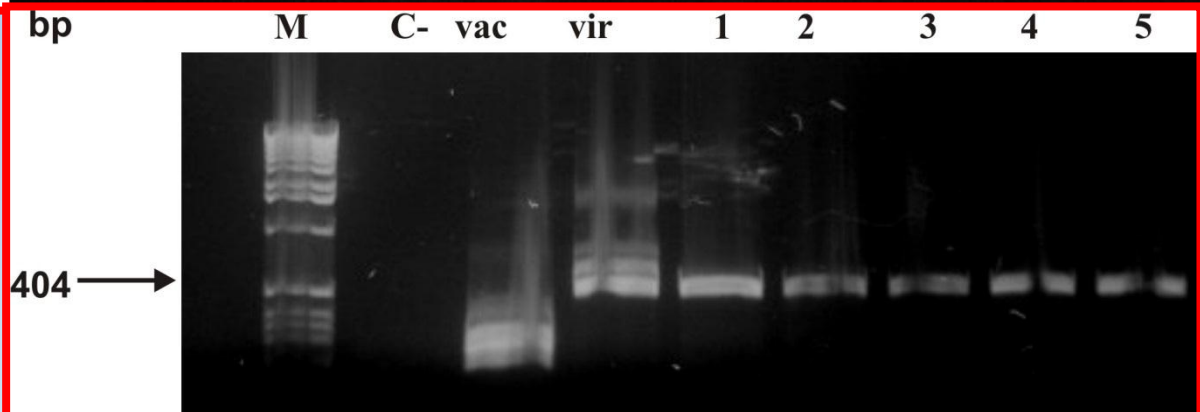
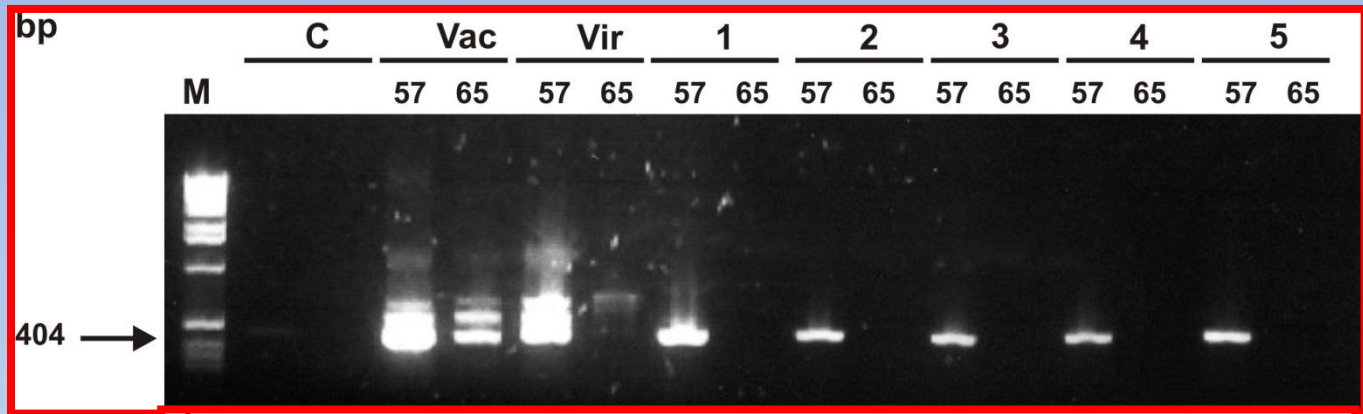
5' ↓ G A T C 3'
3' C T A G ↑ 5'

Thermo Scientific Mbol restriction enzyme recognizes [^]GATC sites and cuts best at 37°C in R buffer (Isoschizomers: BfuCI, BssMI, BstKTI, BstMBI, DpnII, Kzo9I, NdeII, Sau3AII). See [Reaction Conditions for Restriction Enzymes](#) for a table of enzyme activity, conditions for double digestion, and heat inactivation for this and other restriction enzymes. Note: Also available as a [FastDigest enzyme](#) for rapid DNA digestion.

5 ↓ G A T C 3
3 ↓ C T A G 5

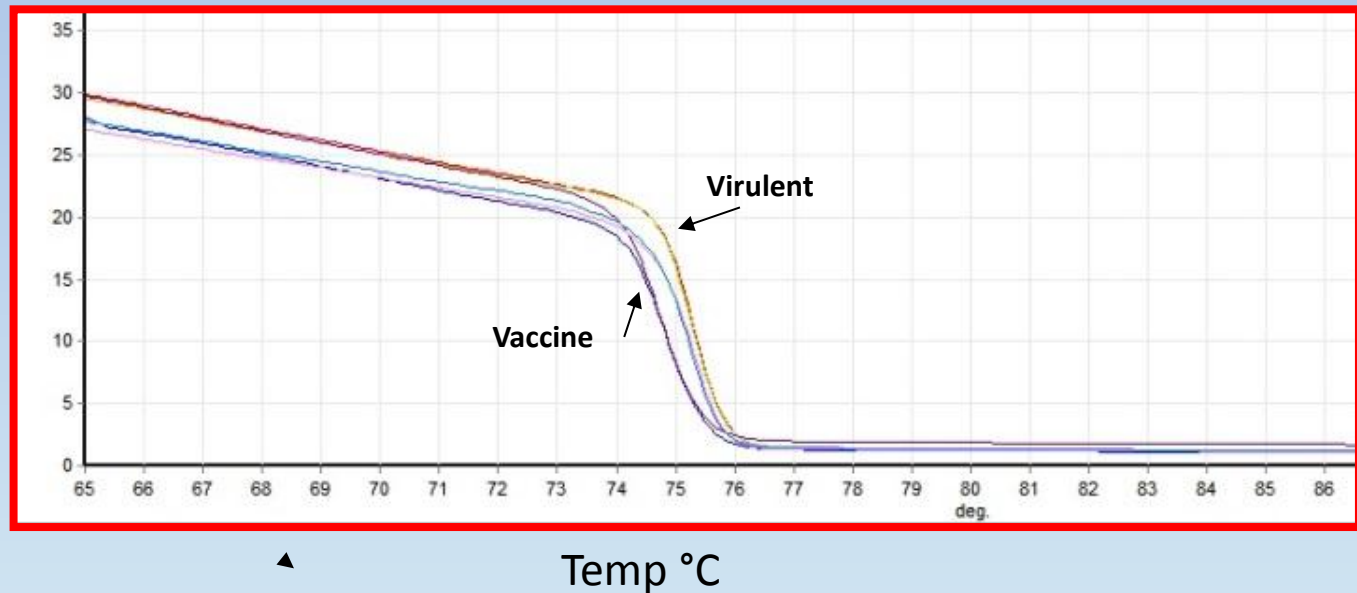


Temperature gradient & *Mbol* digest



High resolution curve (HRM) can differentiate between vaccine and virulent strains

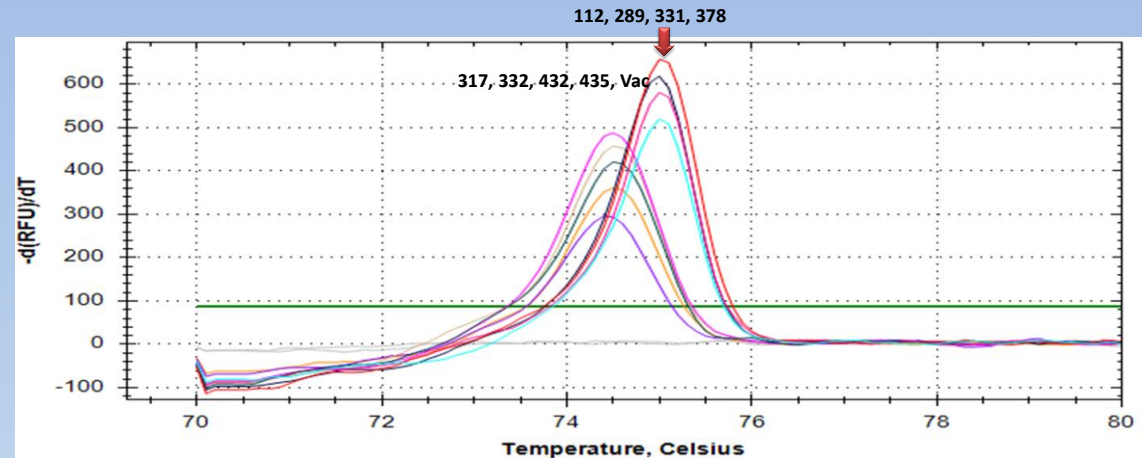
HRM analysis



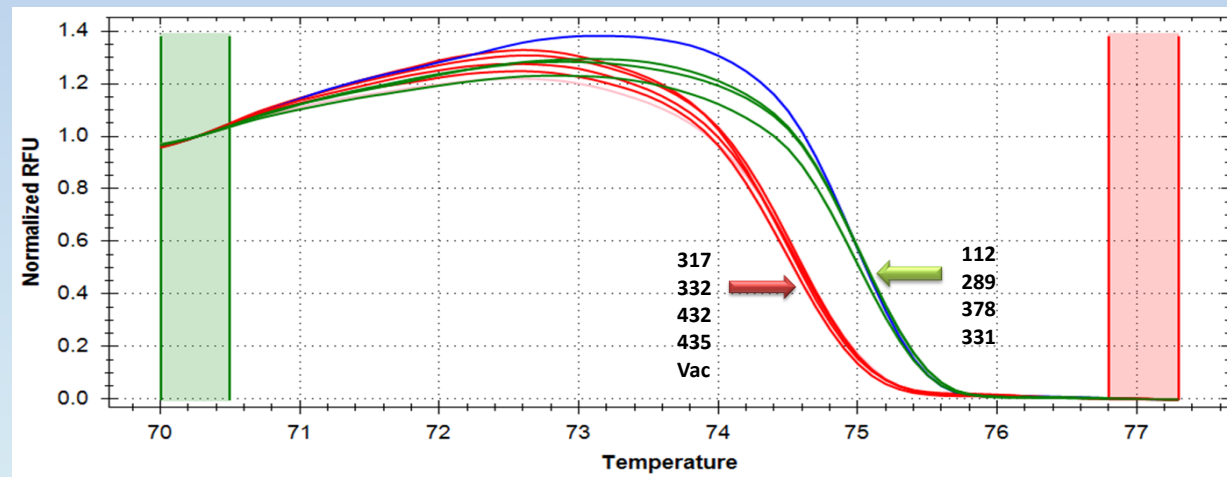


High resolution curve (HRM) can differentiate between vaccine and virulent strains

virulent isolates are positioned at
 T_m **76.1 °C**
viruses isolated from vaccinated
cattle, which developed disease
symptoms, together with vaccine
control samples are located at T_m
of **75.5 °C**



112 - LSD infected cattle Isolate
289 - LSD infected cattle Isolate
317 - LSD vaccinated cattle isolate
331 - LSD infected cattle Isolate
332 - LSD vaccinated cattle isolate
378 - LSD infected cattle Isolate
432 - LSD vaccinated cattle isolate
435 - LSD vaccinated cattle isolate
Vac - Neethling vaccine virus



Зависимость результатов исследования от вида материала (пробы)

- Всего было исследовано в ПЦР **31** животное от которых одновременно были отобраны биопсия и кровь
- *положительный результат* в ПЦР в *двух видах* образцов: **8**
- *положительный результат* в ПЦР в *образцах кожи* и *сомнительный* в пробах крови **7**
- *положительный результат* в ПЦР в *образцах кожи* и *отрицательный* в пробах крови **7**
- *сомнительный результат* в ПЦР в *образцах кожи* и *отрицательный* в пробах крови **1**
- *отрицательный результат* в ПЦР в *образцах кожи* и *отрицательный* в пробах крови **8**

Зависимость результатов исследования от вида материала (пробы)

вид материала (пробы)	Всего проверено			
	Σ	К-во проб с положит. рез-м	К-во проб с сомнительн. рез-м	К-во проб с отрицательн. рез-м
Биопсия кожи	23	22	1	0
Кровь, лейкоцитарная фракция	23	8	7	8

Отрицательный контроль:

а. В крови: 0/8

б. В коже: 0/8

Идентификация вируса LSD

Методы лабораторной диагностики

- **Отбор образцов и подготовка ткани для выделения вируса и обнаружения антигена**

Для проведения ПЦР и изолирования вируса мы использовали биоптаты кожи и лимфатических узлов, материал полученный при патологоанатомическом вскрытии из пораженных участков легких или лимфатических узлов, цельную кровь больных животных.

Используют для исследования сперму быков и слюну больных животных.

Идентификация вируса LSD

Методы лабораторной диагностики

Полученные образцы

☐ *биопсия кожи:*

- пересылка во льду, в термосах, в холодильнике при температуре 4°C
- хранение при температуре -20 °C
- длительное хранение предпочтительно при температуре -70 °C.

☐ *Кровь* пересылают при температуре 4°C, во льду в термосах, в холодильнике . Лейкоцитарную пленку (buffy coat) хранят при температуре -20 °C или -70 °C

Идентификация вируса LSD

Методы лабораторной диагностики

- При необходимости транспортировать пробы на большие расстояния без охлаждения - следует добавить в транспортную среду 10% р-р глицерина;
- Образцы должны быть достаточного размера.
- Материал для гистологического исследования пересылается в лабораторию в 10% растворе формалина

Выделение и репродукция вируса ВД (LSD) на культуре клеток



Для этой цели используют как первично-трипсинизированные, так и перевиваемые культуры клеток.

AHL-1 cells (CCL 195) cell line is derived from the lung of a normal, adult, male Armenian hamster, *Cricetulus migratorius*

AHL1_3 Day

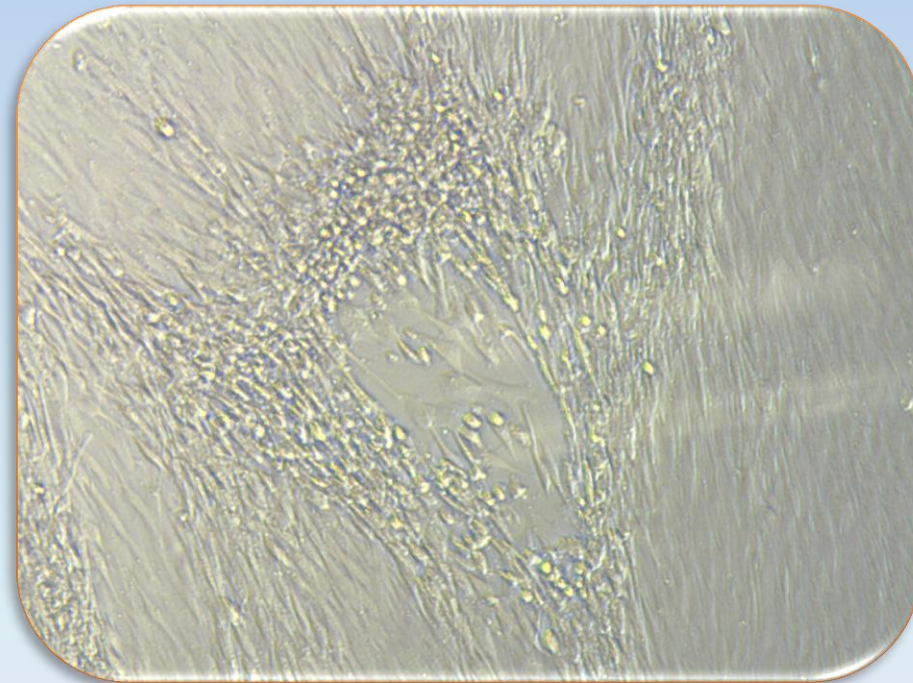
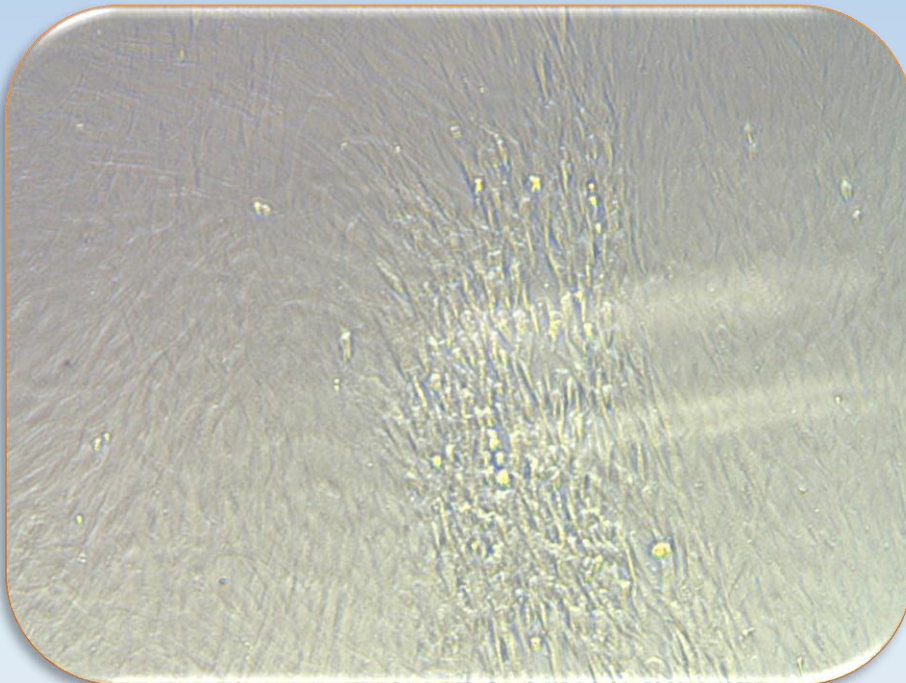
AHL1_4 Day



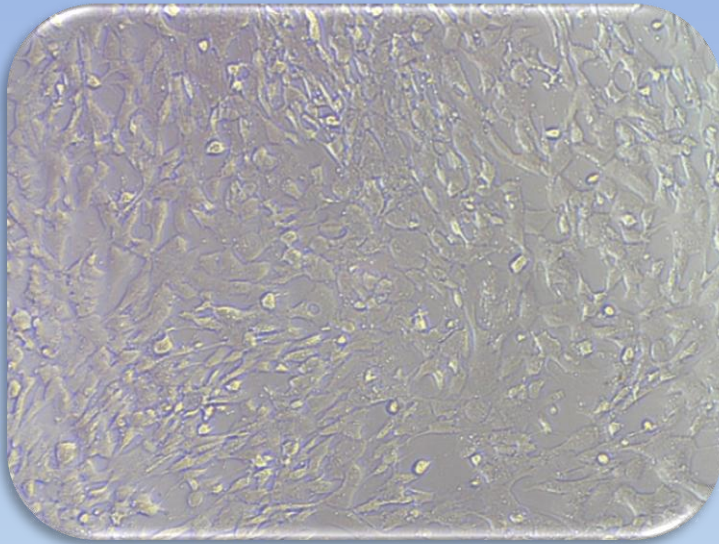
Armenian hamster lung cell line

LSDV. AHL1_4 Day PI

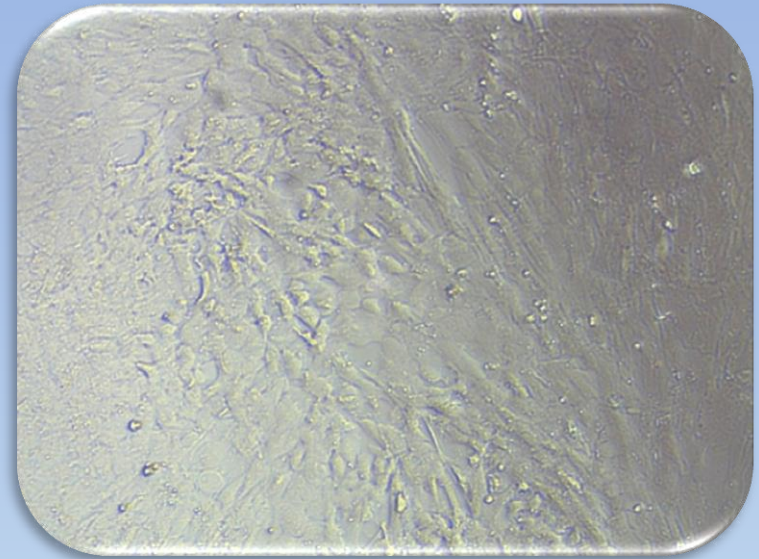
LSDV. AHL1_5Day PI



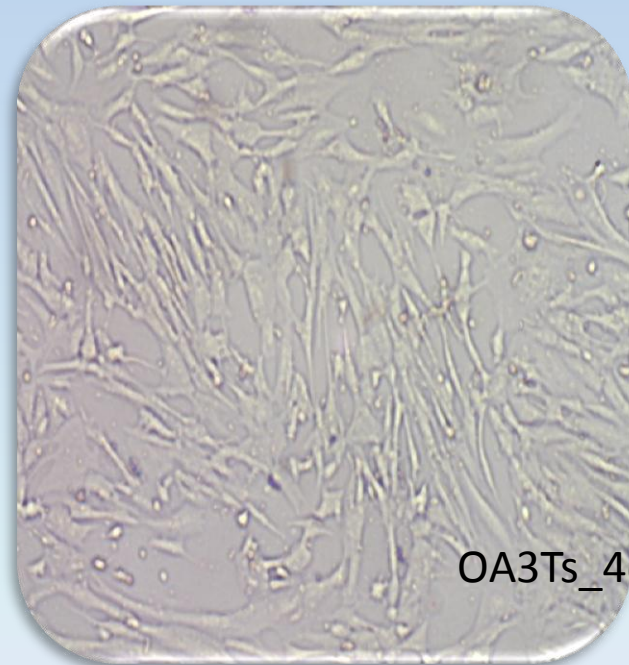
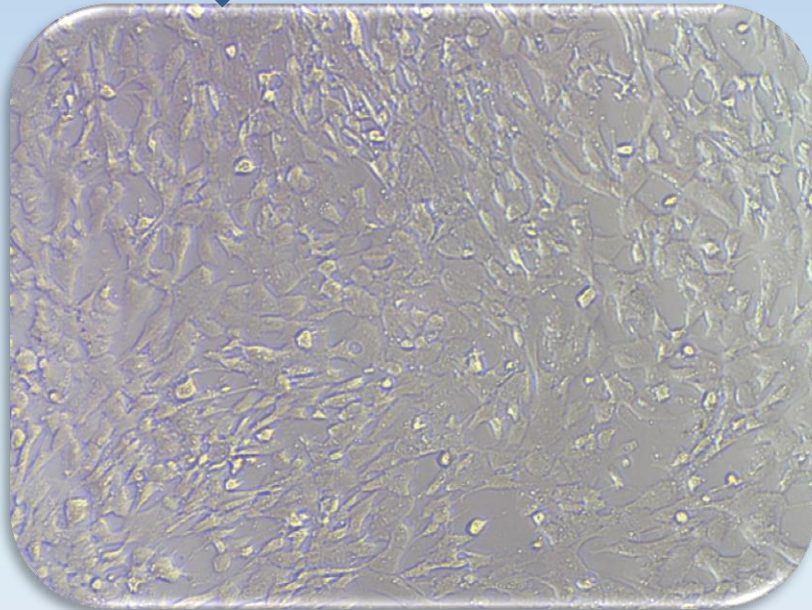
Ovine testis cell line (OA3.Ts)



OA3Ts_3dPI. LSDV

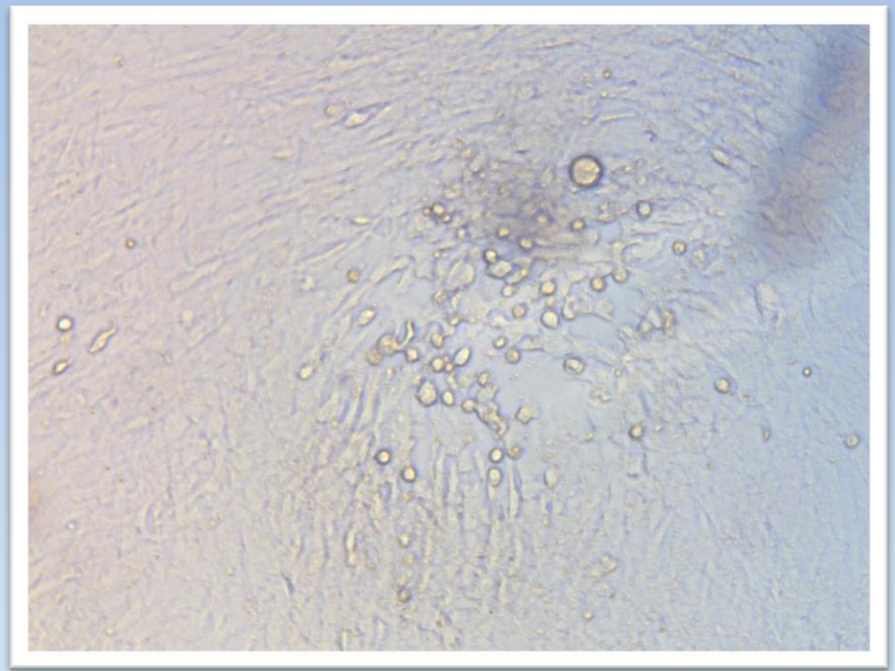
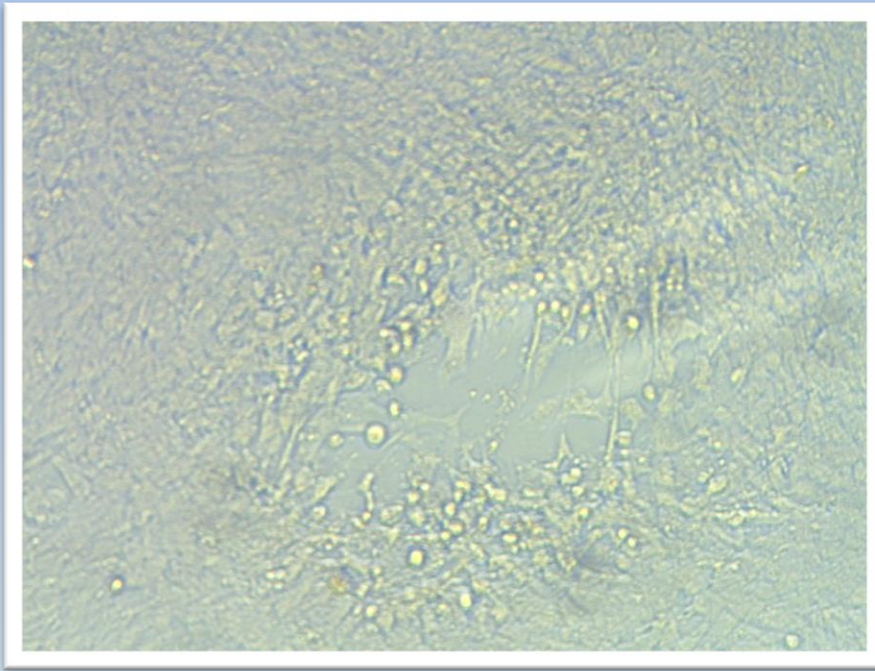


OA3Ts_7dPI. LSDV



OA3Ts_4dPI. LSDV

OA3Ts_4dPI. LSDV
(titration: 10^{-2} . titer $10^{3.5}$)



2007
Sep

Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization.

J. Vet. Diagn. Invest.

J Vet Diagn Invest 2007 Sep;19(5):486-91

Shawn Babiuk, Geoff Parkyn, John Copps, June E Larence, Marta I Sabara, Timothy R Bowden, David B Boyle, R Paul Kitching

[Download Full Paper](#)



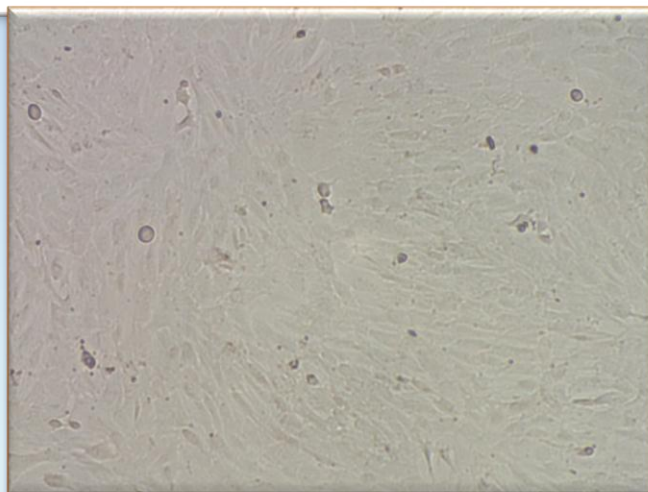
An ovine testis cell line (OA3.Ts) was evaluated and compared with primary lamb kidney (LK) cells for its utility in capripoxvirus propagation and titration. A comparison of OA3.Ts cell growth kinetics and morphology at low (<33) and high (34-36) passage levels indicated a difference in both characteristics. However, viral titers determined in low and high passage OA3.Ts cells were comparable with those obtained using LK cells.

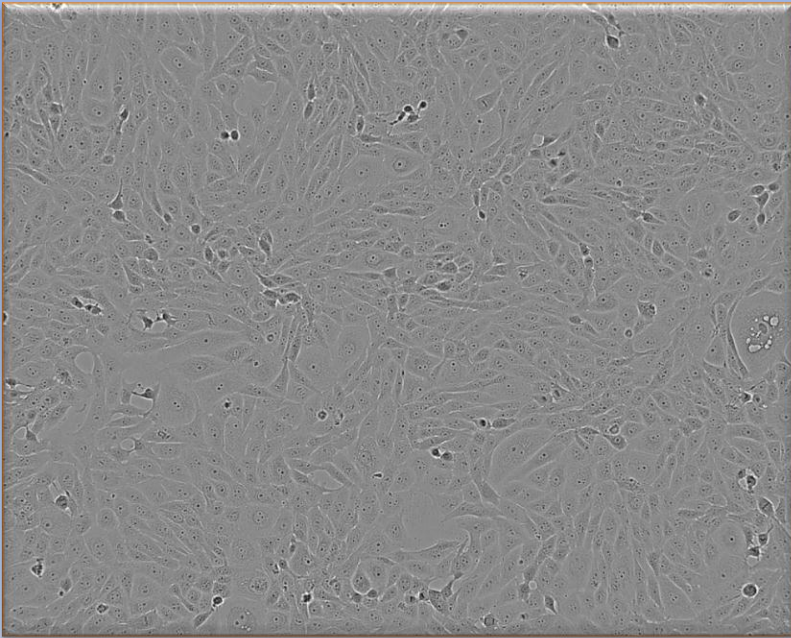
Capripoxvirus infection of OA3.Ts and LK cells resulted in a similar cytopathic effect, which allowed for the detection of discrete viral plaques following immunostaining with capripoxvirus-specific antiserum.

Affiliation

National Centre for Foreign Animal Disease, 1015 Arlington Street, Winnipeg MB, R3E

Canada. babiuks@inspection.gc.ca





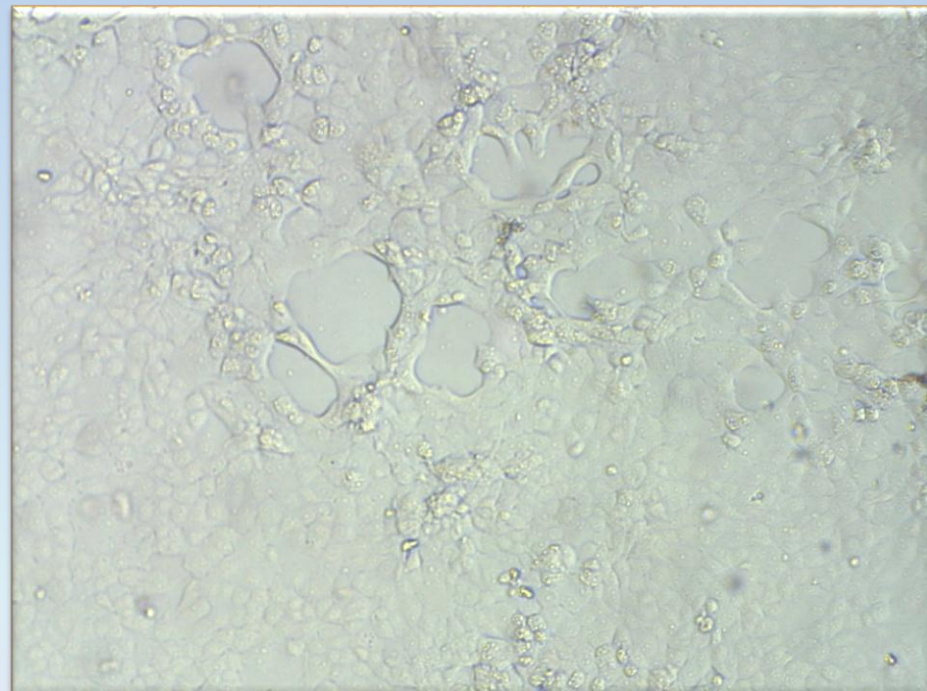
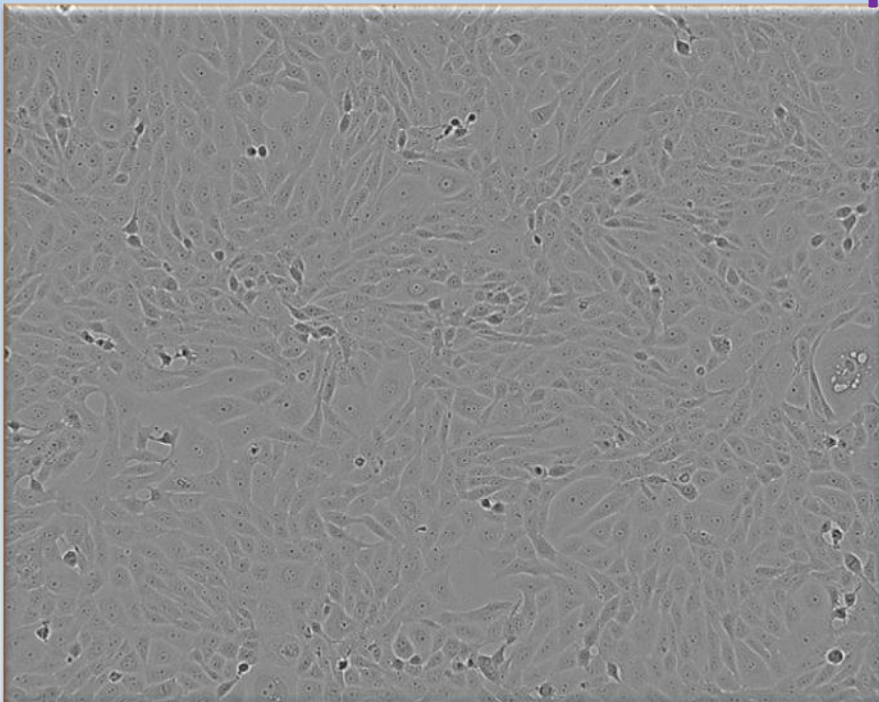
Derived from the kidney of an apparently normal, adult *Bos taurus*. Also known as MDBK (NBL-1).

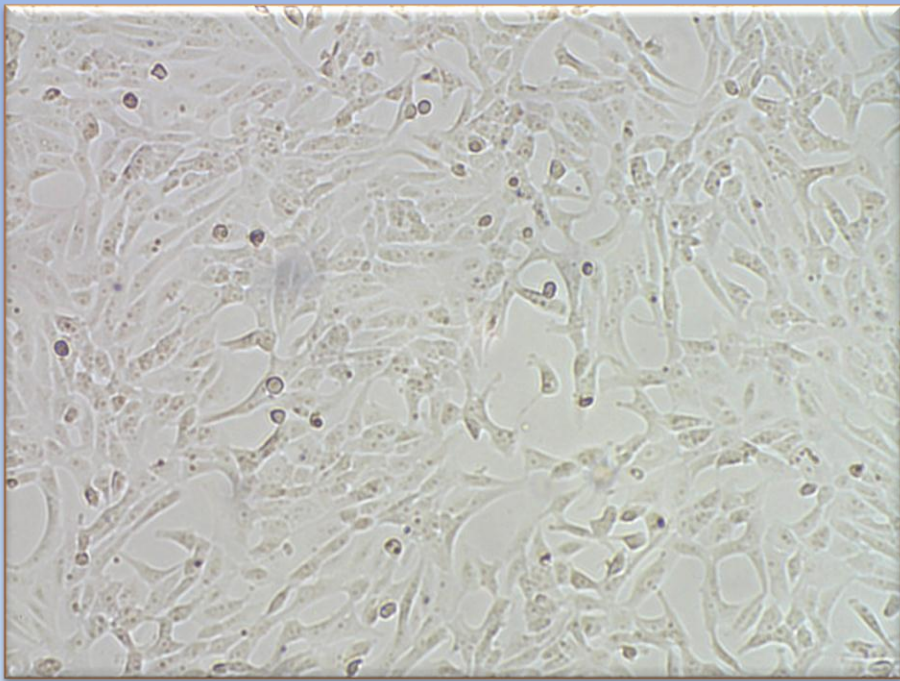


48 h post seeding

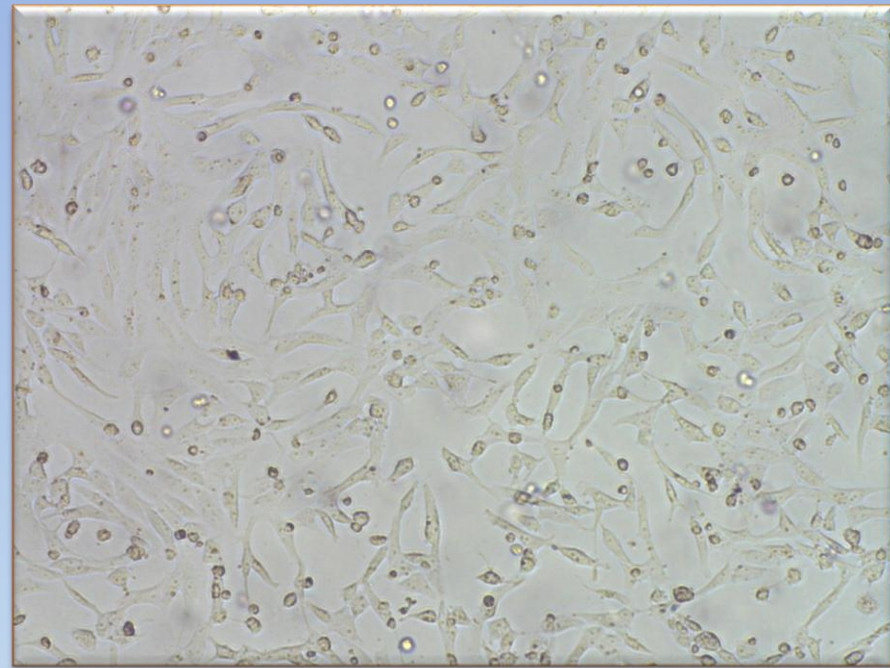
MDBK

4DPI. LSDV

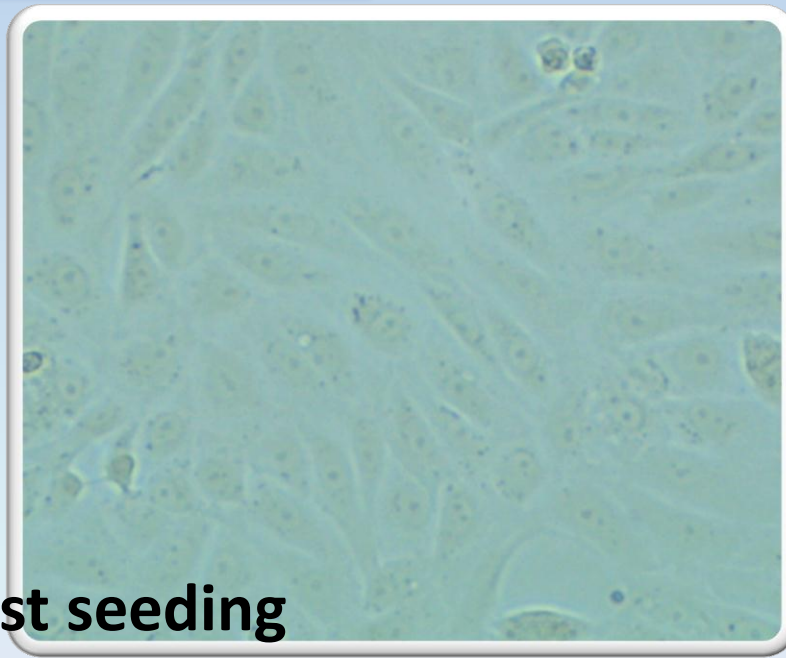




VERO 2dPI. LSDV

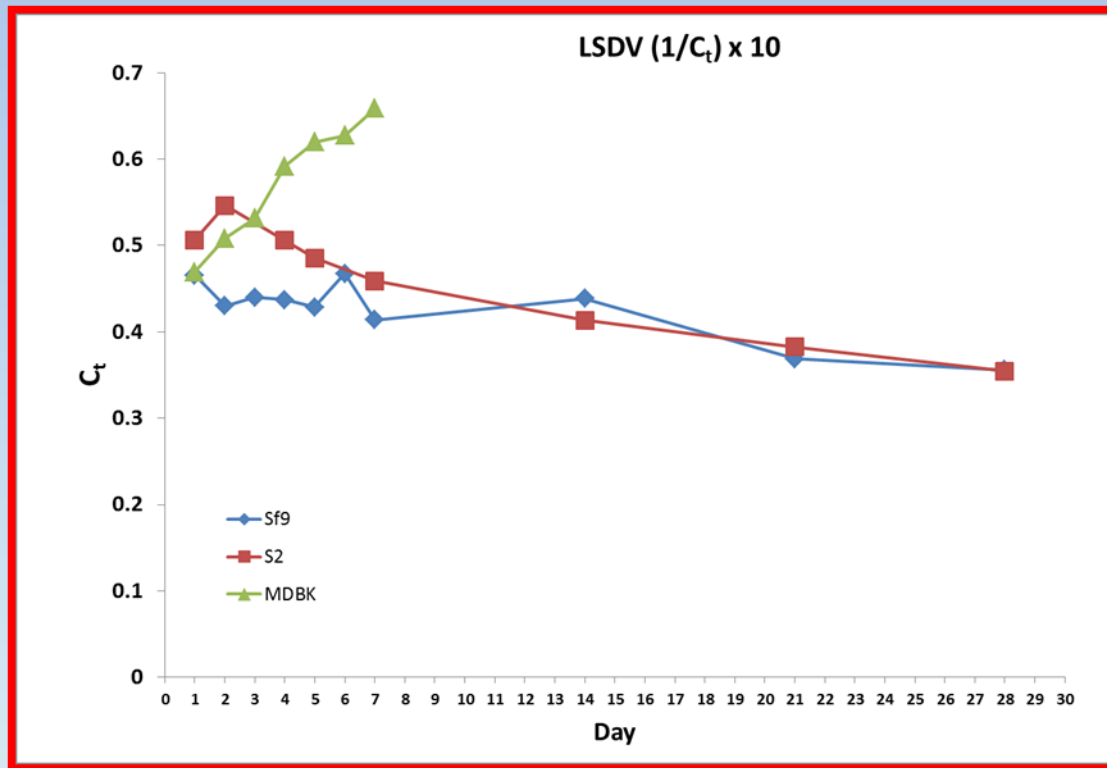


VERO 4dPI. LSDV



VERO 24 h post seeding

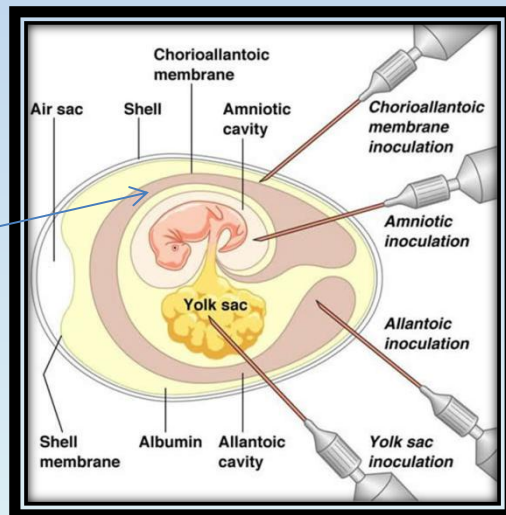
LSDV replication in insect cell line





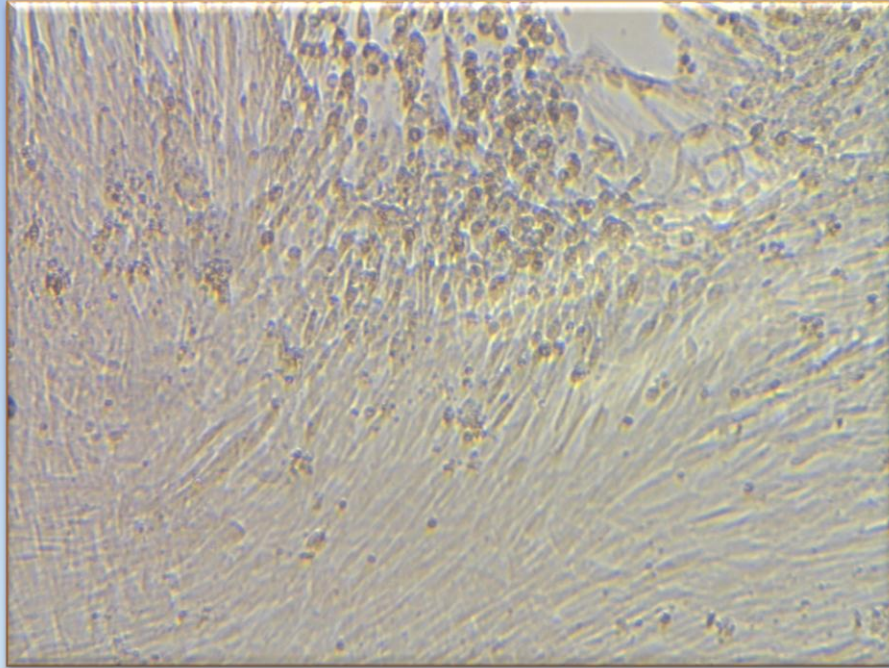
Первичные культуры тканей: семенников
ягнят, дермис крупного рогатого скота, мышечная
ткань эмбрионов КРС , ХАО КЭ.

Chorioallantoic
membrane(CAM)

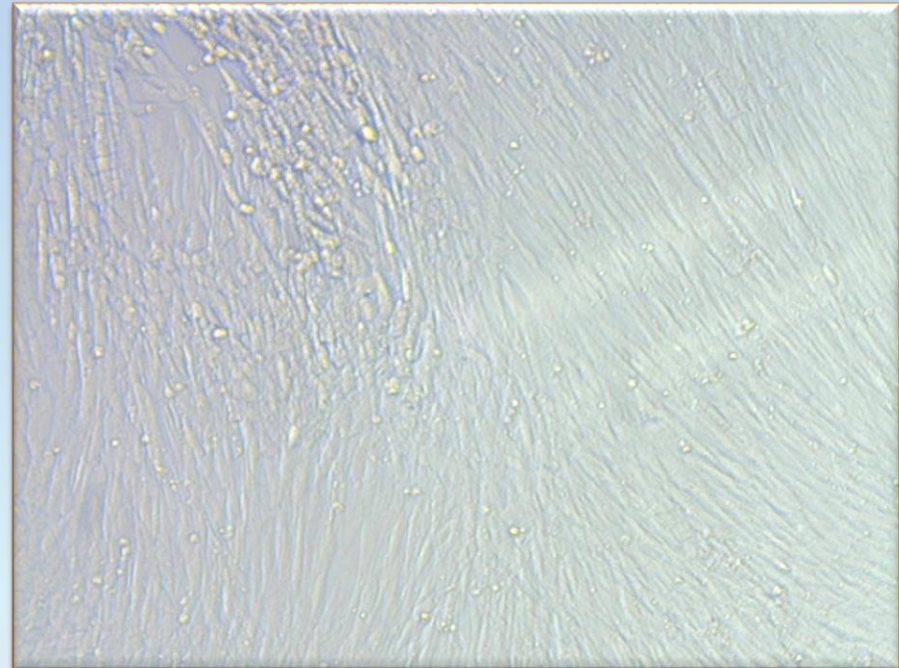


LK 2 .4DPI. LSDV

titration: 10^{-2} . titer $10^{3.5}$



первично-
трипсинизированные
клетки почки овцы



Дифференциальный диагноз

- *контагиозный пустулезный стоматит*
- *ложная бугорчатка*
- *Dermatophilosis*
- *Аллергия на укусы насекомых*
- *Крапивница (Urticaria)*
- *Фотосенсибилизация*
- *Гиподерматоз крупного рогатого скота
(Hypoderma bovis и Hypoderma lineatum)*

Дифференциальный диагноз

- ***Вирусная диарея крупного рогатого скота (болезнь слизистых оболочек, инфекционная диарея крупного рогатого скота, BVD) –молодняк с эрозивно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта.***
- ***Безноитиоз (Besnoitiosis)***
- ***Демодекоз (Demodicosis)***
- ***Кожный туберкулез и лейкоз (Cutaneous tuberculosis and BLV)***

Дифференциальный диагноз
контагиозный пустулезный стоматит
(Bovine pustular stomatitis virus infection)

Parapoxvirus, ***контагиозный пустулезный стоматит*** , вирус которого близок к вирусу вызывающему дерматит овец (Ecthyma contagiosum)

заболевание молодняка крупного рогатого скота и человека
распространяется путем прямого контакта с инфицированными крупного рогатого скота или слюны инфицированного животного

BPS

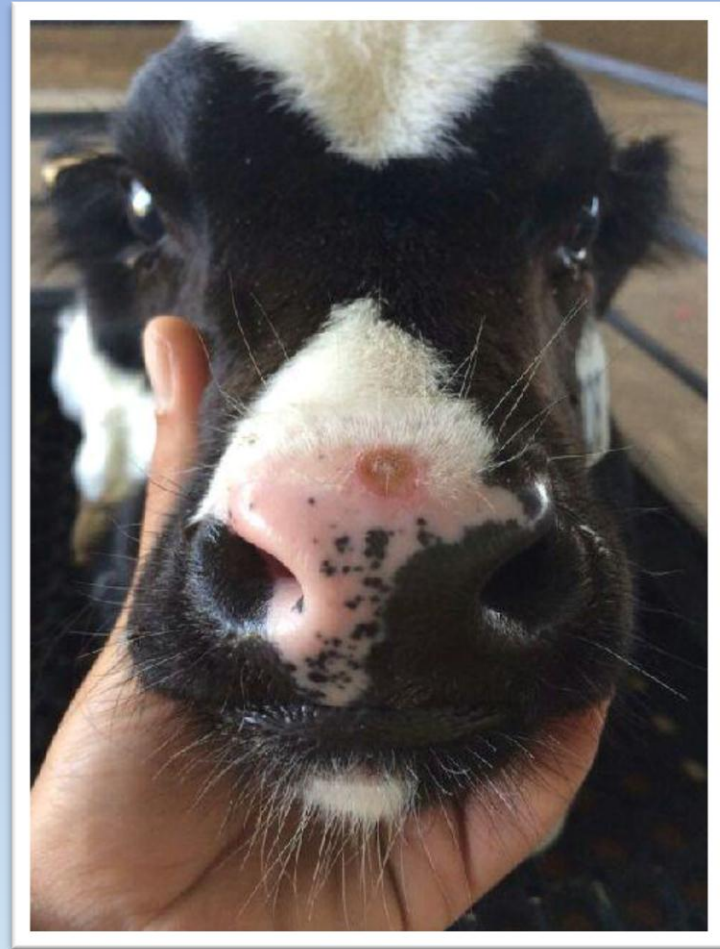


Photo by Dr. Eran Efraim, 2014

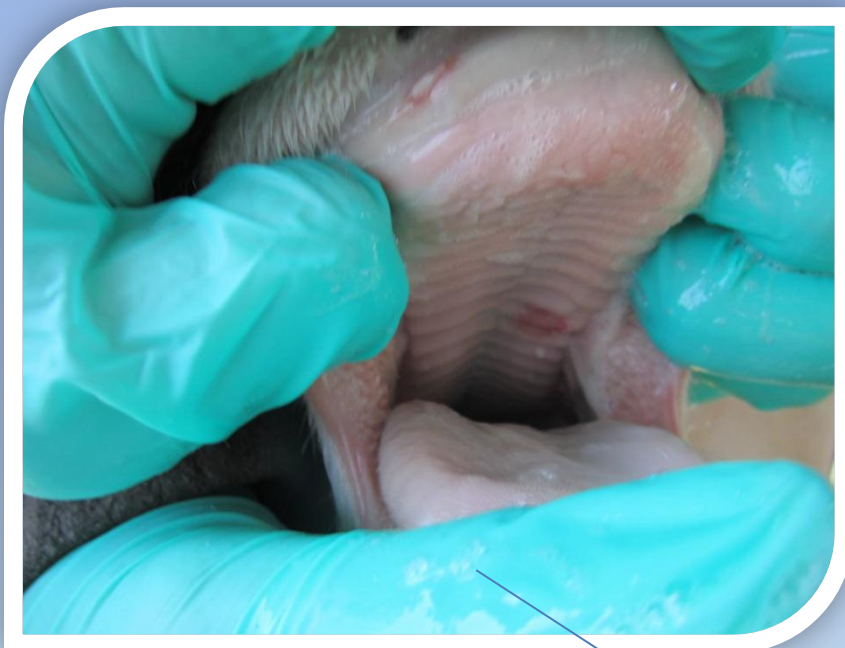


Photo by Dr. Eran Efraim,
2012 Hachaklait



Photo by Dr. Moty Valdman, 2012 Hachaklait

Дифференциальный диагноз

Dermatophilosis

Заболевание, вызванное *Dermatophilus congolensis*, относящийся к актиномикозам, поражающее крупный рогатый скот, овец, лошадей, коз, оленей, а иногда и людей.

У человека он вызывает пустулы на руках и поражения в виде мелких красных язв, которые спонтанно заживают, оставляя рубцы

Герпес вирус крупного рогатого скота - 2 (BoHV2)

относится к семейству герпесвирусов.

Вызывает две болезни крупного рогатого скота: mamillitis крупного рогатого скота и псевдо-нодулярный дерматит (ложная бугорчатка). Вирус называется Allerton. болезнь, протекающую более благоприятно чем нодулярный дерматит.

Заболевание сопровождается лихорадкой и узелками на коже головы, спины и промежности. Выздоровление в течении нескольких недель. Mamillitis характеризуется поражением сосков и вымени. BoHV-2, распространяется с помощью членистоногих и механическим путем (доярки и доильная аппаратура)



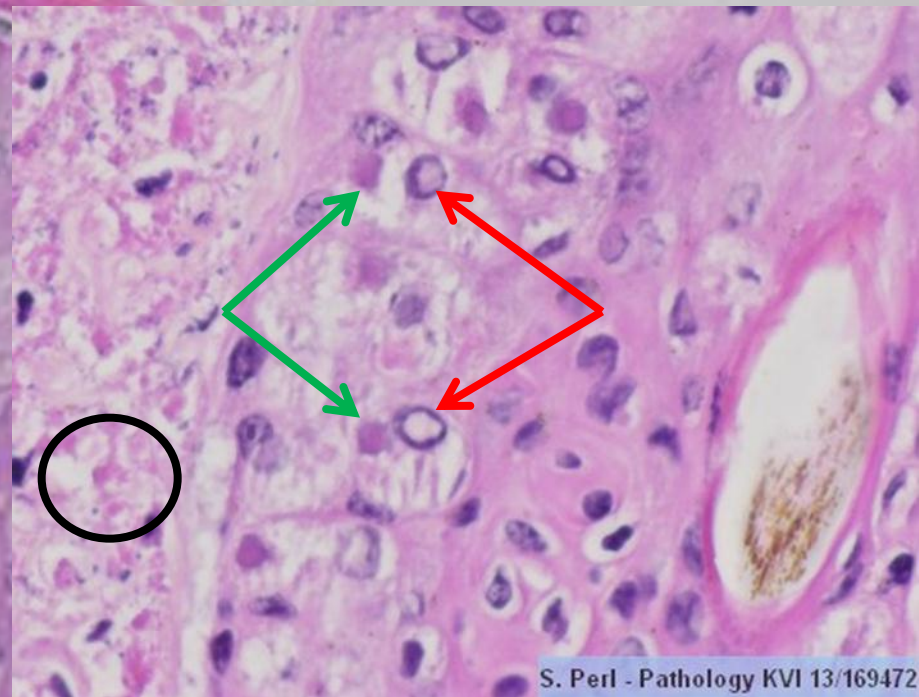
- **Capripoxvirusus вызывает характерный цитопатический эффект и образование внутрицитоплазматических телец- включений**
- **герпесвирус - псевдо-LSDV (Аллертон - герпес mammilitis), вызывает в клетках образования синцития и внутриядерные тельца-включения**

Main histologic lesions

- **Acute form**
 - Acanthosis and hyperkeratosis
 - Epidermal ballooning degeneration (epidermis and adnexae)
 - **Intracytoplasmic eosinophilic inclusion bodies** (epithelium, macrophages, fibroblasts)
 - Dermal and subcutaneous **vasculitis** with necrosis and edema
 - Lymphangitis
 - Lymphadenitis
 - Similar lesions in upper GI tract, upper respiratory
- **Subacute form**
 - Mild acanthosis
 - Dermal fibrosis
 - Infarcts
 - Lymphoplasmacytic infiltrate
 - Foamy macrophages

Nucleus

Eosinophilic ICIB

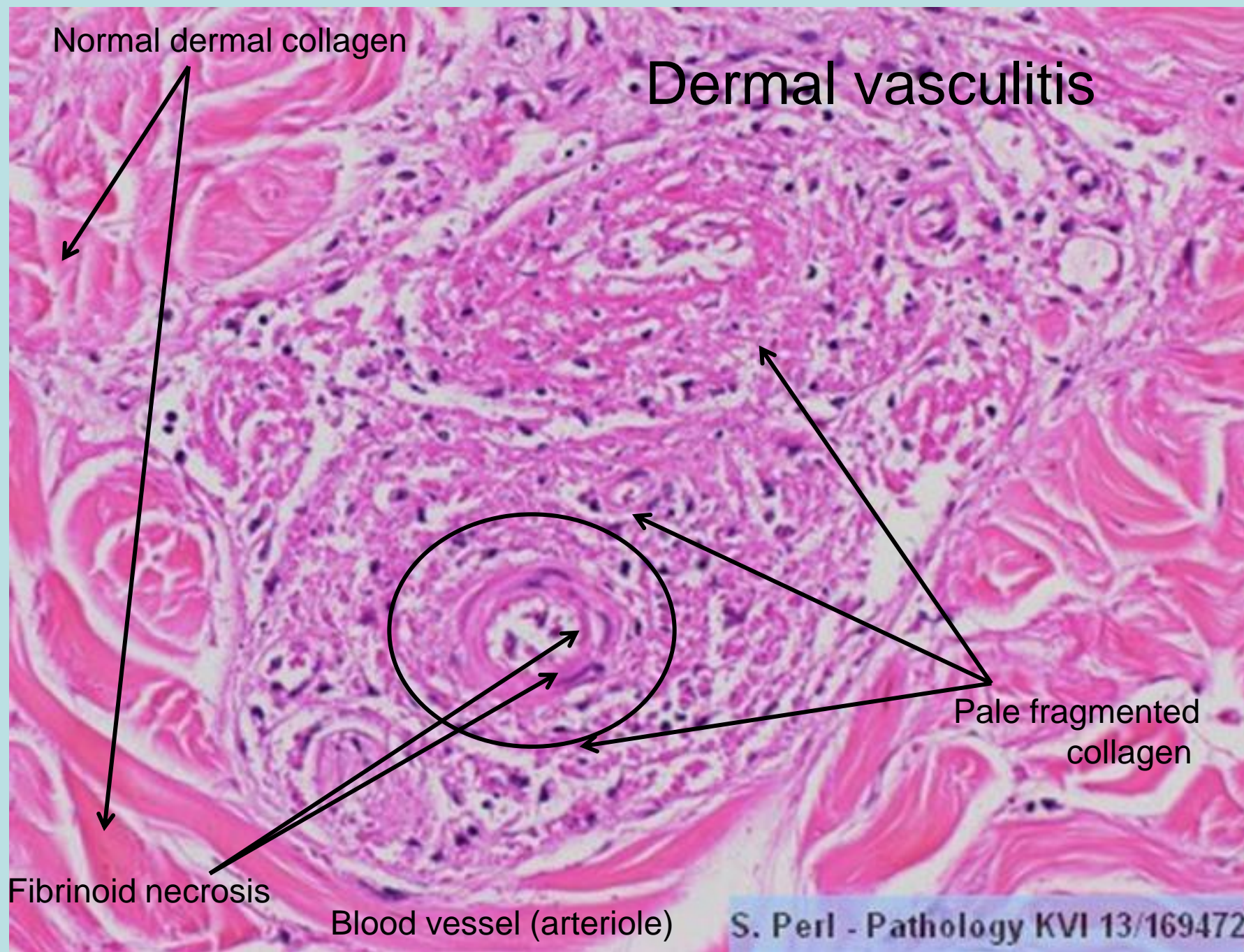


S. Perl - Pathology KVI 13/169472

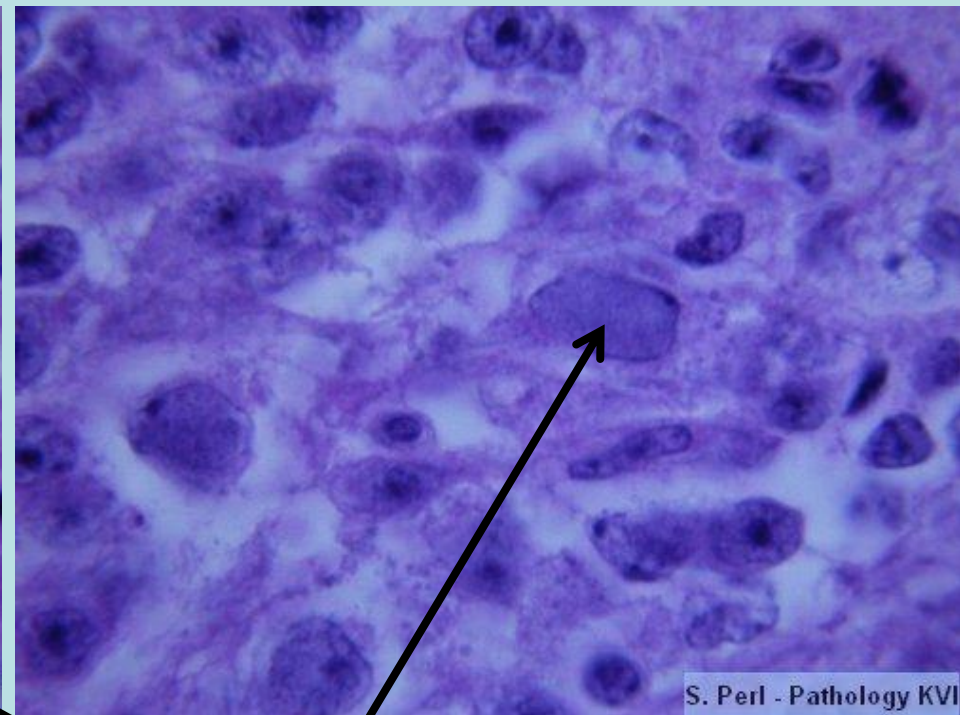
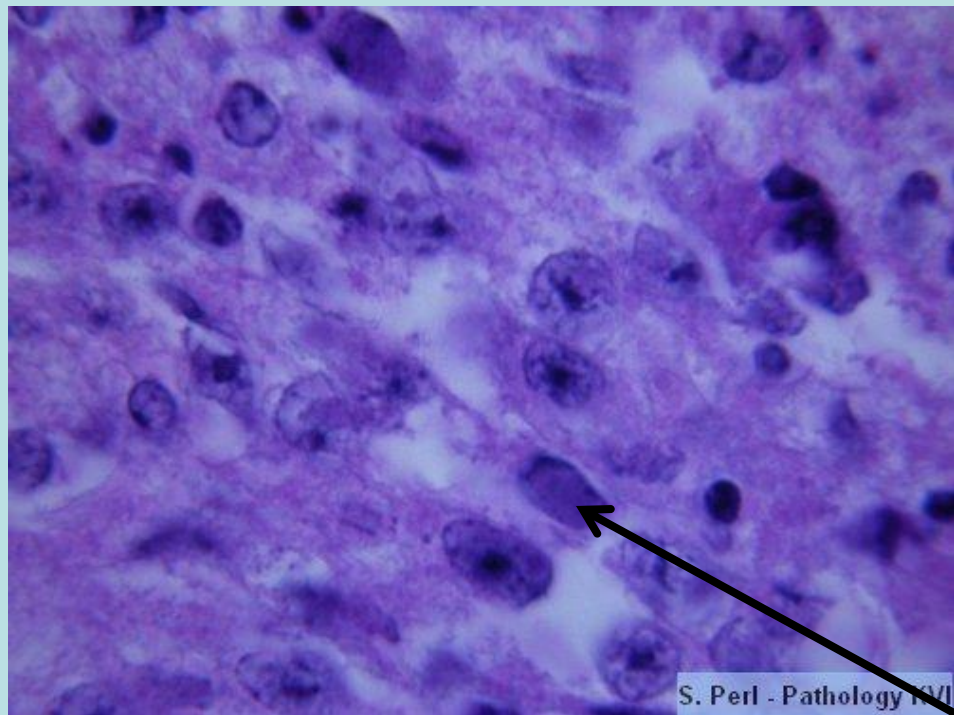


Epithelial swelling and
clearing (ballooning)

S. Perl - Pathology KVI 13/169472



Herpes (BHV 1, brain)



INIB

Nuclear chromatin margination

Гиподерматоз крупного рогатого скота (*Hypoderma bovis* и *Hypoderma lineatum*)



Аллергия на укусы насекомых



BLV

Photo by Dr. Boris Eventov



- Inflammatory leukogram
- Anemia
- Thrombocytopenia
- Hyperfibrinogenemia
- Hyperproteinemia
- Decreased creatinine concentration
- Hyperkalemia and hyperchloremia



Спасибо!

Many thanks to

Dr. Kris De Clercq of CODA-CERVA, BELGIUM

Dr. Eeva Tuppurainen

Int'l partners – welcome !!





Int'l partners – welcome !!



Attachment

DNA extraction for poxviruses

For blood we are using the Qiagen kit; QIamp DNA Blood Mini kit Cat. 51104 according to the manufacturer's instructions.

For other types of samples (skin, buffy coat, tears, and saliva) we are using the Viral Gene-spin, Viral DNA/RNA extraction kit (Intron, cat. No. 17151, South Korea), according to the manufacturer's instructions.

Extraction from skin: approximately 100 mg of tissue is incubated overnight at 56°C in .180 µl PBS with 20 µl of Proteinase K 20 mg/ml. A 3-hour incubation is also sufficient

Extraction from peripheral blood leukocytes, cell culture or other fluid samples: samples are incubated (180 + 20 Proteinase K) at 56°C for 10 minutes, then processed per the manufacturer's instructions.

After extraction, each sample was incubate at 95°C for 5 min.

qPCR reaction

the reaction mix contains:

10 μ l reaction mix (Bioline)

1 μ l LSDV forward primer

1 μ l LSDV revers primer

1 μ l LSDV probe

1 μ l Capri forward primer

1 μ l Capri revers primer

1 μ l Capri probe

4 μ l sample

20 μ l Total volume

Reaction conditions are:

95⁰C 3'

40 cycles of;

95⁰C 10''

60⁰C 1'

Primers & probes

LSD

Reverse 5' agcttatgtccttcatgtttgga 3'

Forward 5' gtttgtgattactgttatattg 3'

Probe FAM- CCA AGA CAG AAT CGA ACG-MGB

Capripox

Reverse 5' aaatgaaaccatggatgggata 3'

Forward 5' aaacgtatatggaatagagtt 3'

Probe VIC- TGGCTCATAGATTTCCT- MGB

PCR reaction

the reaction mix contains

12.5 μ l Emerald mix – Takara cat. RR310A

1 μ l reverse primer

1 μ l forward primer

5 μ l sample

5.5 μ l H₂O

Total volume 25 μ l

Reaction conditions are

95°C 3'

35 cycles of;

95°C 30''

49°C 30''

72°C 40''

and then

72°C 3 min.

Primers

Reverse 5' gtaagagggacattagttct 3'

Forward 5' agcttatgtccttcattgtttgga 3'

The PCR products are examined in 1.5% agarose gel with ethidium bromide

Dr. Yehuda Stram,
Virology division KVI