

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-114>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



## Штаммы диплоидных клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus* и их перmissивность к орбивирусам (*Reoviridae: Orbivirus*) – возбудителям трансмиссивных болезней животных

Поволяева О.С., Чадаева А.А., Луницин А.В., Юрков С.Г.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», 601125, Владимирская обл., п. Вольгинский, Россия

**Введение.** Культуры клеток летучих мышей являются востребованной моделью как для изоляции вирусов трансмиссивных болезней, так и для оценки возможной роли данных видов млекопитающих в формировании природных резервуаров переносчиков возбудителей арбовирусных инфекций.

**Цель исследования.** Получение и характеристика штаммов диплоидных клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus*, оценка их перmissивности к вирусам блютанга, африканской чумы лошадей (АЧЛ), эпизоотической геморрагической болезни оленей (ЭГБО).

**Материалы и методы.** Культуры клеток лёгкого нетопыря-карлика получали методом стандартной ферментативной дезагрегации ткани доноров и селекцией клеток по адгезивным свойствам. Биологические свойства штаммов клеток изучены цитологическими, кариологическими методами. Перmissивность культур клеток определяли к орбивирусам блютанга, АЧЛ, ЭГБО.

**Результаты.** Диплоидные штаммы клеток (эпителиоподобного и фибробластоподобного типа), сохраняющие цитоморфологические характеристики и стабильность кариотипа, получены из ткани лёгкого нетопыря-карлика *Pipistrellus pipistrellus*. Установлена их перmissивность к вирусам рода *Orbivirus* семейства *Reoviridae* возбудителям трансмиссивных заболеваний животных. Паспортизированные штаммы диплоидных клеток чувствительны к орбивирусам блютанга, АЧЛ, ЭГБО. Инфекционная активность вирусов в эпителиоподобной культуре клеток соответствовала активности в референтных культурах Vero и CV-1. Фибробластоподобная культура клеток была менее перmissивна к вирусам блютанга и ЭГБО, однако накопление вируса АЧЛ было выше на  $1,52,0 \text{ Ig TЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

**Обсуждение.** Перmissивность полученных штаммов клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus* к вирусам блютанга, АЧЛ, ЭГБО согласуется с данными изоляции орбивирусов у летучих мышей видов *Pteropus poliocephalus*, *Pteropus hypomelanus*, *Rousettus aegyptiacus leachii*, *Syconycteris crassa*, *Myotis macrodactylus*, *Eidolon helvum*.

**Заключение.** Штаммы диплоидных клеток лёгкого нетопыря-карлика перmissивны к орбивирусам блютанга, АЧЛ, ЭГБО, что позволяет рекомендовать их для изоляции этих вирусов, а вид *Pipistrellus pipistrellus* рассматривать как потенциальный природный резервуар и переносчик возбудителей данных трансмиссивных болезней.

**Ключевые слова:** орбивирус; летучие мыши; штамм диплоидных клеток; трансмиссивные болезни

**Для цитирования:** Поволяева О.С., Чадаева А.А., Луницин А.В., Юрков С.Г. Штаммы диплоидных клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus* и их перmissивность к орбивирусам (*Reoviridae: Orbivirus*) – возбудителям трансмиссивных болезней животных. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(3): 227–236. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-114>

**Для корреспонденции:** Юрков Сергей Григорьевич, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии, 601125, Владимирская обл., п. Вольгинский, Россия. E-mail: [patronn13@rambler.ru](mailto:patronn13@rambler.ru)

**Участие авторов:** Поволяева О.С. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Чадаева А.А. – проведение экспериментов; Луницин А.В. – сбор, анализ и интерпретация данных; Юрков С.Г. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста, окончательное одобрение статьи к публикации.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен этическим комитетом организации (протокол № 7 от 05.08.2020).

Поступила 05.05.2022  
Принята в печать 02.06.2022  
Опубликована 30.06.2022

## ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-114>

## Dwarf bat's (*Pipistrellus pipistrellus*) lung diploid cell strains and their permissivity to orbiviruses (*Reoviridae: Orbivirus*) – pathogens of vector-borne animal diseases

Olga S. Povolyaeva, Anna A. Chadaeva, Andrey V. Lunitsin, Sergey G. Yurkov

Federal Research Center for Virology and Microbiology, 601125, Vladimir region, Volginsky, Russia

**Introduction.** Bat cell cultures are a popular model both for the isolation of vector-borne disease viruses and for assessing the possible role of these mammalian species in forming the natural reservoirs of arbovirus infection vectors. The goal of the research was to obtain and characterize strains of diploid lung cells of the bat (*Pipistrellus pipistrellus*) and evaluate their permissivity to bluetongue, African horse sickness (AHS), and epizootic hemorrhagic disease of deer (EHD) viruses.

**Materials and methods.** Cell cultures of the dwarf bat's lung were obtained by standard enzymatic disaggregation of donor tissue and selection of cells for adhesive properties. The permissivity of cell cultures was determined to bluetongue, AHL, and EHD orbiviruses.

**Results.** Diploid cell strains (epithelium-like and fibroblast-like types) retaining cytomorphological characteristics and karyotype stability were obtained from tissue of the bat's lung. Their permissivity to viruses of the genus *Orbivirus* of the *Reoviridae* family, pathogens of transmissible animal diseases, has been established.

**Discussion.** The permissivity of the obtained strains of bat's lung cells to bluetongue, AHL, and EHD viruses is consistent with the isolation of orbiviruses in bats of the species *Pteropus poliocephalus*, *Pteropus hypomelanus*, *Rousettus aegyptiacus leachii*, *Syconycteris crassa*, *Myotis macrodactylus*, and *Eidolon helvum*.

**Conclusion.** Strains of diploid lung cells of the dwarf bat are permissive to orbiviruses of bluetongue, AHS, and EHD, which allows us to recommend them for the isolation of these viruses, and the species *Pipistrellus pipistrellus* to be considered as a potential natural reservoir and carrier of pathogens of these vector-borne diseases.

**Keywords:** orbivirus; bats; diploid cell strain; vector-borne diseases

**For citation:** Povolyaeva O.S., Chadaeva A.A., Lunitsin A.V., Yurkov S.G. Dwarf bat's (*Pipistrellus pipistrellus*) lung diploid cell strains and their permissivity to orbiviruses (*Reoviridae: Orbivirus*) – pathogens of vector-borne animal diseases. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(3): 227–236. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-114>

**For correspondence:** Sergey G. Yurkov, Dr. Sci. Biol., Professor, Chief Researcher, Federal Research Center for Virology and Microbiology, 601125, Vladimir region, Russia. E-mail: [patronn13@rambler.ru](mailto:patronn13@rambler.ru)

**Information about the authors:**Povolyaeva O.S., <https://orcid.org/0000-0002-5635-6677>Chadaeva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9615-9758>Lunitsin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5043-446X>Yurkov S.G., <https://orcid.org/0000-0002-6801-9424>

**Contribution:** Povolyaeva O.S. the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Chadaeva A.A. – conducting of the experiments; Lunitsin A.V. – collection, analysis and interpretation of the data; Yurkov S.G. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text, final approval of the article for publication.

**Funding.** The research was funded by the State budget.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the ethics committee of the institution (Protocol No 7 dated 05.08.2020).

Received 05 May 2022

Accepted 02 June 2022

Published 30 June 2022

### Введение

Арбовирусные инфекции занимают существенное положение в структуре вирусной патологии млекопитающих. Возбудители векторных заболеваний наносят значительный экономический урон сельскохозяйственным животным [1], а трансмиссивные болезни людей составляют более 17% всех инфекционных болезней,

от которых ежегодно умирает более 700 тыс человек [2]. Патогены рода *Orbivirus* семейства *Reoviridae*, относящиеся к группе арбовирусов, включают как ряд вирусов, вызывающих респираторные, лихорадочные и неврологические болезни человека с явлениями поражения центральной нервной системы [3], так и важных в эпидемическом отношении возбудителей болезней сельскохозяйственных животных: блютанга (BTV),

африканской чумы лошадей (AHSV, АЧЛ), эпизоотической геморрагической болезни оленей (EHNV, ЭГБО), перуанской чумы лошадей (PHSV), которые передаются насекомыми-гематофагами [4–6].

Риск возникновения вспышек трансмиссивных болезней определяется наличием природных резервуаров патогена и векторных переносчиков возбудителей.

Установлено, что летучие мыши являются одним из важных природных резервуаров вирусов многих семейств [7], таких как *Filoviridae* [8], *Coronaviridae* [9, 10], *Rhabdoviridae* [11], *Herpesviridae*, *Adenoviridae* [12], *Paramyxoviridae* [13], *Astroviridae* и [14] а также *Reoviridae*, включая род *Orbivirus* [15, 16].

В европейских странах обитает более 40 видов летучих мышей, которые являются насекомоядными. Они питаются мухами, комарами, мокрецами, многие из которых рассматриваются потенциальными векторами возбудителей особо опасных вирусных болезней животных [17]. Установлено, что одна летучая мышь массой 40 г в течение часа охоты съедает от 200 до 600 насекомых, что составляет до 30 г корма [18].

L.C. La Motte Jr [19] продемонстрировал, что летучие мыши могут заражаться вирусом японского энцефалита, входящим в экологическую группу арбовирусов, при скармливании им инфицированных комаров, и в эксперименте воспроизвел передачу вируса в цикле «комары – летучие мыши комары». Также эти исследования показали чувствительность к вирусу летучих мышей видов *Eptesicus fuscus*, *Myotis lucifugus*, *Pipistrellus subflavus* и способность инфицированных животных поддерживать латентный вирус в условиях имитации гибернации в течение 107 дней.

Приведённые данные позволяют рассматривать насекомоядных летучих мышей как вероятную экологическую нишу и резервуар прежде всего возбудителей арбовирусных инфекций.

Передача патогенов от летучих мышей к млекопитающим может происходить при прямом контакте с животными, через контаминированные секретами и экскретами летучих мышей кормовые продукты (плоды, растения) и иные объекты (места пребывания) или через переносчиков [20, 21]. Распространение вируса летучими мышами возможно с заражением промежуточных хозяев [22].

В то же время отмечены значительные трудности в выделении вирусов от летучих мышей в культурах клеток [23–25]. Для изоляции вирусных патогенов от представителей различных семейств млекопитающих более эффективны культуры клеток, полученные из тканей, содержащих клетки-мишени, в видовом отношении соответствующие носителю вируса.

Первичные и перевиваемые культуры клеток из тканей летучих мышей получены в основном от видов, обитающих в тропических и субтропических зонах всех континентов, а их чувствительность изучена к вирусам зоонозных инфекций человека [26, 27]. Ранее нами показана перmissивность штамма диплоидных клеток почки лесного нетопыря к вирусам различных таксономических групп – возбудителям болезней животных [28].

Вспышки трансмиссивных заболеваний животных – блютанга, ЭГБО, АЧЛ, относящихся к роду *Orbivirus*, основным переносчиком возбудителей которых являются мокрецы из рода *Culicoides*, а также комары, москиты и некоторые виды клещей, – за последние три года регистрировались в странах Европы (Швейцария, Испания, Португалия, Италия, Германия, Франция, Бельгия, Сербия, Румыния, Северная Македония, Люксембург, Греция, Хорватия, Болгария, Босния и Герцеговина, Албания, Черногория), Азии (Израиль) и Африки (Тунис, Эфиопия, Алжир) [29].

Совпадение ареалов распространения и миграции нетопыря-карлика и территорий, неблагоприятных по приведённым выше векторным болезням животных, определяют актуальность цели наших исследований – получение диплоидных штаммов клеток лёгкого летучих мышей вида *Pipistrellus pipistrellus* и изучение их перmissивности к ряду вирусов рода *Orbivirus* возбудителей трансмиссивных вирусных заболеваний животных.

### Материалы и методы

**Животные.** В качестве доноров лёгкого отобраны клинически здоровые летучие мыши вида нетопырь-карлик (*Pipistrellus pipistrellus*), отловленные при помощи туман-сети в августе в Ростовской области.

**Культуры клеток.** В работе использовали полученные штаммы диплоидных культур клеток лёгкого нетопыря-карлика diploid cell line *Pipistrellus pipistrellus lung ep.* и diploid cell line *Pipistrellus pipistrellus lung f.*, а также референтные перевиваемые линии клеток почки африканской зелёной мартышки Vero и CV-1 из коллекции клеточных культур Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии (ФГБНУ ФИЦВиМ, п. Вольгинский) [30].

**Вирусы.** Перmissивность клеточных культур определяли к следующим вирусам семейства *Reoviridae* рода *Orbivirus*:

- вирус блютанга 1-го серотипа с инфекционной активностью (ИА) в перевиваемой линии клеток почки африканской зелёной мартышки Vero 6,25 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>;
- вирус ЭГБО, штамм Альберто с ИА 6,25 ± 0,25 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> в перевиваемой линии клеток почки африканской зелёной мартышки CV-1;
- вирус АЧЛ 1-го серотипа на уровне 5-го пассажа в перевиваемой линии клеток CV-1 с ИА 5,75 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Используемые штаммы вирусов получали из Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных (реестровый номер центра коллективного пользования – 441429)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Государственная коллекция микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных. URL: <http://ckp-rg.ru/ckp/441429/>

**Питательные среды и растворы.** Среда Игла MEM (Minimum Essential Medium), Dulbecco's MEM (DMEM), DMEM/F12 (1 : 1), McCoy's 5A, приготовленные из сухих концентратов производства HyClone и Sigma (США). Фетальная сыворотка крови крупного рогатого скота (КРС) производства HyClone (США) и Biological Industry (Израиль). Буференный фосфатом физиологический раствор (рН 7,4), солевой раствор Эрла, дистиллированная вода, 0,25% раствор трипсина, 0,02% раствор Версена, диметилсульфоксид (Sigma, США).

Первичную культуру клеток готовили методом стандартной трипсинизации ткани в растворе 0,25% трипсина и 0,02% Версена в соотношении 1 : 1 при температуре 35–37°C. Субкультивирование культур клеток и установление штаммов диплоидных клеток проводили методом последовательных пересевов.

Кариологическое изучение полученных культур клеток проводили по методике, предложенной С.Е. Ford, J.L. Hamerton [31] и К.Н. Rothfels, L. Siminovitch [32]. Препараты исследовали при помощи световой микроскопии, проводя подсчёт числа хромосом в метафазных пластинках в 50 клетках каждой культуры.

Чувствительность культур клеток лёгкого летучих мышей к вирусам трансмиссивных инфекционных болезней животных, относящиеся к семейству *Reoviridae*, оценивали по скорости и интенсивности развития цитопатического действия (ЦПД) в первом пассаже с определением ИА полученного вирусного материала в перевиваемых линиях клеток, к которым данные патогены были адаптированы ранее. Определение перmissивности полученных клеток к исследуемым вирусам проводили с использованием множественности заражения 0,01–0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл, адсорбции вируса в течение 60 мин и инкубировании инфицированных культур при 37,0 ± 0,5°C до развития выраженного ЦПД.

ИА вируса определяли путём титрования в перmissивных для каждого вируса референтных культурах



**Рис. 1.** Летучая мышь вида нетопырь-карлик (*Pipistrellus pipistrellus*).

**Fig. 1.** The dwarf bat (*Pipistrellus pipistrellus*).

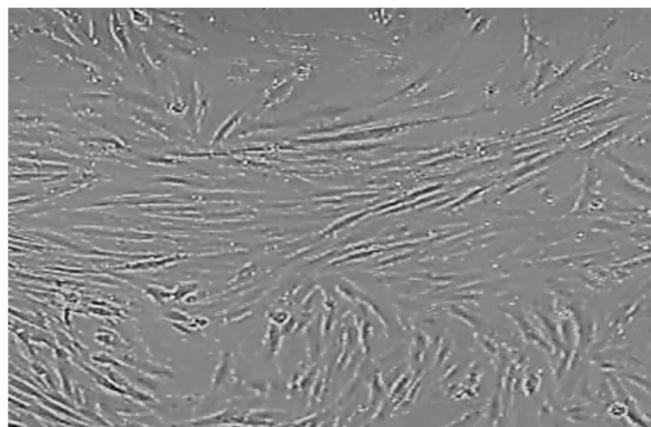
клеток, учитывали развитие ЦПД. Титр вируса рассчитывали по методике Рида и Менча в модификации Ашмарина.

## Результаты

Эвтаназию летучих мышей вида *Pipistrellus pipistrellus* (**рис. 1**) проводили внутрибрюшинным введением 500 мкл 70% этилового спирта и цервикальной дислокацией шейных позвонков [33]. Данная процедура соответствует российскому законодательству и одобрена Комиссией по биоэтике ФГБНУ ФИЦВиМ как отвечающая требованиям Директивы Европейского Парламента 2010/63/EU [34].

Летучих мышей вскрывали и извлекали лёгкие, которые помещали в ёмкости с солевым раствором Эрла с добавлением антибиотиков (20 мкг/мл ципрофлоксацина и 5 мкг/мл амфотерицина В). Ткань лёгких механически измельчали на фрагменты размером около 2–3 мм<sup>3</sup>, отмывали от крови солевым раствором Эрла и проводили стандартную трипсинизацию. Объединенную клеточную суспензию центрифугировали при 700 g в течение 10 мин, затем диспергирующую смесь декантировали, осадок клеток ресуспендировали в 25 см<sup>3</sup> ростовой среды. При посевной концентрации 375 ± 25 тыс. клеток/см<sup>3</sup> и жизнеспособности клеток по тесту витального окрашивания трипановым синим на уровне 82–84% формирование конфлюэнтного монослоя клеток отмечено на 6-е сутки культивирования (**рис. 2**).

Последовательные пассажи клеточной культуры с коэффициентом посева 1 : 2 осуществляли с использованием питательной среды DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крови КРС. При посевной концентрации 135 ± 15 тыс. клеток/см<sup>3</sup> конфлюэнтный монослой формировался на 3–5-е сутки культивирования. Субкультура клеток лёгкого была представлена фибробластоподобными клеточными



**Рис. 2.** Первично-трипсинизированная культура клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus* через 144 ч культивирования (микрофотография, увеличение ×100).

**Fig. 2.** Primary trypsinized cell culture of *Pipistrellus pipistrellus* lung after 144 hs of cultivation (microphotograph, magnification ×100).

элементами, содержащими ядра овальной формы с 13 округлыми ядрышками, варьирующими по размеру. Ядерный матрикс гомогенный. В монослойной культуре присутствовали в незначительном количестве эпителиоподобные клетки, формирующие отдельные островки роста. Проллиферативная активность клеток с увеличением пассажного уровня возрастала, культура уплотнялась, формировала разнонаправленные потоки.

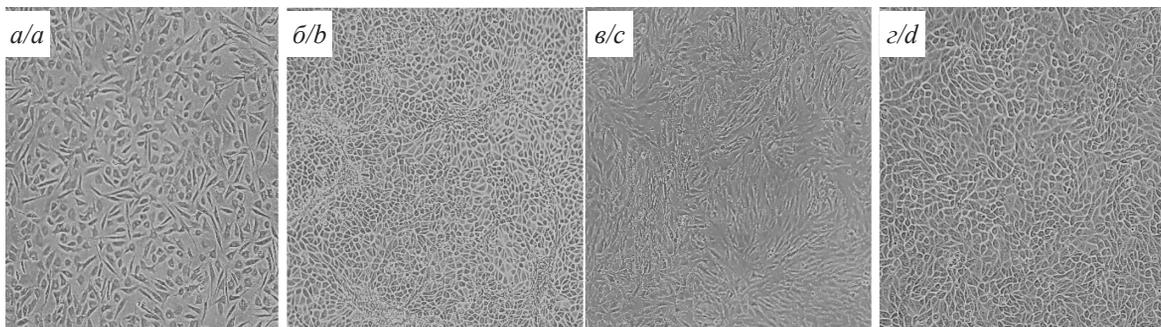
При пересеве культуры отмечено, что при обработке клеточного монослоя смесью трипсина и Версена 1 : 3 в первую очередь отслаивались фибробластоподобные клетки. Для снятия эпителиоподобных клеток требовалась их более продолжительная экспозиция в диспергирующем растворе. Также пролиферативный потенциал фибробластоподобных клеток был более высокий, что приводило к значительному увеличению их доли в пассажных уровнях. В связи с этим селекцией по адгезивным и ростовым свойствам с использованием низких посевных концентраций культура клеток лёгочной ткани нетопыря-карлика на уровне 27-го пассажа была разделена на две клеточные субпопуляции, отличающиеся по фено-

типу: фибробластоподобные и эпителиоподобные. В дальнейшем две эти популяции сохраняли данные цитоморфологические характеристики до начала периода старения (рис. 3).

Кариологический анализ клеток лёгкого нетопыря-карлика на уровне 33-го пассажа подтвердил видовую принадлежность полученных культур. В условиях непрерывного культивирования обе культуры показали стабильность кариотипа, который сохранял как диплоидный набор хромосом ( $2n = 42$ ,  $NFa = 50$ ), так и отсутствие хромосомных перестроек и образование маркерных хромосом (рис. 4).

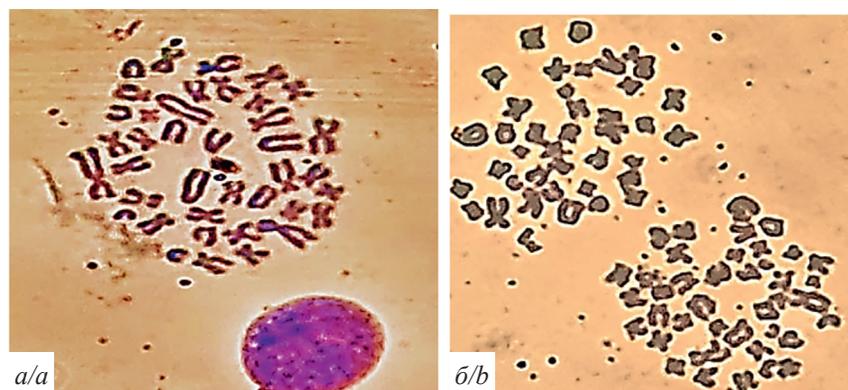
Оптимизация среды культивирования клеток лёгкого нетопыря-карлика показала, что среды DMEM/F12 и McCoy's обеспечивали более высокие пролиферативные показатели культуры при равной цитоморфологической картине монослоя. При этом срок формирования конфлюэнтного монослоя и индекс пролиферации у них были выше, чем в среде DMEM. Для дальнейшего использования была выбрана среда DMEM/F12.

По совокупности цитоморфологических, ростовых и кариологических показателей клеточные культуры



**Рис. 3.** Монослой культуры клеток лёгкого *Pipistrellus pipistrellus*: а – диплоидный штамм культуры, 15-й пассаж; б – смешанная культура, 27-й пассаж; в – диплоидный штамм культуры клеток фибробластоподобного типа, 32-й пассаж; г – диплоидный штамм культуры клеток эпителиоподобного типа, 32-й пассаж (микрофотография, увеличение  $\times 150$ ).

**Fig. 3.** Monolayer of cell culture of *Pipistrellus pipistrellus* lung: а – diploid culture strain, 15<sup>th</sup> passage level; б – mixed culture, 27<sup>th</sup> passage level; в – diploid cell culture strain of fibroblast-like type, 32<sup>th</sup> passage level; г – diploid cell culture strain of epithelial-like type, 32<sup>th</sup> passage level (microphotograph, magnification  $\times 150$ ).



**Рис. 4.** Метафазные пластинки культуры клеток лёгкого *Pipistrellus pipistrellus*: а – эпителиоподобных клеток; б – фибробластоподобных клеток (микрофотография, увеличение  $\times 900$ ).

**Fig. 4.** Metaphase plate of the cell culture of *Pipistrellus pipistrellus* lung: а – epithelial-like cells; б – fibroblast-like cells (microphotograph, magnification  $\times 900$ ).

*P. pipistrellus lung f.* и *P. pipistrellus lung ep.* соответствовали определению диплоидного штамма и получили наименования «Штамм диплоидных эпителиоподобных клеток лёгкого нетопыря-карлика (Diploid cell line *Pipistrellus pipistrellus lung ep.*)» и «Штамм диплоидных фибробластоподобных клеток лёгкого нетопыря-карлика (Diploid cell line *Pipistrellus pipistrellus lung f.*)» соответственно. Полученные культуры клеток криоконсервированы в жидком азоте на различных пассажных уровнях. Жизнеспособность данных культур клеток после размораживания по тесту витального окрашивания трипановым синим составила 74–92%.

Во второй фазе (активной пролиферации) диплоидные штаммы клеток находились до уровня 43-го пассажа культуры фибробластоподобного типа и до 47-го пассажного уровня культуры эпителиоподобного типа. При коэффициентах пересева 1 : 2–1 : 3 в оптимизированной среде (DMEM/F12 90% и FBS 10%) клетки формировали конфлюэнтный монослой через 48 ч культивирования. Отмечено, что культура фибробластоподобного типа сохраняла без смены среды типичную морфологию и отсутствие проявлений цитопатического эффекта, вызванного возможными эндогенными вирусами, и признаков дегенерации клеток в течение 28 дней, а культура эпителиоподобного типа сохраняла те же характеристики в течение 35 дней.

Бактериологический контроль клеточных расплеков обеих культур показал отсутствие контаминации бактериями, грибами и микоплазмами. Возможные экзогенные вирусные контаминанты (пестивирусы диареи КРС и классической чумы свиней), источником которых могут быть сыворотки крови и трипсин, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени не выявлены.

При изучении перmissивности штаммов диплоидных клеток лёгкого летучих мышей к вирусу блютанга 1-го серотипа на 2-е сутки отмечены начальные признаки ЦПД в культуре клеток diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.* в виде округления клеток. На 3-и сутки в культуре наблюдали отслоение и лизис инфицированных клеток, сопровождающийся деструкцией клеточного монослоя.

В культуре diploid cell line *P. pipistrellus lung f.* ЦПД вируса проявлялось на 6-е сутки с округлением кле-

ток, разрежением монослоя и отслоением клеток. В контрольных интактных (неинфицированных) культурах изменений клеточного монослоя не наблюдали.

Результаты определения ИА вируса блютанга, полученного в культуре клеток diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, сопоставимы с активностью вируса в контрольной культуре инфицированных перmissивных клеток почки африканской зелёной марышки (Vero), в которой отмечено развитие характерного ЦПД с активностью вируса  $6,31 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

Вирусрепродуцирующая активность diploid cell line *P. pipistrellus lung f.* в отношении вируса блютанга была на два логарифма ниже, и срок развития ЦПД также отставал.

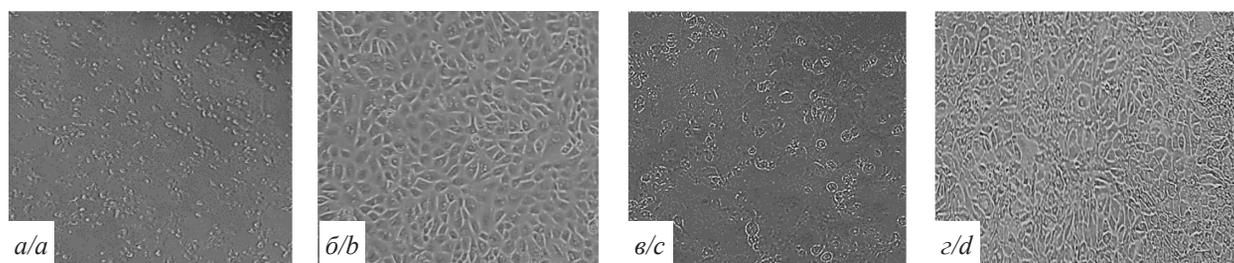
Характер развития ЦПД вируса блютанга в штаммах диплоидных клеток лёгкого *Pipistrellus pipistrellus* представлен на **рис. 5**.

При изучении чувствительности культур исследуемых штаммов диплоидных клеток к вирусу ЭГБО на 2-е сутки в культурах клетках diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.* и diploid cell line *P. pipistrellus lung f.* отмечен лизис отдельных клеток монослоя. ЦПД вируса в diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.* выражалось в очаговой деструкции и отслоении клеток на 3-й день, а в культуре клеток diploid cell line *P. pipistrellus lung f.* на 4-й день после заражения. Характер развития ЦПД вируса ЭГБО в штаммах диплоидных клеток лёгкого летучих мышей представлен на **рис. 6**.

В контрольной культуре инфицированных референтных перmissивных клеток CV-1 отмечено развитие характерного ЦПД с накоплением вируса до титров ИА  $6,38 \pm 0,08 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , тогда как в diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.* она составила  $5,69 \pm 0,22 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , а в diploid cell line *P. pipistrellus lung f.* она была ниже  $4,56 \pm 0,07 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  и ЦПД развивалось на сутки позже.

Это указывает на то, что культуры клеток одного тканевого происхождения (лёгочная ткань), но представленные разным фенотипом клеток (эпителиоподобные и фибробластоподобные), обладали различной перmissивностью к исследуемому вирусу.

Изучение чувствительности штаммов диплоидных клеток к вирусу АЧЛ показало, что развитие ЦПД вируса в культуре клеток diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*



**Рис. 5.** Цитопатическое действие вируса блютанга: *a* – в культуре diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33-й пассаж, на 3-и сутки; *b* – контроль diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33-й пассаж; *c* – в культуре diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32-й пассаж, на 6-е сутки; *d* – контроль diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32-й пассаж (микрофотография, увеличение  $\times 150$ ).

**Fig. 5.** Cytopathic effect of BTV: *a* – in the culture of diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33<sup>th</sup> passage level, on the third day; *b* – control diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33<sup>th</sup> passage level; *c* – in the culture of diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32<sup>th</sup> passage level, sixth day; *d* – diploid cell line control *P. pipistrellus lung f.*, 32<sup>th</sup> passage level (microphotograph, magnification  $\times 150$ ).

проявлялось на 1-е сутки в виде лизиса клеток и разрывание монослоя. В культуре клеток diploid cell line P. pipistrellus lung ep. цитопатический эффект вируса АЧЛ, сопровождающийся округлением и отслоением инфицированных клеток от подложки с деструкцией клеточного монослоя, отмечали через 72 ч (рис. 7).

ИА вирусного материала, полученного в diploid cell line P. pipistrellus lung ep., при титровании в перmissive культуре клеток CV-1 составила  $5,75 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . Фибробластоподобная культура клеток лёгкого была более перmissive к вирусу, в которой он накапливался на 1,52 логарифма выше ( $7,25 \pm 0,17 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ), а ЦПД развивалось в течение 24 ч после инокуляции вируса. В контрольной культуре инфицированных перmissive клеток CV-1 активность вируса составляла  $5,69 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  (таблица).

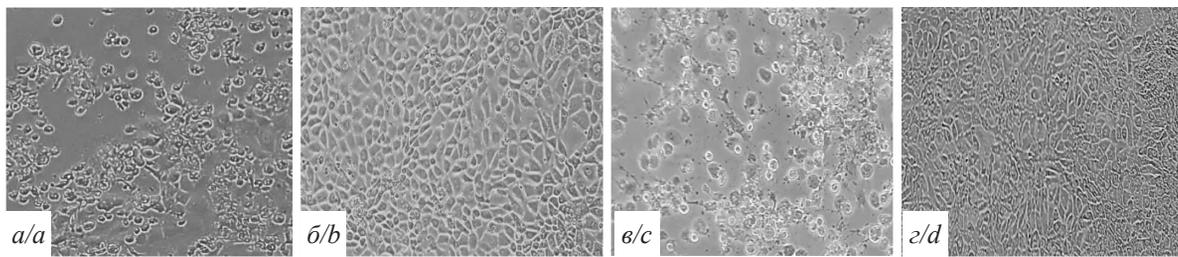
### Обсуждение

Арбовирусные инфекции, включая болезни сельскохозяйственных животных, вызываемые представителями рода *Orbivirus*, представляют постоянный риск заноса и распространения. Идентификация реовирусов и новых патогенов этого семейства у летучих

мышей свидетельствует о высоком уровне перmissiveности клеток тканей и органов представителей *Microchiroptera* [35].

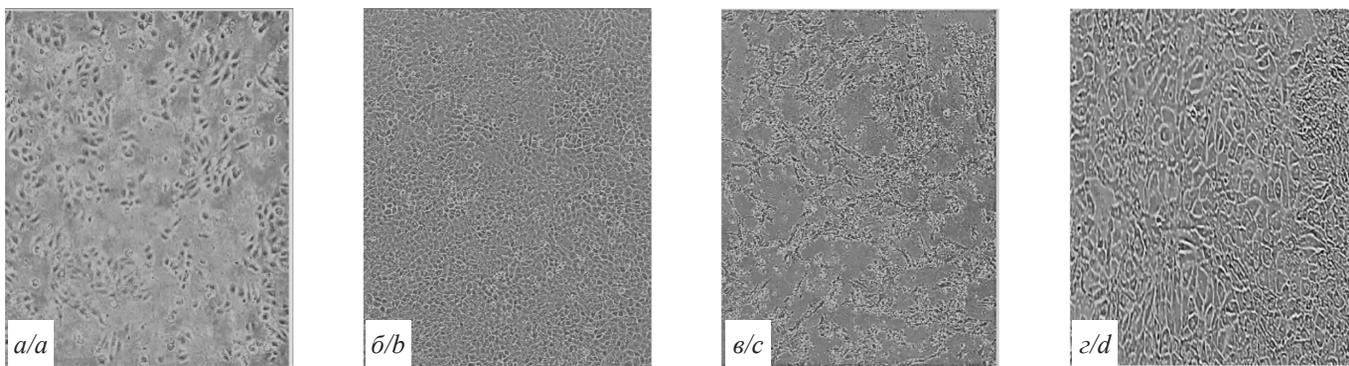
Роль летучих мышей, обитающих и мигрирующих в Российской Федерации с включением в ареал распространения территории сопредельных стран, неблагополучных по трансмиссивным болезням млекопитающих, недостаточно изучена. Культуры клеток из тканей летучих мышей являются наиболее востребованной лабораторной моделью для первичной изоляции и изучения вирусов, ассоциированных с отрядом рукокрылых. Полученные нами штаммы диплоидных клеток лёгкого нетопыря-карлика *Pipistrellus pipistrellus* обладали стабильными цитоморфологическими, пролиферативными и кариологическими характеристиками, что позволило создать крупные криобанки клеток для проведения долговременных вирусологических исследований.

Результаты исследований показали репродукцию орбовирусов возбудителей трансмиссивных инфекций сельскохозяйственных животных с развитием цитопатического эффекта в клетках полученных штаммов диплоидных клеток лёгкого летучих мы-



**Рис. 6.** Цитопатическое действие вируса эпизоотической геморрагической болезни оленей: *a* – в культуре diploid cell line P. pipistrellus lung ep., 33-й пассаж, на 2-е сутки; *б* – контроль diploid cell line P. pipistrellus lung ep., 33-й пассаж; *в* – в культуре diploid cell line P. pipistrellus lung f., 32-й пассаж, на 3-и сутки; *г* – контроль diploid cell line P. pipistrellus lung f., 32-й пассаж (микрофотография, увеличение  $\times 150$ ).

**Fig. 6.** Cytopathic effect of EHDV: *a* – in the culture of diploid cell line P. pipistrellus lung ep., 33<sup>th</sup> passage level, on the second day; *b* – control diploid cell line P. pipistrellus lung ep., 33<sup>th</sup> passage level; *c* – in the culture of diploid cell line P. pipistrellus lung f., 32<sup>th</sup> passage level, on the third day; *d* – diploid cell line control P. pipistrellus lung f., 32<sup>th</sup> passage level (microphotograph, magnification  $\times 150$ ).



**Рис. 7.** Цитопатическое действие вируса африканской чумы лошадей: *a* – в культуре diploid cell line P. pipistrellus lung ep., 32-й пассаж, на 3-и сутки; *б* – контроль diploid cell line P. pipistrellus lung ep., 32-й пассаж; *в* – в культуре diploid cell line P. pipistrellus lung f., 32-й пассаж, на 3-и сутки; *г* – контроль diploid cell line P. pipistrellus lung f., 32-й пассаж (микрофотография, увеличение  $\times 150$ ).

**Fig. 7.** Cytopathic effect of African horse sickness virus: *a* – in the culture of diploid cell line P. pipistrellus lung ep., 32<sup>th</sup> passage level, on the third day; *b* – control diploid cell line P. pipistrellus lung ep., 32<sup>th</sup> passage level; *c* – in the culture of diploid cell line P. pipistrellus lung f., 32<sup>th</sup> passage level, for the first day; *d* – diploid cell line control P. pipistrellus lung f., 32<sup>th</sup> passage level (microphotograph, magnification  $\times 150$ ).

Таблица. Оценка перmissивности штаммов диплоидных культур клеток лёгкого нетопыря-карлика к реовирусам ( $n = 4$ )Table. Sensitivity of the diploid cell line *P. pipistrellus lung* to viruses of the *Reoviridae* family ( $n = 4$ )

№	Вирус, семейство Virus, family	Сроки ЦПД (сутки) / Инфекционная активность в культурах клеток (lg ПЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> ) Time frame of cytopathic action (day) / Infection activity in cell culture (lg TCID <sub>50</sub> /ml <sup>3</sup> )		
		diploid cell line <i>P. pipistrellus lung ep.</i>	diploid cell line <i>P. pipistrellus lung f.</i>	контрольная (референтная) культура клеток control (reference) cell culture
1	Блютанг, <i>Reoviridae</i> Bluetongue, <i>Reoviridae</i>	3 / 6,06 ± 0,18	6 / 4,06 ± 0,14	6,0–6,5 (Vero)
2	ЭГБО, <i>Reoviridae</i> EHD, <i>Reoviridae</i>	2 / 5,69 ± 0,22	3 / 4,56 ± 0,07	3 / 6,0–6,5 (CV-1)
3	АЧЛ, <i>Reoviridae</i> AHS, <i>Reoviridae</i>	3 / 5,75 ± 0,18	1 / 7,25 ± 0,17	3 / 5,5–6,0 (CV-1)

**Примечание.** АЧЛ – африканская чума лошадей, ЭГБО – эпизоотическая геморрагическая болезнь оленей, ЦПД – цитопатическое действие.

**Note.** AHS – African horse sickness, EHD – epizootic hemorrhagic disease of deer, TCID – tissue culture infectious dose.

шей вида нетопырь-карлик без предварительной адаптации вирусов к клеткам. ИА вируса АЧЛ в фибробластоподных клетках значительно превышала активность как в культуре клеток лёгкого эпителио-подобного типа, так и в перевиваемой линии клеток CV-1, к которой данный штамм вируса был адаптирован ранее. Данные по перmissивности клеток из тканей представителей отряда рукокрылых к орбивирусам позволяют рассматривать вид *Pipistrellus pipistrellus* как возможный природный резервуар этих патогенов и его непосредственное участие в эпидемическом процессе.

### Выводы

1. Впервые получены и паспортизированы штаммы диплоидных клеток из тканей лёгкого нетопыря-карлика *P. pipistrellus lung f.* и *P. pipistrellus lung ep.* Созданы криобанки клеточных штаммов на разных пассажных уровнях для вирусологических исследований.

2. Установлена перmissивность полученных штаммов диплоидных клеток лёгкого нетопыря-карлика к вирусам блютанга, ЭГБО и АЧЛ, что позволяет рекомендовать данные клеточные системы для первичной изоляции вирусных патогенов.

3. Репродукция вирусов рода *Orbivirus* возбудителей трансмиссивных болезней сельскохозяйственных животных в культурах клеток лёгкого нетопыря-карлика *Pipistrellus pipistrellus* указывает на возможность участия представителей данного вида в эпидемическом процессе в качестве переносчика возбудителя или промежуточного хозяина при формировании природных резервуаров инфекции.

### ЛИТЕРАТУРА

- Narladkar B.W. Projected economic losses due to vector and vector-borne parasitic diseases in livestock of India and its significance in implementing the concept of integrated practices for vector management. *Vet. World*. 2018; 11(2): 151–60. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.151-160>
- ВОЗ. Трансмиссивные болезни: Информационный бюллетень; 2020. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- Еремян А.А., Львов Д.К., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Гительман А.К. и др. Генетическое разнообразие

вирусов вида *Chenuda virus* (*Orbivirus*, *Reoviridae*), циркулирующих в Средней Азии. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(2): 81–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-81-86>

- Maclachlan N.J., Guthrie A.J. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet. Res.* 2010; 41(6): 35. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010007>
- Львов Д.К., Алексеев К.П., Алимбарова Л.М., Алипер Т.И., Альховский С.В., Андропова В.Л. и др. *Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Руководство по вирусологии*. М.; МИА; 2013.
- Attoui H., Mohd Jaafar F. Zoonotic and emerging orbivirus infections. *Rev. Sci. Tech.* 2015; 34(2): 353–61. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2362>
- Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
- Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*. 2005; 438(7068): 575–6. <https://doi.org/10.1038/438575a>
- Lau S.K., Woo P.C., Li K.S., Huang Y., Tsoi H.W., Wong B.H., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(39): 14040–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506735102>
- Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013; 7477(503): 535–8. <https://doi.org/10.1038/nature12711>
- Aréchiga Ceballos N., Vázquez Morón S., Berciano J.M., Nicolás O., Aznar López C., Juste J., et al. Novel lyssavirus in bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(5): 793–5. <https://doi.org/10.3201/eid1905>
- Jánoska M., Vidovszky M., Molnár V., Liptovszky M., Harrach B., Benko M. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *Vet. J.* 2011; 189(1): 118–21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.020>
- Aurine N., Baquerre C., Gaudino M., Jean C., Dumont C., Rival-Gervier S., et al. Reprogrammed Pteropus bat stem cells as a model to study host-pathogen interaction during Henipavirus infection. *Microorganisms*. 2021; 9(12): 2567. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122567>
- Waruhiu C., Ommeh S., Obanda V., Agwanda B., Gakuya F., Ge X.Y., et al. Molecular detection of viruses in Kenyan bats and discovery of novel astroviruses, caliciviruses and rotaviruses. *Virol. Sin.* 2017; 32(2): 101–14. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3930-2>
- Kohl C., Lesnik R., Brinkmann A., Ebinger A., Radonić A., Nitsche A., et al. Isolation and characterization of three mammalian orthoreoviruses from European bats. *PLoS One*. 2012; 7(8): e43106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043106>
- Chua K.B., Crameri G., Hyatt A., Yu M., Tompang M.R., Rosli J., et al. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104(27): 11424–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701372104>

17. Макаров В.В., Лозовой Д.А. *Новые особо опасные инфекции, ассоциированные с рукокрыльями*. Владимир: 2016.

18. Gonsalves L., Bicknell B., Law B., Webb C., Monamy V. Mosquito consumption by insectivorous bats: does size matter? *PLoS One*. 2013; 8(10): e77183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077183>

19. La Motte L.C. Jr. Japanese B encephalitis in bats during simulated hibernation. *Am. J. Hyg.* 1958; 67(1): 101–8. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119912>

20. Melaun C., Werblow A., Busch M.W., Liston A., Klimpel S. Bats as potential reservoir hosts for vector-borne diseases. In: Klimpel S., Mehlhorn H. *Bats (Chiroptera) as Vectors of Diseases and Parasites. Parasitology Research Monographs, Volume 5*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39333-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39333-4_3)

21. Schuh A.J., Amman B.R., Jones M.E., Sealy T.K., Uebelhoer L.S., Spengler J.R., et al. Modelling filovirus maintenance in nature by experimental transmission of Marburg virus between Egyptian rousette bats. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14446. <https://doi.org/10.1038/ncomms14446>

22. Smith I., Wang L.F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2013; 3(1): 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.006>

23. Gloza-Rausch F., Ipsen A., Seebens A., Götsche M., Panning M., Drexler J.F., et al. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(4): 626–31. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071439>

24. Geldenhuys M., Coertse J., Mortlock M., Markotter W. *In Vitro Isolation of Bat Viruses Using Commercial and Bat-Derived Cell Lines*. Caister Academic Press; 2020: 149–80. <https://doi.org/10.21775/9781912530144.10>

25. Banerjee A., Misra V., Schountz T., Baker M.L. Tools to study pathogen-host interactions in bats. *Virus Res.* 2018; 248: 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.02.013>

26. Cramer G., Todd S., Grimley S., McEachern J.A., Marsh G.A., Smith C., et al. Establishment, immortalisation and characterisation of pteropid bat cell lines. *PLoS One*. 2009; 4(12): e8266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008266>

27. Hoffmann M., Müller M.A., Drexler J.F., Glende J., Erdt M., Gützkow T., et al. Differential sensitivity of bat cells to infection by enveloped RNA viruses: coronaviruses, paramyxoviruses, filoviruses, and influenza viruses. *PLoS One*. 2013; 8(8): e72942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072942>

28. Поголяева О.С., Юрков С.Г., Лаптева О.Г., Колбасова О.Л., Чадаева А.А., Кольцов А.Ю. и др. Биологическая характеристика и перmissивность к вирусам штамма диплоидных клеток почки летучей мыши нетопыря Натузиуса (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; (Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 29–39. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-12>

29. OIE; World Animal Health Information System. Disease situation. Available at: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>

30. Юрков С.Г., Зуев В.В., Сидоров С.И., Кушнir С.Д., Смыслова Н.Ю., Неверовская Н.С. и др. *Каталог коллекции клеточных культур ВНИИВВиМ*. Покров; 2010.

31. Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 1956; 31(6): 247–51. <https://doi.org/10.3109/10520295609113814>

32. Rothfels K.H., Siminovitch L. Air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Stain Technol.* 1958; 33(2): 73–7. <https://doi.org/10.3109/10520295809111827>

33. Baker K.S., Todd S., Marsh G., Fernandez-Loras A., Suu-Ire R., Wood J.L.N., et al. Co-circulation of diverse paramyxoviruses in an urban African fruit bat population. *J. Gen. Virol.* 2012; 93(Pt. 4): 850–6. <https://doi.org/10.1099/vir.0.039339-0>

34. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32010L0063>

35. Fagre A.C., Lee J.S., Kityo R.M., Bergren N.A., Mossel E.C., Nakayiki T., et al. Discovery and characterization of Bukakata orbivirus (Reoviridae: Orbivirus), a novel virus from a Ugandan bat. *Viruses*. 2019; 11(3): 209. <https://doi.org/10.3390/v11030209>

## REFERENCES

- Narladkar B.W. Projected economic losses due to vector and vector-borne parasitic diseases in livestock of India and its significance in implementing the concept of integrated practices for vector management. *Vet. World*. 2018; 11(2): 151–60. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.151-160>
- WHO. Vector-borne diseases: Fact Sheet; 2020. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- Eremyan A.A., L'vov D.K., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., Aristova V.A., Gitel'man A.K., et al. Genetic diversity of viruses of Chenuda virus species (orbivirus, reoviridae) circulating in Central Asia. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(2): 81–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-81-86> (in Russian)
- Maclachlan N.J., Guthrie A.J. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet. Res.* 2010; 41(6): 35. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010007>
- L'vov D.K., Alekseev K.P., Alimbarova L.M., Aliper T.I., Al'khovskiy S.V., Andronova V.L., et al. *Viruses and Viral Infections of Humans and Animals: A Guide to Virology [Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh. Rukovodstvo po virusologii]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
- Attoui H., Mohd Jaafar F. Zoonotic and emerging orbivirus infections. *Rev. Sci. Tech.* 2015; 34(2): 353–61. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2362>
- Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
- Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*. 2005; 438(7068): 575–6. <https://doi.org/10.1038/438575a>
- Lau S.K., Woo P.C., Li K.S., Huang Y., Tsoi H.W., Wong B.H., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(39): 14040–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506735102>
- Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013; 7477(503): 535–8. <https://doi.org/10.1038/nature12711>
- Aréchiga Ceballos N., Vázquez Morón S., Berciano J.M., Nicolás O., Aznar López C., Juste J., et al. Novel lyssavirus in bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(5): 793–5. <https://doi.org/10.3201/eid1905>
- Jánoska M., Vidovszky M., Molnár V., Liptovszky M., Harrach B., Benko M. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *Vet. J.* 2011; 189(1): 118–21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.020>
- Aurine N., Baquerre C., Gaudino M., Jean C., Dumont C., Rival-Gervier S., et al. Reprogrammed Pteropus bat stem cells as a model to study host-pathogen interaction during Henipavirus infection. *Microorganisms*. 2021; 9(12): 2567. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122567>
- Waruhiu C., Ommeh S., Obanda V., Agwanda B., Gakuya F., Ge X.Y., et al. Molecular detection of viruses in Kenyan bats and discovery of novel astroviruses, caliciviruses and rotaviruses. *Viral Sin.* 2017; 32(2): 101–14. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3930-2>
- Kohl C., Lesnik R., Brinkmann A., Ebinger A., Radonić A., Nitsche A., et al. Isolation and characterization of three mammalian orthoreoviruses from European bats. *PLoS One*. 2012; 7(8): e43106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043106>
- Chua K.B., Cramer G., Hyatt A., Yu M., Tompang M.R., Rosli J., et al. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104(27): 11424–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701372104>
- Makarov V.V., Lozovoy D.A. *New Particularly Dangerous Infections Associated with Bats [Novye osobo opasnye infektsii, assotsirovannye s rukokrylymi]*. Vladimir; 2016. (in Russian)
- Gonsalves L., Bicknell B., Law B., Webb C., Monamy V. Mosquito consumption by insectivorous bats: does size matter? *PLoS One*. 2013; 8(10): e77183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077183>
- La Motte L.C. Jr. Japanese B encephalitis in bats during simulated hibernation. *Am. J. Hyg.* 1958; 67(1): 101–8. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119912>

20. Melaun C., Werblow A., Busch M.W., Liston A., Klimpel S. Bats as potential reservoir hosts for vector-borne diseases. In: Klimpel S., Mehlhorn H. *Bats (Chiroptera) as Vectors of Diseases and Parasites. Parasitology Research Monographs, Volume 5*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39333-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39333-4_3)
21. Schuh A.J., Amman B.R., Jones M.E., Sealy T.K., Uebelhoer L.S., Spengler J.R., et al. Modelling filovirus maintenance in nature by experimental transmission of Marburg virus between Egyptian rousette bats. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14446. <https://doi.org/10.1038/ncomms14446>
22. Smith I., Wang L.F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2013; 3(1): 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.006>
23. Gloza-Rausch F., Ipsen A., Seebens A., Göttsche M., Panning M., Drexler J.F., et al. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(4): 626–31. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071439>
24. Geldenhuys M., Coertse J., Mortlock M., Markotter W. *In Vitro Isolation of Bat Viruses Using Commercial and Bat-Derived Cell Lines*. Caister Academic Press; 2020: 149–80. <https://doi.org/10.21775/9781912530144.10>
25. Banerjee A., Misra V., Schountz T., Baker M.L. Tools to study pathogen-host interactions in bats. *Virus Res.* 2018; 248: 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.02.013>
26. Crameri G., Todd S., Grimley S., McEachern J.A., Marsh G.A., Smith C., et al. Establishment, immortalisation and characterisation of pteropid bat cell lines. *PLoS One.* 2009; 4(12): e8266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008266>
27. Hoffmann M., Müller M.A., Drexler J.F., Glende J., Erdt M., Gützkow T., et al. Differential sensitivity of bat cells to infection by enveloped RNA viruses: coronaviruses, paramyxoviruses, filoviruses, and influenza viruses. *PLoS One.* 2013; 8(8): e72942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072942>
28. Povolyaeva O.S., Yurkov S.G., Lapteva O.G., Kolbasova O.L., Chadaeva A.A., Kol'tsov A.Yu., et al. Biological characteristics and permissiveness to viruses of diploid kidney cells strain from the bat *Nathusius' pipistrelle* (*Pipistrellus Nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; (Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae). *Voprosy virologii.* 2021; 66(1): 29–39. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-12> (in Russian)
29. OIE; World Animal Health Information System. Disease situation. Available at: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>
30. Yurkov S.G., Zuev V.V., Sidorov S.I., Kushnir S.D., Smyslova N.Yu., Neverovskaya N.S., et al. *Catalog of the All-Russian Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology Cell Culture Collection [Katalog kolektsii kletochnykh kul'tur VNIIVViM]*. Pokrov; 2010. (in Russian)
31. Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 1956; 31(6): 247–51. <https://doi.org/10.3109/10520295609113814>
32. Rothfels K.H., Siminovitch L. Air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Stain Technol.* 1958; 33(2): 73–7. <https://doi.org/10.3109/10520295809111827>
33. Baker K.S., Todd S., Marsh G., Fernandez-Loras A., Suu-Ire R., Wood J.L.N., et al. Co-circulation of diverse paramyxoviruses in an urban African fruit bat population. *J. Gen. Virol.* 2012; 93(Pt. 4): 850–6. <https://doi.org/10.1099/vir.0.039339-0>
34. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32010L0063>
35. Fagre A.C., Lee J.S., Kityo R.M., Bergren N.A., Mossel E.C., Nakayiki T., et al. Discovery and characterization of Bukakata orbivirus (Reoviridae: Orbivirus), a novel virus from a Ugandan bat. *Viruses.* 2019; 11(3): 209. <https://doi.org/10.3390/v11030209>