

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА КОНТАГИОЗНОЙ ЭКТИМЫ ОТ ОВЕЦ В РЕСПУБЛИКЕ ТЫВА В 2015 ГОДУ

Д.В. ЯНЖИЕВА¹, Н.И. САЛЬНИКОВ¹, Т.Р. УСАДОВ¹, С.П. ЖИВОДЕРОВ¹,
Л.К. САРЫГЛАР², А.В. ЛУНИЦИН¹

Контагиозная эктима — инфекционная болезнь овец и коз, характеризующаяся поражением слизистых оболочек ротовой полости, кожи губ, головы, молочных желез и конечностей. Вирус контагиозной эктимы (Orf virus, ВКЭ) — представитель рода *Parapoxvirus* в подсемействе *Chordopoxvirinae* семейства *Poxviridae*. Геном представлен линейной двухцепочечной молекулой ДНК размером 138 т.п.н., содержащей 132 открытые рамки считывания. Антигенная структура вируса недостаточно изучена, не все штаммы серологически идентичны, в связи с чем актуально выделение и изучение его новых изолятов. Анализ отечественной литературы показал отсутствие подобных работ на фоне малого числа зарегистрированных вспышек контагиозной эктимы в России. Мы впервые выделили ВКЭ от овец в Республике Тыва после экспериментального заражения полученным от них биоматериалом, идентифицировали его и изучили биологические свойства изолята. В августе 2015 года в Республике Тыва было зарегистрировано заболевание овец, характеризующееся развитием эритемы, везикул, пустул и струпьев на коже ушей и конечностей. Струнья от этих животных были взяты для выделения и идентификации возбудителя. С этой целью экспериментально заразили трех ягнят суспензией струпьев с кожи инфицированных животных (губы на границе кожной и слизистой поверхностей скарифицировали, а затем наносили инокулом ватными тампонами). На 4-5-е сут после заражения на губах ягнят появились везикулы, перешедшие в стадию пустул и струпьев. Заживление поражений наблюдали через 2 нед. Суспензию струпьев от инфицированных животных использовали для инокуляции первичной культуры клеток почки овцы. На 7-е сут после инокуляции клеточный монослой собрали и провели 2-й пассаж. В монослоях 1-го и 2-го пассажей специфического цитопатического действия вируса не наблюдали. Смывы с кожи губ от экспериментально инфицированных ягнят исследовали методом ПЦР в реальном времени согласно описанному протоколу (G. Venkatesan с соавт., 2014). При этом ДНК вируса контагиозной эктимы была выявлена в смывах, полученных на 7-28-е сут после заражения. ДНК вируса контагиозной эктимы также обнаружили в струпьях от инфицированных ягнят и в лизатах клеточного монослоя после 2-го пассажа. При исследовании референтных образцов ДНК ВКЭ (штамм IA82), нодулярного дерматита (штамм Вакцинный), оспы овец (штаммы Монгольский и Б5/96), оспы коз (штамм ОК/А-04) положительные результаты получили только с ДНК ВКЭ, чем подтверждается специфичность системы. Аналитическая чувствительность ПЦР-РВ для выявления генома вируса контагиозной эктимы составила $1,3 \pm 0,03 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Таким образом, возбудитель, вызвавший в 2015 году болезнь у овец в Республике Тыва, выделен в культуре клеток почки овцы от экспериментально инфицированных ягнят и идентифицирован как вирус контагиозной эктимы.

Ключевые слова: овцы, контагиозная эктима, вирус, ПЦР, культура клеток.

Контагиозный пустулезный дерматит — инфекционная болезнь, для которой характерно поражение слизистых оболочек ротовой полости, кожи губ, головы, молочных желез и конечностей с образованием узелков, везикул, пустул и корок при преимущественном поражении какого-либо одного участка тела. Болезнь распространена повсеместно. Во многих странах с развитым овцеводством и козоводством это стационарная инфекция (1). Ее вирусная этиология доказана при экспериментальном воспроизведении, при этом была установлена вторичная роль возбудителя некробактериоза. Инфекционный агент контагиозного пустулезного дерматита — вирус контагиозной эктимы (ВКЭ, contagious ecthyma virus, Orf virus, род *Parapoxvirus*, подсемейство *Chordopoxvirinae*, семейство *Poxviridae*). Его вирионы имеют овальную форму и размер $200-300 \times 140-170$ нм. Геном представлен линейной двухцепочечной молекулой ДНК (138 т.п.н.), содержащей 132 открытые рамки считывания (2). Вирус вызывает болезнь у овец, коз, серн и туров всех возрастов, а также у других парнокопытных полорогих животных. Молодые особи болеют тяжелее. Человек заражается очень редко (главным образом, при контакте с больными животными), ес-

ли на коже есть порезы и царапины. Поражения развиваются в месте проникновения вируса, чаще на кистях рук (3).

Основной источник инфекции — больные животные, в организме которых вирус размножается. Во внешнюю среду он выделяется со струпьями, корочками и истечениями из ротовой полости, что вызывает заражение пастбищ, кормушек, воды, кормов, кошар, тепляков, загонов, подстилки. Вирусом загрязняется шерстный покров овец, предметы ухода, одежда чабанов. Овцы могут заразиться при пастьбе на инфицированных пастбищах, поедании зараженного сена, комбикорма, при приеме воды из зараженных водоемов, а также при непосредственном контакте с больными особями (1, 4). Болезнь распространяют и переболевшие вирусоносители, поступившие в благополучные хозяйства (1, 4, 5), следовательно, важен вирусологический контроль за перемещением животных.

У ВКЭ антигенная структура недостаточно изучена и не все штаммы серологически идентичны, в связи с чем актуально выявление и исследование его изолятов (3, 6-9). За рубежом общепринятая схема изучения свойств новых изолятов ВКЭ включает выделение возбудителя в культурах клеток овцы, секвенирование варьируемых участков генома и филогенетический анализ. Такой анализ выполнен для штаммов, полученных от коз в Корее, Индии, Гималаях и на Тайване (10-14). Изучены биологические свойства пяти штаммов ВКЭ от коз (Техас, 2003-2004 годы) (15). Описан способ идентификации и филогенетического анализа изолятов ВКЭ по данным секвенирования гена B2L (16), примененный для изучения штаммов от овец из Индии и Бразилии (17, 18). Разработаны и валидированы методы выявления генома этого вируса на основе ПЦР (19-21), проведено сравнение диагностических характеристик разных ПЦР-протоколов и выделения ВКЭ в культуре клеток (22). В отечественной литературе подобные работы отсутствуют, что, по-видимому, связано с недостаточным вниманием владельцев животных и ветеринарных специалистов к этой инфекции и, соответственно, с малым числом зарегистрированных вспышек контагиозной эктимы в России. Мы впервые выделили ВКЭ от овец в Республике Тыва, используя собранный биоматериал для экспериментального заражения ягнят, и изучили биологические свойства изолята.

Цель работы заключалась в идентификации возбудителя, вызвавшего в 2015 году заболевание с симптомами контагиозной эктимы у овец в Республике Тыва.

Методика. Кожные струпья с конечностей и ушей, взятые у овец с признаками контагиозной эктимы, помещали в жидкость Эддингтона и транспортировали в термоконтейнере. Из биоматериала готовили 10 % суспензию, добавляя к навеске фосфатно-солевой буфер (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ NaH₂PO₄, pH 7,4) в соотношении 1:9 (масса/объем) и гомогенизировали в фарфоровой ступке. Суспензию осветляли центрифугированием (3 мин при 7000 об/мин). Биологические свойства вируса изучали при заражении трех ягнят в условиях вивария суспензией струпьев с кожи конечностей больных особей (инфекционный материал наносили ватными тампонами на скарифицированную поверхность губ на границе кожи и слизистой оболочки). Клинический осмотр животных проводили ежедневно, с мест введения вируса брали смывы.

Вирус выделяли в перевиваемой культуре клеток почки овцы (линия ПО-ВНИИВВиМ; музей Всероссийского НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии), выращенной в матрасах с посадочной площадью 150 см². Суспензию струпьев от инфицированных животных пропускали через фильтр 45 мкм («Millipore», США), разбавляли средой Игла MEM с

антибиотиками (гентамицин — 50 мкг/мл, амфотерицин Б — 2,5 мкг/мл) в соотношении 1:1. Далее 1 мл суспензии вносили в матрасы с культурой клеток и оставляли на 30 мин в CO₂-инкубаторе MCO-18AC («Sanyo Electric Co., Ltd», Япония) при 37 °С. Культуральную среду декантировали, вносили 10 мл среды Игла МЕМ, содержащей 2 % фетальной телячьей сыворотки («Биолот», Россия), и 7 сут культивировали при тех же условиях. Затем монослой подвергали 3-кратному замораживанию и оттаиванию и использовали для 2-го пассажа (последующие пассажи не проводили).

Пробы биоматериала исследовали на наличие ДНК вируса контагиозной эктимы методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). ПЦР выполняли на термоциклере Rotor Gene 6000 («Corbett Research Pty, Ltd», Австралия) по следующей программе: 10 мин при 95 °С — предварительная денатурация; 30 с при 95 °С, 1 мин при 60 °С — детекция по каналу Green. Реакционная смесь содержала 10 пмоль каждого праймера, 3 пмоль флуоресцентного зонда, 2,5 мкл 10× ДНК-буфера, 10 ммоль смеси трифосфатов и 1,5 ед. активности Taq ДНК-полимеразы рекомбинантной («Thermo Fisher Scientific», США). Использовали праймеры OV RT-F (5'-TACACGGAGTTGGCCGTGATCTTGTA-3') и OV RT-R (5'-CGCCAA-GTACAAGAAGCTGATGA-3') и гибридизационный зонд OV Probe (5'-[FAM]TGCATCGAGTTGTAGATCTCGCGGT[BHQ-1]-3'), разработанные в 2014 году (23). Специфичность системы проверяли с образцами ДНК штаммов вирусов нодулярного дерматита, оспы овец, оспы коз и контагиозной эктимы (Коллекция микроорганизмов ВНИИВВиМ), аналитическую чувствительность теста контролировали с 10-кратными разведениями первичной культуры клеток синовиальной мембраны ягненка (музей ВНИИВВиМ), инфицированной вирусом контагиозной эктимы. Для титров приведены значения с относительным стандартным отклонением ±0,03 (24).

Результаты. В августе 2015 года в СПК «Бай-Хол» сумона Бай-Тал



Клинические признаки контагиозной эктимы у овец: А, Б — струпья на коже ушей, В — пустулы на коже ушей, Г — пустулы на коже ноги (Республика Тыва, 2015 год).

(Эрзинский р-н, Республика Тыва) у овец и ягнят, родившихся в конце

марта—начале апреля, было зарегистрировано заболевание, сопровождавшееся поражением кожных покровов в виде струпьев на коже конечностей, ушей, носа. У ягнят сначала наблюдали покраснение кожного покрова в области ушей, затем на конечностях и в области ноздрей выпадала шерсть и происходило образование везикул и долго не заживающих язв (рис.). При экспериментальном заражении здоровых особей биоматериалом от больных животных на 4-5-е сут на местах введения вируса появились везикулы, которые через 1 сут превратились в пустулы. Подсыхая, пустулы образовывали серовато-коричневые струпья. Спустя 2 нед после экспериментального заражения происходило заживление поражений.

После двух пассажей (по 7 сут) в первичной культуре клеток ПО-ВНИИВВиМ специфическое цитопатическое действие вируса контагиозной эктимы не проявлялось. Репродукцию вируса в культуре клеток подтверждали выявлением его геномной ДНК методом ПЦР-РВ в лизате клеточного монослоя после 2-го пассажа (7 сут). Используемая система олигонуклеотидных праймеров и Taq-man зонд комплементарны гену ДНК-полимеразы этого вируса (9). При исследовании референтных образцов ДНК ВКЭ (штамм IA82), нодулярного дерматита (штамм Вакцинный), оспы овец (штаммы Монгольский и Б5/96), оспы коз (штамм ОК/А-04) положительные результаты получили только с ДНК ВКЭ, чем подтверждается специфичность системы. Лизат культуры клеток ПО-ВНИИВВиМ, инфицированной ВКЭ (2-й пассаж), при этом был ПЦР-положительным. То есть только образцы ДНК ВКЭ оказались ПЦР-положительными, что также свидетельствовало о специфичности использованных праймеров и зонда. Наибольшее разведение культурального материала, содержащего ВКЭ (референтный штамм IA82, инфекционная активность $5,3 \pm 0,03 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$), для которого получили положительный ПЦР-результат, — 10^{-4} (табл. 1). Следовательно, аналитическая чувствительность ПЦР-РВ для выявления генома вируса контагиозной эктимы составила $1,3 \pm 0,03 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

1. Аналитическая чувствительность ПЦР-РВ при выявлении генома вируса контагиозной эктимы

Разведение	Титр вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	Пороговый цикл
10^{-1}	$4,3 \pm 0,03$	17,81
10^{-2}	$3,3 \pm 0,03$	22,09
10^{-3}	$2,3 \pm 0,03$	25,59
10^{-4}	$1,3 \pm 0,03$	30,46
10^{-5}	$0,3 \pm 0,03$	Нет значений

Примечание. ПЦР-РВ — ПЦР в режиме реального времени. Пороговый цикл — цикл, на котором кривая флуоресценции пересекает пороговую линию.

Исследование пустул, образовавшихся на местах введения вируса, а также культурального материала тоже дало положительный результат (Ст 8,1-9,3).

2. Пороговые циклы ПЦР-РВ при выявлении генома вируса контагиозной эктимы в мазках из ротовой полости в разные сроки после экспериментального заражения животных

Время, сут	1-й ягненок	2-й ягненок	3-й ягненок
7	18,23	19,32	18,51
14	25,98	22,27	24,21
21	35,59	29,21	30,43
28	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный

Примечание. ПЦР-РВ — ПЦР в режиме реального времени. Пороговый цикл — цикл, на котором кривая флуоресценции пересекает пороговую линию.

Исследование материала от экспериментально зараженных овец показало, что на 7-28-е сут вирус накапливался в эпителии слизистой ротовой полости и в слюне в количестве, достаточном для идентификации в ПЦР-РВ (табл. 2). Ис-

следование пустул, образовавшихся на местах введения вируса, а также культурального материала тоже дало положительный результат (Ст 8,1-9,3). Таким образом, мы впервые обнаружили вирус контагиозной эктимы у овец с симптомами этого заболевания, проявившегося в Республике Тыва в 2015 году, и изучили биологические свойства изолята. При экспериментальном заражении полевой изолят

вызывал везикулярно-пустулезную сыпь в месте введения (на границе кожи и слизистой губ). Возбудитель был выделен из кожных струпьев от экс-

периментально инфицированных животных в перевиваемой культуре клеток почки овцы и идентифицирован методом ПЦР в реальном времени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коломыцев А.А., Закутский Н.И., Гузалова А.Г., Миколайчук С.В., Моргунов Ю.П. Контагиозный пустулезный дерматит овец и коз. Ветеринарная патология, 2008, 4: 31-37.
2. Delhon G., Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., de la Concha-Bermejillo A., Lehmkuhl H.D., Piccone M.E., Kutish G.F., Rock D.L. Genomes of the parapoxviruses Orf virus and bovine papular stomatitis virus. J. Virol., 2004, 78(1): 168-177 (doi: 10.1128/JVI.78.1.168-177.2004).
3. Bayindir Y., Bayraktar M., Karada N., Ozcan H., Kayabas U., Otlu B., Durmaz R., Doganay M. Investigation and analysis of a human orf outbreak among people living on the same farm. New microbiologica, 2011, 34: 37-43.
4. Hosamani A., Scagliarini A., Bhanuprakash V., McInnes C.J., Singh R.K. Orf: an update on current research and future perspectives. Expert Review on Anti-infective Therapy, 2009, 7(7): 879-893 (doi: 10.1586/eri.09.64).
5. Bhanuprakash V., Venkatesan G., Balamurugan V., Hosamani M., Yogisharadhya R., Chauhan R.S., Pande A., Mondal B., Singh R.K. Pox outbreaks in sheep and goats at Makhdoom (Uttar Pradesh), India: evidence of sheep pox virus infection in goats. Transbound. Emerg. Dis., 2010, 57(5): 375-382 (doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01158.x).
6. Abubankr M.I., Abu-Elzein E.M., Housawi F.M., Abdelrahman A.O., Fadlallah M.E., Nayel M.N., Adam A.S., Moss S., Forrester N.L., Coloyan E., Gameet A., Al-Afaleq A.I., Gould E.A. Pseudo cow poxvirus: the etiological agent of contagious ecthyma (Auzdyk) in camels (*Camelus dromedarius*) in the Arabian peninsula. Vector Borne Zoonotic Diseases, 2007, 7(2): 257-260 (doi: 10.1089/vbz.2006.0627).
7. Abdelrahman K., Soliman H. Molecular and virological studies on contagious pustular dermatitis isolates from Egyptian sheep and goats. Research in Veterinary Science, 2010, 89(2): 290-294 (doi: 10.1016/j.rvsc.2010.02.019).
8. Wise L.M., Savory L.J., Dryden N.H., Whelan E.M., Fleming S.B., Mercer A.A. The development of oral lesions in lambs naturally infected with orf virus. Veterinary Journal, 2007, 174(3): 663-664 (doi: 10.1016/j.tvjl.2006.10.024).
9. Venkatesan G., Balamurugan V., Bhanuprakash V. TaqMan based real-time duplex PCR for simultaneous detection and quantitation of Capri pox and Orf virus genomes in clinical samples. J. Virol. Methods, 2014, 201: 44-50 (doi: 10.1016/j.jviromet.2014.02.007).
10. Oem J.-K., Chung J.-Y., Kim Y.-J., Lee K.-K., Kim S.-H., Jung B.-Y., Hyun B.-H. Isolation and characterization of orf viruses from Korean black goats. J. Vet. Sci., 2013, 14(2): 227-230 (doi: 10.4142/jvs.2013.14.2.227).
11. Bora D.P., Barman N.N., Das S.K., Bhanuprakash V., Yogisharadhya R., Venkatesan G., Kumar A., Rajbongshi G., Khatoon E., Chakraborty A., Bujarbaruah K.M. Identification and phylogenetic analysis of orf viruses isolated from outbreaks in goats of Assam, a northeastern state of India. Virus Genes, 2012, 45: 98-104 (doi: 10.1007/s11262-012-0740-y).
12. Chan K.W., Lin J.W., Lee S.H., Liao C.J., Tsai M.C., Hsu W.L., Wong M.L., Shih H.C. Identification and phylogenetic analysis of orf virus from goats in Taiwan. Virus Genes, 2007, 35: 705-712 (doi: 10.1007/s11262-007-0144-6).
13. Mondal B., Bera A.K., Hosamani M., Tembhurne P.A., Bandyopadhyay S.K. Detection of orf virus from an outbreak in goats and its genetic relation with other parapoxviruses. Veterinary Research Community, 2006, 30: 531-539 (doi: 10.1007/s11259-006-3270-z).
14. Hosamani M., Yadav S., Kallesh D.J., Mondal B., Bhanuprakash V., Singh R.K. Isolation and characterization of an Indian orf virus from goats. Zoonoses Public Health, 2007, 54: 204-208 (doi: 10.1111/j.1863-378.2007.01046.x).
15. Musser J.M.B., Taylor C.A., Guo J., Tizard I.R., Walker J.W. Development of a contagious ecthyma vaccine for goats. Am. J. Vet. Res., 2008, 69: 1366-1370 (doi: 10.2460/ajvr.69.10.1366).
16. Hosamani M., Bhanuprakash V., Scagliarini A., Singh R.K. Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (B2L) of Indian orf viruses isolated from sheep and goats. Vet. Microbiol., 2006, 116: 317-324 (doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.028).
17. Venkatesan G., Balamurugan V., Bora D.P., Yogisharadhya R., Prabhu M., Bhanuprakash V. Sequence and phylogenetic analyses of an Indian isolate of orf virus from sheep. Veterinaria Italiana, 2011, 47(3): 323-332.
18. Abrahao J.S., Campos R.K., Trindade G.S., Guedes M.I., Lobato Z.I., Mazur C., Ferreira P.C., Bonjardim C.A., Kroon E.G. Detection and phylogenetic analysis of orf virus from sheep in Brazil: a case report. Virol. J., 2009, 6: 47 (doi: 10.1186/1743-422X-6-47).

19. Chan K.W., Hsu W.L., Wang C.Y., Yang C.H., Lin F.Y., Chulakasian S., Wong M.L. Differential diagnosis of orf viruses by a single-step PCR. *J. Virol. Methods*, 2009, 160(1-2): 85-89 (doi: 10.1016/j.jviromet.2009.04.025).
20. Gallina L., Dal Pozzo F., Mc Innes C.J., Cardeti G., Guercio A., Battilani M., Ciulli S., Scagliarini A. A real-time PCR assay for the detection and quantification of orf virus. *J. Virol. Methods*, 2005, 134: 140-145 (doi: 10.1016/j.jviromet.2005.12.014).
21. Nitsche A., Buttner M., Wilhelm S., Pauli G. Meyer H. Real-Time PCR detection of parapoxvirus DNA. *Clin. Chem.*, 2006, 52(2): 316-319 (doi: 10.1373/clinchem.2005.060335).
22. Kottaridi C., Nomikou K., Lelli R., Markoulatos P., Mangana O. Laboratory diagnosis of contagious ecthyma: comparison of different PCR protocols with virus isolation in cell culture. *J. Virol. Methods*, 2006, 134: 119-124 (doi: 10.1016/j.jviromet.2005.12.005).
23. Venkatesan G., Balamurugan V., Bhanuprakash V. TaqMan based real-time duplex PCR for simultaneous detection and quantitation of Capri pox and Orf virus genomes in clinical samples. *J. Virol. Methods*, 2014, 201: 44-50 (doi: 10.1016/j.jviromet.2014.02.007).
24. Лаккин Г.Ф. Биометрия. М., 1990.

¹ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии,

601125 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1, e-mail: darima.yanzhieva.90@mail.ru, nikolai.salnikov2010@yandex.ru, usadov.tr@mail.ru, zhivoderov-serg@mail.ru, lunicyun@mail.ru;

²ГБООУ ВПО Тувинский государственный университет, 667000 Россия, Республика Тыва, г. Кызыл, ул. Ленина, 36, e-mail: saryglar.1959@mail.ru

Поступила в редакцию 4 октября 2016 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 6, pp. 861-866

IDENTIFICATION AND ISOLATION OF ORF VIRUS FROM SHEEP IN THE REPUBLIC OF TUVA IN 2015

D.V. Yanzhieva¹, N.I. Sal'nikov¹, T.R. Usadov¹, S.P. Zhivoderov¹, L.K. Saryglar², A.V. Lunitsin¹

¹All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 1, ul. Akademika Bakuleva, pos. Vol'ginskii, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601125 Russia, e-mail darima.yanzhieva.90@mail.ru, nikolai.salnikov2010@yandex.ru, usadov.tr@mail.ru, zhivoderov-serg@mail.ru, lunicyun@mail.ru;

²Tuvan State University, 36, ul. Lenina, Kyzyl, Tuva Republic, 667000 Russia, e-mail saryglar.1959@mail.ru
Received October 4, 2016 doi: 10.15389/agrobiologia.2016.6.861eng

Abstract

Orf is infectious disease of sheep and goats, characterized by lesions of mucosa of the oral cavity, skin of lips, head, mammary glands and limbs. The causal agent (virus of contagious ecthyma — Orf virus) is a member of genus *Parapoxvirus*, subfamily *Chordopoxvirinae*, family *Poxviridae*. Genome of the Orf virus consists of linear double stranded DNA (138 kbp) and contains 132 open reading frames. Its antigenic structure is poorly understood, and strains are not serologically identical. That is why the investigation of novel isolates of Orf virus is actual. However, we are not aware of such research in Russia possibly due to rare outbreaks recognized. We first identified Orf virus in sheep from Tuva Republic and studied biological properties of the isolate. Disease of sheep, characterized by erythema, vesicles, pustules and scabs on ears and legs has been registered in August 2015 in Tuva Republic. The scabs were sampled for isolation and identification of the causative agent. For this result three lambs were experimentally infected with the scab suspension. The mucocutaneous borders of the lips along the labial commissures were scarified and inoculum was loaded by cotton swabs. The lip vesicles appeared at days 4-5 and then formed pustules and scabs. After 2 weeks the lesions healing occurred. The suspension of scabs from lips of infected lambs was used to inoculate sheep kidney cell culture. In 7 days post inoculation the cell monolayer was harvested for second passage. However, we did not observe specific cytopathic effect in the monolayers during these passages. The skin swabs from experimentally infected lambs were examined by Real-Time PCR in accordance to the protocol developed by G. Venkatesan et al. (2014), and Orf virus DNA was detected at days 7 to 28 post infection. We also detected Orf virus DNA in scabs from the infected lambs and in lysates of the monolayers harvested after second passage. The PCR test was positive for reference strain IA82 of Orf virus unlike other viruses (nodular dermatitis vaccine strain, sheep pox strains Mongolian and B5/96 or goatpox strain QA/A-04) that confirmed specificity of the PCR system. Its analytical sensitivity to detect Orf virus genomic DNA was $1.3 \pm 0.03 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$. Thus, the pathogen which caused the disease of sheep in Tuva Republic in 2015 was isolated from experimentally infected lambs using sheep kidney cell culture and identified as Orf virus.

Keywords: sheep, Orf virus, PCR, cell culture.