Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

### ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ

**ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ УААН**

#### ГАРАГУЛЯ Галина Ігорівна

## УДК 619:616.98:578.083.2:636.591

**СЕРОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ ПЕРЕПЕЛІВ ЩОДО ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ ТА ВИКОРИСТАННІ**

**КУЛЬТУР КЛІТИН**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата ветеринарних наук

###### Харків

2004

### Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Харківській державній зооветеринарній академії, Сумському національному аграрному університеті, відділі вивчення хвороб птиці Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН та відділі культур клітин Сумської біологічної фабрики.

Науковий керівник **доктор ветеринарних наук, професор,**

 **член-кореспондент УААН**

 **Головко Валерій Олексійович,**

 Харківська державна зооветеринарна академія,

 ректор, завідувач кафедри менеджменту та

 економіки ветеринарної справи.

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор

 **Білокінь Віктор Степанович,**

 Інститут експериментальної і клінічної

 ветеринарної медицини УААН,

 головний науковий співробітник

 лабораторії біотехнології;

 кандидат ветеринарних наук, доцент

 **Пархоменко Людмила Іванівна,**

 Луганський національний аграрний університет,

 кафедра мікробіології, фармакології, клінічної

 діагностики, вірусології, клінічної біохімії

 та токсикології.

**Провідна установа**  Національний аграрний університет

 Кабінету Міністрів України, кафедра

 мікробіології, вірусології та біотехнології, м. Київ.

Захист відбудеться “ 28 ” вересня 2004 року о 9-30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.359.01 в Інституті експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН за адресою: 61023, м. Харків, вул. Пушкінська, 83.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН за адресою:

61023, м. Харків, вул. Пушкінська, 83.

 Автореферат розісланий “ 26 ” серпня 2004 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

доктор ветеринарних наук Бабкін А.Ф.

### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

### Актуальність теми

Перепелівництво вже багато років розвивається в різних країнах світу та з кожним роком стає популярнішим (Гущин В.В. с соавт.,1995; Панікар І.І. з співав.,1995; Пигарева М., 1993; Тикк Х.,1991; Lucotte 1974; Panda B., Singh R.P., 1990; Paul D.C., 1992).

В Україні перепелині ферми розташовані в птахогосподарствах різних форм власності, перепелів розводять аматори багатьох міст нашої країни.

 Перепели та їх яйця мають високі дієтичні, поживні та лікувальні властивості. Перепелині яйця за вмістом поживних речовин переважають курячі: в них більше калію, фосфору, заліза, вітамінів В1 і В2 (Кудрявцева У., 1997; Нанос В., 1995, 1996; Шомин Ф.Ф., 1999; Baumgartner J., Simeonova J., 1992; Adashi S. еt all, 1991; Panda B., Singh R.P., 1990).

 Перепелині ембріони успішно використовуються в наукових дослідженнях і у виробництві вакцин (Аллабердина К.А., 1974; Осидзе Д.Ф. и др., 1991; Богомолова Н., Мерцлина Т., 1975; Брудно И.А.,1982; Воронин Е.С., 1986; Краснова В.П., 1996; Медуницин Н., 1999; Fatunmbi O.O., 1996; Majerciak V., 2001).

Перепели - перша птиця, яка була включена в програму дослідження космосу. На орбітальному комплексі “Союз-34 -Салют-3” проведена інкубація перепелиних яєць, а дорослі перепели літали в орбітальному комплексі “Мир” (Пигарева М., Афанасьев Т.,1993; Laukova A. et all.,1993; Sabo V. еt all, 2001; Sinyak Y. et all, 2003).

У літературі є дані з вивчення різних біологічних і фізіологічних властивостей перепелів, використанню птиці та перепелиних ембріонів як експериментальної моделі (Гарбузов О.С.,1975; Alexander D.J., 1986; Rascher F.J. et all, 1964; Salter D. еt all, 1999;). Є ряд повідомлень про використання культур клітин перепелиних ембріонів (Аллабердина К.А., 1974; Бектемиров Г.А., 1980; Богомолова Н., 1974, 1980, 1981; Воронин Е.С., 1985; Кутумбетов Л.Б. и др., 2002; Осидзе С.Д., 1986; Фидаров Ф.М., 1975; Щербакова О.Е., 1975; Farrow W.M. et all, 1975; Reynolds D.L., Maraqa A.D., 1999; Sabara M.A., Larence J.I., 2002).

За кордоном вивчали вірусні хвороби перепелів (Ratmamohan N., 1993; Swain P., 1997). У перепелів описані спалахи окремих вірусних хвороб, характерних для курей, а саме: ньюкаслської хвороби (Rampin T., 1993; Suloshawa S., 1991; Shaw A.M., 1994), хвороби Марека (Dutton R.L., 1973; Imai K., 1991; Schumacher D., 2001), грипу (Pearson J.E., 1986; Webster R.G., 2002), бронхіту перепелів (Olson N.O., 1950; Chandra R.K., 1998), а також випадки ізоляції інших вірусів-збудників хвороб (Lee L.H., 1992; Dherde K., 1991; Hill R.W., 1962; Das B.B., 1992; Crawford J.F., 1988; Carlson H.S., 1974; Mc Ferrau J.B., 1980).

Треба зазначити, що серед хвороб перепелів в Україні реєструвались лише бактеріальні інфекції (Булгакова І.О., 1997; Данілов О.В., 2001; Педан В.А., 2003; Рисований В.І., 2003; Чикадзе В.А., 1976). Вірусні хвороби у перепелів перебігають безсимптомно, а вірусоносійство підтверджено виявленням у сироватці їх крові вірусоспецифічних антитіл (Богомолова Н.Н. и др., 1981; Воронин Е.С. и др., 1970; Панікар І.І. та ін., 1995, 1997, 2000; Панікар Іг.Іг., 1996; Farkas T. еt all, 1998; Mall M.P., Khanna P.N., 1998; Suloshana S., Sudharma D., 1987).

Враховуючи це, ми мали на меті вивчити епізоотичну ситуацію з вірусних хвороб перепелів на фермах України за даними серологічного моніторингу, провести ізоляцію і культивування вірусів, одержаних від перепелів з високими титрами противірусних антитіл, встановити господарства-постачальники інкубаційного яйця для отримання ембріонів, випробувати різні методики одержання первинної культури клітин з перепелиних ембріонів та встановити їх чутливість до вірусів і визначити оптимальні умови культивування вірусів у перепелиних ембріонах і культурах клітин із них.

### Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Харківської державної зооветеринарної академії і є частиною спільних досліджень, що проведені разом із співробітниками кафедри вірусології, патанатомії і ветсанекспертизи Сумського національного аграрного університету згідно теми 14/11: “Вивчення заразних хвороб перепелів при моно- і асоційованому перебігу”, № державної реєстрації 0101U003466 (1998-2003рр.).

***Мета досліджень***

*Метою наших досліджень було обгрунтування методу виготовлення і використання первинних культур клітин із ембріонів перепелів, визначення птахогосподарств-постачальників інкубаційного яйця за результатами серологічного моніторингу перепелів та вивчення кореляції рівня специфічних антитіл і вірусоносійства.*

**Основні завдання досліджень:**

- Провести серологічний моніторинг і вивчити епізоотичну ситуацію щодо вірусних інфекцій ряду курячих у перепелиних птахогосподарствах України.

- За даними серологічного моніторингу визначити благополуччя господарств-постачальників інкубаційного яйця та ембріонів перепелів для виготовлення первинних культур клітин.

- Випробувати способи одержання і оптимізувати параметри культивування первинних культур клітин із тканин ембріонів перепелів.

- З’ясувати можливість застосування первинних культур фібробластів ембріонів перепелів для культивування та ізолювання різних вірусів.

- В порівняльному аспекті вивчити чутливість ембріонів і виготовлених із них первинних культур фібробластів до авіреовірусів та збудників хвороби Ауєскі, ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту, міксоматозу кролів, хвороб Гамборо та Марека.

**Об’єкт досліджень:** вірусні хворобиперепелів, первинні культури клітин ембріонів перепелів і курей.

**Предмет досліджень:** сироватки крові, серологічний моніторинг, епізоотична ситуація з вірусних хвороб перепелів, способи одержання і культивування первинних культур клітин, чутливість клітин і ембріонів до вірусів.

**Методи дослідженнь:** епізоотологічний, клініко-патологоанатомічний, вірусологічний, бактеріологічний, серологічний та статистичний.

##### *Наукова новизна одержаних результатів*

При вивченні епізоотичної ситуації вперше проведено серологічний моніторинг вірусних інфекцій перепелів на фермах різних областей України. Встановлено взаємозв’язок між серопозитивністю перепелів і вірусоносійством, що є критерієм оцінки благополуччя з вірусних хвороб птиці родини курячих.

За морфологічними ознаками онтогенетичного розвитку визначено оптимальний вік ембріонів перепелів, придатних для одержання первиних культур фібробластів.

В порівняльному аспекті показано перевагу первинних культур із тканин ембріонів перепелів над ембріонами за чутливістю до вірусів і накопиченню їх біомаси.

**Практичне значення одержаних результатів** полягає в тому, що вивчення епізоотичної ситуації за показниками серологічного моніторингу перепелів дає змогу встановити благополуччя птахогосподарств і обгрунтувати вибір господарств-постачальників інкубаційного яйця для отримання ембріонів – вихідного матеріалу для виготовлення первинних культур клітин.

Одержані дані експериментальних досліджень щодо поширення вірусних інфекцій серед перепелів і виготовлення та використання первинних культур клітин із тканин їх ембріонів використані в розроблених “Методичних рекомендаціях по одержанню первинної культури фібробластів ембріонів перепелів і використанню для ізоляції і культивування вірусів тварин”, які затверджені Вченою радою Харківської державної зооветеринарної академії у 2003 році і пропонуються для впровадження в лабораторіях ветеринарної медицини та на біофабриках.

Матеріали дисертації з вивчення вірозів перепелів і одержання культур клітин із ембріонів перепелів використовуються в навчальному процесі на кафедрах Харківської ДЗВА, Сумського НАУ і Полтавської ДСГА.

**Особистий внесок здобувача** полягає в самостійному виконанні експериментальної частини роботи, зокрема, в проведенні досліджень сироваток крові і патологічного матеріалу, одержання, культивування та випробування первинних культур клітин із ембріонів перепелів, визначення чутливості ембріонів та культури клітин до вірусів. Обстеження окремих ферм та відбір патологічного матеріалу проводилися разом із співробітниками кафедри вірусології Сумського національного аграрного університету. Частина досліджень виконана на базі відділу вивчення хвороб птиці Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН та цеху культур клітин Сумської біологічної фабрики. Узагальнення первинних даних, їх аналіз і статистична обробка та оформлення рукопису здійснені автором особисто.

### Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи були повідомлені та обговорені на засіданнях кафедри мікробіології, вірусології та імунології Харківської ДЗВА, на щорічних звітних наукових конференціях Харківської ДЗВА в 2002-2003 роках, в звітах з ДБТ 14/11 в 2001 та 2002 роках, на 3-й Українській конференції по птахівництву з міжнародною участю (Алушта, 2001р.), міжнародному симпозіумі “Межрегиональные проблемы экологической безопасности” (Суми, 2003р.).

###  Публікації. Матеріали дисертації опубліковані в 10 друкованих працях, в тому числі 9 - у фахових наукових виданнях.

##### *Структура і обсяг дисертації*

##### *Дисертаційна робота викладена на 141 сторінці комп’ютерного тексту і складається з таких розділів: загальна характеристика роботи, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати власних досліджень, обговорення отриманих результатів, висновки, список використаних джерел, додатки.*

Роботу ілюстровано 26 таблицями, 3 діаграмами. Список використаних літературних джерел включає 291 найменування, в тому числі 185 – іноземних авторів.

### Матеріали та методи досліджень

Робота виконана в період 1999-2003 років на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Харківської державної зооветеринарної академії, кафедрі вірусології, патанатомії та ветсанекспертизи Сумського національного аграрного університету, відділах вивчення хвороб птиці Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН та культур клітин Сумської біологічної фабрики.

Епізоотичну ситуацію щодо заразних хвороб перепелів у різних країнах світу вивчали шляхом аналізу спеціальної літератури та даних мережі Інтернет. При особистому епізоотологічному обстеженні 16 птахоферм різних форм власності Харківської, Сумської, Полтавської, Донецької, Луганської, Дніпропетровської і Одеської областей та АР Крим враховували також дані звітності установ ветеринарної медицини.

В ході експериментів використані збудники хвороби Марека (епізоотичний штам герпесвірусу курей “Таганрог-2001” і виробничий штам герпесвірусу індиків FC-126), хвороби Гамборо (виробничий штам Д 78), ньюкаслської хвороби (виробничий штам La Sota), інфекційного бронхіту (виробничий штам Н 120), хвороби Ауєскі (виробничий штам УНДІЕВ 18”в”), міксоматозу кролів (виробничий штам В 82) та авіреовірус (епізоотичний штам ІЕКВМ).

Культивування вірусів здійснювали на первинних культурах фібробластів ембріонів курей та перепелів 10-11- та 7-11-добової інкубації, відповідно. Їх патогенність визначали зараженням ембріонів курей та культури фібробластів перепелів.

Первинні культури фібробластів ембріонів курей і перепелів виготовляли за загальноприйнятою та модифікованою нами методиками (Анджапаридзе О.Г. с соавт., 1962, Дьяконов Л.П. с соавт., 1986; Белоконь В.С. с соавт., 1993). Культури фібробластів із ембріональних тканин птахів вирощували на живильних середовищах Ігла та 199 вітчизняного виробництва з додаванням 10% сироватки крові великої рогатої худоби в матрасах і ролерних посудинах. Для підтримки життєздатності інфікованих досліджуваними вірусами культур клітин використовували суміш цих середовищ у рівних пропорціях без сироватки крові великої рогатої худоби.

Характер цитопатичних змін вивчали за допомогою інвертованого мікроскопу “Біолам П-1” (“Ломо”).

Інфекційну активність вірусу визначали методом титрування на курячих ембріонах і моношаровій культурі фібробластів, а їх ідентифікацію – в серологічних РЗГА та РНГА.

Для статистичної обробки результатів досліджень використовували загальноприйняті в біології методи: константні методи математичної статистики при обробці даних серологічних досліджень (Садовский Н.В., 1975) та метод Ріда і Менча при обчисленні інфекційної активності вірусів.

### РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Епізоотична ситуація з вірусних хвороб перепелів**

Результати аналізу даних щодо поширення вірозів на перепелиних фермах різних країн світу свідчать, що серед перепелів реєструвались спалахи окремих захворювань (табл. 1).

**Таблиця 1**

**Реєстрація ензоотій вірусних хвороб перепелів**

**у світі (1963 - 2003рр.)**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Хвороба Ньюкасла** | **Грип** | **Хвороба Марека** | **Бронхіт** | **Віспа** | **Лей-кози** | **СЗН-76** |
| СШАІталіяІндіяКитайКореяЄгипетАнгліяПакистанЯпонія | СШАІталіяІндіяКитайТуреччинаЄгипетЯпоніяАнглія | ІндіяКитайАнгліяЯпоніяФранціяНімеччина | СШААнгліяІндіяІталія | СШАІндіяІспаніяІталіяПольща | АнгліяЯпоніяІндія | АнгліяІндія |

Ензоотії вірусних хвороб спостерігали в тих країнах, де перепелів розводять десятки років, і де є промислові ферми з поголів’ям у сотні тисяч птахів. В США, Англії, Індії, Китаї, Японії та Кореї вчені вивчають необхідність і можливість вакцинації перепелів проти ньюкаслської хвороби, хвороби Марека, бронхіту та віспи вакцинами для курей та розробляють вакцини для перепелів. А в США, Індії та Японії вакцинація перепелів проти ньюкаслської хвороби і хвороби Марека стала обов’язковою для найбільших промислових ферм.

Інші вірусні хвороби перепелів реєструвались лише як спорадичні випадки: хвороба Гамборо (США, Єгипет), аденовірусна інфекція (Англія), реовірусна інфекція (Китай, Англія, Німеччина), енцефаломієліт (США, Ізраїль, Індія), саркома Рауса та еритробластоз (США), сказ (Індія). Згадки про виділення від перепелів інших вірусів птахів або вірусів інших видів тварин у доступній нам літературі не знайдені.

*В нашій роботі ми вивчали епізоотичну ситуацію на різних перепелиних фермах восьми регіонів України. Кількість перепелів на фермах, які були обстежені, мала значні коливання (від 195 до 20000 голів). Ферми відрізнялись за розташуванням та епізоотичною ситуацією.*

Значна кількість перепелів (від 2 до 20 тисяч голів) утримувалась на шести фермах фірм “Укрнафта” в с.Супрунівка Полтавської області, “Демпург” м. Суми та “Поиск А.С.” м. Антрацит Луганської області, “Вітіз” Дніпропетровської області, а також птахофабрик “Першотравнева” Одеської області та “Південна” АР Крим. На інших, здебільшого аматорських фермах, кількість перепелів не перевищувала 100 - 300 голів.

На перепелиних фермах України в обстежених нами областях клінічні прояви вірусних хвороб перепелів не реєструвались, але в окремих господарствах в РНГА були виявлені противірусні антитіла до збудників найбільш поширених вірусних хвороб птиці ряду курячих.

Було встановлено, що титри противірусних антитіл в сироватках крові перепелів на різних фермах коливаються в широких межах: від 0 до 1:512. Діагностичними вважали титри від 1:8 - 1:16 і вище.

Слід відмітити, що на всіх обстежених фермах України в сироватці крові перепелів не виявлені антитіла до збудників таких вірозів, як грип, лейкоз, саркома Рауса.

З восьми регіонів України тільки в Луганській, Одеській та Харківській областях дослідженнями сироваток крові перепелів встановлено, що противірусних антитіл не було, або їх титри не перевищували рівня 1:2 - 1:4.

До вірусів-збудників інфекційного бронхіту, ньюкаслської хвороби, хвороби Марека, інфекційного ларинготрахеїту, віспи, синдрому зниження несучості, енцефаломієліту, адено- та реовірусної інфекції в деяких птахогосподарствах реєстрували досить високі титри антитіл (таблиця 2).

В окремих господарствах птиця виявилася серопозитивною до збудників хвороби Марека (Полтавська область), хвороби Гамборо (Сумська область), інфекційного ларинготрахеїту (Сумська і Полтавська області), реовірусної інфекції (Сумська і Донецька області), інфекційного бронхіту (Сумська і Полтавська області та АР Крим), аденовірусної інфекції (Полтавська і Дніпропетровська області та АР Крим). Це свідчить про циркуляцію вірусів у птахогосподарствах і про їх потенційну небезпеку.

**Таблиця 2**

**Результати серологічних досліджень сироватки крові перепелів**

**крупних ферм восьми регіонів України за 1998 - 2003 роки**

|  |  |
| --- | --- |
| **Область** | **Рівень противірусних антитіл проти збудників, log2**  |
| **хвороби Марека** | **інфекційного бронхіту** | **інфекційного ларинго-трахеїту** | **енцефало-мієліту** | **хвороби Гамборо** | **синдрому зниження несучості** | **аденовірусної інфекції** | **реовірусної інфекції** |
| Сумська | 2,0±0,19 | **3,33**±**0,44** | **3,33**±**0,35** | 2,67±0,25 | **4,0**±**0,93** | 0,60±0,30 | 2,50±0,28 | **6,50**±**0,56** |
| Луганська | 0 | 1,33±0,39 | 1,5±0,63 | 0 | 0 | 1,33±0,39 | 0 | 0 |
| Донецька | 1,5±0,94 | 2,0±0,72 | 2,0±1,25 | 2,0±1,25 | 1,0±,30 | 1,75±0,59 | 1,5± 0,94 | **4,0±****2,51** |
| **Полтавська** | **4,75±****0,27** | **6,0**±**1,0** | **3,0**±**0,50** | 2,0±1,25 | 2,5±1,88 | 2,5±1,57 | **4,6±****1,2** | 1,75±0,27 |
| **Дніпропет-ровська** | 2,75±0,27 | 1,5±0,94 | 2,0±1,25 | **3,75±****0,27** | 1,5±0,63 | 0,33±0,20 | **7,0** | 2,0 |
| **Одеська** | 0 | 1,6±0,30  | 2,5±0,36 | 0 | 2,2± 0,65 | **3,0** | **3,0** | 0 |
| **Харківська** | 1,67±0,39 | 0 | 0 | 0 | 1,5± 0,36 | 1,5± 0,63 | 1,67±0,39 | 0 |
| АР Крим | 3,0±1,25 | **3,8**±**1,1** | 2,5± 0,72 | 2,67± 0,79 | 2,5± 0,63 | 2,5±0,59 | **5,6±****0,70** | 2,67±0,79 |

**Примітка:** жирним шрифтом виділені діагностичні титри противірусних антитіл (3 log2і вище).

Навіть в аматорських фермах з незначною кількістю поголів’я перепелів у зонах, неблагополучних з вірозів курей, виявлені досить високі титри вірусоспецифічних антитіл (табл. 3).

Титри противірусних антитіл у перепелів промислових птахофабрик та аматорських ферм не збігаються. У 74% випадків титри антитіл у сироватці перепелів птахофабрик вищі у 2-4 рази, ніж у перепелів аматорських ферм, в 12% випадків - рівні, в 14% - нижчі. Між тим, спостерігається кореляція між випадками реєстрації вірусних хвороб серед курей та виявленням діагностичних титрів противірусних антитіл у сироватці крові перепелів, що свідчить про їх інфікованість. Зокрема, при вірусологічному дослідженні матеріалу (печінка, легені, селезінка, головний мозок), які відібрано від перепелів ферми “Укрнафта” Полтавської області, виділено цитопатичний агент, який в РЗГА ідентифіковано як вірус ньюкаслської хвороби.

###### Таблиця 3

**Результати серологічних досліджень сироватки**

**крові перепелів аматорських ферм України в 1998-2002 роках**

|  |  |
| --- | --- |
| Області | **Титри антитіл (log2) проти вірусів, що викликають** |
| **хворобу** **Марека** | **інфекційний бронхіт** | **інфекційний****ларинготрахеїт** | **хворобу Гамборо** | **енцефало-****мієліт** | **аденовірусну****інфекцію** | **реовірусну****інфекцію** |
| **Сумська** | 0 | **3,33±****0,39** | 0 | **4,5±****0,99** | 0 | 0,75±0,41 | **4,2±****1,33** |
| **Дніпропет-ровська** | 2,5±0,63 | 0,75±0,41 | 1,0±0,54 | 0,75±0,27 | **3,75**±**0,27** | 7,0 | 2,0 |
| **Полтавська** | 0 | 2,33±0,39 | 0 | 2,33±0,39 | 0 | 0 | 0 |
| **Донецька** | 1.5±0,63 | **4,6**±**0,39** | **3,0**±**0,72** | 1,67±0,39 | **4,0** | **3,0** | 0 |

Таким чином, дані серологічних досліджень дозволяють з’ясувати інфікованість перепелів та виявити випадки вірусоносійства за високим рівнем специфічних антитіл, що може бути критерієм оцінки благополуччя птахогосподарств у відношенні вірусних хвороб.

**Одержання первинних культур фібробластів**

 **перепелиних ембріонів (ФЕП)**

Перед нами стояло завдання відпрацювати метод отримання первинних клітинних культур із ембріонів перепелів різних термінів інкубації в порівнянні з отакими ембріонів курей, визначити їх культуральні властивості та чутливість до вірусів-збудників інфекційних хвороб птиці і ссавців.

 Були проведені експерименти відносно встановлення оптимального віку ембріонів перепелів для одержання первинної культури клітин. З цією метою вивчали морфологічні ознаки фізіологічного розвитку ембріонів перепелів та курей в порівняльному аспекті. Як відомо, перепели мають коротший інкубаційний період, ніж кури, в зв’язку з чим ми порівнювали періоди ембріонального розвитку курячих ембріонів, які найчастіше використовують у вірусологічних дослідженнях, з розвитком перепелиних ембріонів за макроскопічними морфологічними ознаками. Оптимальний для отримання культури клітин 10-11-добовий вік курячого ембріону відповідає у перепелиного 7,5-9-добовому.

Ми порівнювали також кількість клітин, одержаних із одного курячого та перепелиного ембріону, а також терміни росту та життєздатності культур клітин із цих ембріонів (табл. 4).

**Таблиця 4**

### Характеристика культур фібробластів

### за показниками кількості клітин, одержаних з ембріона,

### термінів росту та життєздатності

|  |  |
| --- | --- |
| **Показники (для перепелиних та курячих ембріонів)** | Вік ембріонів, діб |
| **7** | **8** | **9** | **10** | **11** |
| **Середній вихід клітин з одного ембріона,****млн. клітин** | **Перепелів** | 5-6 | 7-10 | 9-11 | 10-11 | 10-11 |
| **Курей** | - | - | 30-35 | 30-45 | 35-45 |
| **Термін форму-вання моношару клітин, год.** | **Перепелів** | 18-24 | 18-24 | 20-36 | 24-36 | 36-48 |
| **Курей** | - | - | - | 24-36 | 24-36 |
| **Термін життєздатності фібробластів перепелів, діб** | 8-9 | 9-11 | 10-12 | 10-12 | 8-9 |

Ми визначили тривалість основних фаз розвитку ФЕП.Фаза адаптації та логарифмічного росту тривала від 18 до 72 годин, стаціонарна – 5-10 діб, загибель клітин наставала через 8-12 діб без заміни середовища. При ролерному культивуванні моношар утворювався швидше, але й загибель клітин наставала раніше, ніж при стаціонарному методі культивування.

Ріст і формування моношару клітин залежали від посівної концентрації та їх проліферативної активності (табл. 5).

**Таблиця 5**

**Залежність терміну утворення моношару фібробластів із ембріонів перепелів та курей від посівної концентрації клітин**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Метод культиву-вання** | **Посівна концентрація,****тис. клітин/см2** | **Термін утворення** **моношару клітин, годин** |
| **ембріона перепелів** | **ембріона** **курей** |
| Ролерний | 200-400 | 16-20 | 24-48 |
| 100-200 | 24-48 | - |
| Стаціонарний | 700-1000 | - | 24-36 |
| 600-700 | 18-24 | 36-48 |
| 400-500 | 24-56 | - |
| 200-300 | 48-72 | - |

При ролерному вирощуванні термін формування моношару клітин був меншим, що обумовлено кращими умовами аерації в результаті почергових змін рідкої та газової фаз при обертанні флаконів або бутлів, навіть при меншій посівній концентрації.

Нами встановлено, що при висіві первинних клітин до 20-25% їх не прикріплюються на склі і зливаються при заміні живильного середовища. Проте, після осаджування цієї частини клітин центрифугуванням і наступному висіві їх у свіжому середовищі з додаванням 10-20% кондиційованого середовища дає можливість отримання додаткових культур фібробластів.

 Аналізуючи результати цих досліджень, можна стверджувати, що за культурально-морфологічними характеристиками первинні культури, одержані з перепелиних ембріонів, не поступаються аналогічним культурам, виготовленим з ембріонів курей. В той же час процес одержання та культивування фібробластів перепелів продуктивніший і економічніший. Про це свідчать отримані нами дані відносно використання ембріонів 8-9-добової інкубації (проти 10-11-добової ембріонів курей), тобто до появи пір’яних сосочків і формування кігтів, що в свою чергу забезпечує отримання чистих культур клітин. Фібробласти перепелів мають високу проліферативну активність, що дозволяє при застосуванні відповідної концентрації (200-300 тисяч клітин/см3) отримувати через 16-20 годин моношарову культуру, придатну для використання. Для одержання культури фібробластів необхідно брати у 1,5 разів більше ембріонів перепелів у порівнянні з ембріонами курей. Фактично тканин трьох ембріонів перепелів достатньо для одержання суспензії клітин для висіву у два 1,5-літрових матраси чи 3-літрових бутля.

**Вивчення чутливості первинної культури перепелиних фібробластів та перепелиних ембріонів до вірусів**

Перепелині ембріони та культуру фібробластів ембріонів перепелів інфікували вірусами-збудниками хвороб птахів і ссавців. Зокрема, культури клітин інфікували вірусом хвороби Марека, авіреовірусом, герпесвірусом індиків, вірусом ньюкаслської хвороби, хвороби Ауєскі та міксоматозу кролів, перепелині ембріони – вірусами хвороби Гамборо і Ауєскі, ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту.

Усі використані віруси викликали різну за характером прояву ЦПД, яку виявляли через різні проміжки часу в залежності від виду вірусу.

Так, ЦПД вірусів птахів проявлялась раніше, ніж у вірусів ссавців. Серед проявів ЦПД характерним було округлення клітин та їх відшарування, а також утворення симпластів (табл. 6).

У подальших дослідженнях було з’ясовано, що репродукція вірусів залежала від адаптації і рівня пасажів у первинній культурі фібробластів перепелів. Критерієм її оцінки служила інфекційна активність, яка визначалась методом титрування вірусів на культурі фібробластів ембріонів курей. Результати досліджень свідчать, що досить висока репродуктивна активність після третього пасажу спостерігалась у вірусу хвороби Ауєскі, інфекційність якого становила 5,8 lg ТЦД50/см3, у вірусу міксоматозу репродуктивна активність була менша – 4,4 lg ТЦД50/см3 .

**Таблиця 6**

 **Характер ЦПД в культурі ФЕП, інфікованій вірусами**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Віруси | Штам | Характерні ознаки ЦПД |
| **час появи перших ознак ЦПД** | **округлення клітин** | **формування симпластів** | **формування “бляшок”** | **термін повного відшарування клітин** |
| Хвороби Марека | Таганрог-2001 | 18-24 | + | - | +++ | 120 |
| **Авіреовірус** | К 72 | 18-24 | + | +++ | - | 48 |
| **Ньюкаслської хвороби** | La Sota | 24-36 | + | ++ | - | 72 |
| **Герпесвірус індиків** | FC 126 | 18-24 | + | +++ | - | 120 |
| **Хвороби Ауєскі** | В-82 | 48-60 | +++ | - | - | 96 |
| **Міксоматозу кролів** | УНДІЕВ 18”в” | 60-72 | +++ | - | - | 96 |

**Примітка**: - негативний результат;

+ ЦПД охоплювала не більше 25% клітин;

++ ЦПД охоплювала 25-50% клітин;

+++ ЦПД охоплювала до 75% клітин

Інфекційна активність вірусів-збудників хвороб птиці була приблизно однаковою і коливалась у межах 8,23-8,77 lg ТЦД50/см3при культивуванні в культурі ФЕП, а при культивуванні на перепелиних ембріонах - від 7,0 до 7,56 lg ЕЛД50/см3**.**

У процесі порівняльного вивчення чутливості ембріонів перепелів до вірусів-збудників хвороб ссавців (хвороби Ауєскі та міксоматозу кролів) і птиці (ньюкаслської хвороби та інфекційного бронхіту) показана можливість використання цього тест-об’єкту для виділення та культивування вказаних вірусів. Проте, виявлені ознаки ураження ембріонів перепелів не є характерними окремо для якихось із вірусів, в результаті чого необхідно проведення додаткових досліджень для їх ідентифікації в серологічних реакціях. У цьому відношенні використання ембріонів перепелів поступається культурі ФЕП, на якій віруси репродукуються з характерними для кожного вірусу цитопатичними змінами.

**ВИСНОВКИ**

1. За результатами серологічного моніторингу перепелів 16 птахогосподарств 8 регіонів України у 1998-2003 роках виявлена серопозитивність щодо збудників вірусних інфекцій птиці на 12 фермах, встановлена кореляція рівня специфічних антитіл і вірусоносійства, що є критерієм оцінки благополуччя птахогосподарств і можливості постачання інкубаційного яйця для отримання ембріонів і виготовлення з них первинних культур клітин. Випробувано метод одержання і культивування фібробластів ембріонів перепелів, визначена їх чутливість до вірусів різних родин.

2. В птахогосподарствах України, де виявлена серопозитивність перепелів, нестабільність епізоотичної ситуації з інфекційних хвороб обумовлена недодержанням вимог протиепізоотичних заходів та ізольованого утримання перепелів від інших птахів. Найвища інфікованість перепелів збудниками хвороб Марека, інфекційного бронхіту, інфекційного ларинготрахеїту, адено- та реовірусної інфекції реєструється на фермах Дніпропетровської, Сумської та Полтавської областей і Автономної Республіки Крим, в яких титри вірусоспецифічних антитіл досягають 4-8 log2.

3. Високий рівень вірусоспецифічних антитіл корелює з вірусоносійством. Титри специфічних антитіл від 3 log2 і вище свідчать про вірусоносійство, що підтверджується виділенням збудника ньюкаслської хвороби на ембріонах і первинних культурах клітин. У перепелів з невисокими титрами специфічних антитіл (1-2 log2) віруси не виділені.

4. Для виготовлення первинної культури клітин придатні 7-9-добові ембріони перепелів, які за морфологічними показниками онтогенетичного розвитку відповідають 10-11-добовим ембріонам курей. Використання трьох ембріонів перепелів забезпечує вихід такої ж кількості клітин, як із одного ембріона курей (30-35 мільйонів клітин) і достатнє для висіву у два 1,5-літрових матраси при стаціонарному або два 3-літрових бутля при ролерному культивуванні.

5. Посівна концентрація клітин із ембріонів перепелів 200-300 і 400-500 тисяч на 1 см3 живильного середовища забезпечує формування за 18-24 години суцільного моношару при ролерному (у флаконах та бутлях) і стаціонарному (у матрасах і пробірках) культивуванні, відповідно. Зменшення посівної концентрації збільшує термін формування моношару клітин. До 20-25% висіяних клітин не прикріплюються до поверхні скла, а застосування способу “зливів клітин” у 2-3 рази підвищує ефективність використання трипсинізованої тканини ембріонів перепелів.

6. Первинна культура клітин, що виготовлена з тканин ембріонів перепелів 7-9-добової інкубації, складається з веретеноподібних клітин з короткими цитоплазматичними відростками, з округлими ядрами, розміщеними в центрі клітин, і за морфологічними ознаками не відрізняється від культури фібробластів ембріонів курей. Термін життєздатності культури клітин при одноразовій заміні середовища становить 10-12 діб.

7. Перепелині ембріони чутливі до вірусів хвороб птиці (ньюкаслської, інфекційного бронхіту, інфекційного ларинготрахеїту) та хвороби Ауєскі. При культивуванні збудників хвороби Ауєскі, інфекційного бронхіту та ларинготрахеїту у ембріонів спостерігають відставання у рості та розвитку і крововиливи на шкірі. Інфікування вірусом ньюкаслської хвороби викликає загибель ембріонів та накопичення його в екстраембріональній рідині у титрі до 6,56 lg ЕЛД50, що нижче, ніж на культурі фібробластів перепелів, на 0,67-1,77lg.

8. Культура фібробластів перепелів чутлива до вірусів - збудників хвороб птиці (Марека, ньюкаслської, герпесвірусу індиків та авіреовірусу) та ссавців (міксоматозу кролів та хвороби Ауєскі), репродукція яких відбувається з появою характерних цитопатичних змін, забезпечує накопичення біомаси з титром інфекційної активності на третьому пасажі вірусу хвороби Ауєскі – 5,8 lg ТЦД50/см3 , міксоматозу – 4,4 lg ТЦД50//см3 , ньюкаслської хвороби - 8,77 lg ЕЛД50/см3.

**ПРОПОЗИЦІЇ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА**

На підставі проведених досліджень і отриманих результатів розроблені “Методичні рекомендації по одержанню первинної культури фібробластів ембріонів перепелів для ізоляції і культивування вірусів”, які затверджені Вченою радою Харківської державної зооветеринарної академії і пропонуються для використання на біопідприємствах і спеціалізованих лабораторіях ветеринарної медицини.

Методики одержання та інфікування первинних культур фібробластів ембріонів перепелів використовуються у навчальному процесі на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології ХДЗВА, кафедрі біотехнології і ветеринарного менеджменту Полтавської ДАА та на кафедрі вірусології, патанатомії і ветсанекспертизи Сумського НАУ.

**Список робіт, опублікованих за темою дисертації**

1. Данілов О.О., Педан В.А., Гарагуля Г.І., Панікар Іг.Іг. Епізоотична ситуація з інфекційних хвороб перепелів в світі і в Україні// Вісник Сумського ДАУ. Вип. 4.- Суми, 1999.- С. 57-60

*Дисертантка провела аналіз літературних джерел з розповсюдження вірусних хвороб перепелів у світі*

1. Панікар І., Тимченко І., Семіняченко С., Гарагуля Г. Показники вакцинних титрів антитіл проти ньюкаслської хвороби птиці на фоні профілактики бактеріозів// Вет. медицина України.- 2000.- №4.- С. 28

*Дисертантка відібрала матеріал та провела серологічні дослідження сироватки крові перепелів проти вірусу ньюкаслської хвороби*

1. Гарагуля Г.І. Вірусні хвороби перепелів: дані про перебіг в виробничих умовах і при експериментальному зараженні// Птахівництво: Міжвідом. темат. наук. зб. Вип. 51: За матеріалами ІІІ Української конф. по птахівництву з міжнар. участю.- Борки, 2001.- С. 515-519
2. Головко В.О., Гарагуля Г.І. Інфекційні хвороби перепелів: ситуація в світі та динаміка розвитку// Проблеми зооінженерії та вет. медицини: Зб. наук. праць, присвячений 150-річчю від дня заснування ХЗВІ. Вип. 9 (33). Ч. 1.- Х., 2001.- С. 108-111

*Дисертантка підібрала і проаналізувала літературні джерела, провела серологічні дослідження і узагальнила результати*

1. Панікар Іг.Іг., Гарагуля Г.І. Хвороби перепелів вірусної етіології та їх перебіг в деяких областях України і автономній республіці Крим// Наукові праці Полтавської держ. аграр. академії. Т.2 (21): Вет. науки.- Полтава, 2002.- С. 194-195

Дисертантка проводила епізоотологічне обстеження перепелиних ферм 8 регіонів України та узагальнила результати досліджень

1. Гарагуля Г.І., Морозова І.Я. Застосування культур клітин з перепелиних ембріонів як біологічних систем для культивування вірусів// Вісник Сумського нац. агарар. ун-ту: Науково-метод. журнал. Сер. “Вет. медицина”. Вип. 8.- Суми, 2002.- С. 17-20

Дисертанткою проведені дослідження щодо випробування методик виготовлення культур клітин та використання одержаних культур клітин для індикації вірусів

1. Гарагуля Г.І., Панікар Іг.Іг. Перепелівництво в країнах світу і напрямки вивчення вірусних хвороб перепелів// Вісник Сумського нац. аграр. ун-ту: Науково-метод. журнал. Вип. 7.- Суми, 2002.- С. 23-25

Дисертантка провела аналіз даних літератури та написала основні положення статті

1. Панікар І.І., Панікар Іг.Іг., Гарагуля Г.І. Забезпечення біобезпеки птахівничих ферм і санітарної якості продукції птахівництва// Межрегиональные проблемы экологической безопасности: Междунар. симпозиум: Сб. трудов.- Сумы, С.-Петербург, 2003.- С. 349-352

Дисертантка провела аналіз даних літератури та написала основні положення статті

1. Морозова И.Я., Гарагуля Г.И. Использование перепелиных эмбрионов для клеточной культуры// Вет. медицина: Міжвідом. темат. наук. зб. Вип. 81.- Х., 2003.- С. 218-221

Дисертантка провела дослідження по одержанню культур клітин з ембріонів перепелів та вивченню їх біологічних властивостей

1. Гарагуля Г.І. Первичная культура клеток фибробластов эмбрионов перепелов: получение и биологические свойства// Наукові праці Кримського держ. агротехнологіч. ун-ту. Вип. 79.- Сімферополь, 2003.- С. 31-35

**Гарагуля Г. I. СЕРОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ ПЕРЕПЕЛІВ ЩОДО ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ ТА ВИКОРИСТАННІ КУЛЬТУР КЛІТИН. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія.

 Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН, м. Харків, 2004.

 Дисертація присвячена вивченню інфікованості вірусами перепелів та можливості використання інкубаційного яйця для одержання ембріонів і виготовлення з них первинних культур клітин для культивування вірусів різних родин. Проведено серологічний моніторинг вірозів перепелів 16 ферм 8 регіонів України і встановлена пряма кореляція між серопозитивністю та вірусоносійством. Показано, що інфікованість вірусами-збудниками хвороб ряду курячих залежить від умов утримання і контакту з поголів’ям інших видів птиці. При ізольованому утриманні перепелів титри противірусних антитіл в їх сироватці коливались від 0 до 2 log2 та відсутнє вірусоносійство, що дозволяє вважати їх благополучними. Інкубаційне яйце з цих господарств можна використовувати для інкубації та виготовлення з ембріонів первинних культур клітин. В разі утримання перепелів з іншими видами птиці можливе їх інфікування вірусами, що підтверджується високими титрами противірусних антитіл (від 3 до 9 log2) та виділенням вірусу ньюкаслської хвороби від перепелів одного з господарств. Це свідчить про непридатність інкубаційного яйця перепелів цих господарств для використання з біотехнологічною метою. Випробувано методи одержання первинних культур фібробластів перепелиних ембріонів і встановлено, що переваги має модифікована методика, при якій у 7-9-добових ембріонів видалялась тільки голова. Клітини, що отримані із тканин ембріонів, були морфологічно однорідними та мали високу проліферативну активність. Оптимальна посівна концентрація клітин при ролерному методі культивування становить 200-300 тисяч клітин в 1 см3, а при стаціонарному – 500-700 тисяч. Моношар за таких умов формується у найкоротший термін – за 24-48 годин. Ролерний метод культивування дозволяє отримати з одного ембріона в 1,8 рази більшу кінцеву концентрацію клітин із розрахунку на одиницю об’єму живильного середовища у порівнянні з матрасами. З’ясовано можливість застосування первинних культур фібробластів перепелиних ембріонів для культивування вакцинних і польових штамів вірусів птиці і ссавців. Штами вірусів викликали характерну для кожного цитопатогенну дію через 24-72 годин після інфікування.

**Ключові слова:** перепели, серологічний моніторинг, титри противірусних антитіл, ембріони, первинні культури фібробластів, інфікування вірусами.

**Гарагуля Г.И. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПЕРЕПЕЛОВ ОТНОСИТЕЛЬНО ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПРИ ПРИГОТОВЛЕНИИ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК. Рукопись**

*Диссертация на соискание научной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология*

Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН, г.Харьков, 2004

Диссертация посвящена изучению инфицирования вирусами перепелов птицехозяйств и возможности использования инкубационных яиц для получения эмбрионов, приготовления из них первичных культур клеток и использования их при культивировании и изоляции вирусов различных семейств. Проведен серологический мониторинг вирозов перепелов на 16 фермах восьми регионов Украины и установлена прямая корреляция между серопози-тивностью и вирусоносительством. Установлено, что на фермах трех областей Украины где перепела содержались отдельно от других видов птицы, титры противовирусных анитител в сыворотке их крови колебались то 0 до 2 log2, что свидетельствует о благополучии этих ферм. Инкубационное яйцо из этих хозяйств можно использовать для получения эмбрионов и культур клеток из них в вирусологических исследованиях. Совместное содержание перепелов с другими видами птицы может привести к инфицированию вирусами, что подтверждено высокими титрами противовирусных антител (от 3 до 9 log2) и выделением вируса ньюкаслской болезни от перепелов одного из хозяйств. Это свидетельствует о непригодности инкубационного яйца из таких хозяйств для использования с биотехнологической целью. Апробированы методы получения первичных культур фибробластов перепелиных эмбрионов и установлено, что преимущества имеет модифицированная методика, при которой у 7-9-суточных эмбрионов удалялись только головы. Культуры, полученные из тканей эмбрионов, были морфологически однородными и имели высокую пролиферативную активность. Оптимальная посевная концентрация при роллерном методе культивирования была 200-300 тысяч клеток в 1 см3 взвеси, а при стационарном – 400-500 тысяч. Монослой клеток при таких условиях формируется в наиболее короткие сроки – за 24-48 часов. Роллерный метод культивирования позволяет получать от одного эмбриона в 1,8 раза большую концентрацию клеток из расчета на единицу объема питательной среды в сравнении с матрасами. Выяснена возможность применения первичных культур фибробластов перепелиных эмбрионов для культивирования вакцинных и полевых штаммов вирусов птиц (вируса болезни Марека, ньюкаслской болезни, герпесвируса индеек, авиреовируса) и млекопитающих (вирусы миксоматоза кроликов и болезни Ауески). Все вирусы вызывали в культуре клеток цитопатогенное действие, характер и сроки развития которого зависели от вида вируса. Вирусы птиц вызывали ЦПД через 18-36 часов, и его характер был идентичен изменениям в культуре фибробластов куриных эмбрионов. Вирусы млекопитающих приводили к деструкции и отслоению клеток через 48-72 часа после инфицирования. Перепелиные эмбрионы чувствительны к вирусам болезни Ауески, ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита и ларинготрахеита, но титры репродуктивной активности этих вирусов при инфицировании эмбрионов, ниже, чем при культивировании их в культуре клеток на 0,67-1,77 lg.

**Ключевые слова:** перепела, серологический мониторинг, титры противовирусных антител, культура фибробластов эмбрионов перепелов, инфицирование вирусами.

**Garagulya G.I. Serological monitoring of quails to virology infection FOR PREPARATION AND USE CELL CULTURES. – The manuscript.**

*Thesis for degree of Candidate of Science ( Veterinary Medicine), Speciality 16.00.03 – Veterinary microbiology and virology.*

The Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov, 2004.

Thesis is dedicated to the investigation of epizootologic features of viral diseases of quails. There have been carried out serological monitoring of viral diseases of quails on different farms various regions of Ukraine. There have been determinated the relation of seropositive quails and during keeping them with other species of birds. It was established that on the three regions of Ukraine the quails were isolated from other birds. On these farms of the titer antiviral antibodies were from 0 to 1:8 and designated that on these farms there were no viral diseases. This allows to use of quail embryos for preparation and use of the culture cells in virological investigations. We have investigated various methods of obtaining the initial fibroblast cell culture from embryos and established that modified methods is the best. Cell cultures were made from 8-10-days old quail’s embryos but only without heads. The initial fibroblast cell culture were morphologically identical and had high mitotic activity. The sowing concentration of cells in roller method composed 200-300 thousand cells in 1 ml and 500-700 thousand in stationary method. The monocellular layer was forming in a short them - from 18 to 48 hours. The roller methods allow to obtain from one embryo in 1,8 times higher of area monolayer of cells. We have studied and established that the initial fibroblast cell culture may be used for the cultivation of various viruses of animals. The strains of viruses had citopathological effect on the fibroblast cell cultures over 24-72 hours after they have been infected.

**Key words**: quail, serological monitoring, titer of antiviral antibody, embryo’s fibroblast cell culture, infected of virus.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>