

## EPIZOOTOLOGICAL MONITORING OF LEPTOSPIROSIS OF AGRICULTURAL ANIMALS IN SUMY REGION

Kambur M.D., Livoschenko L.P., Livoschenko Ye.M.  
Sumy National Agrarian University

Vlasenko O.A., Zadorozhny I.V.

Head Department of Veterinary Medicine in Sumy Region, Sumy

*The analysis of epizootic situation concerning leptospirosis of agricultural animals in the Sumy region for the last 3 years has been conducted. On the basis of RMA with the cultures of leptospira of 7 serogroups: pomona, tarassovi, icterohaemorrhagiae, hebdomadis, grippotyphosa, canicola, sejroe, it has been set, that the Sumy region is not safe concerning leptospirosis of agricultural animals. In the period since 2006 to 2008 leptospirosis has been detected in cattle (35,5% to 43,85%), horses (44,2% - 52,6%), pigs (15,7% - 26,8%) and small cattle (4,2 - 7,8%).*

УДК 616.988-092.18

### ЦИТОМЕТРИЯ ДНК РЕЗИСТЕНТНЫХ К ВИРУСУ ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА КЛЕТОК

Каралян З.А., Восканян Г.Е., Аброян Л.А., Акопян Л.О., Каралова Е.М.  
Институт молекулярной биологии НАН Республики Армения, г. Ереван, Армения;  
e-mail: zkaralyn@yahoo.com

*RD - линия рабдомиосаркомы человека, НЕК 293 - линия эмбриональных клеток почки человека, HEp-2 - линия карциномы гортани человека были заражены вирусом энцефаломиокардита (ВЭМ) в дозе 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/клетка. Репликация ВЭМ во всех клеточных культурах вызывала апоптоз. Клетки, выжившие после литической инфекции, имели отличный от контрольного фенотип и были охарактеризованы как менее трансформированные (в них отмечалось снижение пролиферативной активности, снижение количества ДНК, повышение зуплоидии, снижение среднего числа ядрышек). Описанные изменения могут являться следствием селекции (уничтожение вирусом многоядерных анеуплоидных клеток) и модификации клеток (деблокированием клеток, находящихся в фазе G<sub>2</sub>), происходящих под действием ВЭМ.*

Вирус энцефаломиокардита (ВЭМ) способен вызывать литическую инфекцию, которая характеризуется быстрым развитием морфологических и биохимических изменений в клетке, приводящих ее к гибели. Однако даже в высокочувствительных к инфекции ВЭМ клеточных линиях, после нескольких циклов репликации вируса, остаются единичные жизнеспособные клетки. Резистентные клетки характеризуются существенными изменениями в морфологии и метаболизме. Хотя размножение пикорнавирусов протекает в цитоплазме, однако интерес представляют изменения происходящие в ядре клетки. Выбор клеточных культур объясняется их различным — эмбриональным и опухолевым происхождением.

**Материалы и методы.** Вирус. Использовался штамм ВЭМ Columbia-SK, предоставленный институтом вирусологии АН России, Москва. Для получения острой вирусной инфекции ВЭМ использовался в дозе 0.1 ТЦД<sub>50</sub> на клетку.

**Клетки.** В работе использовались следующие клеточные линии человека: линия рабдомиосаркомы (RD), линия эмбриональных клеток почки (НЕК 293), линия карциномы гортани (HEp-2). Определение мертвых клеток в суспензии проводилось окраской трипановым синим по стандартной методике.

Клетки НЕК 293 были любезно предоставлены Dr Pascale Galea (Trophos-Марсель), а HEp-2 и RD Институтом Полиомиелита, Москва.

**Интерферон (ИФН).** В работе использовался нативный ИФН в дозе 100 и 1000 Ед/мл.

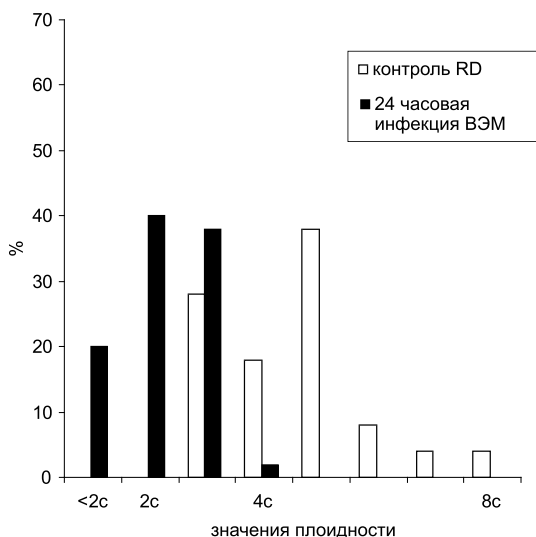
**Цитофотометрия.** Цитофотометрия проводилась рутинным методом с использованием окраски по Фельгену.

**Определение апоптоза.** Характерные изменения ДНК и структуры хроматина в апоптотически измененных клетках определялись с помощью цитофотометрического анализа окрашенных по Фельгену препаратов [4].

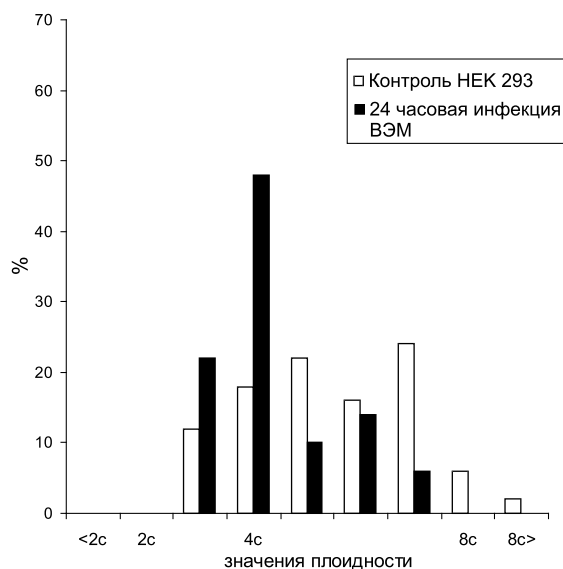
**Результаты.** Репликация вируса в клетках RD протекала очень быстро и давала пик титра ( $3.5 \log_{10}$ ) к 24 часам после инфекции. В последующие 12 часов уровень вируса сохранялся неизменным. К 24 часам после начала инфекции свыше 84 % популяции составляли погибшие клетки, и практически отсутствовал монослой — оставались только единичные живые клетки. Нами впервые получена инфекция ВЭМ на клетках НЕК 293 [1]. Адаптация лабораторного штамма вируса прошла без осложнений и уже с 3 пассажа были зафиксированы устойчивые данные репликации вируса. В целом, репликация ВЭМ в клетках НЕК 293 протекала медленнее, однако к 24 часам после начала инфекции насчитывалось около 30 % живых клеток. Пики вирусных титров наблюдались к 24 — 48 часам после начала инфекции ( $4.0 \log_{10}$ ). ВЭМ в клетках НЕР-2 реплицировался быстро, с высокими титрами накопления. В клетках вируса достигал своего максимума уже через 24 часа ( $7.5 \log_{10}$ ), затем медленно снижался к 72 часам. Через 48 часов после начала инфекции около 94 % клеток были мертвыми, а целостность монослоя была значительно нарушена уже к 24 часам. Подавляющее большинство мертвых клеток во всех культурах (70-91%) погибало апоптотическим путем.

Анализ цитофотометрии ДНК продемонстрировал, что линия RD являлась околотетраплоидной (среднее количество ДНК составляло  $3.9 \pm 0.4$  «с»). Под действием ВЭМ в культуре наблюдалось снижение количества ДНК и, начиная с 24 часов с начала инфекции разница становилась достоверной ( $2.6 \pm 0.3$  «с»). Клетки НЕК 293 являются гипертетраплоидными ( $5.4 \pm 0.4$  «с»). Под действием вируса количество ДНК начинало понижаться и после 24 часовой инфекции разница с контролем становилась достоверной ( $4.1 \pm 0.4$  «с»). Популяция клеток НЕР-2 также гипертетраплоидная, среднее количество ДНК составляло  $4.7 \pm 0.4$  «с». Под действием вируса после 24 часовой инфекции количество ДНК начинало понижаться и к 48 часам разница с контролем становилась достоверной ( $3.4 \pm 0.3$  «с»). Во всех случаях различия были достоверны ( $p > 0.001$ ).

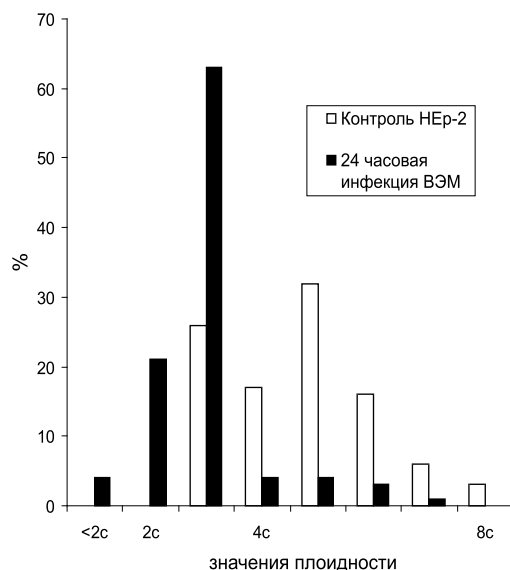
Под действием ВЭМ во всех культурах наблюдалось не только снижение абсолютных показателей содержания ДНК, но и изменение структуры клеток по классам плоидности.



**Рис. 1.** Изменение распределения ДНК по классам плоидности в культуре RD под действием ВЭМ.

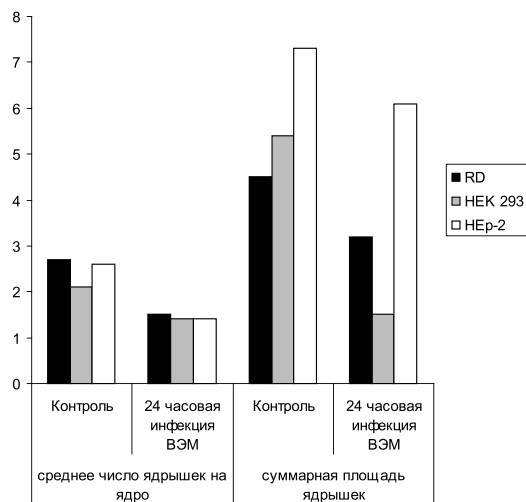


**Рис. 2.** Изменение распределения ДНК по классам плоидности в культуре НЕК 293 под действием ВЭМ.



**Рис. 3.** Изменение распределения ДНК по классам плоидности в культуре HEp-2 под действием ВЭМ.

Как следует из графиков (1-3), в заключительной стадии вирусной инфекции наблюдалось возрастание эуплоидной популяции во всех изученных культурах (RD контроль – 22 %, ВЭМ – 40 %, НЕК 293 – контроль 25%, ВЭМ – 48 %, HEp-2 – контроль 16 %, ВЭМ – 24 %). Помимо повышения эуплоидной популяции, в клеточных культурах RD и HEp-2 под действием вируса появляются диплоидные клетки. Как следует из графика (4), ВЭМ во всех исследованных линиях достоверно уменьшалась площадь ядрышек и их среднее число. Последнее снижалось за счет исчезновения из популяции многоядрышковых клеток.



**Рис. 4.** Изменение основных ядрышковых показателей под воздействием инфекции ВЭМ (по вертикали – условные единицы)

Для дифференцировки ИФН-опосредованного воздействия нами было исследовано действие ИФН на клеточные культуры. ИФН угнетает пролиферативную активность клеток – достоверно снижает митотическую активность и повышает процент мертвых клеток, имеется тенденция к снижению числа клеток на единицу площади. Однако при воздействии ИФН не происходит снижения содержания ДНК, лишь несколько повышается эуплоидная популяция клеток. Под действием ИФН достоверно снижается среднее количество ядрышек на ядро.

Сходство процессов, протекающих во всех трех клеточных культурах заставляет предполагать, что одной из движущих сил данного явления может быть селекция клеток вирусом. Скорее всего селективно ВЭМ вызывает апоптоз многоядрышковых клеток, содержащих анеуплоидный геном. В пользу этого предположения говорят данные о генетической детерминированности ядрышкообразующих регионов. Селекция может происходить, например, за счет повышенной экспрессии рецептора для ВЭМ – VCAM-1 на чувствительных клетках [2]. Однако мы можем также заключить, что ВЭМ, не только проводит селекцию клеток всех вышеупомянутых культур, но и способен модифицировать клетки. Модификация заключается прежде всего в возникновении диплоидных популяций клеток в культурах RD и HEp-2, отсутствующих в контроле. В пользу модификационных изменений говорит также и изменение фенотипа клеток, выживших после острой инфекции ВЭМ. Основным селекционным фактором является апоптоз, индуцируемый в клетках под воздействием вируса [3]. Модификация же клеток вызывается деблокированием клеток находящихся в фазе  $G_2$  и стимуляцией их деления. В целом, фенотип подобных клеток можно охарактеризовать как менее трансформированный по сравнению с исходной клеточной популяцией.

#### Список литературы

1. Karalova, E. M., Jaghatspanyan, N. G., Hakobyan, L.H., Abroyan, L.O., Ter-Pogossyan, Z.R., Gasparyan, M.H., Avetisyan, A.S., Karalyan, Z.A. Nuclear phenotype modifications in human cell cultures after infection with encephalomyocarditis virus. *BioChemistry: An Indian Journal*. 2008 apr, v.2, N1, p.29-35.
2. Kawano T, Yanoma S, Nakamura Y, Shiono O, Kokatu T, Kubota A, Furukawa M, Tsukuda M. Evaluation of soluble adhesion molecules CD44 (CD44st, CD44v5, CD44v6), ICAM-1, and VCAM-1 as tumor markers in head and neck cancer. *Am J Otolaryngol*. 2005; 26(5):308-13.
3. Labadie K, Saulnier A, Martin-Latil S, Colbere-Garapin F. Reduced apoptosis in human intestinal cells cured of persistent poliovirus infection. *J Virol*. 2007, Mar;81(6):3033-6.
4. Maria S. S., Vidal B. C., Melo M. L. S. Image analysis of DNA fragmentation and loss in V79 cells under apoptosis. *Genet. Mol. Biol*. 2000, 23 1415-4757

## DNA CYTOMETRY OF RESISTANT TO ENCEPHALOMYOCARDITIS VIRUS CELLS

Karalyan Z.A., Voskanyan H.E., Abroyan L.O., Hakobyan L.A., Karalova E.M.  
Institute of Molecular Biology of National Academy of Sciences of Republic Armenia,  
Yerevan, Armenia

*RD human rhabdomyosarcoma cells, HEp-2 – human larynx cancer cells and HEK 293 – human embryonic kidney cells were infected with 0.1 TCD<sub>50</sub>/cell of the Columbia-SK strain of encephalomyocarditis virus (EMCV). EMCV was propagated in the RD, HEp-2 and HEK cell line and induced apoptosis. Resistant cells in all cultures which survived after lytic infection had differentiated phenotypic modifications, and may be characterized by suppressed malignancy (suppressed proliferation rate, decreased DNA amount, increased euploidy, decreased of the average number of nucleoli). Described changes may be result of selection (elimination of the multinucleolar aneuploidy cells) and modification (debloking of G<sub>2</sub> cells) of the cells in all cultures under the action of EMCV.*

УДК 619: 578.822.2:636.7

### ОСОБЛИВОСТІ ЕПІЗООТОЛОГІЇ ПАНЛЕЙКОПЕНІЇ КІШОК В УМОВАХ МЕГАПОЛІСУ М. ХАРКІВ

Келеберда М.І., Гонтаренко А.О.

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Іванченко І.М.

Харківська державна зооветеринарна академія

*У статті наведені дані щодо розповсюдження панлейкопенії кішок у Харкові. Показане значне розповсюдження панлейкопенії та встановлена вікова залежність і сезонність при панлейкопенії. Проведені дослідження біологічного матеріалу від хворих тварин методом ІФА дозволили встановити наявність антигену вірусу панлейкопенії кішок у 12 голів із 68 досліджених. Вивчені гемаглютинуючі властивості вірусу.*

Проблема вірусних захворювань кішок є актуальною як для власників тварин, так і для ветеринарних лікарів. Особливий масштаб вона приймає в племінних розплідниках, в яких не дотримуються ветеринарно-санітарні правила. Незважаючи на велику кількість вакцинних препаратів проти вірозів кішок, культура утримання домашніх тварин знаходиться на низькому рівні, певна кількість кішок утримується на вільному виході та контактує з безпритульними тваринами, що безперечно сприяє постійній підтримці вірусоносійства на високому рівні.

Серед вірусних хвороб котятих особливе місце займає панлейкопенія кішок (ПЛК), яка характеризується високою летальністю (до 60-80 % серед кошенят), клінічно проявляється гастроентеритом, сильною діареєю та блюванням, лабораторно—вираженою лейкопенією й імуносупресією. На жаль, у більшості лікарень і лабораторій ветеринарної медицини України діагностика цього захворювання ґрунтується на візуальній оцінці клінічних ознак цього захворювання без використання методів лабораторної діагностики, що не виключає постановку хибних діагнозів та не дає повного уявлення про епізоотичну ситуацію щодо даного захворювання. Тому метою нашої роботи було дослідити епізоотичну ситуацію щодо панлейкопенії в умовах мегаполісу м. Харків.

**Матеріали та методи.** Збір і аналіз епізоотичних даних щодо панлейкопенії кішок (ПЛК) проводили на підставі даних “Журналів про реєстрацію хворих тварин” ветеринарних лікарень м. Харків за період з березня по листопад 2008 р. та матеріалу, що потрапляв до лабораторії з вивчення хвороб дрібних домашніх тварин ННЦ «ІЕКВМ», при цьому враховували породну, вікову сприйнятливості кішок до вірусу ПЛК та їх захворюваність у залежності від пори року.