

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ КЛЕЩА *Dermacentor marginatus*

© 2019 г. Н. И. Римиханов¹, Е. Ю. Эпова², А. В. Белякова², А. А. Лебедева³,
Е. С. Мутных³, Ю. К. Бирюкова⁴ *, М. В. Зылькова⁴, А. В. Шибаева², Е. В. Трубникова⁴,
Д. А. Каратаева⁵, Р. М. Акбаев⁵, Я. Я. Тыньо⁵, Б. К. Лайпанов⁵

¹Московский государственный университет пищевых производств,
кафедра ветеринарной медицины, Москва, 125080 Россия

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

³Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

⁴Курский государственный университет, научно-исследовательская лаборатория “Генетика”, Курск, 305000 Россия

⁵Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина,
кафедра паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы, Москва, 109472 Россия

*e-mail: biriukova-ula@mail.ru

Поступила в редакцию 30.01.2019 г.

После доработки 11.02.2019 г.

Принята к публикации 26.02.2019 г.

В связи с изменением общей экологической обстановки в России в последние годы резко увеличилось потери животноводства от анаплазмоза овец. В связи с этим обострилась проблема получения вакцины против этого заболевания. Перевиваемая культура клеток клеща может служить удобным субстратом для наработки биомассы возбудителя анаплазмоза овец *Anaplasma ovis* в промышленных условиях с целью ее использования в производстве культурально-клеточной инактивированной вакцины. Путем культивирования гомогената яиц на модифицированной среде Лейбовица L15 получена перевиваемая клеточная линия пастбищного клеща *Dermacentor marginatus* – основного резервуарного хозяина *A. ovis*. Линия DM-77 имеет дедифференцированный фенотип: клетки округлые, с крупными ядрами и выраженными ядрышками. К моменту окончания работы линия выдержала восемь пассажей, не проявляя признаков потери скорости роста. При культивировании на среде с содержанием фетальной сыворотки 10% при 32°C время удвоения числа клеток составило 2.8 ± 0.3 сут.

Ключевые слова: клещ, анаплазмоз овец, перевиваемая культура, клеточная линия, *Anaplasma ovis*, *Dermacentor marginatus*.

DOI: 10.1134/S0016675819080125

Актуальность работы обусловлена тем, что в связи с изменением климата в последние два года на территории Северо-Кавказского и Южного федеральных округов наблюдается резкое увеличение заболеваемости мелкого рогатого скота анаплазмозом овец [1]. Он представляет собой хроническое заболевание, которое может наносить значительный экономический ущерб из-за снижения продуктивности овец по молоку и мясу. Ранее летальные исходы от анаплазмоза овец в острой фазе встречались в виде исключений, однако в последние годы отмечают неуклонное повышение смертности инфицированных животных, достигающее до 80%. Гибель животных обусловлена анемией и анорексией [2]. Возбудителем болезни является внутриклеточный паразит группы эрлийий *Anaplasma ovis* (порядок Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae), переносчиком которой является пастбищный клещ *Dermacentor marginatus* [3]. Патологическая картина при анаплазмозе связана с

разрушением эритроцитов и нарушением эритропоэза. Степень зараженности эритроцитов, как правило, колеблется в диапазоне 3–40%, но может достигать 80%.

По данным департамента животноводства и племенного дела минсельхоза РФ, в настоящее время поголовье овец в Российской Федерации превышает 24 млн голов. Около 70% поголовья сосредоточено в Северо-Кавказском федеральном округе (свыше 9 млн голов) и Южном федеральном округе (более 6 млн голов). Наиболее крупными субъектами Федерации, в которых сосредоточено поголовье овец, являются Дагестан (более 5 млн голов), Ставропольский край (2.3 млн голов), Республика Калмыкия (2.3 млн голов), Астраханская область (1.4 млн голов), Карачаево-Черкесская республика (1.3 млн голов), Республика Тува (1.2 млн голов), Волгоградская область (0.9 млн голов). В последние годы анаплазмоз крупного рогатого скота зарегистрирован на

27 территориях субъектов Федерации, в частности в Брянской, Смоленской, Калужской, Тверской, Рязанской, Владимирской, Московской, Пензенской, Оренбургской, Ульяновской, Курганской, Новосибирской, Калининградской областях, Республике Башкортостан, Алтайском крае, Анапласмоз овец регистрируют в Дагестане, Ставропольском и Краснодарском краях, Саратовской, Калужской и Нижегородской областях, Республике Марий Эл. Одной из значимых целей Приоритетного направления развития науки, технологий и техники в Российской Федерации “Науки о жизни” является решение вопросов защиты сельскохозяйственных животных. Развитие технологий производства вакцин – одно из наиболее действенных элементов государственной политики в части повышения конкурентоспособности отечественного животноводства. Дело в том, что само по себе производство вакцин затратно на стадии разработки и испытаний и редко обеспечивает высокую рентабельность производителю. Испытания новых вакцин, как правило, занимают многие годы и даже десятилетия, связаны с риском распространения возбудителя из лабораторий. Однако отдача от применения вакцин в животноводстве огромна, так как вакцинация является единственным действенным методом предотвращения массовых вспышек инфекционных заболеваний, особенно вирусной природы, против которых неэффективны медикаментозные средства лечения.

Промышленный выпуск вакцины для борьбы с анапласмозом в нашей стране не налажен, хотя имеется публикация, описывающая экспериментальный дизайн такой вакцины [4]. На практике профилактика этого заболевания основана на борьбе с механическими переносчиками возбудителя *A. ovis* – клещами и кровососущими насекомыми. Учитывая эпизоотическую ситуацию по анапласмозу крупного рогатого скота в РФ, где заболевания регистрируют в виде отдельных очагов, для его профилактики предлагается разработать отечественную технологию производства инактивированной культуральной вакцины против анапласмоза овец. Разработка вакцины против анапласмоза овец является редким примером, когда создание и испытание новой вакцины возможно провести в короткий срок и при невысоких затратах. Это объясняется доказанной высокой защитной и технологической эффективностью ряда ранее разработанных вакцин, основанных на использовании природного антигена – инфицированных паразитом эритроцитов овец [4]. Очевидно, что наличие эффективной отечественной технологии производства вакцины против анапласмоза на основе культуры клеток резервуарного хозяина *A. ovis* позволит в короткий срок произвести и испытать новую вакцину, не создавая риска распространения инфекционного агента. Результат испытаний будет реги-

стрироваться в форме прекращения распространения анапласмоза, риск падежа поголовья при этом полностью отсутствует. Реализация целей такой работы способна внести вклад в повышение конкурентоспособности отечественных производителей ветеринарных вакцин и повышение эффективности отечественного овцеводства.

В связи с изложенным целью работы было создано клеточной линии клеща *D. marginatus*, которая служила бы в качестве клеточного субстрата *A. ovis* для наработки биомассы внутриклеточного паразита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор и определение клещей. Напитавшиеся самки клеща *D. marginatus* были собраны в Грачевском районе Ставропольского края в мае 2018 г., как описано ранее [5]. Их помещали в стерильные стеклянные пробирки, закрытые ватно-марлевыми пробками, термостатируемые при 28°C, и в течение 2–3 сут ожидали откладки яиц.

Отложенные самками клещей яйца в течение 1–6 ч использовали для получения перевиваемых клеточных культур.

Культуральные среды и добавки к ним. Для получения и поддержания клеточных линий *D. marginatus* использовали среду Лейбовица L15 (Life Technologies, США), модифицированную согласно Munderloh и Kurtti [6]: в среду L15 добавляли дополнительно глюкозу, органические кислоты, витамины, минеральную добавку и аминокислоты. После стерилизации к 3 объемным частям среды L15 добавляли 1 часть деионизованной воды культурального качества, 10% конечного объема фетальной сыворотки (Hyclone), 5% от конечного объема триптозофосфатного бульона (BD Biosciences, США), 0.1%-ный концентрат бычьего липопротеина с холестерином (MP Biomedical, США), NEPER до 10 мМ и NaHCO₃ до 1 мМ; pH доводили до 7.1 с помощью 1 М стерильного раствора NaOH.

Получение клеточной культуры. Поверхность яиц *D. marginatus* из единичной кладки стерилизовали, промывая их в течение 3 мин в растворе 0.5%-ного гипохлорита натрия, свежеприготовленного на растворе состава: твин-80 – 0.5%, бензалкония хлорид 0.5%, этанол 70%. Затем стерилизующий раствор сливали и промывали яйца 3 раза стерильной деионизованной водой. Воду тщательно удаляли и вносили 200 мкл культуральной среды.

Яйца осторожно гомогенизировали, как описано [7], разрушали в полипропиленовой пробирке с помощью пестика (Kimble Chase, США), стараясь нарушить целостность хориона, но не повредить клетки. Гомогенат переносили в плоскостенную культуральную пробирку Nunclon с площадью ра-

бочей поверхности 5.5 см^2 и герметичной пробкой (Thermo Fisher Scientific, США), содержащую 500 мкл среды, 100 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ОАО Борисовский завод медицинских препаратов, Белоруссия). Объем сред доводили до 2 мл и инкубировали пробирку в термостате при 32°C . Смену среды проводили 1–2 раза в неделю или в случае резкого падения рН, наблюдаемого по изменению цвета индикатора фенолового красного.

Исследования морфологии клеток с помощью конфокальной микроскопии. Конфокальные флуоресцентные изображения живых клеток культуры *D. marginatus* получали после окрашивания клеток красителями Dihydrorhodamine 123 (Sigma-Aldrich, США), специфичным к митохондриям, и Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, США), специфичным к хроматину ядра. Клетки инкубировали в бессывороточной среде с 1 мкМ Dihydrorhodamine 123 и Hoechst 33342 в течение 1 ч, затем удаляли краситель, трижды промывали фосфатным солевым буфером рН 7.2, инкубировали в течение 3 ч в среде DMEM с 5% телячьей фетальной сывороткой и получали изображения с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SPE 5 (Германия), используя лазеры с длиной волны испускания 488 и 405 нм. Регистрация флуоресценции Dihydrorhodamine 123 – Ex488 нм/Em510–570 нм, а Hoechst 33342 – Ex405 нм/Em415–470 нм.

Исследования скорости роста культур. С целью проведения пересева ростовую среду тщательно удаляли с поверхности монослоя, трижды промывая его стерильным фосфатно-солевым раствором. К клеткам добавляли 1 мл 0.25%-ного раствора трипсина-ЭДТА (Life Technologies, США) на плоскостенную пробирку Nunclon, выдерживали в течение 10 мин при 32°C , что приводило к отсоединению клеток от пластиковой подложки. Действие трипсина останавливали, добавляя 2–3 мл свежей модифицированной ростовой среды Лейбовица L15. Клетки, полученные из одной пробирки с площадью рабочей поверхности 5.5 см^2 , распределяли по трем таким же чистым пробиркам, создавая плотность клеток в момент засева 3.5×10^5 ф. о. е./мл. Засеянные пробирки помещали в термостат при температуре 32°C . Смену среды проводили 1 раз в 3 сут. С 24-го часа после засева и до момента достижения слитности (конфлюэнтности) монослоя проводили подсчет числа клеток в 10 случайно выбранных полях из каждой пробирки с применением фазово-контрастного микроскопа. На основании этих подсчетов определяли число клеток в каждой пробирке на каждые сутки после высева.

Определение кариотипа клеток. В клеточной культуре, находящейся в логарифмической фазе роста (4–5-е сут после пересева), проводили смену

среды на свежую, содержащую 12.5 мкМ колхицина (в качестве исходного использовали коммерчески доступный раствор колхицина с концентрацией 0.125 мМ, ООО Биолот, Россия) и инкубировали при 32°C в течение 24 ч. Клетки собирали с подложки путем обработки 0.25%-ным трипсином, как описано выше, осаждали центрифугированием при 300 g в течение 10 мин, суспендировали в 4 мл 75 мМ KCl и инкубировали при 32°C в течение 1 ч. После обработки клетки вновь осаждали центрифугированием при 300 g в течение 10 мин и суспендировали в фиксирующем растворе метанол–уксусная кислота в соотношении 3 : 1. Клетки осаждали центрифугированием, суспендировали в свежем фиксирующем растворе и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

Клетки осаждали центрифугированием в третий раз и суспендировали в 200 мкл свежего фиксирующего раствора, наносили на охлажденные до -20°C предметные стекла и высушивали на воздухе.

Для специфического выявления районов ядрышковых организаторов использовали метод дифференциальной окраски хромосом нитратом серебра, предложенный Howell и Black [8], с некоторыми модификациями [9]. На препарат под каждое покровное стекло наносили 50 мкл бидистиллированной деионизированной воды, 150 мкл 50%-ного раствора нитрата серебра и 100 мкл коллоидного проявляющего раствора (2%-ный раствор желатина в 0.1%-ном растворе муравьиной кислоты) и инкубировали во влажной камере в термостате при температуре $56.7\text{--}60^\circ\text{C}$ 40–60 мин. После промывки под струей проточной воды каждый препарат высушивали. Мазки заливали 3.2%-ным красителем Гимза в буфере Соренсона, рН 6.8, и выдерживали в течение 60 мин при 37°C . Микроскопирование препаратов проводили с помощью фазово-контрастного микроскопа Zeiss (увел. окуляра 10, увел. объектива 90) с масляной иммерсией. Подсчет числа хромосом проводили в 100 клетках каждого препарата.

Методы статистического анализа. Для оценки достоверности скорости роста клеточных культур использовали непараметрические методы статистического анализа: расчет медианы признака, интерквартильных интервалов, минимального и максимального значений [10]. При обработке качественных показателей вычисляли: размер выборочной доли в процентах и ошибку выборочной доли. При сравнении двух независимых групп были использованы непараметрический критерий Манна–Уитни и точный критерий Фишера [10]. В случае отклонения нулевой гипотезы и принятия альтернативной ($p < 0.05$) проводили попарное сравнение групп с использованием непараметрического теста Манна–Уитни, применяя поправку Бонферрони при оценке значения p .

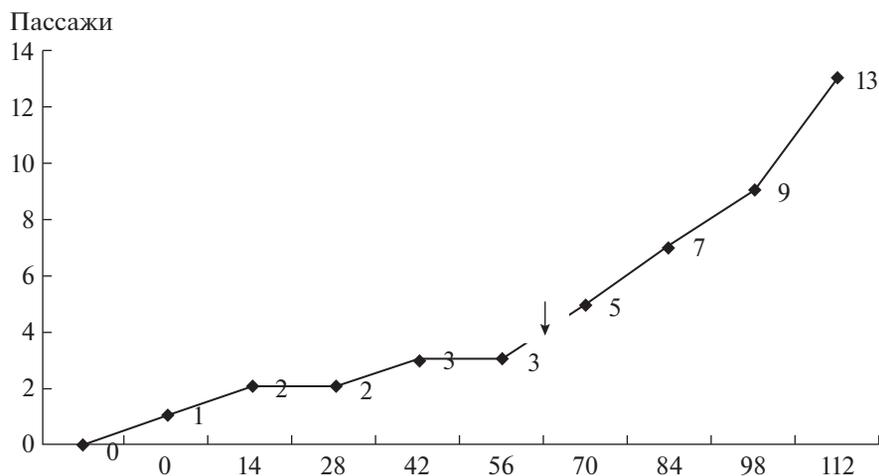


Рис. 1. Характеристика скорости роста первичных культур и полученной из них иммортализованной культуры DM-77. На диаграмме показано число пассажей (ось ординат) в зависимости от общего числа дней с момента начала эксперимента (ось абсцисс). Стрелкой отмечен момент, когда было проведено объединение наиболее быстрорастущих адгезионных культур по 3–4 и получено четыре смешанных культуры, которые были проведены через четыре дополнительных пассажа. Хорошо видна гибель большинства первичных культур вследствие исчерпания потенциала клеточного деления при проведении пассажей 2 и 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение и характеристика первичных клеточных культур

В результате высева гомогенатов 12 независимо полученных кладок *D. marginatus* было получено 44 независимых первичных культуры. При этом было установлено, что для инициации роста на площади рабочей поверхности 5.5 см² необходимо использовать гомогенат не менее 30 эмбрионов: при меньшей дозе высева рост адгезионной культуры не начинался. Использование CO₂-инкубатора не требовалось, так как пробирки имели герметичные пробки. Через 24 ч после первичного высева клетки прикреплялись к поверхности пластика, не образуя агрегатов или скоплений. Большинство клеток в первичных культурах имели округлую форму, крупное активное ядро с большим числом ядрышек и не имели признаков дифференциации. Основная часть эмбриональной ткани *D. marginatus* не прикреплялась к поверхности пластика и скапливалась на дне пробирок. Однако по ходу инкубации из них мигрировали отдельные клетки, которые занимали место на поверхности подложки. В отличие от первоначально прикрепившихся клеток, клетки, вышедшие из эмбриональной ткани с задержкой в 24–72 ч, имели дифференцированный фенотип. Большинство из них имели веретеновидную форму и небольшое ядро. Такие клетки можно классифицировать как фибробластоподобные. Существенно меньшая доля клеток имела плоскую чешуевидную форму. Эти клетки проявляли склонность к образованию контактов друг с другом и были классифицированы как эпителиальные. Наряду с этими

двумя основными типами встречались единичные клетки нетипичной морфологии. Среди них выделялись клетки нейронального типа (с одним длинным выростом) и железистого типа (бокаловидной формы). Аналогичная картина на этой стадии для первичных культур медоносной пчелы *Apis mellifera* ранее описывалась в работе [11].

Отбор линий, способных к длительному автономному росту

Первичные линии, полученные при высева гомогенатов эксплантов, достигли конfluenceности через 14–17 сут. После этого их снимали с подложки путем обработки 1%-ным трипсином в растворе Версена и пересевали в чистые пробирки Nunclon. Доза засева составляла 1/10 часть от исходного количества. По описанной схеме было проведено четыре пассажа длительностью 7–14 сут каждый. Пересев производили при достижении культурой конfluenceности 80–90%. После этого 31 первичная культура из 44 утратила или существенно снизила способность к росту. Оставшиеся 13 культур имели сходную морфологию: состояли из однотипных округлых клеток дедифференцированного фенотипа. Изменение суммарной скорости роста культур представлено на рис. 1.

Поскольку оставшиеся культуры показывали тенденцию к замедлению роста при каждом следующем пассаже (рис. 1), было проведено объединение их по 3–4 в равных долях по числу клеток. В результате было получено четыре смешанных культуры, которые были проведены через четыре дополнительных пассажа. В результате была получена одна культура, не показавшая тенденции к

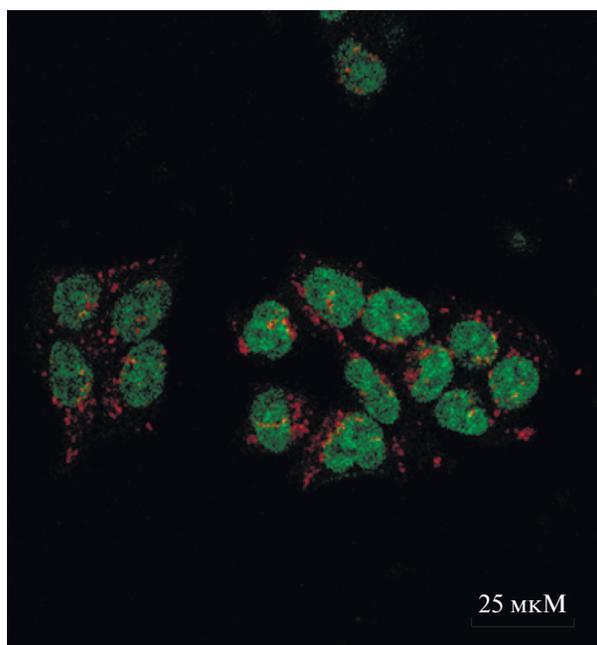


Рис. 2. Исследование морфологии клеточной линии DM-77 методом конфокальной микроскопии. Показана колокализация митохондриального маркера Dihydrorhodamine 123 (Ex488/Em510–570, красный цвет) в живых клетках линии DM-77. Ядра окрашены Hoechst 33342 (Ex405 нм/Em415–470 нм, зеленый цвет). Съемку проводили через 3 ч после инкубации с красителем (1 мкМ, 1 ч).

замедлению скорости роста (рис. 1). Она получила обозначение DM-77 и была подвергнута детализованному исследованию.

Культуральная и морфологическая характеристика клеточной линии DM-77

Для линии DM-77 была определена максимальная скорость роста, достигавшаяся при разбавлении культуры, полученной после снятия монослоя с конфлюэнтностью 80% с подложки и разбавлении ее свежей средой в 3 раза. При культивировании на среде с содержанием фетальной сыворотки 10% при 32°C время удвоения числа клеток составило 2.8 ± 0.3 сут.

Морфология клеток, находящихся в максимально активной фазе роста, была исследована методом конфокальной микроскопии (рис. 2). Было установлено, что они сохраняют округлую форму и полностью дедифференцированный фенотип с крупным метаболически активным ядром.

Для клеток был определен кариотип и митотический индекс [12]. Для этого клетки в течение 40 мин обрабатывали 0.125 мМ колхицином в гипотоническом растворе KCl. При обработке ~4000 клеток было установлено, что клетки, находящиеся в процессе митоза или имевшие хорошо различимые хромосомы, составляли $1.2 \pm 0.2\%$. Все проанализированные клетки имели по 28 хромосом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточные линии клещей давно используются для выделения облигатных внутриклеточных бактериальных паразитов, имеющих медицинское и ветеринарное значение [13, 14]. Так, эмбриональная клеточная линия ISE6 из североамериканского клеща *Ixodes scapularis* обладает высокой перmissивностью по отношению ко многим внутриклеточным эндосимбионтам. Она была использована для выделения переносимых клещами представителей рода *Rickettsia* [15–25].

Полученная нами клеточная линия DM-77 обладает высокой скоростью роста, превышающей показатели линии ISE6. Таким образом, в дальнейшем она может быть испытана в качестве субстрата для заражения возбудителем *A. ovis* и наработки его биомассы, которая затем может использоваться для производства инактивированной культурально-клеточной вакцины.

Работа выполнена при поддержке субсидии министерства науки и высшего образования РФ по Соглашению № 074-11-2018-017 от 29 мая 2018 г.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Логвинов А.Н., Тохов Ю.Г., Луцук С.Н. Обработка пастбищ против иксодовых клещей // Вестн. АПК Ставрополя. 2014. Т. 4. № 16. С. 115–117.
2. Логвинов А.Н., Михайленко В.В., Луцук С.Н. Морфологические изменения в плаценте овец при анаплазмозе // Вестн. АПК Ставрополя. 2013. Т. 3. № 11. С. 142–145.
3. Carelli G., Decaro N., Lorusso A. et al. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR // Vet. Microbiol. 2007. V. 124. № 1–2. P. 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.022>
4. Георгиу Х.Г. Разработка способа получения анаплазменного антигена для серологической диагностики анаплазмоза овец // Ветеринария и кормление. 2013. № 6. С. 30–34.
5. Волцит О.В., Павлинов И.Я. Изменчивость формы гнатосомы взрослых особей трех видов рода *Dermacentor* (Ixodidae) // Паразитология. 1995. Т. 29. № 4. С. 199.
6. Munderloh U.G., Kurtti T.J. Formulation of medium for tick cell culture // Exp. Appl. Acarol. 1989. № 7. P. 219–229. <https://doi.org/10.1007/BF01194061>
7. Goblirsch M.J., Spivak M.S., Kurtti T.J. A cell line resource derived from honey bee (*Apis mellifera*) embryonic tissues // PLoS One. 2013. V. 8. № 7. e69831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069831>
8. Howell W.M., Black D.A. A rapid technique for producing silver-stained nucleolus organizer regions and trypsin-giemsa bands on human chromosomes // Hum. Genet. 1978. V. 43. № 1. P. 53–56. <https://doi.org/10.1007/BF00396478>
9. Ляпунова Н.А., Еголина Н.А., Вейко Н.Н. и др. Ядрышкообразующие районы (ЯОР) хромосом человека: опыт количественного цитологического и молекулярного анализа // Биологич. мембраны. 2001. Т. 18. № 3. С. 189–199.
10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2003. 312 с.
11. Bergem M., Norberg K., Aamodt R.M. Long-term maintenance of in vitro Cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells // BMC Dev. Biol. 2006. № 6. P. 17. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-17>
12. Brito R.M., Oldroyd B.P. A scientific note on a simple method for karyotyping honey bee (*Apis mellifera*) eggs // Apidologie. 2010. V. 41. № 2. P. 178–180. <https://doi.org/10.1051/apido/2009058>
13. Kurtti T.J., Mattila J.T., Herron M.J. et al. Transgene expression and silencing in a tick cell line: A model system for functional tick genomics // Insect. Biochem. Mol. Biol. 2008. V. 38. № 10. P. 963–968. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.07.008>
14. Kurtti T.J., Burkhardt N.Y., Heu C.C. et al. Fluorescent protein expressing *Rickettsia buchneri* and *Rickettsia peacockii* for tracking symbiont-tick cell interactions // Vet. Sci. 2016. V. 3. № 4. pii: E34. <https://doi.org/10.3390/vetsci3040034>
15. Simser J.A., Palmer A.T., Fingerle V. et al. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group Rickettsia, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 9. P. 4559–4566. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4559-4566.2002>
16. Pornwiroon W., Pourciau S.S., Foil L.D. et al. Rickettsia felis from cat fleas: Isolation and culture in a tick-derived cell line // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 5589–5595.
17. Baldrige G.D., Burkhardt N.Y., Labruna M.B. et al. Wide dispersal and possible multiple origins of low-copy-number plasmids in rickettsia species associated with blood-feeding arthropods // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 1718–1731. <https://doi.org/10.1128/AEM.02988-09>
18. Munderloh U.G., Blouin E.F., Kocan K.M. et al. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture // J. Med. Entomol. 1996. V. 33. № 4. P. 656–664.
19. Munderloh U.G., Madigan J.E., Dumler J.S. et al. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture // J. Clin. Microbiol. 1996. V. 34. P. 664–670.
20. Woldehiwet Z., Horrocks B.K., Scaife H. et al. Cultivation of an ovine strain of Ehrlichia phagocytophilain tick cell cultures // J. Comp. Pathol. 2002. V. 127. P. 142–149. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0574>
21. Munderloh U.G., Tate C.M., Lynch M.J. et al. Isolation of an *Anaplasma* sp. organism from white-tailed deer by tick cell culture // J. Clin. Microbiol. 2003. V. 41. № 9. P. 4328–4335. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4328-4335.2003>
22. Tate C.M., Howerth E.W., Mead D.G. et al. *Anaplasma odocoilei* sp. nov. (family Anaplasmataceae) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) // Ticks and Tick-Borne Diseases. 2013. V. 4. P. 110–119.
23. Munderloh U.G., Silverman D.J., MacNamara K.C. et al. *Ixodes ovatus* Ehrlichia exhibits unique ultrastructural characteristics in mammalian endothelial and tick-derived cells // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2009. V. 1166. P. 112–119. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04520.x>
24. Varela A.S., Luttrell M.P., Howerth E.W. et al. First culture isolation of *Borrelia lonestari*, putative agent of southern tick-associated rash illness // J. Clin. Microbiol. 2004. V. 42. P. 1163–1169. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.3.1163-1169.2004>
25. Munderloh U.G., Yabsley M.J., Murphy S.M. et al. Isolation and establishment of the raccoon Ehrlichia-like agent in tick cell culture // Vector Borne Zoonotic Dis. 2007. V. 7. P. 418–425.

Establishing a Cultivable Cell Line of a Tick *Dermacentor marginatus*

**N. I. Rimikhanov^a, E. Yu. Epova^b, A. V. Belyakova^b, A. A. Lebedeva^c, E. S. Mutnykh^c,
Yu. K. Biryukova^{d,*}, M. V. Zylkova^d, A. V. Shibaeva^b, E. V. Trubnikova^d,
D. A. Karataeva^e, R. M. Akbaev^e, Y. Y. Tyno^e, and B. K. Laypanov^e**

^aMoscow State University of Food Production, Department of Veterinary Medicine, Moscow, Russia

^bEmanuel Institute of Biochemical Physics, Moscow, Russia

^cVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^dKursk State University, Interdepartmental Research Laboratory "Genetics", Kursk, Russia

^eMoscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K.I. Skryabin,
Department of Parasitology and Veterinary-Sanitary Examination, Moscow, Russia

*e-mail: biriukova-ula@mail.ru

Due to overall shifting in ecological state in Russia, losses from ovine anaplasmosis have recently demonstrated a trend to a sharp growth. This actualizes a problem of establishing a vaccine against this disease. A continuous cell culture from tick may serve as an appropriate cell substrate for producing biomass of the ovine anaplasmosis causative agent *Anaplasma ovis* which can be used for manufacturing a cell-cultural inactivated vaccine. Such a continuous cell line of the tick *Dermacentor marginatus*, the principal reservoir host of *A. ovis* has been established by cultivation of a homogenate of the tick eggs on a modified Leibowitz medium L15. The established cell line DM-77 has an undifferentiated phenotype. The cells are roundish, contain massive nuclei with well visible nucleoli. To the end of the work, the cell line was passaged 8 times and did not express signs of deceleration in growth. When cultivated in a medium with 10% fetal serum at 32°C, a duplication time was 2.8 ± 0.3 days.

Keywords: tick, anaplasmosis of sheep, embryo, cell line, *Anaplasma ovis*, *Dermacentor marginatus*.