8. Rublenko, N. M., Derjabin, O. M., Golovko, A. M., Pinchuk, N. G. (2016) Vyjavlennja ta analiz poshyrennja geniv pomirnyh bakteriofagiv u shtamah Salmonella enterica [Detection and analysis of the distribution of moderate bacteriophage genes in Salmonella enterica strains]. *Naukovyj visnyk veterynarnoi' medycyny − Scientific Herald of Veterinary Medicine.,* Vol. 1, 95-102 [in Ukrainian].

9. Tomasz, M., Lipman, R., Chowdary, D., Pawlak, J., Verdine, G. L. & Nakanishi, K. (1987) Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science.,* Vol. *235*(4793), 1204-1208 [in English].

10. Ho, T. D., Figueroa-Bossi, N., Wang, M., Uzzau, S., Bossi, L., Slauch, J. M (2002) Identification of GtgE, a novel virulence factor encoded on the Gifsy-2 bacteriophage of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology*., Vol. *184*(19), 5234-5239 [in English].

11. Stanley, T. L., Ellermeier, C. D., Slauch, J. M. (2000) Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects Salmonella enterica serovar Typhimurium survival in Peyer's patches. *Journal of bacteriology.,* Vol. *182*(16), 4406-4413 [in English].

12. Mirold, S., Rabsch, W., Rohde, M., Stender, S., Tschäpe, H., Rüssmann, H. & Hardt, W.D. (1999) Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic Salmonella typhimurium strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*., Vol. 96(17), 9845-9850 [in English].

13. Schatten, H., & Eisenstark, A. (Eds.). (2007). *Salmonella: methods and protocols*. Springer Science & Business Media [in English]

14. Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I., & Galán, J. E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences.,* Vol. 97(18), 10225-10230 [in English]

15. Hensel, M., Shea, J. E., Waterman, S. R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G. Et al. (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Molecular microbiology.,* Vol. 30(1), 163-174 [in English].

УДК 619: 616:57.043:611-018.8.085.2:578

САВИНОВА І.В., аспірант, e-mail: isavinova@ukr.ne
КЛЕСТОВА З.С., д-р. вет. наук, проф., e-mail: zinaklestova@gmail.com
Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м.Київ

НОВІ БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ВИВЧЕННЯ ВІРУСІВ ТЕЛОКРОВНИХ ТВАРИН ЗА ЗАСТОСУВАННЯ КЛІТИН ХОЛОДНОКРОВНИХ ТВАРИН

У представленій роботі наводяться дані про використання першої вітчизняної перещеплюваної лінії клітин TF, отриманої з тканин рептилій, а саме з пулу внутрішніх паренхіматозних органів новонародженої черепахи червоновухої (Trachemys scripta elegance). Отримана перещеплювана клітинна лінія TF, призначена для вірусологічних досліджень, зокрема для визначення спектру чутливості до вірусів – збудників інфекцій тварин та людини. Сприйнятливість клітинної лінії TF була досліджена на рівні 89 пасажу на моделях ДНК та РНК вмісних вірусів представників родин Herpesviridae, Rhabdoviridae,.

Ключові слова: *культура клітин, рептилії, віруси, тварини, чутливість.*

Вступ. Вірусні інфекційні захворювання (як добре відомі і досліджені, так і нові, емерджентні) широко розповсюджені у всьому світі і завдають значних економічних збитків не лише галузі тваринництва, а і становлять загрозу для популяцій диких, рідкісних та зникаючих видів тварин у природі [1-3]. Особливістю дослідження інфекційних хвороб цієї категорії тварин є недостатня вивченість не лише збудників захворювань, що їм притаманні, а також патогенів, резервуарними хазяями яких, можуть бути такі тварини [4]. Виникнення емерджентних захворювань пов'язано, безпосередньо зі збільшенням кількості транспортних перевезень, подорожей, об'ємів торгівлі тваринами (особливо нелегальних), а також варварською експансією людської діяльності у дику природу та вторгненням сільського господарства у біогеоценози, що формувались тисячоріччями [3]. Не останню роль у виникненні емерджентних захворювань відіграє масове захоплення екзотичними хатніми улюбленцями, які потрапляють до країни, у більшості своїй, нелегально нових територій і ареалів існування. А безвідповідальне ставлення господарів призводить до того, що врешті решт такі тварини опиняються у дикій природі [5,6]. Поява великої кількості різноманітних видів тварин, що раніше не зустрічались на даній території, у значній мірі впливає на епізоотичну, епідемічну та екологічну ситуацію та біобезпеку держави в цілому, оскільки роль цих тварин у епізоотичних/епідемічних ланцюгах багатьох інфекційних хвороб лишається невивченою.

Варто зазначити, що відсутність комерційного та наукового інтересу до амфібій та рептилій пов'язана з тим, що дані тварини не вирощуються в Україні у промислових масштабах так широко, як тварини інших класів. І, незважаючи на те, що у світі питанню інфекційних вірусних хвороб амфібій та рептилій стало приділятися більше уваги з 2009 р. , оскільки ранавіроз та хітрідіомікоз амфібій внесені до Списку МЭБ (OIE Aquatic Manual 2009), та три вірусних захворювання рептилій: фібропапіломатоз морських черепах, папіломатоз крокодилів та ранавірусна інфекція рептилій включені Робочою групою МЕБ з питань захворювання диких тварин до списку захворювань, "які необхідно контролювати, враховуючи їх важливість для диких тварин, а також з метою захисту тваринництва та здоров'я людей" [7] - кількість досліджень у цьому напрямку залишається дуже обмеженою.

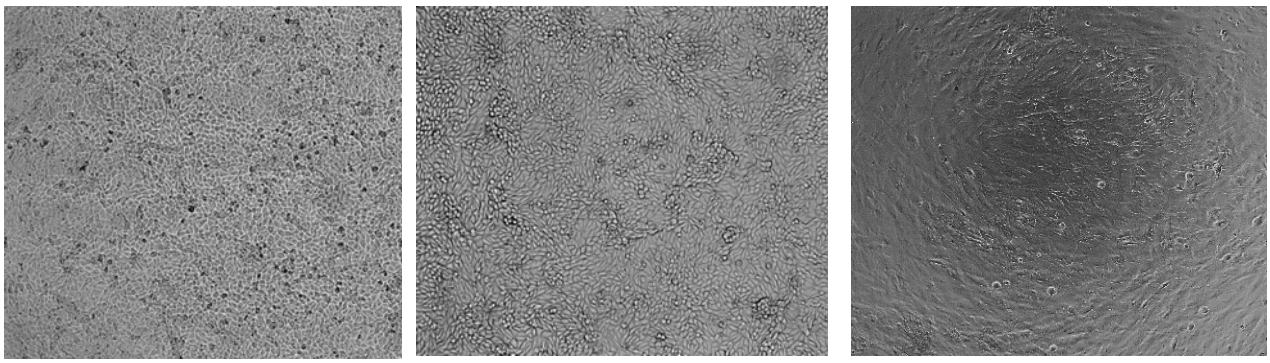
В Україні питання діагностики захворювань таких тварин не розроблено взагалі, так само, як відсутні будь-які діагностичні системи для виявлення інфекційних хвороб рептилій чи амфібій. Отже, вирішення питання розробки діагностичних та дослідницьких інструментів у вигляді нових культур клітин для виявлення та вивчення вірусних захворювань таких тварин, отримання вітчизняних культур клітин та збагачення національних колекцій новими лініями, пошук нових пермісивних до вірусів стабільних клітинних систем різного видового та тканинного походження, безперечно, є актуальним, оскільки дозволить розширити спектр комплексних досліджень патогенів – збудників вірусних інфекцій тварин та людини, а також має суттєве значення для подальшого розвитку вітчизняної ветеринарної галузі і біологічної безпеки України.

Мета роботи. Дослідити чутливість клітинної лінії TF на моделях вірусів - збудників захворювань теплокровних тварин та людини.

Матеріали і методи. *Культури клітин.* У якості тест-об'єктів у дослідженні чутливості отриманої культури клітин рептилій були використані наступні клітинні лінії: досліджувана клітинна лінія TF (пул внутрішніх паренхіматозних органів новонародженої черепахи червоновухої) та референтні клітинні лінії ВНК-21 (культура клітин нирки новонародженого сирійського хом'яка), MDBK (культура клітин нирки КРС).

Клітини TF для проведення дослідження вирощували до досягнення 90% конфлюенту у композиції поживних середовищ DMEM та RPMI-1640 у співвідношенні 3:2 з додаванням 12% фетальної сироватки КРС, L-глутаміну 2mM/см^3 у кінцевій концентрації. Температура інкубації становила 29±1,0°С. Для здійснення адгезії вірусів культуру клітин TF поміщали за температурних умов оптимальних для вірусних штамів теплокровних тварин (37±0,2°С), експозиція складала 1 год. Референсні культури клітин ВНК-21 та MDBK були отримані з Банку культур клітин відділу експериментальних клітинних систем Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (Рис.1). Референсні перещеплювані культури клітин теплокровних тварин вирощували у поживному середовищі DMEM з додаванням 10% фетальної сироватки КРС за температури 37°С.

Віруси: У якості тест-моделей для визначення чутливості клітинної лінії TF до вірусів теплокровних використовували референтний штам «Арський» вірусу хвороби Ауєскі родини *Herpesviridae* та референтний штам "Індіана" вірусу везикулярного стоматиту родини *Rhabdoviridae*, які були отримані з Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ).



Перещеплювана культура клітин ВНК-21 | Перещеплювана культура клітин MDBK | Перещеплювана культура клітин TF

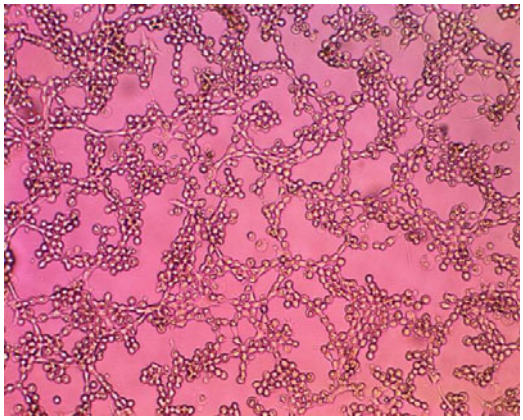
Рисунок 1. Моношари референтних культур клітин ВНК-21, MDBK та нової отриманої перещеплюваної культури клітин TF (за збільшення х100)

Визначення титру інфекційної активності вірусів проводили за інфекційною активністю в культурах клітин тварин на 96-лункових плоскодонних стерильних планшетах (з розрахунку 5х10^{3}кл./см^2), спостерігаючи розвиток цитопатичного ефекту (ЦПЕ) та визначаючи 50%-ву тканинну цитопатичну дозу (ТЦД50/см^3). Для визначення ТЦД50 готували ряд 10-кратних розведень вірусу на поживному середовищі для клітин. Кожним розведенням вірусу в об'ємі 150 мкл заражали клітини в 4 лунках та інкубували в CO_2 інкубаторі за 37 ºС референсні лінії клітин теплокровних тварин і за 29±1°С для культури клітин TF упродовж 24, 48, 96 год культивування або поки моношар у контрольних лунках залишався незміненим. Культури клітин досліджували кожні 12 годин після інфікування вірусами. Титр вірусу визначали за методикою Ріда і Менча. Статистичну обробку проводили за методом Стьюдента [8].

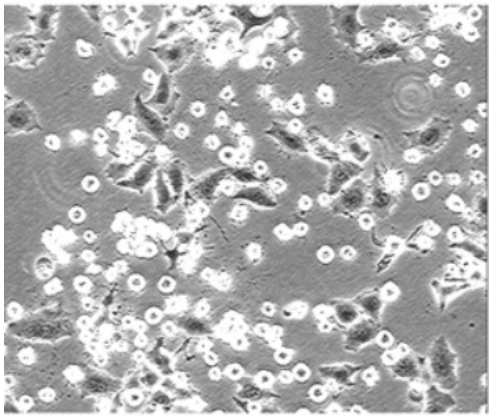
Результати та обговорення

Враховуючи, що обидва віруси тривалий час зберігалися у замороженому стані, з метою відновлення їх інфекційної активності, після розморожування було проведено три "сліпі" пасажи на усіх трьох, як референсних так і досліджуваній TF культурах клітин. Як

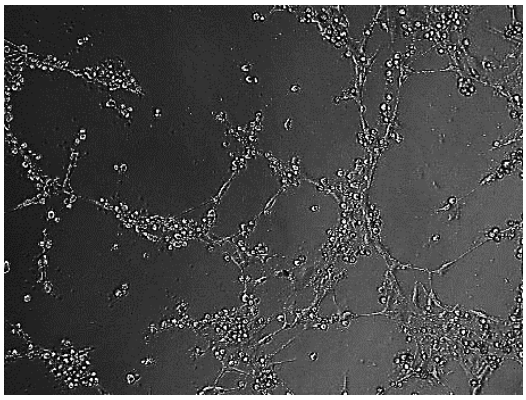
референсні культури клітин тварин ВНК-21 та MDBK, так і досліджувана культура клітин TF вже з першого пасажу виявили свою сприйнятливість до досліджуваних вірусних штамів. Вірус хвороби Ауескі спричиняв ЦПЕ у культурі клітин ВНК-21, на 2–3 добу після зараження клітин. Вірус везикулярного стоматиту призводив до появи ознак ЦПЕ у культурі клітин MDBK також на 2–3 добу після зараження. Досліджувана культура клітин TF проявляла чутливість до обох досліджуваних вірусів вже з першого пасажу. Але на першому пасажі початкові ознаки ЦПЕ у культурі клітин TF з'являлись на 3-5 добу культивування, а починаючи з другого пасажу - раніше, на 2-3 добу. Характеристика ЦПЕ обох вірусів була досить схожа, не специфічна у різних культурах клітин і представляла собою заокруглення клітин, які втрачали зв’язки між собою та здатність прикріплюватись до поверхні скла або пластику, що призводило до їх вільного плавання у культуральній рідині та загибелі (Рис. 2.).



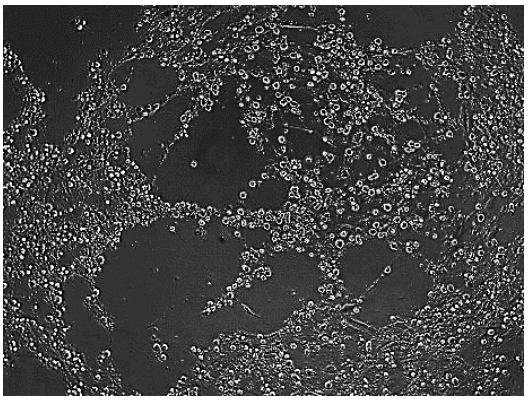
ЦПЕ у інфікованій вірусом хвороби Ауєскі культурі клітин ВНК-21 (48 год)



ЦПЕ у інфікованій вірусом везикулярного стоматиту культурі клітин MDBK (48 год)



ЦПЕ у інфікованій вірусом везикулярного стоматиту культурі клітин TF (96 год)



ЦПЕ у інфікованій вірусом хвороби Ауєскі культурі клітин TF (96 год)

Рис. 2. ЦПЕ спричинений впливом досліджуваних вірусів у культурах клітин

Для отримання максимальної концентрації вірусів флакони із зараженою культурою клітин забирали із термостата на кінцевих стадіях ЦПЕ, коли деструкції досягали більшість або всі клітин, утворювались проміжки у моношарі внаслідок відривання клітин від поверхні прикріплення.

Після проведення третього пасажу усі три культури клітин були посіяні на 96-ти луночні планшети та було проведено титрування усіх трьох досліджуваних вірусів. Найвищий рівень інфекційної активності вірусу хвороби Ауєскі був у культурі клітин ВНК-21 і становив 7,5±0,22 lg ТЦД50/см^3, на 48 год культивування. У культурі клітин MDBK вірус везикулярного стоматиту сягнув свого піку інфекційної активності на 48 год культивування, яка складала 6,5±0,30 lg ТЦД50/см^3

Нами вперше встановлена чутливість перещеплюваної клітинної лінії TF, отриманої з холоднокровної хребетної тварини, до вірусів теплокровних тварин, а саме до збудників хвороби Ауескі, у якій титр вірусу досягав 3,7±0,07 lg ТЦД50/см^3 на 48 год в третьому пасажі, та вірусу везикулярного стоматиту, титр якого становив 5,8±0,12lg ТЦД50/см^3 в третьому пасажі на 48 год культивування. Цитоморфологічні зміни, які викликають віруси хвороби Ауескі та везикулярного стоматиту у культурі клітин TF подібні до тих змін, які відбуваються у інших культурах клітин, як референтних, так і у виведеної нами лінії TF, а саме, віруси реплікуючись, руйнують моношар клітин, які округлючись відокремлюються від субстрату.

Таким чином, досліджувана культура клітин TF, отримана з пулу внутрішніх паренхіматозних органів новонародженої черепахи червоновухої *(Trachemys scripta elegance)* виявилась чутливою до обох досліджуваних модельних вірусів: з родини *Herpesviridae,* вірусу хвороби Ауєскі, штаму «Арський» та родини *Rhabdoviridae,* вірусу везикулярного стоматиту штаму "Індіана".

Висновки та перспективи подальших досліджень. Отримана нами перещеплювана культура клітин TF, з пулу внутрішніх паренхіматозних органів черепахи червоновухої *(Trachemys scripta elegance)*, придатна для дослідження репродукції вірусів теплокровних тварин, які проявляють в ній виражену інфекційну активність. Цей встановлений нами факт дозволяє зробити припущення щодо можливості подальшого використання цієї культури клітин в еволюційних дослідженнях вірусів, при тестуванні та розробці, контролі профілактичних противірусних препаратів, та для проведення інших вірусологічних досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Daszak P. Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. / Daszak P., Cunningham A.A., Hyatt A.D.//Science, − 2000. − 287 (5452) − P.443-449.

2. Jones K.E. Global trends in emerging infectious diseases. / Jones K.E., Patel N.G., Levy M.A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J.L., Daszak R.// Nature − 2008. − 451 (7181) − P.990-993.

3. Bronsvoort B.M. Animal movements and the spread of infectious diseases. / Bronsvoort BM, Hamilton KA, Cleaveland S., Fèvre E.M.// Trends Microbiol − 2006. − Mar;14(3) – P.125-131.

4. Siembieda J.L. The role of wildlife in transboundary animal diseases. / Siembieda J.L. Kock R.A., McCracken T.A., Newman S.H.// Jun. Anim Health Res Rev. − 2011.- 12(1) – P.95-111

5. Lowe S.J. 100 of the World' s Worst Invasive Alien Species / Lowe S.J., Browne M., Boudjelas S.// IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG), Auckland, New Zealand − 2000. − P.12

6. Куртяк Ф. Ф. Червоновуха прісноводна черепаха, Trachemys scripta elegans (Wied 1839) (Reptilia ; Testudines), як інвазивна загроза на Закарпатті. / Ф. Ф. Куртяк, М. Ф. Куртяк// Науковий вісник Ужгородського університету Серія Біологія – 2013. - Випуск 34 − С.1–5

7. WAHIS-Wild Interface, not OIE-listed diseases [Electronic resourse] the mode of access; http://www.oie.int/wahis_2/public/wahidwild.php/Index#

8. Ветеринарна вірусологія / Калініна О. С. – К.: - Вища освіта, - 2004. − с. 257-261.

НОВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИРУСОВ ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КЛЕТОК ХОЛОДНОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ */Савинова И.В., Клестова З.С.*

В представленной работе приводятся данные об использовании первой отечественной перевиваемой линии клеток TF, полученной из тканей рептилий, а именно из пула внутренних паренхиматозных органов новорожденного черепахи красноухой (Trachemys scripta elegance). Полученная перевиваемых клеточная линия TF, предназначенная для вирусологических исследований, в частности для определения спектра чувствительности к вирусам - возбудителей инфекций животных и человека. Восприимчивость клеточной линии TF была исследована на уровне 89 пассажа на моделях ДНК и РНК содержащих вирусов представителей семей Herpesviridae, Rhabdoviridae, Paramixoviridae.

Ключевые слова: *культура клеток, рептилии, вирусы, животные, чувствительность.*

NEW BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES FOR THE INVESTIGATION OF HEAT-BASED ANIMAL VIRUSS IN THE USE OF COLD-CROWN ANIMALS CELLS/ *Savinova I.V., Klestova Z.S.*

Introduction. *Domestic and wild animal population movements are important in the spread of disease. Understanding the volume of these movements and the risks associated with them is fundamental in elucidating the epidemiology of these diseases, some of which might entail zoonotic risks. The importance of the worldwide animal trade is reviewed and the role of the unregulated trade in animals is highlighted. A range of key examples are discussed in which animal movements have resulted in the introduction of pathogens to previously disease-free areas. Measures based on heightened surveillance are proposed that mitigate the risks of new pathogen introductions. Cell culture is essential for virus replication and isolation and this is a useful diagnostic tool to investigate the viral ecology, biology and evolution.*

The goal of the work*. The aim of this study was to investigate a new stable cell line from the pool of internal parenchymal organs of the newborn turtle (Trachemys scripta elegance) for viral research.*

Materials and methods of research. *There are BHK-21(baby hamster kidney), MDBK (Bos taurus kidney) and TF (internal parenchymal organs of the newborn turtle Red-eared slider) cell lines. There are DNA and RNA-containing viral models of the families Herpesviridae (Aujeszky's disease virus) and Rhabdoviridae (Vesicular stomatitis virus, (Indiana)).*

Results of research and discussion. *The sensitivity of the newly obtained cell line TF from the cold-blooded vertebrate animal to the viruses of warm-blooded animals have detected. The Aujeszky's disease virus titer has reached 3.7 ± 0.07 lg TCDD50 / cm^3 for 48 hours in the third passage, and the vesicular stomatitis virus titer has reached 5.8 ± 0.12lg TCDD50 / cm^3 in the third passage for 48 h cultivation. The Aujeszky's disease virus and vesicular stomatitis virus have led to cytomorphological changes in the TF cell culture were similar to those in other cell cultures have occurred. The virus's replication have destroyed the cells monolayer and have led rounded off cells and separated from the substrate of both reference and TF cell lines.*

Conclusions and perspectives of further research: *The retrieved TF cell culture, from the pool of internal parenchymal organs of the turtle reddish-brown (Trachemys scripta elegance), is suitable for the study of reproduction of warm-blooded viruses that exhibit pronounced infectious activity in it. This fact, established by us, allows us to make assumptions about the possibility of further use of this culture of cells in the evolutionary research of viruses, in the testing and development, control of prophylactic antiviral drugs, and for other viral studies.*

Key words: *cell culture, reptiles, viruses, animals, sensitivity.*

REFERENCES

1. Daszak P., Cunningham A.A., Hyatt A.D. (2000) Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science,* 287 (5452), 443-449 [in English].

2. Jones K.E., Patel N.G., Levy M.A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J.L. et al (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature,* 451 (7181), 990-993 [in English].

3. Bronsvoort BM, Hamilton KA, Cleaveland S., Fèvre E.M. (2006) Animal movements and the spread of infectious diseases. *Trends Microbiol.,*14(3), 125-131 [in English].

4. Siembieda J.L. Kock R.A., McCracken T.A., Newman S.H. (2011) The role of wildlife in transboundary animal diseases. *Jun. Anim Health Res Rev.,* 12(1), P.95-111 [in English].

5. Lowe S.J., Browne M., Boudjelas S. (2000) 100 of the World' s Worst Invasive Alien Species. *IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG)*, P.12 [in English].

6. Kurtjak F. F., Kurtjak M. F. (2013) Chervonovukha prisnovodna cherepakha, Trachemys scripta elegans (Wied 1839) (Reptilia ; Testudines), yak invazyvna zahroza na Zakarpatti. [Cherry juvenile freshwater tortoise, Trachemys scripta elegans (Wied 1839) (Reptilia, Testudines), as an invasive threat in Zakarpatyia]. *Naukovyy visnyk Uzhhorods'koho universytetu Seriya Biolohiya – Scientific herald of Uzhgorod University. Series Biology,* Vol. 34, 1–5 [in Ukrainian]

7. WAHIS-Wild Interface, not OIE-listed diseases. Retrieved from: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahidwild.php/Index#

8. Kalinina O. S. (2004) *Veterynarna virusolohiya [Veterinary Virology]*. K.: - Vyshcha osvita, 257-261.