
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Биологическая характеристика и перmissивность к вирусам штамма диплоидных клеток почки летучей мыши нетопыря Натусиуса (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; *Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae*)

Поволяева О.С., Юрков С.Г., Лаптева О.Г., Колбасова О.Л., Чадаева А.А., Кольцов А.Ю., Синдрякова И.П., Власов М.Е., Живодёров С.П., Луницин А.В.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» Минобрнауки России, 601125, Владимирская область, пос. Вольгинский, Россия

Введение. Летучие мыши (*Microchiroptera*) являются эпидемиологически важным естественным резервуаром вирусов различных таксономических групп, включая возбудителей особо опасных болезней человека и животных. Учитывая актуальность арбовирусных инфекций, представляется целесообразным проведение исследований по изучению спектра чувствительности клеток из тканей летучих мышей, обитающих и мигрирующих на территории Российской Федерации, к вирусам векторных инфекций сельскохозяйственных животных.

Цель исследования – получение диплоидного штамма клеток почечной ткани летучей мыши (ПЛМ) вида нетопырь лесной, или нетопырь Натусиуса (*Pipistrellus nathusii*), изучение его биологических характеристик, а также оценка перmissивности полученной клеточной культуры к вирусам блятанга, лихорадки долины Рифт (ЛДР), заразного узелкового дерматита (ЗУД) крупного рогатого скота (КРС), миксомы кроликов (*Mucomatosis cuniculi*), фибромы Шоупа, африканской чумы лошадей (АЧЛ) и африканской чумы свиней (АЧС).

Материал и методы. Донорами органов служили 2 особи клинически здоровых самцов летучей мыши *P. nathusii*. Для получения диплоидного штамма культуры клеток почки *этого вида* и изучения свойств полученной клеточной культуры градации от 6-го и выше пассажных уровней использовали традиционные цитологические, вирусологические и молекулярные методы. Определяли перmissивность данного штамма к вирусам блятанга, ЛДР, ЗУД, миксомы кроликов, фибромы Шоупа, АЧЛ и АЧС.

Результаты. Формирование конфлюэнтного монослоя наблюдали через 72 ч, при этом индекс пролиферации (ИП) был равен 2,7–3,3. Клеточный монослой сохранялся без смены среды в течение 45 сут (срок наблюдения). Показана стабильность кариотипа в условиях непрерывного субкультивирования на уровне 36-го пассажа. Культура клеток получила наименование «Штамм диплоидных клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* (Diploid cell line *Pipistrellus nathusii* kidney)»; установлена её перmissивность к вирусам блятанга, ЛДР, ЗУД и миксомы кроликов.

Обсуждение. Чувствительность полученного клеточного материала к вирусам блятанга и ЛДР согласуется с данными об идентификации реовируса и возбудителя ЛДР у египетских фруктовых летучих мышей (*Rousettus aegyptiacus*), а перmissивность данного штамма к возбудителям ЗУД и миксомы кроликов – с результатами обнаружения поксвирусов у вида поздний кожан (*Eptesicus fuscus*).

Выводы. Получен и паспортизирован штамм диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii*. Установленная перmissивность к вирусам блятанга, ЛДР, ЗУД и миксомы кроликов позволяет использовать его для выделения и изучения этих патологических агентов. Репродукция возбудителей в клетках данного штамма из тканей ПЛМ вида *P. nathusii*, обитающего и мигрирующего на территории европейской части Российской Федерации, указывает на его потенциальную роль в эпидемиологии значимых инфекций, особенно трансмиссивных.

Ключевые слова: летучие мыши; штамм диплоидных клеток; вирус; особо опасные инфекционные болезни

Для цитирования: Поволяева О.С., Юрков С.Г., Лаптева О.Г., Колбасова О.Л., Чадаева А.А., Кольцов А.Ю., Синдрякова И.П., Власов М.Е., Живодёров С.П., Луницин А.В. Биологическая характеристика и перmissивность к вирусам штамма диплоидных клеток почки летучей мыши нетопыря Натусиуса (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; *Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 29-39. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-12>

Для корреспонденции: Юрков Сергей Григорьевич, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» Минобрнауки, 601125, Россия, Москва. E-mail: patronn13@rambler.ru

Участие авторов: Поволяева О.С. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Юрков С.Г. – концепция и дизайн исследования, написание текста; Лаптева О.Г. – сбор и обработка материала; Колбасова О.Л. – сбор и обработка материала; Чадаева А.А. – сбор и обработка материала; Кольцов А.Ю. – сбор и обработка материала; Синдрякова И.П. – сбор и обработка материала; Власов М.Е. – сбор и обработка материала; Живодёров С.П. – сбор и обработка материала; Луницин А.В. – сбор и обработка материала.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.09.2020

Принята в печать 12.11.2020

Biological characteristics and permissiveness to viruses of diploid kidney cells strain from the bat *Nathusius' pipistrelle* (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; *Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae*)

Ol'ga S. Povolyaeva, Sergey G. Yurkov, Oksana G. Lapteva, Ol'ga L. Kolbasova, Anna A. Chadaeva, Andrey Yu. Kol'tsov, Irina P. Sindryakova, Mikhail E. Vlasov, Sergey P. Zhivoderov, Andrey V. Lunitsin

FSBRI «Federal Research Center for Virology and Microbiology» of the Ministry of Science and Higher Education of Russia, 601125, Vladimir region, Vol'ginsky vill., Russia

Introduction. Bats are an epidemiologically important natural reservoir of viruses of various taxonomic groups, including causative agents of especially dangerous infections of humans and animals. Considering the relevance of arbovirus infections, it seems advisable to study the spectrum of the sensitivity of cells derived from bats inhabiting and migrating on the territory of the Russian Federation to causative agents of vector-borne diseases of animals. The study aimed to obtain a diploid strain of cells from renal tissue of bats *Pipistrellus nathusii* and to investigate its biological characteristics, as well as to assess its permissiveness for bluetongue (BTV); Rift Valley fever (RVFV); lumpy skin disease (LSDV); rabbit myxoma (Myxomatosis cuniculi); rabbit, or Shope fibroma (RFV); African horse sickness (AHSV) and African swine fever (ASFV) viruses.

Material and methods. There were 2 clinically healthy male individuals of *P. nathusii* who taken as donors of organs. To obtain diploid kidney cell culture strain and to study its properties, the level of the 6th passage was investigated by conventional cytological, virological, and molecular methods. The permissiveness of the obtained cell culture for BTV, RVFV, LSDV, Myxomatosis cuniculi, RFV, AHSV and ASFV was determined.

Results. The formation of a confluent monolayer was observed after 72 hours, while the proliferation index was 2.7–3.3. The cell monolayer had been maintained without changing the medium for 45 days (observation period). The stability of the karyotype had been demonstrated in continuous subculturing at the 36th passage. The cell culture named «Diploid cell line *Pipistrellus nathusii* kidney», and its permissiveness to BTV, RVFV, LSDV and Myxomatosis cuniculi had been demonstrated.

Discussion. The sensitivity of the strain to BTV and RVFV is consistent with the data on the identification of reovirus and RVFV in Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*), and its permissiveness for LSDV and rabbits myxoma virus is consistent with the results of detection of poxviruses in big brown bat (*Eptesicus fuscus*).

Conclusion. A diploid kidney cell strain derived from *P. nathusii* was obtained and certified. Its permissiveness to BTV, RVFV, LSDV and rabbits myxoma viruses makes it possible to use this strain for isolation and studies of these viruses. Reproduction of the viruses in diploid kidney cells strain derived from *P. nathusii* living and migrating in the European part of the Russian Federation indicates their potential role in the epidemiology of significant infections, especially transmissible ones.

Key words: bat; diploid cell strain; virus; highly dangerous infectious diseases

For citation: Povolyaeva O.S., Yurkov S.G., Lapteva O.G., Kolbasova O.L., Chadaeva A.A., Kol'tsov A.Yu., Sindryakova I.P., Vlasov M.E., Zhivoderov S.P., Lunitsin A.V. Biological characteristics and permissiveness to viruses of diploid kidney cells strain from the bat *Nathusius' pipistrelle* (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; *Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1): 29-39 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-12>

For correspondence: Sergey G. Yurkov, Ph.D., D.Sci. (Biol.), Prof., Chief Researcher, FSBRI «Federal Research Center for Virology and Microbiology» of the Ministry of Science and Higher Education of Russia. E-mail: patronn13@rambler.ru

Information about the authors:

Povolyaeva O.S., <http://orcid.org/0000-0002-5635-6677>

Yurkov S.G., <http://orcid.org/0000-0002-6801-9424>

Lapteva O.G., <http://orcid.org/0000-0002-4435-8368>

Kolbasova O.L., <http://orcid.org/0000-0001-5153-0982>

Chadaeva A.A., <http://orcid.org/0000-0002-9615-9758>

Kol'tsov A.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-3294-6602>

Sindryakova I.P., <http://orcid.org/0000-0002-5947-9402>

Vlasov M.E., <http://orcid.org/0000-0002-8324-3256>

Zhivoderov S.P., <http://orcid.org/0000-0002-4919-3080>

Lunitsin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-5043-446X>

Contribution: Povolayaeva O.S. – research conception and design of the study, collecting and processing of the results, statistical processing of the results, writing of the text; Yurkov S.G. – research conception and design of the study; Lapteva O.G. – collecting and processing of the results; Kolbasova O.L. – collecting and processing of the results; Chadaeva A.A. – collecting and processing of the results; Koltsov A.Yu. – collecting and processing of the results; Sindryakova I.P. – collecting and processing of the results; Vlasov M.E. – collecting and processing of the results; Zhivoderov S.P. – collecting and processing of the results, Lunitsin A.V. – collecting and processing of the results.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 18 September 2020

Accepted 12 November 2020

Введение

Возникновение и распространение новых вирусных заболеваний человека и животных интенсифицировало исследования в области поиска источников, переносчиков и резервуаров вирусов, а также эволюции и изменчивости этих патологических агентов, установления механизмов преодоления ими видовых барьеров. Рукокрылые (*Chiroptera*), насчитывающие свыше 1200 видов, являются вторым по величине отрядом млекопитающих [1], что наряду с высокой популяционной плотностью, широчайшим ареалом распространения, миграционной подвижностью и особенностями организации иммунной системы [2] позволяет рассматривать их как один из важнейших естественных резервуаров и источников распространения вирусных агентов [3–5]. Изоляция от летучих мышей (*Microchiroptera*) более 200 видов вирусов различных таксономических групп [6] подтвердила значение этих представителей рукокрылых как важнейшего звена эпидемического процесса при ряде особо опасных инфекционных болезней [7].

Установлено, что летучие мыши в большинстве биогеографических регионов, включая Западную Палеарктику, выступают естественным резервуаром для вирусов многих значимых семейств, таких как *Rhabdoviridae* [8, 9], *Coronaviridae* [10], *Herpesviridae*, *Adenoviridae* [11], *Filoviridae* [12], *Reoviridae* [13], *Paramyxoviridae* [14–16], *Astroviridae* и др. [17]. В то же время роль этих животных в эпидемиологии вирусных инфекций для Российской Федерации изучена недостаточно.

Следует отметить, что в подавляющем большинстве работ по идентификации вирусов летучих мышей основным инструментом исследований стали молекулярно-генетические методы, однако сам факт идентификации, в свою очередь, указывает также на высокий уровень перmissивности клеток тканей данных представителей млекопитающих к вирусам различных таксономических групп.

Основной лабораторной моделью первичной изоляции вирусных патогенов являются культуры клеток. Тем не менее в случаях, когда в качестве источника инфекции рассматриваются летучие мыши, использование традиционных систем культивирования на клеточных культурах видов, не являющихся резервуарами, как правило, является малопродуктивным. По данным ряда исследователей, попытки выделить инфекционные агенты, переносимые летучими мышами, в различных линиях клеток мле-

копитающих в большинстве случаев не увенчались успехом [18].

Исследования по оценке чувствительности клеточного материала из тканей летучих мышей к патогенам немногочисленны и выполнены только для ряда видов, в основном связанных с возбудителями вирусных болезней человека [12]. Одной из первых клеточных культур, полученных из тканей летучих мышей, была культура клеток лёгкого вида *Tadarida brasiliensis* Tb 1 Lu (ATCC CCL-88), которая оказалась чувствительной к ретровирусу лейкоза КРС [19], вирусу энцефаломиокардита мышей, вирусу Эбола [20], возбудителям гриппа человека и птиц [21].

В связи со вспышками новых особо опасных болезней, ассоциированных с летучими мышами в качестве резервуаров возбудителей (Эбола, Хендра, Нипах, SARS, MERS, SARS-CoV-2), значительно расширились исследования по получению культур клеток из тканей различных видов представителей рукокрылых как для непосредственно вирусологических целей [22–25], так и для изучения иммунологических аспектов устойчивости этих млекопитающих к вирусным инфекциям и механизмов взаимодействия вирус–клетка [26, 27].

Кроме того, данные по чувствительности *in vitro* клеточных культур из тканей и органов летучих мышей могут быть экстраполированы на процессы оценки восприимчивости их хозяев к патогенам, исследование возможности вирусносительства и участия данных животных в формировании природных инфекционных очагов [28]. Поэтому целью этой работы явились получение диплоидного штамма клеток почки летучей мыши (ПЛМ) – представителя семейства *Vespertilionidae*, вида *Pipistrellus nathusii* как многочисленного, широко распространённого в европейской части России, склонного к антропоургической среде обитания, не находящегося в зоне риска и в то же время совершающего миграции, а также изучение перmissивности полученной культуры к ряду вирусов – возбудителей инфекционных заболеваний животных.

Материал и методы

Животные. В экспериментах использованы летучие мыши вида нетопырь лесной, или нетопырь Натузиуса (*Pipistrellus nathusii*), отловленные при помощи туман-сети в Волгоградской области. В качестве доноров почек были отобраны 2 клинически здоровых самца с массой тела 10 и 12 г.

Культура клеток. Исследования выполняли с полученным нами диплоидным штаммом культуры клеток почки нетопыря лесного (Diploid cell line *Pipistrellus nathusii* kidney) градации 6-го и последующих пассажных уровней.

Вирусы. Определялась перmissивность клеточной культуры к следующим вирусным агентам:

- Вирус блютанга (семейство *Reoviridae*) 1-го серотипа 6-го пассажа в перевиваемой линии клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus sabaeus*) Vero с инфекционной активностью (ИА) 6,25 lg ТЦД₅₀/мл (ТЦД – титр цитопатического действия, ЦПД).

- Вирус лихорадки долины Рифт (ЛДР, семейство *Phenuiviridae*), штамм «1974-ВНИИВВиМ» на уровне 10-го пассажа в перевиваемой линии клеток почки сайги (*Saiga tatarica*) (ПС) с ИА 5,5 lg ТЦД₅₀/мл.

- Вирус заразного узелкового дерматита (ЗУД) крупного рогатого скота (КРС) (семейство *Poxviridae*) – полевой изолят, выделенный в очаге инфекции в Самарской области на уровне 5-го пассажа в первичной культуре клеток тестикул козлёнка (*Capra hircus*) (ТК), ИА 6,0 lg ТЦД₅₀/мл.

- Вирус африканской чумы лошадей (АЧЛ, семейство *Reoviridae*) 1-го серотипа на уровне 5-го пассажа в перевиваемой линии клеток почки африканской зелёной мартышки (CV-1) с ИА 5,75 lg ТЦД₅₀/мл.

- Вирус африканской чумы свиней (АЧС, семейство *Asfarviridae*), штамм «Волгоград» на уровне 4-го пассажа в культуре клеток костного мозга свиньи (*Sus scrofa domesticus*) с ИА 7,25 lg ГАЕ₅₀/мл (ГАЕ – гемагглютинирующая единица).

- Вирус фибромы Шоупа (семейство *Poxviridae*), патогенный для кроликов (*Oryctolagus*), выделен из патологического материала с ИА на кроликах на уровне 5-го пассажа 4,11 lg ИД₅₀/мл (ИД – инфицирующая доза).

- Вирус миксомы кроликов (семейство *Poxviridae*), штамм В-82 на уровне 3-го пассажа в перевиваемой линии клеток почки кролика РК-13/2-03, ИА – 6,5 lg ТЦД₅₀/мл.

Используемые штаммы вирусов получали из Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» («ФИЦВиМ») (реестровый номер центра коллективного пользования (ЦКП) – 441429, <http://ckp-rf.ru/ckp/441429/>).

Питательные среды и растворы. Для культивирования клеток в качестве ростовой среды применяли питательные среды Игла MEM и DMEM («HyClone», США) с добавлением 10% фетальной сыворотки крови КРС (FBS) («HyClone») и антибиотиков (ципрофлоксацин и амфотерицин в конечной концентрации 10 и 5 мкг/мл соответственно).

Первичную клеточную культуру почки получали методом стандартной трипсинизации с использованием 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора Версена. Субкультуры клеток ПЛМ поддерживали общепринятой методикой последовательных пересевов

при температуре $37 \pm 0,5$ °С в атмосфере с повышенным до 5% содержанием углекислого газа и относительной влажности 95%.

Криоконсервирование клеток проводили в ростовой среде с добавлением криопротектора – 10% DMSO (Dimethyl Sulfoxide for cell culture), «Sigma», США) с эквilibрацией при 4 °С в течение 60 мин и последующим быстрым замораживанием при –70 °С; через 14 сут клетки подвергали глубокому замораживанию в жидком азоте (–196 °С).

Для кариологического исследования клеточную культуру на стадии активного роста инкубировали в среде с колхицином (0,05 мкг/мл среды) в течение 2 ч. Клетки диспергировали смесью 0,02% раствора Версена и 0,25% раствора трипсина в соотношении 7 : 1, подогретой до $37,0 \pm 1,0$ °С. Проводили гипотоническую обработку клеток в суспензии (1 часть FBS и 4 части дистиллированной воды) и выдерживали в термостате 25–40 мин, фиксировали в смеси метанола с ледяной уксусной кислотой в соотношении 3 : 1, наносили на поверхность предметных стёкол и окрашивали 2% водным раствором красителя Романовского–Гимзы [29, 30].

Для определения перmissивности полученных клеток соответствующий вирусный материал инокулировали в культуральные флаконы (по 5 для каждого вируса) с конфлюэнтным клеточным монослоем, для чего из флаконов удаляли ростовую среду и вносили вирус в дозе 0,1–0,01 ТЦД₅₀/кл. Адсорбцию последнего проводили в течение 60 мин. Затем вносили поддерживающую среду, содержащую 2% FBS, и инфицированные культуры инкубировали при $37,0 \pm 0,5$ °С до наступления выраженного ЦПД вируса. Перmissивность клеток к возбудителям миксомы кроликов и фибромы Шоупа определяли при множественности заражения 0,5–0,7 и 0,001–0,002 ИД₅₀/кл соответственно (ИД – инфекционная доза). Адсорбцию и культивирование вируса осуществляли при $33,0 \pm 0,5$ °С.

Инфекционную активность устанавливали путём титрования в перmissивных для каждого патогена клеточных культурах, учитывали развитие ЦПД; титр вируса рассчитывали по методике Рида и Менча в модификации Ашмарина.

Идентификация вируса блютанга, полученного в культуре штамма диплоидных клеток ПЛМ вида *P. nathusii*, проведена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Идентификация полевого изолята вируса ЗУД КРС осуществлена путём ПЦР в реальном времени по методике Bowden T.R. и соавт. [31] с олигонуклеотидными праймерами CaPV-074F1 (5'-AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA-3'), CaPV-074R1 (5'-AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA-3') и гибридизационным зондом CaPV-074P1 (5'-6FAM-TGG CTC ATA GAT TTC CT-MGB-NFQ-3').

Результаты обрабатывали статистически с использованием программы Microsoft Excel 2010. Достоверность статистической разницы между средними величинами определяли по разностному методу Стьюдента–Фишера.



Рис. 1. Летучая мышь, самец, вид нетопырь Натузиуса (*Pipistrellus nathusii*).

Fig. 1. Bat male of *Nathusius' pipistrelle* (*Pipistrellus nathusii*).

Результаты

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с российским законодательством и рекомендациями этического комитета ФГБНУ «ФИЦВиМ» (Владимирская область, пос. Вольгинский).

Получение первичных культур клеток

Летучие мыши вида *P. nathusii* (**рис. 1**) были отловлены с использованием туман-сети в Волгоградской области и доставлены в лабораторию ФГБНУ «ФИЦВиМ».

Эвтаназию животных осуществляли путём внутрибрюшинного введения 0,5 мл 70% этилового спирта и цервикальной дислокацией шейных позвонков через 2 мин после остановки сердца [32]. При вскрытии отделяли почки, которые помещали в отдельные ёмкости, содержащие среду Игла MEM с добавлением антибиотиков (20 мкг/мл ципрофлоксацина и 5 мкг/мл амфотерицина В). После удаления почечных лоханок и мозгового вещества корковый слой почек механически измельчали на фрагменты размером около 2–3 мм³ и отмывали от крови 4 раза средой Игла MEM до получения прозрачных сливов. Затем материал переносили в коническую плоскодонную колбу объёмом 500 мл

и заливали смесью 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора Версена в соотношении 2 : 1 при температуре 37 °С. Ферментативную дезагрегацию осуществляли посредством перемешивания тканевой суспензии на магнитной мешалке в течение 15 мин. После интенсивного помутнения диспергирующего раствора колбу снимали с мешалки, давали отстояться в течение 2 мин и сливали клеточную суспензию во флакон объёмом 500 мл. Данную процедуру повторяли 3 раза до полного истощения ткани. К клеткам в диспергирующем растворе добавляли FBS для нейтрализации трипсина.

В дальнейшем полученную суспензию центрифугировали при 700 g в течение 10 мин, надосадочную жидкость декантировали, а осадок с клетками ресуспендировали в 25 мл ростовой среды. Клеточную суспензию фильтровали через марлевый фильтр для удаления не подвергшихся воздействию трипсина фрагментов почечной ткани, тщательно перемешивали и отбирали пробу суспензии для подсчёта клеточных элементов в камере Горяева. Жизнеспособность клеток по тесту витального окрашивания трипановым синим составила 78–81%. Клеточную суспензию доводили до посевной концентрации 400 тыс. кл/мл ростовой средой и разливали в пластиковые флаконы площадью 25 см² («Corning», США). После 24 ч культивирования клеточный монослой промывали средой с антибиотиками, удаляя не прикрепившиеся и мёртвые клетки, после чего проводили смену ростовой питательной среды. В дальнейшем среду меняли каждые 2–3 сут.

Последовательные пересевы клеточной культуры осуществляли с использованием одних и тех же серий питательной среды и сыворотки (DMEM 90% и FBS – 10%).

Первично-трипсинизированная культура была представлена разнородными в морфологическом отношении клеточными популяциями с преимущественным преобладанием эпителиоподобных клеток (**рис. 2**), образующих вначале островковый клеточный рост, и формированием конфлюэнтного монослоя на 5-е сут культивирования.

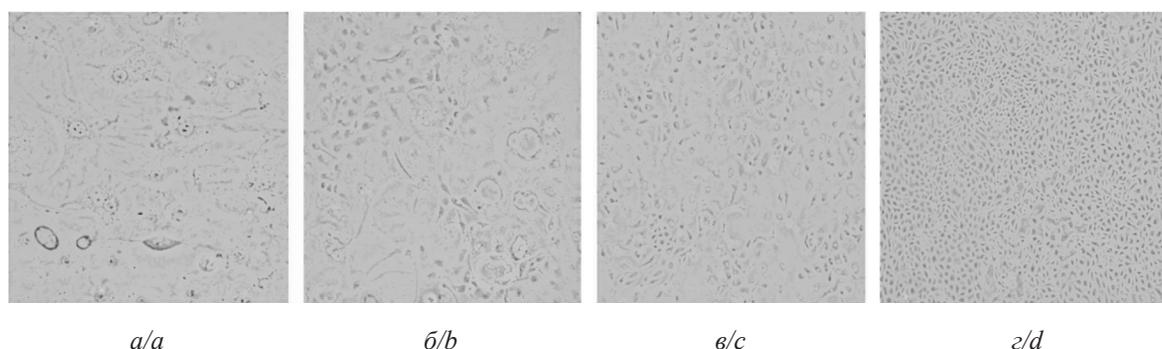


Рис. 2. Первично-трипсинизированная культура клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii*: *a* – через 24 ч культивирования, *б* – через 72 ч культивирования, *в* – спустя 24 ч после 1-го субпассажа, *г* – конфлюэнтный монослой 2-го пассажа (микрофотография, увеличение $\times 150$).

Fig. 2. Primary trypsinized cell culture of *Pipistrellus nathusii* kidney: *a* – after 24 hs of cultivation, *b* – after 72 hs of cultivation, *c* – in 24 hs after the 1st subpassage, *d* – confluent monolayer of the 2nd passage (microphotograph, magnification $\times 150$).

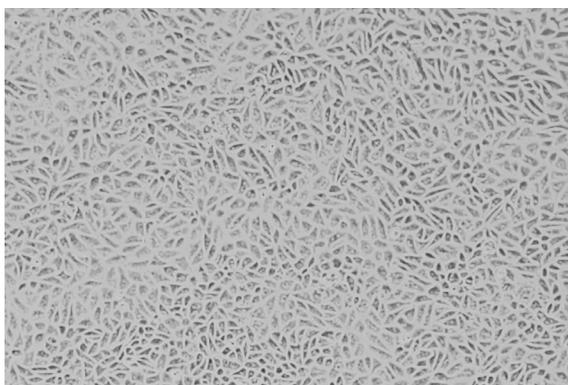


Рис. 3. Монослой культуры клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* на уровне 5-го пассажа (микрофотография, увеличение $\times 150$).

Fig. 3. Monolayer of the kidney cell culture of the bat *Pipistrellus nathusii* at the 5th passage level (microphotograph, magnification $\times 150$).

Дальнейшее культивирование клеток проводили с пересевом 2–3 раза в неделю. При посевной концентрации 120–150 тыс. кл/мл формирование конфлюэнтного монослоя наблюдали через 72 ч, при этом индекс пролиферации (ИП) составлял 2,7–3,3. Клеточный монослой без признаков дегенерации клеток и проявлений ЦПД сохранялся без смены среды на протяжении 45 сут (срок наблюдения).

При морфологическом изучении субкультур установлено, что монослой культуры ПЛМ представлен преимущественно эпителиоподобными полигональными клетками с ядром овальной или эллипсовидной, реже округлой формы с 1–3 (иногда больше) округлыми ядрышками, варьирующими по размеру. Ядерный матрикс равномерный. При пассировании клеточный монослой сохранял характерную типичную морфологию (рис. 3).

В результате последовательных пересевов в среде Игла DMEM с 10% FBS получены субкультуры, и на уровне 4-, 10-, 13-, 18-, 20-, 22-, 28- и 33-го пассажей созданы криобанки данной культуры в жидком азоте.

После размораживания на нулевом пассаже жизнеспособность клеток по тесту витального окрашивания трипановым синим составляла от 78 до 85%, клеточный монослой формировался на 2-е сут культивирования и был представлен типичными эпителиоподобными клетками.

Целями кариологического анализа культуры клеток почки нетопыря лесного (*P. nathusii*) стали как подтверждение видовой принадлежности, так и оценка стабильности хромосомного набора клеток в условиях длительного культивирования.

Как отмечено рядом исследователей, виды рода *Pipistrellus* обладают значительным внутривидовым кариологическим полиморфизмом и внутривидовой стабильностью [33]. Количество хромосом в их клетках варьирует от 26 до 44, а число плеч аутосом (NFa) – от 44 до 56 [34], поэтому хромосомные характеристики для представителей этого рода являются надёжным видовым признаком.

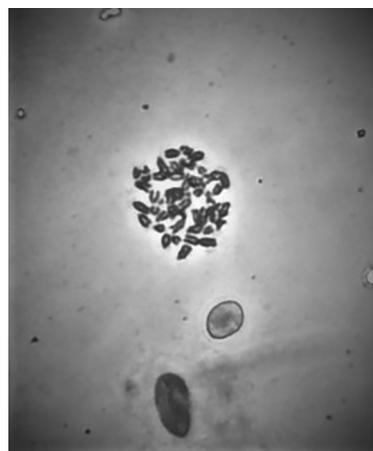


Рис. 4. Метафазная пластинка культуры клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* (микрофотография, увеличение $\times 900$).

Fig. 4. Metaphase plate of the kidney cell culture of the bat *Pipistrellus nathusii* (microphotograph, magnification $\times 900$).

Анализ 50 метафазных пластинок клеточной культуры, проведённый на 2-м и 3-м пассажных уровнях после криоконсервации и на уровне 36-го пассажа – в условиях непрерывного субкультивирования, показал, что модальный класс хромосом культуры клеток соответствует диплоидному набору ($2n = 44$) данного вида при NFa = 50. Полученные результаты согласуются с данными хромосомного анализа ряда других представителей рода *Pipistrellus*, таких как кожановидный нетопырь (*Pipistrellus savii koreensis*) и средиземноморский нетопырь, или нетопырь Куля (*P. Kuhli*) [35, 36].

Кариологические исследования культуры клеток ПЛМ на уровне 36-го пассажа в условиях непрерывного субкультивирования показали стабильность кариотипа, который сохранял как диплоидный набор хромосом, так и отсутствие хромосомных перестроек и образования маркерных хромосом (рис. 4).

По совокупности цитоморфологических, ростовых и кариологических показателей начиная с 6-го пассажа клеточная культура соответствовала характеристике диплоидного штамма и получила наименование «Штамм диплоидных клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* (Diploid cell line *Pipistrellus nathusii* kidney)».

При изучении чувствительности штамма диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii* к вирусу блютанга с множественностью заражения 0,1–0,01 ТЦД₅₀/кл на 2-е сут отмечено незначительное ЦПД в виде формирования тяжёлой из веретенообразных клеток. На 3-и сут наблюдали округление и отслоение инфицированных клеток от подложки с лизисом и деструкцией клеточного монослоя. В контрольной культуре подобных изменений не выявлено (рис. 5).

ИА вируса, полученного в исследуемой культуре, при титровании в 2-суточной культуре перевиваемой линии клеток почки африканской зелёной мартышки (Vero) составила 5,5 lg ТЦД₅₀/мл.

Для определения чувствительности к возбудителю ЛДР вирус с множественностью заражения 0,1–

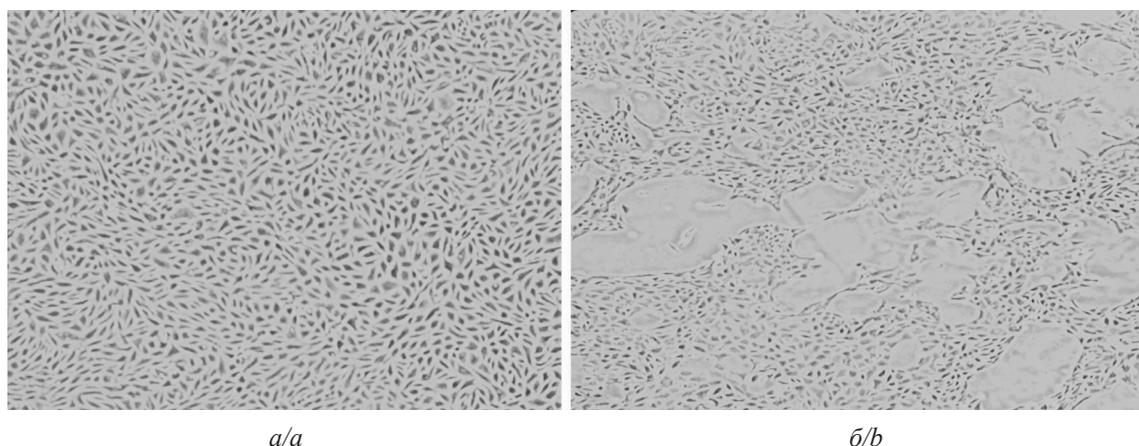


Рис. 5. Цитопатическое действие вируса блютанга в культуре штамма диплоидных клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii*, 12-й пассаж: *a* – контрольная клеточная культура, *б* – культура клеток на 3-и сут после заражения (микрофотография, увеличение $\times 150$).

Fig. 5. Cytopathic effect of BTV in the culture of the diploid kidney cell strain of the bat *Pipistrellus nathusii*, 12th passage: *a* – control cell culture, *b* – cell culture in 3 days after infection (microphotograph, magnification $\times 150$).

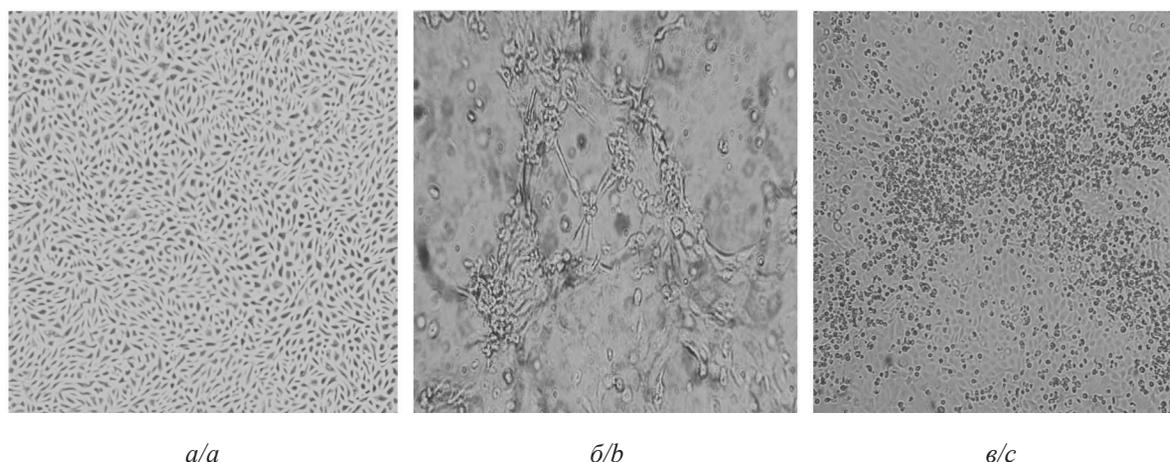


Рис. 6. Цитопатическое действие вируса ЛДР в культуре штамма диплоидных клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* 12-го пассажа: *a* – контрольная культура клеток, *б* – культура клеток на 3-и сут после заражения, *в* – культура клеток на 5-е сут после заражения (микрофотография, увеличение $\times 150$).

Fig. 6. Cytopathic effect of RVFV in the culture of the diploid kidney cell strain of the bat *Pipistrellus nathusii*, 12th passage: *a* – control cell culture, *b* – cell culture on day 3 after infection, *c* – cell culture on day 5 after infection (microphotograph, magnification $\times 150$).

0,01 ТЦД₅₀/кл инокулировали в культуральные флаконы с конфлюэнтным монослоем штамма диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii*. На 3-и сут инкубации отмечены начальные признаки развития ЦПД в виде появления тяжелой веретенообразных клеток. На 5-е сут имели место округление и отслоение инфицированных клеток от подложки на фоне лизиса и деструкции клеточного монослоя. В контрольной культуре подобных изменений также не зарегистрировано (**рис. 6**).

Значение ИА возбудителя ЛДР при титровании в 2-суточной культуре перевиваемой клеточной линии Vero было равным 5,25 lg ТЦД₅₀/мл.

Изучение перmissивности полученного штамма к вирусу ЗУД КРС проводили в отношении полевого изолята, выделенного с использованием первичной культуры клеток ТК. Как и в вышеописанных опытах, вирус ЗУД вызывал в исследуемой культуре раз-

витие ЦПД на 3-и сут, выражающегося в формировании тяжей из веретенообразных клеток. На 5-е сут наблюдали округление и отслоение инфицированных клеток от подложки, а также лизис и деструкцию клеточного монослоя. В контрольной культуре аналогичных изменений не отмечено (**рис. 7**).

Показатель ИА полевого изолята вируса ЗУД, полученного на 5-е сут культивирования в исследуемой культуре, составил 5,25 lg ТЦД₅₀/мл.

Исследование перmissивности клеточного материала ПЛМ *P. nathusii* к возбудителям АЧЛ и АЧС показало, что клетки культуры не поддерживали репродукцию этих вирусов. На протяжении 10 сут наблюдения клеточный монослой инфицированных культур морфологически не отличался от контрольных, а тест-культуры (CV-1 и лейкоциты свиньи соответственно) не показали нарастания ИА в материалах заражённых культур клеток.

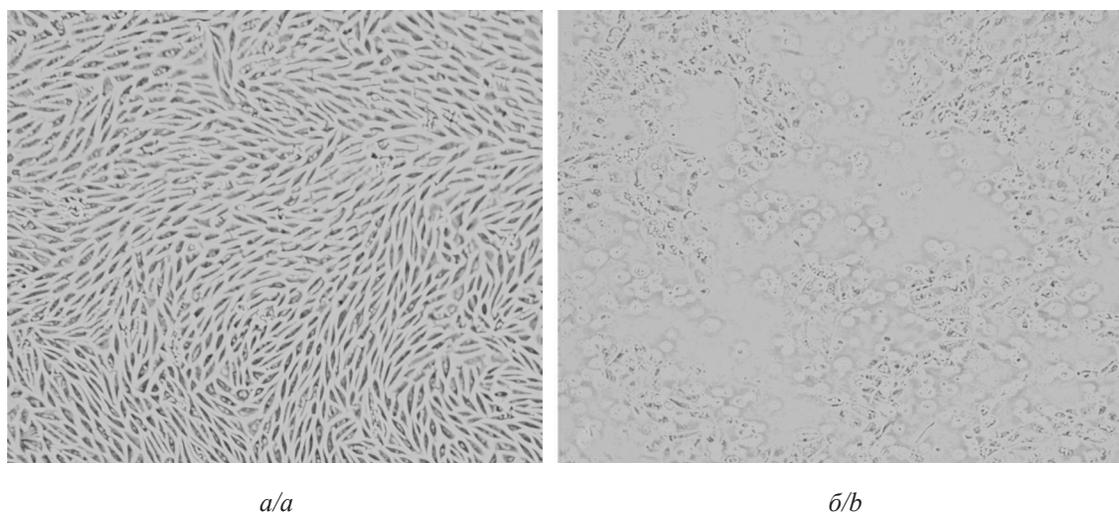


Рис. 7. Цитопатическое действие вируса ЗУД КРС в культуре штамма диплоидных клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* 10-го пассажа: *a* – контрольная клеточная культура, *б* – культура клеток на 3-и сут после заражения (микрофотография, увеличение $\times 150$).

Fig. 7. Cytopathic effect of LSDV in the culture of the diploid kidney cell strain of a bat *Pipistrellus nathusii*, 10th passage: *a* – control cell culture, *b* – cell culture in 3 days after infection (microphotography, magnification $\times 150$).

В инфицированной вирусом миксомы кроликов (*Mухоматозис сункули*) исследуемой культуре на 3-и сут инкубирования наблюдали ЦПД вируса в виде образования стяжек (**рис. 8**). На 5-е сут отмечали округление и отслоение инфицированных клеток от подложки, деструкцию клеточного монослоя.

Значение ИА вируса миксомы кроликов, полученного в исследуемой культуре, было равным $4,25 \pm 0,25 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{мл}$.

Исследование перmissивности полученных клеток к вирусу фибромы Шоупа проводили на кроликах с патогенным для них изолятом возбудителя, выделенным из патологического материала, с ИА на уровне 5-го пассажа $4,11 \text{ lg ИД}_{50}/\text{мл}$. Методом ПЦР подтверждена аутентичность использованного вируса.

Результаты определения вирусрепродуцирующей способности культуры штамма диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii* в отношении вирулентного вируса фибромы Шоупа показали отсутствие развитие цитопатического эффекта, а титр ИА не превышал введённую дозу инфекционного агента.

Обсуждение

Изучение спектра чувствительности клеток из тканей летучих мышей, обитающих и мигрирующих на территории Российской Федерации, к вирусам векторных инфекций сельскохозяйственных животных, для которых имеет место риск заноса и распространения, является актуальным, в особенности для возбудителей трансмиссивных вирусных болезней.

Все разновидности летучих мышей, обитающих в России (около 40 видов), – насекомоядные. По оценкам специалистов, 1 особь в течение 1 ч охоты съедает до 200 комаров, которые, в свою очередь, могут выступать переносчиками возбудите-

лей многих трансмиссивных заболеваний. Ежегодная миграция части популяций летучих мышей средней полосы РФ на юг простирается на ареал Средиземного и Чёрного морей, Закавказья, северного Ирана и северной Турции (http://vertebrata.ru/index/lesnoj_netopyr/0-407), в том числе на регионы, стационарные по особо опасным болезням сельскохозяйственных животных. Данные по изоляции патогенов от летучих мышей в различных регионах мира (включая вирусы особо опасных болезней) указывают на необходимость подобных исследований для РФ, где роль рукокрылых в распространении возбудителей указанных болезней не получила достаточного экспериментального подтверждения.

Полученный штамм диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii* сохранял цитоморфологические, ростовые и кариологические характеристики на протяжении 36 пассажей (срок наблюдения), что позволило создать крупный криобанк этих клеток на разных пассажных уровнях и оценить их перmissивность к вирусам – возбудителям экономически значимых и карантинных заболеваний.

Показатели чувствительности полученной клеточной культуры к вирусам блютанга и ЛДР согласуются с данными об идентификации реовируса и возбудителя ЛДР у египетских фруктовых летучих мышей [37, 38], а перmissивность полученного штамма диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii* к вирусам ЗУД КРС и миксомы кроликов (*Мухоматозис сункули*) соответствует результатам обнаружения поксвирусов у летучих мышей вида поздний кожан (*Eptesicus fuscus*) [39]. Кроме того, данный клеточный штамм также может быть использован для выделения и изучения вирусных патогенов – возбудителей инфекционных болезней человека.

Выводы

1. Впервые получен и паспортизирован штамм диплоидных клеток ПЛМ *Pipistrellus nathusii*. Создан криобанк этого штамма на разных пассажных уровнях для вирусологических исследований.

2. Установлена перmissивность полученного клеточного штамма к вирусам блютанга, ЛДР, ЗУД, миксома кроликов. Данная культура клеток оказалась нечувствительной к возбудителям АЧЛ, АЧС и фибромы Шоупа.

3. Методом ПЦР подтверждена таксономическая принадлежность полевых изолятов вирусов ЗУД и фибромы Шоупа, используемых в экспериментальной работе с культурой клеток летучей мыши.

4. Репродукция возбудителей трансмиссивных болезней сельскохозяйственных животных в клетках диплоидного штамма из тканей летучей мыши *P. nathusii*, обитающей и мигрирующей на территории европейской части Российской Федерации, свидетельствует о возможности вирусоносительства представителями указанного вида, а также их потенциальном участии в эпидемическом процессе в качестве переносчиков вирусов из сопредельных с РФ территорий. Это, в свою очередь, позволяет говорить о роли данных животных в формировании природных резервуаров инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

- IUCN SSC Bat Specialist Group. Available at: <https://www.iucn.org/commissions/ssc-groups/mammals/specialist-groups-a-e/bat> (accessed January 18, 2021).
- Baker M.L., Schountz T., Wang L.F. Antiviral immune responses of bats: a review. *Zoonoses Public Health*. 2013; 60(1): 104–16. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01528.x>.
- 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>.
- Wang L.F., Walker P.J., Poon L.L. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses? *Curr. Opin. Virol.* 2011; 1(6): 649–57. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.013>.
- Drexler J.F., Corman V.M., Wegner T., Tateno A.F., Zerbini R.M., Gloza-Rausch F., et al. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(3): 449–56. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100526>.
- Moratelli R., Calisher C.H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2015; 110(1): 1–22. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150048>.
- Макаров В.В., Лозовой Д.А. Вирусы и рукокрылые. Эпидемиологические особенности восприимчивости. *Пест-Менеджмент*. 2017; (4): 13–22.
- Vázquez-Morón S., Juste J., Ibáñez C., Berciano J.M., Echevarría J.E. Phylogeny of European Bat Lyssavirus 1 in *Eptesicus isabellinus* Bats, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(3): 520–3. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100894>.
- Ceballos N.A., Morón S.V., Berciano J.M., Nicolás O., López C.A., Juste J., et al. Novel lyssavirus in Bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(5): 793–5. <https://doi.org/10.3201/eid1905.121071>.
- 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; 503(7477): 535–8. <https://doi.org/10.1038/nature12711>.
- Jánoska M., Vidovszky M., Molnár V., Liptovszky M., Harrach B., Benkő 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>.
- 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>.
- 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., Koh C.L., Hooi P.S., Wee K.F., Khong J.H., Chua B.H., et al. Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect.* 2002; 4(2): 145–51. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01522-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01522-2).
- Halpin K., Young P.L., Field H.E., Mackenzie J.S. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 8): 1927–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-1927>.
- Albariño C.G., Foltzer M., Towne J.S., Rowe L.A., Campbell S., Jaramillo C.M., et al. Novel paramyxovirus associated with severe acute febrile disease, South Sudan and Uganda, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(2): 211–6. <https://doi.org/10.3201/eid2002.131620>.
- 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>.
- Zhang H., Todd S., Tachedjian M., Barr J.A., Luo M., Yu M., et al. A novel bat herpesvirus encodes homologues of major histocompatibility complex classes I and II, C-type lectin, and a unique family of immune-related genes. *J. Virol.* 2012; 86(15): 8014–30. <https://doi.org/10.1128/jvi.00723-12>.
- Graves D.C., Ferrer J.F. In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Res.* 1976; 36(11 Pt. 1): 4152–9.
- Sandekian V., Lim D., Prud'homme P., Lemay G. Transient high level mammalian reovirus replication in a bat epithelial cell line occurs without cytopathic effect. *Virus Res.* 2013; 173(2): 327–35. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.010>.
- Slater T., Eckerle I., Chang K. Bat lung epithelial cells show greater host species-specific innate resistance than MDCK cells to human and avian influenza viruses. *Virol. J.* 2018; 15(1): 68. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0979-6>.
- Jordan I., Horn D., Oehmke S., Leendertz F.H., Sandig V. Cell lines from the Egyptian fruit bat are permissive for modified vaccinia Ankara. *Virus Res.* 2009; 145(1): 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.007>.
- 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>.
- 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>.
- Biesold S.E., Ritz D., Gloza-Rausch F., Wollny R., Drexler J.F., Corman V.M., et al. Type I interferon reaction to viral infection in interferon-competent, immortalized cell lines from the African fruit bat *Eidolon helvum*. *PLoS One*. 2011; 6(11): e28131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028131>.
- Zhou P., Chionh Y.T., Irac S.E., Ahn M., Jia Ng J.H., Fossum E., et al. Unlocking bat immunology: establishment of *Pteropus alecto* bone marrow-derived dendritic cells and macrophages. *Sci. Rep.* 2016; 6: 38597. <https://doi.org/10.1038/srep38597>.
- Irving A.T., Rozario P., Kong P., Luko K., Gorman J.J., Hastie M.L., et al. Robust dengue virus infection in bat cells and limited innate immune responses coupled with positive serology from bats in IndoMalaya and Australasia. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020; 77(8): 1607–22. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03242-x>.
- Жуков В.А., Шишкина Л.Н., Сафатов А.С., Сергеев А.А., Пьянков О.В., Петрищенко В.А. и др. Валидация модифицированного алгоритма прогнозирования восприимчивости хозяина к вирусам с учетом параметров восприимчивости первичных культур клеток-мишеней и факторов врожденного иммунитета. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2010; (5): 24–9.
- 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>.
- 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>.

31. Bowden T.R., Babiuk B.S., Parkyn G.R., Coppes J.S., Boylea D.B. Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*. 2008; 371 (2) 380–393. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.10.002>.
32. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals (Formerly AVMA Guidelines on Euthanasia): 2013 Edition. Available at: <https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/Euthanasia-Guidelines.aspx> (accessed January 18, 2021).
33. Воронцов Н.Н., Раджабли С.И., Волобуев В.Т. Сравнительная кариология летучих мышей семейства Vespertilionidae (Chiroptera). В кн.: *Млекопитающие (эволюция, кариология, систематика, фаунистика)*. Новосибирск: Наука; 1969: 16–21.
34. Baker R.J. Karyotypic trends in bats. In: *Wimsatt W.A., ed. Biology of bats*. Academic Press Inc.: New York; 1970, 65–97. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-758001-2.50007-1>.
35. Park S.R., Won P.O. Chromosomes of Korean bats. *J. Mammal. Soc. Jpn.* 1978; (7): 199–203. <https://doi.org/10.11238/jmammsojapan.1952.7.1999>.
36. Дзуев Р.И., Хашкулова М.А., Боготова И.Х. Особенности хромосомного набора и промеров тела средиземноморского нетопыря (*Pipistrellus kuhli*) в условиях лесостепного пояса северного макросклона Центрального Кавказа. *Современные проблемы науки и образования*. 2016; (3): 390.
37. Balkema-Buschmann A., Rissmann M., Kley N., Ulrich R., Eiden M., Groschup M.H. Productive propagation of Rift valley fever phlebovirus vaccine strain MP-12 in Rousettus aegyptiacus fruit bats. *Viruses*. 2018; 10(12): 681. <https://doi.org/10.3390/v10120681>.
38. 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>.
39. Emerson Ginny L., Nordhausen R., Garner M.M., Huckabee J.R., Johnson S., Wöhrle R.D., et al. Novel Poxvirus in big brown bats, Northwestern United States. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(6): 1002–4. <https://doi.org/10.3201/eid1906.121713>.
11. Jánoska M., Vidovszky M., Molnár V., Liptovszky M., Harrach B., Benkő 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>.
12. 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>.
13. 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>.
14. Chua K.B., Koh C.L., Hooi P.S., Wee K.F., Khong J.H., Chua B.H., et al. Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect.* 2002; 4(2): 145–51. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01522-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01522-2).
15. Halpin K., Young P.L., Field H.E., Mackenzie J.S. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 8): 1927–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-1927>.
16. Albariño C.G., Foltzer M., Towne J.S., Rowe L.A., Campbell S., Jaramillo C.M., et al. Novel paramyxovirus associated with severe acute febrile disease, South Sudan and Uganda, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(2): 211–6. <https://doi.org/10.3201/eid2002.131620>.
17. 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. *Virology*. 2017; 511(2): 101–14. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3930-2>.
18. Zhang H., Todd S., Tachedjian M., Barr J.A., Luo M., Yu M., et al. A novel bat herpesvirus encodes homologues of major histocompatibility complex classes I and II, C-type lectin, and a unique family of immune-related genes. *J. Virol.* 2012; 86(15): 8014–30. <https://doi.org/10.1128/jvi.00723-12>.
19. Graves D.C., Ferrer J.F. In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Res.* 1976; 36(11 Pt. 1): 4152–9.
20. Sandekian V., Lim D., Prud'homme P., Lemay G. Transient high level mammalian reovirus replication in a bat epithelial cell line occurs without cytopathic effect. *Virus Res.* 2013; 173(2): 327–35. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.010>.
21. Slater T., Eckerle I., Chang K. Bat lung epithelial cells show greater host species-specific innate resistance than MDCK cells to human and avian influenza viruses. *Virology*. 2018; 511(1): 68. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0979-6>.
22. Jordan I., Horn D., Oehmke S., Leendertz F.H., Sandig V. Cell lines from the Egyptian fruit bat are permissive for modified vaccinia Ankara. *Virus Res.* 2009; 145(1): 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.007>.
23. 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>.
24. 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.2018.06.007>.
25. Biesold S.E., Ritz D., Gloza-Rausch F., Wollny R., Drexler J.F., Corman V.M., et al. Type I interferon reaction to viral infection in interferon-competent, immortalized cell lines from the African fruit bat *Eidolon helvum*. *PLoS One*. 2011; 6(11): e28131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028131>.
26. Zhou P., Chionh Y.T., Irac S.E., Ahn M., Jia Ng J.H., Fossum E., et al. Unlocking bat immunology: establishment of Pteropus alecto bone marrow-derived dendritic cells and macrophages. *Sci. Rep.* 2016; 6: 38597. <https://doi.org/10.1038/srep38597>.
27. Irving A.T., Rozario P., Kong P., Luko K., Gorman J.J., Hastie M.L., et al. Robust dengue virus infection in bat cells and limited innate immune responses coupled with positive serology from bats in IndoMalaya and Australasia. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020; 77(8): 1607–22. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03242-x>.
28. Zhukov V.A., Shishkina L.N., Safatov A.S., Sergeev A.A., Piankov O.V., Petrishchenko V.A., et al. Validation of a modified algorithm for predicting host susceptibility to viruses taking into account susceptibility parameters of primary target cell cultures and congenital immune factors. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2010; (5): 24–9 (in Russian).

REFERENCES

1. IUCN SSC Bat Specialist Group. Available at: <https://www.iucn.org/commissions/ssc-groups/mammals/specialist-groups-a-e/bat> (accessed January 18, 2021).
2. Baker M.L., Schountz T., Wang L.F. Antiviral immune responses of bats: a review. *Zoonoses Public Health*. 2013; 60(1): 104–16. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01528.x>.
3. 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>.
4. Wang L.F., Walker P.J., Poon L.L. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses? *Curr. Opin. Virol.* 2011; 1(6): 649–57. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.013>.
5. Drexler J.F., Corman V.M., Wegner T., Tateno A.F., Zerbinati R.M., Gloza-Rausch F., et al. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(3): 449–56. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100526>.
6. Moratelli R., Calisher C.H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2015; 110(1): 1–22. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150048>.
7. Makarov V.V., Lozovoy D.A. Viruses and chiroptera. Epidemiological features of susceptibility. [*Virusy i rukokrylye. Epidemiologicheskie osobennosti vosprimchivosti*]. *Pest-Menedzhment*. 2017; (4): 13–22 (in Russian).
8. Vázquez-Morón S., Juste J., Ibáñez C., Berciano J.M., Echevarría J.E. Phylogeny of European Bat Lyssavirus 1 in *Eptesicus isabellinus* Bats, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(3): 520–3. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100894>.
9. Ceballos N.A., Morón S.V., Berciano J.M., Nicolás O., López C.A., Juste J., et al. Novel lyssavirus in Bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(5): 793–5. <https://doi.org/10.3201/eid1905.121071>.
10. 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; 503(7477): 535–8. <https://doi.org/10.1038/nature12711>.

29. 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>.
30. 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>.
31. Bowden T.R., Babiuk S.L., Parkynb G.R., Copps J.S., Boylea D.B. Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology.* 2008; 371 (2) 380–393. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.10.002>.
32. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals (Formerly AVMA Guidelines on Euthanasia): 2013 Edition. Available at: <https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/Euthanasia-Guidelines.aspx> (accessed January 18, 2021).
33. Vorontsov N.N., Radzhabli S.I., Volobuev V.T. Comparative karyology of bats of Vespertilionidae family (Chiroptera). In: *Mammals (Evolution, Karyology, Taxonomy, Faunistics) [Sravnitel'naya kariologiya letuchikh myshei semeistva Vespertilionidae (Chiroptera). In: Mlekopitayushchie (evolyutsiya, kariologiya, sistematika, faunistika)]*. Novosibirsk: Nauka; 1969: 16–21 (in Russian).
34. Baker R.J. Karyotypic trends in bats. In: *Wimsatt W.A., ed. Biology of bats*. Academic Press Inc.: New York; 1970, 65–97. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-758001-2.50007-1>.
35. Park S.R., Won P.O. Chromosomes of Korean bats. *J. Mammal. Soc. Jpn.* 1978; (7): 199–203. <https://doi.org/10.11238/jmammsocjapan1952.7.1999>.
36. Dzuev R.I., Khashkulova M.A., Bogotova I.Kh. Features of the chromosome set and measurements of body mediterranean bat (*Pipistrellus Kuhli*) in the conditions of forest-steppe zone macrolone the northern Central Caucasus. [*Osobennosti khromosomno-go nabora i promerov tela sredizemnomorskogo netopyrya (Pipistrellus Kuhli) v usloviyakh lesostepnogo poyasa severnogo makrosklona Tsentral'nogo Kavkaza*]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2016; (3): 390 (in Russian).
37. Balkema-Buschmann A., Rissmann M., Kley N., Ulrich R., Eiden M., Groschup M.H. Productive propagation of Rift valley fever phlebovirus vaccine strain MP-12 in *Rousettus aegyptiacus* fruit bats. *Viruses.* 2018; 10(12): 681. <https://doi.org/10.3390/v10120681>.
38. 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>.
39. Emerson Ginny L., Nordhausen R., Garner M.M., Huckabee J.R., Johnson S., Wohrle R.D., et al. Novel Poxvirus in big brown bats, Northwestern United States. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(6): 1002–4. <https://doi.org/10.3201/eid1906.121713>.