

УДК 573.4

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА В КАЧЕСТВЕ ИНСТРУМЕНТА ТОЧНОЙ ДИАГНОСТИКИ КАПРИПОКСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2023 г. С. В. Тошаков^{1,*}, Э. В. Гросфельд¹, А. Д. Козлова¹, А. С. Крылова¹, М. В. Патрушев¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: stepan.toshchakov@gmail.com

Поступила в редакцию 13.12.2022 г.

После доработки 13.12.2022 г.

Принята к публикации 19.12.2022 г.

Инфекционные заболевания сельскохозяйственных животных, вызываемые вирусами рода *Capripoxvirus*, представляют собой серьезную экономическую угрозу. Существующие средства диагностики этих возбудителей зачастую дают информацию, которой недостаточно для разработки полноценного комплекса мер по контролю над заболеваниями. Данную проблему может решить получение информации о полном геноме вируса, которое в настоящее время является наиболее достижимым при применении технологий высокопроизводительного секвенирования с последующим метагеномным анализом. В обзоре рассматриваются биология каприпоксвирусных возбудителей, средства диагностики и борьбы с заболеваниями в контексте перспектив внедрения метагеномного анализа как основного средства идентификации этих инфекционных агентов.

DOI: 10.56304/S1992722323030135

ОГЛАВЛЕНИЕ

- Введение
1. Биология возбудителей каприпоксвирусных инфекций
 2. Средства контроля над заболеваниями
 3. Методы диагностики каприпоксвирусов
 4. Применение технологий высокопроизводительного секвенирования для диагностики инфекций сельскохозяйственных животных
- Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Идентификация инфекционных агентов является важной и одновременно ресурсоемкой задачей в клинической диагностике, ветеринарии и пищевой промышленности из-за большого разнообразия патогенных объектов и механизмов их распространения. С перспективой неизбежного роста населения, популяций домашних животных, транспортной связности мира проблема распространения патогенов человека и животных приобретает все более высокую значимость. Вспышки инфекционных заболеваний становятся более массовыми и вызывают проблемы на уровне биологической и пищевой безопасности целых регионов мира.

Развитие высокопроизводительных молекулярно-генетических технологий в последние десятилетия привело к тому, что исследования биологических объектов и процессов вышли на принципиально новый уровень. Многократный рост объема биологических данных разного рода привел к возникновению так называемых “омиксных” научных направлений, включая геномику, транскриптомику, метаболомику и пр. Это, в свою очередь, позволило использовать полученные данные и разработанные подходы в различных практических отраслях, в том числе биотехнологии [1], медицине [2], ветеринарии [3] и криминалистике [4]. Метагеномика, являясь одним из наиболее динамично развивающихся омиксных направлений, ориентирована на комплексное исследование генетического материала, выделяемого из образца окружающей среды [5]. Метагеномный анализ позволяет выявить и идентифицировать все организмы, в том числе не подлежащие культивированию, генетический материал которых находится в образце, т.е. как макро-, так и микроорганизмы и вирусы.

В течение последних десятилетий сельскохозяйственная отрасль столкнулась с возникновением ряда новых угроз, связанных с распространением инфекционных заболеваний, прежде считавшихся эндемичными, или, по крайней ме-

ре, распространенными только в пределах одного региона или континента [6–8]. Одной из наиболее активно распространяющихся групп инфекций сельскохозяйственных животных являются заболевания, вызываемые вирусами, относящимися к роду *Capripoxvirus* (каприпоксвирусы) [9]. Сложность их однозначной молекулярной идентификации классическими молекулярными методами делает эту группу заболеваний интересным примером для анализа перспектив использования метагеномных подходов в диагностике. В данном обзоре рассмотрены особенности биологии каприпоксвирусных инфекций, способы борьбы с ними, а также существующие и развивающиеся подходы в их диагностике в контексте перспектив применения технологий высокопроизводительного секвенирования для точной геномной идентификации возбудителей.

1. БИОЛОГИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КАПРИПОКСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

География распространения и пути передачи

Род *Capripoxvirus* относится к семейству *Poxviridae* и представлен тремя видами: вирусом оспы овец, вирусом оспы коз и вирусом нодулярного дерматита крупного рогатого скота (КРС). Ранее группа этих вирусов и вызываемые ими заболевания считались эндемичными для Африканского континента, однако начиная с конца 90-х гг. стали появляться сообщения о распространении этих инфекций на Среднюю Азию [10], Турцию [11], Индию [12] и КНР [13]. В 2010-х гг. вирус нодулярного дерматита КРС начал появляться на Европейском континенте, в частности на Балканах, куда, по-видимому, был завезен из Турции [14]. В 2018–2019 гг. несколько вспышек каприпоксвирусных заболеваний было зарегистрировано в Центральной России [15] и Забайкальском крае [16].

Вирусы оспы овец и коз, как правило, передаются при прямом контакте, тогда как вирус нодулярного дерматита КРС может также активно распространяться за счет кровососущих насекомых [17, 18]. Именно с этим, вероятно, связан более широкий ареал распространения вируса нодулярного дерматита КРС по сравнению с вирусами оспы овец и коз [19].

Организация генома

Геномы каприпоксвирусов являются линейными молекулами двуцепочечной ДНК длиной ~150000 пар нуклеотидов. Степень консервативности генома внутри этого рода является весьма высокой и составляет 96–97% средней нуклеотидной идентичности [20]. Это сильно затрудняет дифференциации вирусов при помощи стандартных молекулярных тестов, накладывая дополни-

тельные требования к разрешающей способности диагностических систем. Высокий уровень содержания АТ-нуклеотидов (более 75%) накладывает определенные ограничения и на использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) тест-систем. Структурно геномы каприпоксвирусов несут центральную кодирующую часть, содержащую 147 открытых рамок считывания, ограниченную двумя идентичными инвертированными терминальными повторами длиной 2100–2400 пар нуклеотидов [21]. Центральная часть генома (открытые рамки считывания с 024 по 123) несет ключевые гены репликации, транскрипции и модификации вирусной РНК, а также гены, отвечающие за сборку вириона [22]. Участки генома, расположенные ближе к инвертированным повторам, содержат гены вирулентности, а также гены, отвечающие за специфичность взаимодействия организм–хозяина.

Геномы вакцинных штаммов характеризуются более чем 99.9% аминокислотной идентичности по сравнению с дикими [23, 24]. Сравнительный анализ генома вакцинных и диких штаммов демонстрирует, что изменения в геноме вакцинного штамма объясняют его ослабление за счет мутаций в генах вирулентности и взаимодействия с хозяином. Интересным фактом является и то, что большинство мутаций, по которым различаются вакцинные и родственные им дикие штаммы, представляют собой сдвиги рамки считывания [25]. Такие типы мутаций могут достаточно легко мутировать обратно, превратив таким образом вакцинный штамм в вирулентный. Таким образом, похожесть вакцинных штаммов на вирулентные требует разработки точных систем их дифференциации с целью прогнозирования и оценки эпидемиологических рисков.

2. СРЕДСТВА КОНТРОЛЯ НАД ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Эффективность борьбы с заболеваниями, вызываемыми каприпоксвирусами, зависит от ряда факторов, в том числе своевременного и быстрого выявления вспышек заболевания, карантинных мер, борьбы с переносчиками (в случае вируса нодулярного дерматита КРС) и, безусловно, охвата вакцинации, которая на данный момент является наиболее эффективным средством борьбы. В основном для борьбы с каприпоксвирусными инфекциями используются живые аттенуированные вакцины, которые ослабляются путем многократных пассажей на культурах клеток [26, 27].

В эндемичных странах для защиты от инфекций, вызванных каприпоксвирусами, чаще всего используют штамм *Neethling* и его производные. Основным недостатком вакцинирования препаратами этого штамма — высокая вероятность побоч-

ных эффектов: воспаления в месте инъекции, снижения выработки молока и т.д. [28]. В регионах, где каприпоксвирусные инфекции только начинают набирать обороты, для вакцинации, как правило, используются местные штаммы [29, 30]. В России, Казахстане и других странах постсоветского пространства для вакцинации против вируса оспы овец используется вакцина NISKHI SPPV [31]. В целом применение живых аттенуированных вакцин позволяет установить полный контроль за заболеванием при охвате поголовья стада более 75% [32].

Поскольку три представителя рода *Capripoxvirus* генетически сходны, предполагалась, что существует возможность разработать универсальную вакцину для защиты от всех трех инфекционных агентов [33, 34]. Однако на данный момент мировому научному сообществу не удалось подобрать идеальный универсальный вариант вакцины, которая могла бы индуцировать иммунный ответ у всех трех хозяев [19]. Отчасти это может быть связано с тем, что для большинства данных вакцин молекулярные механизмы аттенуации возбудителя остаются не изученными, а полные геномы вакцинных штаммов доступны не всегда. В то же время в мировой практике имеются случаи не только неточной идентификации микроорганизма, используемого в качестве вакцинного, но и применения вирулентного штамма для иммунизации по причине отсутствия информации о последовательности его генома [35].

Таким образом, информация о полных последовательностях генома как циркулирующих вирулентных, так и вакцинных штаммов каприпоксвирусов не только обеспечит безопасное применение вакцинных препаратов, но и позволит при помощи сравнительного геномного анализа выявить генетические детерминанты аттенуации и определить круг хозяев, что должно лечь в основу создания универсальной вакцины.

3. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ КАПРИПОКСВИРУСОВ

Точная и своевременная диагностика является ключевым фактором, определяющим эффективность эпидемиологического контроля вспышек заболеваний. Методические подходы к идентификации инфекционных агентов включают в себя методики, основанные на детекции как целого организма (культивирование), так и его генов (молекулярно-генетические методы, включая ПЦР и секвенирование ампликонов) или их продуктов (иммуноферментный анализ).

Диагностика на уровне вируса

Каприпоксвирусы подлежат культивированию практически на всех типах клеток живот-

ных-хозяев [36]. Наличие возбудителя приводит к развитию цитопатогенеза через несколько дней после заражения. Было показано, что культивирование может проводиться как на первичных, так и на трансформированных (вторичных) культурах клеток. Однако поскольку цитопатогенетический эффект является неспецифичным и может наблюдаться в результате действия других инфекционных агентов, как правило, требуется подтверждение присутствия каприпоксвирусов при помощи ПЦР. В то же время использование вторичных культур, способных переносить неограниченное количество пассажей, дает возможность подтверждать присутствие вируса при помощи иммуноокрашивания [37].

Интересным способом подтверждения каприпоксвирусной инфекции является электронная микроскопия, однако помимо того, что такой способ диагностики требует наличия крупного и непростого в обслуживании оборудования, он не позволяет определить видовую принадлежность вирусных частиц и может служить лишь подтверждением присутствия каприпоксвирусов в образце [38].

Серологические тесты

Серологические тесты играют важную роль в современной диагностике, поскольку могут детектировать не только активную инфекцию, но и перенесенное заболевание, а также антитела, появившиеся у животного в результате вакцинации. Для диагностики инфекции каприпоксвирусами используются тесты на вируснейтрализующие антитела, иммуноферментный и иммунофлуоресцентный анализ. Тест на вируснейтрализующие антитела широко используется для детекции наличия антител к каприпоксвирусам как в ходе анализа вспышек заболевания, так и в ходе крупных мониторинговых исследований в эндемичных регионах [39–41]. Тем не менее тест на вируснейтрализующие антитела не позволяет дифференцировать виды каприпоксвирусов, и вывод об идентичности инфекционного агента делается на основании того, от какого животного был проведен забор крови [42].

Подходы, основанные на иммуноферментном анализе (ИФА), также активно используются в диагностике инфекций, опосредованных вирусами рода *Capripoxvirus*. ИФА-методики можно классифицировать по типу используемого антигена. К первой группе можно отнести подходы, использующие в качестве антигена целый инактивированный вирус [37, 43]. Эти методики показывают чувствительность и специфичность, сравнимые с тестом на вируснейтрализующие антитела, однако также не позволяют однозначно определить вид и тем более штамм каприпоксвируса [44]. Вторая группа ИФА-методик использу-

ет в качестве антигена рекомбинантные белки вируса. Наиболее часто используемым антигеном является Р32, который представляет собой белок размером 32 кДа, являющийся одним из основных структурных белков оболочки вируса и обладающий высокой иммуногенностью [45]. Рекомбинантный белок или части белка Р32 подлежат эффективной гетерологической экспрессии в *E. coli* [46, 47]. ИФА-методика, разработанная на основе антигена Р32, экспрессированного в широко применяющихся в биотехнологии дрожжах *Pichia pastoris*, продемонстрировала высокие значения чувствительности и специфичности (94 и 84% соответственно) [47]. Более поздние разработки, основанные на коротких синтетических пептидах белка Р32, также обладают высокой специфичностью и являются многообещающими, поскольку не требуют наработки полного вирусного антигена в больших количествах [48]. Помимо Р32 были попытки использовать другие белки вириона, которые также показали достаточно высокую специфичность [47].

Для детекции каприпоксвирусов, в частности вируса нодулярного дерматита КРС, был разработан и успешно использован ряд методик иммунофлуоресцентного анализа [40, 49]. Так, при использовании в качестве вторичных антител бычьих поликлональных антител, меченных флуоресцеином, метод иммунофлуоресценции показал более высокую чувствительность и специфичность, нежели тест на вируснейтрализующие антитела [50].

ПЦР-тесты

Большая часть подходов, основанных на детекции геномных последовательностей каприпоксвирусов, использует ПЦР.

Первая из созданных ПЦР-систем с помощью пары праймеров, комплементарных консервативной области гена Р32, позволяла детектировать сразу все три вида каприпоксвирусов, не различая их, однако демонстрируя более высокую чувствительность, нежели ИФА [51]. Дальнейшее развитие этой группы методов (универсальных, позволяющих детектировать все три вида каприпоксвирусов) улучшило чувствительность и специфичность метода за счет использования праймеров к другим участкам генома вируса, включая ген РНК-полимеразы [52], ДНК-полимеразы [53], а также последовательности концевых инвертированных повторов [54, 55]. Описанные выше методики использовали гель-электрофорез в агарозном геле для детекции требуемого фрагмента, однако с развитием методов ПЦР в реальном времени (рвПЦР) стали появляться и рвПЦР-протоколы [56].

Одновременно с этим развивалась другая группа методов ПЦР-диагностики, позволяющая однозначно идентифицировать видовую принадлежность вируса. Был создан ряд систем, использующих полиморфизмы длин рестриктных фрагментов ампликонов (ПЦР-ПДФ) для однозначного различения видов *Capripoxvirus* [46, 57, 58]. Позднее, когда появилась информация о полных последовательностях геномов каприпоксвирусов, были созданы системы, использующие вариации длин ампликонов между видами вирусов для видовой идентификации [59, 60]. Кроме того, сравнительный анализ последовательностей генома позволил разработать чрезвычайно эффективные рвПЦР протоколы, использующие для различения полиморфных вариантов анализ кривой плавления как с неспецифическим красителем [61, 62], так и с высокоспецифичными двойными зондами, работающими с использованием фёрстеровского переноса энергии флуоресценции [63]. Сравнительно недавно появились мультиплексные рвПЦР-системы, основанные на зондах (TaqMan-пробах), несущих специфический флуорофор, позволяющих таким образом быстро и надежно дифференцировать виды каприпоксвирусов в одной пробирке [64, 65].

Поскольку помимо видовой идентификации чрезвычайно важной задачей является способность различать дикие и вакцинные штаммы одного вида вирусов, был создан ряд ПЦР-тест-систем, направленных непосредственно на решение этой задачи. На первых этапах в качестве основы использовался классический вариант ПЦР или ПЦР-ПДФ, впоследствии появились варианты, использующие детекцию в режиме реального времени [66, 67]. Отметим, что и в данном случае для подтверждения результатов теста и/или валидации методики зачастую используется секвенирование полученных ампликонов по методу Сэнгера [68]. В настоящее время в связи с активным внедрением вакцинации против каприпоксвирусных инфекций эта группа методов, позволяющая различать инфицированных и вакцинированных животных, развивается очень активно [69].

4. ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Технологии высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS), стремительно подешевевшие за последнее десятилетие, стали мощным инструментом, позволившим идентифицировать и получить информацию о последовательностях геномов новых и известных вирусов при помощи анализа метавирома (т.е.

всех вирусов, содержащихся в данном образце биоматериала) [70]. Основным достоинством метавирусологии является отсутствие необходимости наличия нулевой гипотезы для тестирования биоматериала на присутствие того или иного возбудителя [71]. Важным преимуществом NGS перед другими методами является возможность быстро получить последовательность полного генома вируса, не прибегая к культивированию. Таким образом, NGS является наиболее перспективным подходом не только в тех случаях, когда стандартными тестами не удается установить природу инфекционного агента, но и в тех, когда проявления заболевания указывают на присутствие дополнительной ко-инфекции неизвестной этиологии. К наиболее ярким примерам применения NGS в ветеринарии сельскохозяйственных животных можно отнести выявление вируса Шмалленберга у КРС [72], а также открытие нового парвовируса свиней [73]. Несмотря на то что технологии NGS активно используются в медицине для идентификации и получения детальной информации о геномах патогенов [74], их использование в клинической ветеринарии является ограниченным. Отчасти это объясняется тем, что на данный момент практически отсутствуют универсальные методики обработки и обработки данных, которые были бы применимы для широкого круга типов образцов и хозяев. Кроме того, классические варианты анализа метавирусных образцов подразумевают обогащение образца метагеномной ДНК генетическим материалом вирусов и/или бактерий. Методики такого обогащения весьма разнообразны, индивидуальны, а также зачастую недешевы и трудно масштабируемы [75, 76]. С другой стороны, при относительно невысокой стоимости секвенирования как такового последовательности хозяина могут быть легко удалены биоинформатически [77, 78], позволяя проводить секвенирование образца напрямую, без предварительного обогащения.

В контексте каприпоксвирусных инфекций единственным на данный момент исследованием, использующим методы метагеномики для получения последовательности вируса, является работа [79], где использовалось комбинированное секвенирование при помощи технологии длинных прочтений (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) и высокопараллельных коротких прочтений (Illumina, США) для секвенирования и сборки геномов вирусов оспы овец и коз непосредственно из клинических образцов назальных мазков. При помощи анализа полученных последовательностей геномов удалось подтвердить гипотезу о том, что вирус оспы овец является частично аттенуированным, а вирус оспы коз, напротив, контагиозным и вирулентным [79].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Каприпоксвирусные инфекции в настоящее время являются серьезной и возрастающей угрозой развитию сельского хозяйства. Распространение инфекции из эндемичных районов Африки и Центральной Азии на Россию и Европу создает необходимость развития как средств эффективной молекулярной диагностики, так и средств борьбы с заболеваниями, в частности создания эффективных и универсальных вакцин. Для развития и той и другой области необходимо наличие геномной информации о штаммах каприпоксвирусов, циркулирующих в России и сопредельных странах. Это даст возможность, во-первых, лучше понять механизмы вирулентности и определения круга хозяев для диких и, напротив, механизмы аттенуации для вакцинных штаммов. Во-вторых, методы полногеномной филогении помогут лучше отследить пути передачи вируса и механизмы возникновения новых штаммов, что является краеугольным камнем мониторинга и контроля над заболеванием в масштабах страны.

Развитие технологий NGS в последние десятилетия позволило ученым получать информацию о метавирусах, т.е. о последовательностях геномов всех вирусов, содержащихся в образце. Это открывает большие перспективы в диагностике, поскольку позволяет не только детектировать известные варианты патогенов, но и описывать новые, а также анализировать случаи ко-инфекции. Кроме того, секвенирование клинических образцов позволит создать базу данных полных геномных последовательностей вирусов, которая может лечь в основу системы широкого мониторинга, разработки точных средств молекулярно-генетической диагностики и создания новых, возможно, универсальных для всех каприпоксвирусных инфекций вакцинных препаратов. Растущая доступность технологий NGS позволяет предположить, что именно они в перспективе займут место традиционных молекулярно-генетических и серологических средств идентификации инфекционных агентов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1054).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amer B., Baidoo E.E.K. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. V. 9. P. 613307. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.613307>
2. Wafi A., Mirnezami R. // *Methods.* 2018. V. 151. P. 3. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.05.009>
3. Guillemain N., Horvatić A., Kuleš. J et al. // *Mol. Biosyst.* 2016. V. 12. № 7. P. 2036. <https://doi.org/10.1039/c6mb00220j>

4. Akçan R., Taştekin B., Yildirim M.Ş. et al. // Turk. J. Med. Sci. 2020. V. 50. № 5. P. 1480.
<https://doi.org/10.3906/sag-1912-197>
5. Sleator R.D., Shortall C., Hill C. // Lett. Appl. Microbiol. 2008. V. 47. № 5. P. 361.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02444.x>
6. Daszak P., Cunningham A.A., Hyatt A.D. // Science. 2000. V. 287. № 5452. P. 443.
<https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>
7. Weaver S.C., Reisen W.K. // Antiviral Res. 2010. V. 85. № 2. P. 328.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
8. Wang Q., Vlasova A.N., Kenney S.P. et al. // Curr. Opin. Virol. 2019. V. 34. P. 39.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.001>
9. Babiuk S., Bowden T.R., Boyle D.B. et al. // Transbound. Emerg. Dis. 2008. V. 55. № 7. P. 263.
<https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2009.01067.x>
10. Daoud J.A. // Trop. Anim. Health Prod. 1997. V. 29. № 4. P. 251.
<https://doi.org/10.1007/BF02632317>
11. Oğuzoğlu T.Ç., Alkan F., Ozkul A. et al. // Vet. Res. Commun. 2006. V. 30. № 8. P. 965.
<https://doi.org/10.1007/s11259-006-3259-7>
12. Bhanuprakash V., Indrani B.K., Hosamani M. et al. // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2006. V. 29. № 1. P. 27.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2005.12.001>
13. Zheng M., Liu Q., Jin N. et al. // Mol. Cell. Probes. 2007. V. 21. № 4. P. 276.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.01.005>
14. Mercier A., Arsevska E., Bournez L. et al. // Transbound. Emerg. Dis. 2018. V. 65. № 1. P. 240.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12624>
15. Krotova A., Shalina K., Mazloum A. et al. // Transbound. Emerg. Dis. 2022.
<https://doi.org/10.1111/tbed.14727>
16. Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Agafonov A.P. et al. // Transbound. Emerg. Dis. 2015. V. 62. № 4. P. 453.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12176>
17. Kahana-Sutin E., Klement E., Lensky I. et al. // Med. Vet. Entomol. 2017. V. 31. № 2. P. 150.
<https://doi.org/10.1111/mve.12217>
18. Sprygin A., Pestova Y., Wallace D.B. et al. // Virus Res. 2019. V. 269. P. 197637.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.05.015>
19. Hamdi J., Munyanduki H., Omari Tadlaoui K. et al. // Microorganisms. 2021. V. 9. № 5. P. 902.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9050902>
20. Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z. et al. // J. Virol. 2002. V. 76. № 12. P. 6054.
<https://doi.org/10.1128/jvi.76.12.6054-6061.2002>
21. Gershon P.D., Black D.N. // Virology. 1988. V. 164. № 2. P. 341.
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90547-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90547-8)
22. Moss B. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. V. 5. № 9. P. a010199.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010199>
23. Kumar A., Venkatesan G., Hosamani M. et al. // Gene. 2022. V. 810. P. 146085.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146085>
24. Bamouh Z., Fellahi S., Khayi S. et al. // Microbiol. Resour. Announc. / Ed. Stedman K.M. 2021. V. 10. № 30. P. e00440.
<https://doi.org/10.1128/MRA.00440-21>
25. Biswas S., Noyce R.S., Babiuk L.A. et al. // Transbound. Emerg. Dis. 2020. V. 67. № 1. P. 80.
<https://doi.org/10.1111/tbed.13322>
26. Van Rooyen P.J., Munz E.K., Weiss K.E. // Onderstepoort. J. Vet. Res. 1969. V. 36. № 2. P. 165.
27. Tuppurainen E.S.M., Oura C. A. L. // Transbound. Emerg. Dis. 2012. V. 59. № 1. P. 40.
28. Katsoulos P.-D., Chaintoutis S.C., Dovas C.I. et al. // Transbound. Emerg. Dis. 2018. V. 65. № 1. P. 174.
29. Babiuk S., Bowden T.R., Parkyn G. et al. // J. Gen. Virol. Microbiol. Soc. 2009. V. 90. № 1. P. 105.
30. *Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock* / Ed. Bayry J. Springer, 2017.
31. Amanova Z., Zhugunissov K., Barakbayev K. et al. // Vaccines. 2021. V. 9. № 8. P. 912.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9080912>
32. Calistri P., DeClercq K., Gubbins S. et al. // EFSA J. 2019. V. 17. № 3. P. e05638.
33. Kitching R.P. // Dev. Biol. 2003. V. 114. P. 161.
34. Kitching P. // Vaccine. 1983. V. 1. № 1. P. 4.
35. Longbottom D., Sait M., Livingstone M. et al. // Vaccine. 2018. V. 36. № 25. P. 3593.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.042>
36. Tuppurainen E.S.M., Venter E.H., Coetzer J.A.W. // Onderstepoort J. Vet. Res. AOSIS. 2005. V. 72. № 2. P. 153.
<https://doi.org/10.4102/ojvr.v72i2.213>
37. Babiuk S., Wallace D.B., Smith S.J. et al. // Transbound. Emerg. Dis. 2009. V. 56. № 4. P. 132.
<https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2009.01067.x>
38. Kitching R.P., Smale C. // Res. Vet. Sci. 1986. V. 41. № 3. P. 425.
39. Boshra H., Truong T., Babiuk S. et al. // PLOS One. 2015. V. 10. № 10. P. e0140328.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140328>
40. Gari G., Grosbois V., Waret-Szkuta A. et al. // Acta Trop. 2012. V. 123. № 2. P. 101.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.04.009>
41. Roy P., Purushothaman V., Sreekumar C. et al. // Res. Vet. Sci. 2008. V. 85. № 3. P. 617.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.03.011>
42. Fentie T., Fenta N., Leta S. et al. // BMC Vet. Res. 2017. V. 13. № 1. P. 385.
<https://doi.org/10.1186/s12917-017-1312-0>
43. Bhanuprakash V., Hosaman M., Juneja S. et al. // J. Appl. Anim. Res. 2006. V. 30. № 2. P. 177.
44. Rhazi H., Mikou K., Sadeqy Y. et al. // J. Immunol. Methods. 2022. V. 502. P. 113226.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113226>
45. Chand P. Molecular and immunological characterisation of a major envelope protein of capripoxvirus. University of Surrey, 1992.
46. Heine H.G., Stevens M.P., Foord A.J. et al. // J. Immunol. Methods. 1999. V. 227. № 1. P. 187.
[https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(99\)00072-1](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(99)00072-1)

47. *Bowden T.R., Coupar B.E., Babiuk S.L. et al.* // J. Virol. Methods. 2009. V. 161. № 1. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.031>
48. *Tian H., Chen Y., Wu J. et al.* // Virol. J. 2010. V. 7. № 1. P. 245.
<https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-245>
49. *Abera Z., Degefu H., Gari G. et al.* // BMC Vet. Res. 2015. V. 11. № 1. P. 135.
<https://doi.org/10.1186/s12917-015-0432-7>
50. *Gari G., Biteau-Coroller F., LeGoff C. et al.* // Vet. Microbiol. 2008. V. 129. № 3. P. 269.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.005>
51. *Ireland D.C., Binopal Y.S.* // J. Virol. Methods. 1998. V. 74. № 1. P. 1.
[https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(98\)00035-4](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00035-4)
52. *Mangana-Vougiouka O., Markoulatos P., Koptopoulos G. et al.* // Mol. Cell. Probes. 2000. V. 14. № 5. P. 305.
<https://doi.org/10.1006/mcpr.2000.0319>
53. *Balamurugan V., Jayappa K.D., Hosamani M. et al.* // J. Vet. Diagn. Invest. 2009. V. 21. № 2. P. 225.
<https://doi.org/10.1177/104063870902100208>
54. *Mangana-Vougiouka O., Markoulatos P., Koptopoulos G. et al.* // J. Virol. Methods. 1999. V. 77. № 1. P. 75.
[https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(98\)00138-4](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00138-4)
55. *Markoulatos P., Mangana-Vougiouka O., Koptopoulos G. et al.* // J. Virol. Methods. 2000. V. 84. № 2. P. 161.
[https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00141-x](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00141-x)
56. *Haegeman A., Zro K., Vandenbussche F. et al.* // J. Virol. Methods. 2013. V. 193. № 2. P. 446.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.010>
57. *Hosamani M., Mondal B., Tembhurne P.A. et al.* // Virus Genes. 2004. V. 29. № 1. P. 73.
<https://doi.org/10.1023/B:VIRU.0000032790.16751.13>
58. *Venkatesan G., Balamurugan V., Yogisharadhya R. et al.* // Virol. Sin. 2012. V. 27. № 6. P. 352.
<https://doi.org/10.1007/s12250-012-3277-2>
59. *Lamien C.E., Le Goff C., Silber R. et al.* // Vet. Microbiol. 2011. V. 149. № 1. P. 30.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.09.038>
60. *Zhao Z., Wu G., Yan X. et al.* // BMC Vet. Res. 2017. V. 13. № 1. P. 278.
<https://doi.org/10.1186/s12917-017-1179-0>
61. *Gelaye E., Lamien C.E., Silber R. et al.* // PLOS One. 2013. V. 8. № 10. P. e75971.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075971>
62. *Pestova Y., Byadovskaya O., Kononov A. et al.* // Mol. Cell. Probes. 2018. V. 41. P. 57.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2018.08.003>
63. *Lamien C.E., Leleanta M., Goger W. et al.* // J. Virol. Methods. 2011. V. 171. № 1. P. 134.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.10.014>
64. *Wolff J., Beer M., Hoffmann B.* // Microorganisms. 2021. V. 9. № 4. P. 765.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040765>
65. *Wang H., Kong Y., Mei L. et al.* // J. AOAC Int. 2021. V. 104. № 5. P. 1389.
<https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab040>
66. *Vidanović D., Šekler M., Petrović T. et al.* // Acta Vet. (Beogr.). 2016. V. 66. № 4. P. 444.
67. *Sprygin A., Pestova Y., Prutnikov P. et al.* // Transbound. Emerg. Dis. 2018. V. 65. № 5. P. 1137.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12897>
68. *Kononov A., Byadovskaya O., Kononova S. et al.* // Arch. Virol. 2019. V. 164. № 6. P. 1575.
<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04229-6>
69. *Vidanović D., Tešović B., Šekler M. et al.* // Microorganisms. 2021. V. 9. № 6. P. 1234.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9061234>
70. *Handelsman J.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. № 4. P. 669.
71. *Martínez-Porchas M., Vargas-Albores F.* // Rev. Aquac. 2017. V. 9. № 1. P. 42.
72. *Hoffmann B., Scheuch M., Höper D. et al.* // Emerg. Infect. Dis. 2012. V. 18. № 3. P. 469.
73. *Blomström A.-L., Belák S., Fossum C. et al.* // Virus Res. 2009. V. 146. № 1. P. 125.
74. *Deurenberg R.H., Bathoorn E., Chlebowicz M.A. et al.* // J. Biotechnol. 2017. V. 243. P. 16.
75. *Bhatta T.R., Chamings A., Alexandersen S.* // Viruses. 2021. V. 13. № 8. P. 1608.
76. *Yigit E., Feehery G.R., Langhorst B.W. et al.* // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2016. V. 115. № 1. P. 7.26.1.
<https://doi.org/10.1002/cpmb.12>
77. *Liu Y., Bible P.W., Zou B. et al.* // Bioinformatics. 2020. V. 36. № 5. P. 1577.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz790>
78. *Clarke E.L., Taylor L.J., Zhao C. et al.* // Microbiome. 2019. V. 7. № 1. P. 46.
<https://doi.org/10.1186/s40168-019-0658-x>
79. *Wolff J., King J., Moritz T. et al.* // Viruses. 2020. V. 12. № 10. P. 1098.
<https://doi.org/10.3390/v12101098>