

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет»

И.Я. Строганова, А.А. Трухоненко

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

Методические указания

Красноярск 2013

Рецензент

В.А. Колесников, д-р биол. наук, проф., зав. кафедрой внутренних
незаразных болезней КрасГАУ

Строганова, И.Я.

Использование в вирусологии культуры клеток: метод. указания / И.Я. Строганова, А.А. Трухоненко; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2013. – 48 с.

В издании представлена методика проведения лабораторного занятия по теме «Использование в вирусологии культуры клеток».

Предназначено для студентов очной и заочной форм обучения по дисциплине «Ветеринарная вирусология и биотехнология» специальности 36.05.01 «Ветеринария» (Модуль 1. Модульная единица 3. Общая вирусология).

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Красноярского государственного аграрного университета

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
1. Использование в вирусологии культуры клеток.....	5
2. Контрольные вопросы.....	45
3. Библиографический список.....	47

Введение

План лабораторного занятия (4 часа):

1. Цели использования культуры клеток.
2. Требования, предъявляемые к культурам клеток.
3. Виды культуры клеток.
 - а) первично-трипсинизированные культуры клеток;
 - б) субкультуры;
 - в) перевиваемые культуры клеток;
 - г) диплоидные культуры клеток;
 - д) суспензионные культуры клеток.
4. Хранение культур клеток.
5. Контаминация культур клеток.
6. Растворы.
7. Питательные среды.
8. Посуда.
9. Преимущества культуры клеток.
10. Культивирование вирусов в культуре клеток:
 - а) заражение клеток вирусом;
 - б) культивирование вируса;
 - в) индикация (обнаружение) вируса в культуре клеток:
 - цитопатическое действие (ЦПД): формы цитопатического действия вирусов в культуре клеток;
 - реакция гемадсорбции (РГАд);
 - метод образования бляшек;
 - цветная проба;
 - обнаружение внутриклеточных включений;
 - обнаружение вирусов в реакции иммунофлуоресценции (РИФ);
 - обнаружение вирусов с помощью иммунопероксидазной реакции (иммуноферментного анализа) ИФА;
 - обнаружение вирусов с помощью электронного микроскопа;
 - обнаружение вирусов с помощью ДНК-зондов;
 - обнаружение вирусов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР);
 - метод, основанный на интерференции вирусов.

Использование в вирусологии культуры клеток

Культура клеток – это клетки многоклеточного организма, живущие и размножающиеся в искусственных условиях вне организма (*in vitro*).

Методика культивирования клеток особенно успешно стала развиваться после 40-х годов XX столетия. Этому способствовали следующие обстоятельства: открытие антибиотиков, предотвращающих бактериальное заражение культур клеток, открытие Ху-ангом (1943) и Эндерсом (1949) способности вирусов вызывать специфическую деструкцию клеток (цитопатический эффект) – удобный метод индикации вирусов в культурах клеток, наконец, Дульбекко и Фогт (1952) предложили методику трипсинизации тканей и получения однослойных культур клеток.

1. Цели использования культуры клеток:

1. Обнаружение в биологическом материале активного вируса биопробой.
2. Первичное выделение вируса и его культивирования.
3. Поддержание вирусов в лаборатории в активном состоянии.
4. Титрование вирусов.
5. Накопление большой массы вирусов для лабораторных исследований при производстве вакцин и диагностических тест-систем.
6. Использование как тест-объект в реакции нейтрализации.

2. Требования, предъявляемые к культурам клеток:

1. Культура клеток должна быть чувствительна к предлагаемому вирусу.
2. Работа с культурой клеток требует абсолютной стерильности, которая достигается:
 - работой в специализированных боксах или ламинарах;
 - использованием только стерильных сред и растворов;
 - добавлением во все среды и растворы антибиотиков 100 ЕД/мл;
 - высокими требованиями, предъявляемыми к подготовке посуды для культивирования клеток.

3. Виды культуры клеток. В вирусологической практике применяют следующие культуры клеток.

Первично-трипсинизированные культуры клеток – клетки, полученные непосредственно из органов или тканей организма, растущие *in vitro* в один слой. Культуру клеток можно получить практи-

чески из любого органа или ткани человека или животного (взрослого или эмбриона). Однако лучше это удастся сделать из эмбриональных органов, так как клетки эмбрионов обладают более высокой потенци-ей роста. Чаще всего для этих целей используют почки, легкие, кожу, тимус, тестикулы эмбрионов или молодых животных.

Методика получения первично-трипсинизированной культуры клеток

Для получения первичных клеток от здорового животного не позднее 2–3-х часов после убоя берут соответствующие органы или ткани, измельчают их на кусочки (1–4 мм) и обрабатывают фермен-тами: трипсином, панкреатином, коллагеназой и другими (чаще трип-сином). Ферменты разрушают межклеточные вещества, полученные при этом отдельные клетки суспендируют в питательной среде и культивируют на внутренней поверхности пробирок или матрасов в термостате при 37 °С.

Клетки прикрепляются к стеклу и начинают делиться. В раз-витии культур клеток различают несколько фаз: адаптации, ло-гарифмического роста, стационарную и старения (гибель клеток). Размножаясь, клетки размещаются на поверхности стекла и при пол-ном покрытии его в один слой контактируют друг с другом и пре-кращают делиться (контактная ингибиция). На стекле формируется слой толщиной в одну клетку (поэтому эти культуры клеток называ-ют однослойными или монослойными) (рис. 1, 2, 3).

Обычно монослой формируется через 3–5 дней. Скорость его формирования зависит от вида ткани, возраста животного, качества питательной среды, посевной концентрации клеток и других факто-ров.



Рисунок 1 – Первичная культура клеток легких эмбриона овцы

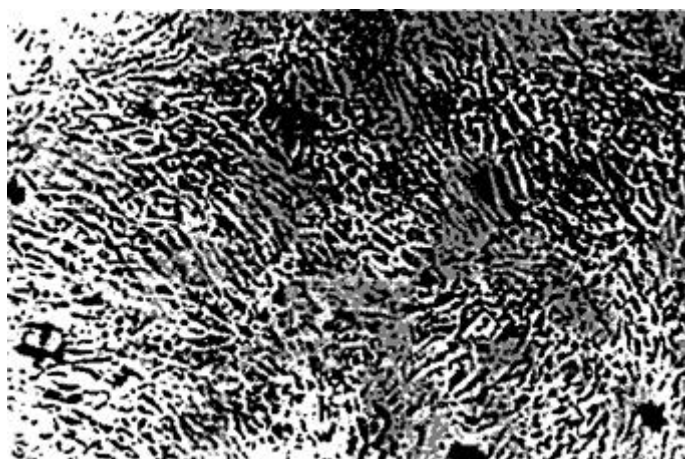


Рисунок 2 – Первичная культура клеток тестикул бычка

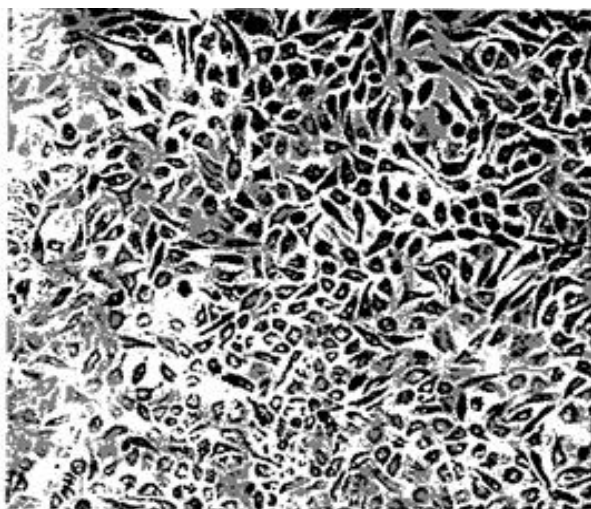


Рисунок 3 – Культура клеток почки обезьяны. Третий день роста

Питательную среду меняют по мере загрязнения ее продуктами жизнедеятельности клеток. Монослой сохраняет жизнеспособность в течение 7–21 дня (в зависимости от вида клеток и состава питательной среды).

Интенсивность размножения клеток и состояние монослоя контролируют визуально под малым увеличением микроскопа (объектив х 10). Лучше для этой цели использовать инвертированный микроскоп.

Для культивирования вирусов используют молодые культуры клеток (как только сформировался монослой).

Субкультуры. В вирусологической практике часто используют субкультуры, которые получают из первичных клеток, выращенных в матрасах, путем снятия их со стекла раствором версена или трипсина, ресуспендирования в новой питательной среде и пересева на новые матрасы или пробирки. Через 2–3 суток формируется монослой.

Практически субкультуру можно получить из всех первичных культур клеток. (Хуже субкультивируются куриные фибробласты.) Субкультуры по чувствительности к вирусам не уступают первичным культурам клеток, кроме того, они более экономичны, и есть возможность выявления контаминации клеток вирусами. Субкультуры получают от 2–5 пассажей (перевивок) и очень редко до 8–10. Последующие пассажи приводят к изменению морфологии клеток и их гибели. Если клеточные культуры прошли более 10 пассажей, они уже на стадии перехода к перевиваемым культурам клеток.

Перевиваемые культуры клеток – это клетки, способные к размножению вне организма неопределенно длительное время. В лабораториях их поддерживают путем пересевов из одного сосуда в другой (при условии замены питательной среды).

Получают перевиваемые клетки из первичных культур клеток с повышенной активностью роста путем длительных пересевов в определенном режиме культивирования. Обычно работа по получению новых клеточных линий продолжается несколько месяцев. Полагают, что механизм происхождения перевиваемых культур клеток – результат генетической изменчивости клеток или селекции единичных клеток, присутствующих в первичной исходной культуре.

Клетки перевиваемых культур имеют одинаковую форму, гетероплоидный набор хромосом (у первичных клеток он диплоидный), стабильны в условиях роста *in vitro*, некоторые из них обладают онкогенной активностью. Последнее свойство ограничивает использование перевиваемых культур клеток для культивирования вирусов при производстве вакцин. Перевиваемые культуры клеток можно получать как из здоровых тканей животных (рис. 4), так и из опухолевых. Среди них наиболее широко используют следующие линии клеток: HeLa (из раковой опухоли шейки матки женщины); Нер-2 (из карциномы гортани человека); КВ (из раковой опухоли полости рта); ВНК-21 (почка новорожденного хомячка); ППЭС (перевиваемая почка эмбриона свиньи); ППТ (перевиваемая почка теленка); ППО (перевиваемая почка овцы); TR (из слизистой трахеи коровы); L (мышинные фибробласты); СОЦ (из сердца обезьяны циномольгус) и др. Характеристика основных клеточных линий, рекомендуемых для использования в ветеринарных лабораториях, представлена в таблице 1.

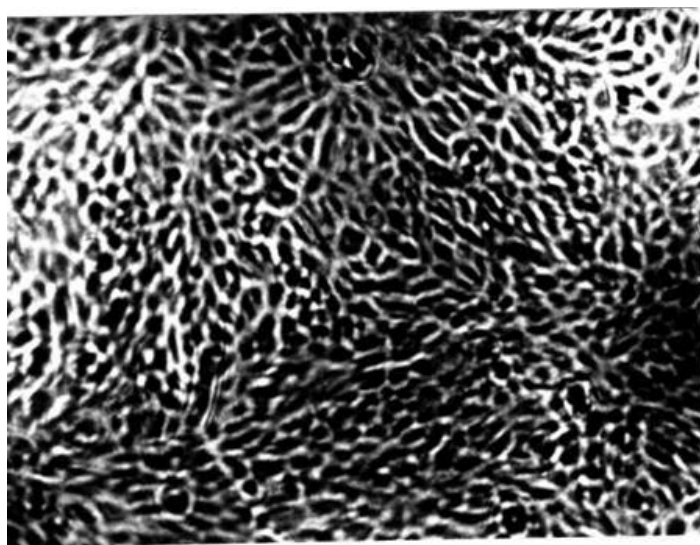


Рисунок 4 – Перевиваемая линия клеток почки теленка

Перевиваемые клетки имеют преимущества перед первичными: их приготовление значительно проще, экономятся труд и материальные средства; эти культуры заранее можно проверить на наличие латентных вирусов и микрофлоры; клональные линии обеспечивают более стандартные условия для размножения вирусов, чем первичные, представляющие смешанную популяцию клеток. Большинство перевиваемых клеток обладает более широким спектром

чувствительности к вирусам, чем соответствующие первичные культуры.

Однако перевиваемые клетки имеют и недостатки: они склонны к малигнизации, то есть злокачественное перерождение независимо от происхождения и снижения чувствительности к вирусам у них происходит быстрее, чем у первичных, поэтому необходимо применять клональные линии перевиваемых клеток. Поддерживают перевиваемые клетки путем периодических пересевов. Чаще используют бесцентрифужный метод.

Для очередного пересева отбирают 2–3-дневную культуру с хорошим монослоем, сливают питательную среду, а клеточный монослой покрывают подогретым до 35–37 °С 0,02%-м раствором версена или смесью версена с 0,25%-м раствором трипсина (9:1). Диспергирующее действие версена объясняется связыванием им двухвалентных катионов (Mg^{++} , Ca^{++}), которые способствуют прикреплению клеток к стеклу и обеспечивают целостность клеточной культуры. Под действием версена клетки округляются, отделяются от стекла.

Через 10–15 минут после округления клеток версен сливают, оставляя небольшое количество его (в 1-литровом матрасе – 5–10 мл, в 0,1-литровом – 2–3 мл), и выдерживают еще 5–10 минут, периодически омывая клетки версеном, затем добавляют небольшое количество питательной среды. После встряхивания подсчитывают клетки в камере Горяева, исходную клеточную взвесь разводят ростовой питательной средой до необходимой концентрации (100–200 тыс. в 1 мл) и разливают при помешивании в пробирки или матрасы, закрывают резиновыми пробками и культивируют в термостате при 37 °С в течение 3–4-х дней до образования сплошного монослоя.

Обычно клетки в камере Горяева не подсчитывают, а пересевуют с коэффициентом от 1:2 до 1:6 в зависимости от вида клеток. Состав питательной среды также зависит от вида клеток, но чаще при культивировании перевиваемых клеток используют среды «Игла», 199 или смеси этих сред с гидролизатом лактальбумина.

Важно отметить, что при поддержании перевиваемых клеток путем их систематического пересева в лаборатории оставляют не менее одного матраса без пересева на случай непригодности последнего пассажа.

Таблица 1 – Характеристика основных свойств перевиваемых линий клеток						
Культура	Среда выращивания	Посевная доза (кл/мл)	Формирование монослоя (дни)	Коэффициент пересева	Пассажей в неделю	Чувствительность к вирусам
СПЭВ – почка эмбриона свиньи	199 + 10 % сыворотки КРС	$(1 - 2) \cdot 10^5$	3-4	1 : 4 – 1 : 6	2	Ящура, гастроэнтерита свиней, ротавирусу свиней, болезни Ауески, болезни Тешена
ППЭС – перевиваемая почка эмбриона свиньи	60 % ГЛА + 30 % 199 + 10 % сыворотки КРС	$(1 - 2) \cdot 10^5$	3-4	1 : 2 – 1 : 3	2	Болезни Ауески, ящура, ротавирусу свиней, коронавирусу свиней, парвовирусу свиней
Пт-80 – почка теленка	50 % ГЛА + 40 % Игла + 10 % сыворотки КРС	$(1 - 2) \cdot 10^5$	3-4	1 : 2 – 1 : 3	2	ИРТ, ПГ-3, рота- и паровирусам КРС, диареи КРС, болезни Ауески, ящура, везикулярного стоматита
ПТ – почка теленка	90 % «Игла» + 10 % сыворотки КРС	$(1 - 2) \cdot 10^5$	4-5	1 : 2 – 1 : 3	2	Ящура, ИРТ, ПГ-3, диареи КРС, болезни Ауески, везикулярного стоматита, ринопневмонии лошадей
МДБК – почка теленка	40 % «Игла» + 50 % 199 + 10 % сыворотки КРС	$1 \cdot 10^5$	2-3	1 : 3 – 1 : 4	2	ИРТ, ПГ-3, Адено-1 п/г, ротавирусам животных, везикулярного стоматита
TR – трахея теленка	90 % «Игла» + 10 % сыворотки КРС	$(1 - 2) \cdot 10^5$	3-4	1 : 2 – 1 : 3	2	ИРТ, ПГ-3, диареи КРС
ЛЭК – легкое эмбриона коровы	0,3 % ФГМ – Игла + 10 % сыворотки КРС	$(1 - 2) \cdot 10^5$	3-4	1 : 4	2	ИРТ, ПГ-3, ротавирусам КРС, ринопневмонии лошадей
ЩЖС – щитовидная железа свиньи	90 % 199 + 10 % сыворотки КРС	$(1 - 2) \cdot 10^5$	3-4	1 : 3	2	Энтеро-, парво-, ротавирусам свиней, ТГС, ринопневмонии лошадей
КСТ – эндотелий коронарных сосудов теленка	90 % 199 + 10 % сыворотки КРС	$(1 - 2) \cdot 10^5$	3-4	1 : 4 – 1 : 6	2	ИРТ, ПГ-3, диареи КРС
Т-1 – почка теленка	50 % «Игла» + 40 % 199 + 10 % сыворотки КРС	$(1 - 3) \cdot 10^5$	3-4	1 : 2 – 1 : 3	1	Аденовирусам 1 и 2 п/г, респираторно-синцитиальному, ИРТ, ПГ-3

Диплоидные культуры клеток. Международный комитет по клеточным культурам дал следующее определение диплоидным клеткам: «это морфологически однородная популяция клеток, стабилизированная в процессе культивирования *in vitro*, имеющая ограниченный срок жизни, характеризующаяся тремя фазами роста, сохраняющая в процессе пассирования кариотип, свойственный исходной ткани, свободная от контаминантов и не обладающая опухолевой активностью при трансплантации хомячкам».

Диплоидные культуры клеток, так же как и перевиваемые, получают из первичных культур клеток. Кариотип клеток очень лабилен и при обычных методах культивирования клеток он изменяется в первые дни. Поэтому потребовались специальные методы обработки ткани, высокого качества питательные среды, фетальная сыворотка для длительного поддержания клеток *in vitro* в диплоидном состоянии. Эту задачу впервые успешно решили американские ученые Хейфлик и Мурхед (1961).

Диплоидные клетки получены из различных тканей эмбриона человека (легкие, почки, кожно-мышечная ткань, сердце и др.) и животных (почка эмбриона крупного рогатого скота, свиней, ВНК-21 – почка хомяка и др.) (рис. 5).

Диплоидные клетки в отличие от перевиваемых имеют ограниченные возможности пассирования. Максимальное число пассажей 50 ± 10 , затем количество делящихся клеток резко уменьшается и они гибнут. Однако диплоидные клетки могут быть использованы в течение длительного времени, так как при каждом пассаже часть клеток можно заморозить (минус 196 °С) и при необходимости восстановить.

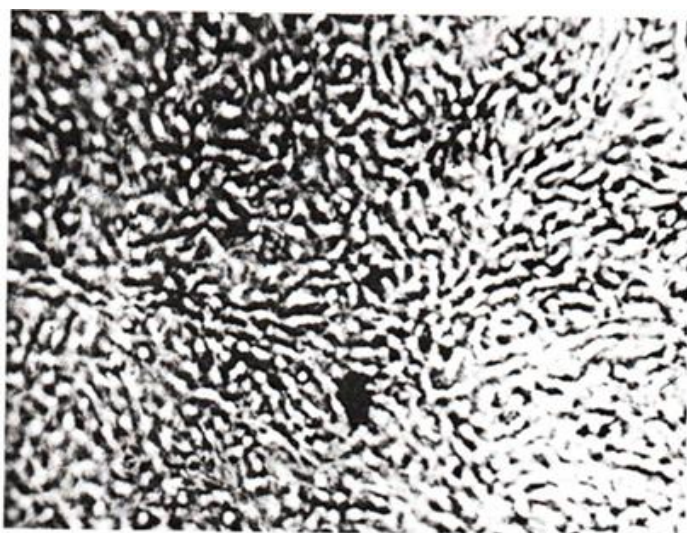


Рисунок 5 – Диплоидная культура клеток легкого эмбриона коровы Л₅Э (x 130)

Диплоидные клетки имеют преимущества перед перевиваемыми и первичными клетками: 10–12 дней они могут быть в жизнеспособном состоянии без смены питательной среды; при смене среды один раз в неделю остаются жизнеспособны в течение 4-х недель; особенно пригодны для длительного культивирования вирусов, у них сохранена чувствительность исходной ткани к вирусам.

Суспензионные культуры клеток. В 1953 году Оуэне с сотрудниками показали способность клеток размножаться в свободно суспендированном состоянии. В последующие годы этот метод был значительно усовершенствован: была создана современная аппаратура, обеспечивающая размножение клеток со строго заданными параметрами (температура, pH, скорость перемешивания), а также адаптированы многие линии перевиваемых клеток к размножению в этих условиях (ВНК-21, Нер-2, МДВК и др.). Выращивание вирусов в суспензионных культурах клеток открывает большие возможности в промышленном производстве вакцин и диагностикумов. Однако только перевиваемые клетки хорошо культивируются в суспензии.

Новый подход к культивированию клеток в суспензии — применение микроносителей (сефадекс, силикагель, цитолар и др.). На микроносителях культивируемые клетки формируют монослой (рис. 6).

Таким образом, этот способ позволяет методами суспензионного культивирования выращивать зависимые от прикрепления к твердому субстрату клетки: первичные, субкультуры, диплоидные. Эти клетки принято называть поверхностно зависимыми.

Способ культивирования на микроносителях в настоящее время чрезвычайно популярен, так как он открывает большие перспективы в клеточной биотехнологии, в получении вакцин и других биологически активных веществ (интерферон, гормоны и т. д.).

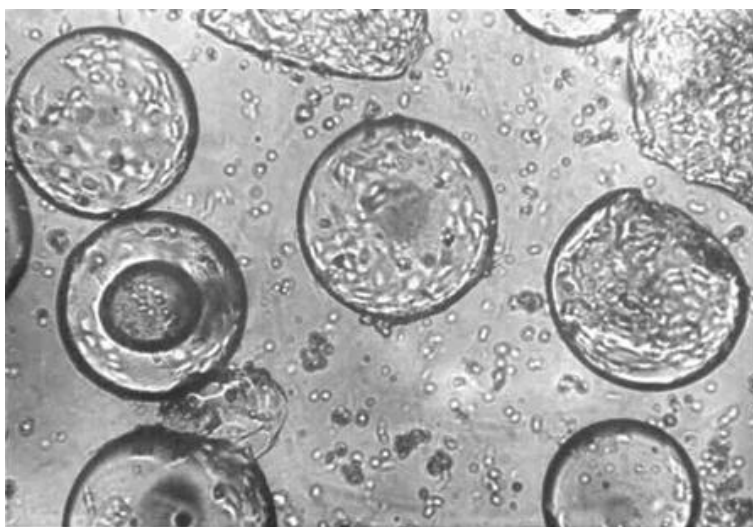


Рисунок 6 – Образование монослоя клеток Л5Э на микроносителях

4. Хранение культур клеток. Каждый из трех основных типов клеточных культур — первичных культур, диплоидных штаммов и перевиваемых линий клеток, используемых в вирусологических исследованиях, часто приходится консервировать, так как при продолжительном пассировании клеток *in vitro* есть опасность бактериального загрязнения и неконтролируемых (генетических) изменений самих клеток.

Наиболее простой метод консервирования культур клеток — хранение их при 4 °С до 1–6 недель. Успешно применяют хранение клеточных штаммов в условиях сухого льда (минус 78 °С) и жидкого азота (минус 196 °С). Для этого клетки снимают с матрасов, суспендируют в концентрации 10^6 в 1 мл питательной среды, содержащей в качестве защитных веществ 10–40 % сыворотки и 10 % очищенного стерильного глицерина (вместо глицерина успешно применяют ДМСО – диметилсульфоксид).

Затем клеточную суспензию разливают в ампулы, запаивают и выдерживают 1–3 часа при 4 °С, после чего замораживают клетки в смеси этилового спирта с сухим льдом. Скорость охлаждения не должна превышать 1 °С в 1 минуту. При снижении температуры до минус 25 °С ампулы помещают для хранения в сухой лед. Если для хранения используют жидкий азот, то ампулы с клетками охлаждают до минус 70 °С и кладут в жидкий азот. Хранение клеток в жидком азоте в течение ряда лет не изменяет их пролиферативную активность и чувствительность к вирусам.

Восстанавливают замороженные клетки следующим образом: ампулу с замороженными клетками быстро погружают в водяную баню на 1–2 минуты при легком встряхивании, затем клетки выливают в матрас, добавляют соответствующее количество ростовой среды и культивируют в термостате при 37 °С. Для удаления глицерина или ДМСО питательную среду заменяют на следующий день после посева.

При транспортировке клеток матрасы с выросшим монослоем заливают средой доверху и закрывают резиновой пробкой. В лаборатории питательную среду сливают и используют при культивировании этих клеток в виде добавок к питательной среде, применяемой в данной лаборатории.

Можно транспортировать и клеточную суспензию при 4 °С. При благоприятных условиях транспортировки, исключающих перегревание и замораживание клеток, 80–90 % из них сохраняют жизнеспособность до 7–8 дней.

Работа с культурой клеток требует абсолютной стерильности, тщательной подготовки посуды, соответствующих растворов, питательных сред и высокого качества воды.

5. Контаминация культур клеток. Работа с культурами клеток, их использование в вирусологических и других исследованиях, в биотехнологии требуют постоянного контроля на отсутствие посторонних агентов (контаминантов). Контаминантами могут быть вирусы, бактерии, грибы, микоплазмы и клетки других клеточных культур.

Микоплазмы — одни из наиболее частых контаминантов, особенно в перевиваемых линиях клеток.

Своевременное выявление их, других микроорганизмов или вирусов в культуре клеток — важное условие поддержания высокого качества последней. Паспортизация стабильных клеточных линий предусматривает в качестве необходимого теста контроль на отсутствие микоплазмokon-таминации, что должно стать обязательным для всех лабораторий, где работают с культурами клеток.

Резкое закисление питательной среды в культуральных флаконах и опалесценция ее могут быть следствием контаминации культур клеток микоплазмами. Для выявления последних используют следующие методы: посев на питательные среды, тест-культуры, цитологические, радиоавтографические и электронно-микроскопические.

В случае контаминации клеточные культуры уничтожают, а культивирование возобновляют из резервных расплодков, хранящихся в жидком азоте. Только редкие и уникальные культуры подлежат деконтаминации.

Предупредить размножение и подавить случайно попавшие в клеточную культуру бактерии удастся с помощью противомикробных препаратов (антибиотиков и др.), добавляемых в ростовые среды непосредственно перед их использованием. Эти препараты следует строго дозировать и применять дифференцирование. Их использование — необходимое условие при возрастании риска контаминации в процессе получения первичных культур клеток при крупномасштабном суспензионном выращивании клеток, массовом производственном культивировании перевиваемых клеток, а также во всех случаях объединения клеточного материала.

При работе с культурами клеток используют многие антимикробные (нетоксичные) препараты в оптимальных дозах, характер

действия которых приведен в таблице 2. Выбор эффективного препарата или комплекса препаратов зависит от чувствительности к ним конкретных контаминантов.

Таблица 2 – Противомикробные препараты для культур клеток (Л. П. Дьяконов и др.)

Препарат	Чувствительные микроорганизмы	Антимикробное действие	Оптимальные концентрации для культур клеток (ед/мл, мкг/мл)
Пенициллин	Б +	Бактерицидное	100,0
Стрептомицин	Б±	»	100,0
Мономицин	Б±, М	»	100,0
Неомицин	Б+, М	»	50,0
Канамицин	Б±, М	»	200,0
Гентамицин	Б±, М	»	200,0
Полимиксин	Б±	»	50,0
Фурагин	Б±	»	8,0
Тетрациклин	Б±, М	Бактериостатическое	30,0
Эритромицин	Б±	То же	50,0
Линкомицин	Б±, М	»	100,0
Левомецетин (хлорамфенкол)	Б±, М	»	30,0
Тилозин	М	»	10,0
Олеандомицин	М	»	15,0
Астазилд (препарат 1)	М	»	10,0
Астазин (препарат 2)	М	»	50,0
Нистатин	МГ	Фунгистатическое	50,0
Амфотерицин	МГ	»	2,5

Обозначения: Б+ – грамположительные бактерии; Б- – грамотрицательные бактерии; М – микоплазмы; препарат 1 – моноэфир сахарозы и жирных кислот; препарат 2 – полисахарид; МГ – микроскопические грибы.

6. Растворы. Наиболее широко используют при работе с культурами клеток растворы Хенкса и Эрла, которые готовят на бидистиллированной воде с добавлением различных солей и глюкозы.

Раствор Хенкса: на 1л бидистиллированной воды 8,0 г NaCl, 0,4 г KCl, 0,1 г MgSO₄ 7H₂O, 0,14 г CaCl₂, 0,06 г KH₂PO₄, 0,06 г NaH₂PO₄, 1,0 г глюкозы, 0,02 г фенолрота, 0,07 г NaHCO₃.

Раствор Эрла: на 1л бидистиллированной воды 6,8 г NaCl, 0,4 г KCl, 0,1 г MgSO₄, 0,2 г CaCl₂, 0,125 г NaH₂PO₄, 2,2 г NaHCO₃, 1,0 г глюкозы.

Эти сбалансированные солевые растворы используют для приготовления всех питательных сред, так как они обеспечивают сохранение рН, осмотическое давление в клетках и соответствующую концентрацию необходимых неорганических веществ. Кроме того, их применяют при различных манипуляциях с культурой клеток (отмывание от ростовых сред, разведение вируса и т. д.).

При культивировании клеток применяют диспергирующие растворы трипсина и версена. Раствор трипсина (0,25%-й на фосфатном буфере) используют для деления кусочков тканей на отдельные клетки и для снятия слоя клеток со стекла. Раствор версена – натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (0,02%-й на растворе Хенкса) – используют для снятия клеток со стекла. Все растворы стерилизуют при соответствующих режимах.

7. Питательные среды. Различают естественные и искусственные (синтетические и полусинтетические) питательные среды.

Естественные среды состоят из смеси солевого раствора (Хенкса, Эрла), сыворотки крови (животных или человека), тканевого (эмбрионального) экстракта (эмбрионов кур, коров, человека), коровьей амниотической жидкости и т. д. Количество каждого компонента в разных примесях сред значительно варьирует. Используют эти среды редко.

В настоящее время применяют в основном искусственные питательные среды. К полусинтетическим питательным средам относят ферментативные гидролизаты различных белковых продуктов: гидролизат лактальбумина, мышечный ферментативный гидролизат, ферментативно-казеиновый дрожжевой гидролизат, гемогидролизат, аминокептид и др. Наиболее широко используют в вирусологической практике 5%-й раствор гидролизата лактальбумина, 5%-й и 2,5%-й раствор гемогидролизата.

Из синтетических сред наиболее широкое применение нашли среда 199 и среда «Игла». В состав среды 199 входит более 60 компонентов: 20 аминокислот, 17 витаминов, компоненты нуклеиновых кислот, источники липидов, 8 минеральных солей и другие вещества. В состав среды «Игла» также входит не менее 60 компонентов, включающих аминокислоты, витамины, углеводы и т. д.

Во все питательные среды и некоторые солевые растворы добавляют индикатор феноловый красный (0,002 %) для определения концентрации водородных ионов (рН). В принятой концентрации он

не оказывает токсического воздействия на клетки и вирусы. При снижении pH среда желтеет, что позволяет определять момент ее закисления продуктами метаболизма клеток до уровня, требующего замены среды на свежую; при сдвигах pH в щелочную сторону растворы принимают красно-малиновый цвет. При нейтральном значении pH (7,2–7,4) цвет среды оранжево-красный. Для регулирования pH солевых растворов и питательных сред используют 7,5%-й раствор бикарбоната натрия (NaHCO_3) и 3%-й раствор уксусной кислоты (CH_3COOH).

Для уничтожения микрофлоры перед использованием в среды добавляют антибиотики: пенициллин и стрептомицин по 100 ЕД/мл. Для подавления плесени используют натриевую соль нистатина по 100 мкг на 1 мл среды.

Все питательные среды принято делить на две группы:

- ростовые, обеспечивающие жизнь и размножение клеток. Они содержат 2–10 % сыворотки крови, применяются в первые дни культивирования клеток;
- поддерживающие, обеспечивающие жизнедеятельность клеток, но не размножение их. Они не содержат сыворотки крови, используются обычно после заражения культуры клеток вирусами.

Сыворотка крови крупного рогатого скота – обязательный компонент ростовых питательных сред. В ее состав входит ряд биологически активных веществ, необходимых для роста клеток *in vitro*. Содержащиеся в сыворотке активная фракция альбуминов и фетуин способствуют прикреплению клеток к поверхности стекла. В практической работе наибольшее применение нашли сыворотки как взрослого крупного рогатого скота, так и телят, получаемые на мясокомбинатах. Самая лучшая сыворотка для культуры клеток – сыворотка эмбрионов коров. При получении сыворотки следует соблюдать строгую стерильность. Каждая серия сыворотки проходит контроль на стерильность и токсические свойства по отношению к культурам клеток.

8. Посуда. Качество посуды имеет важное значение для успешного культивирования клеток вне организма.

Посуда должна быть стерильной, обезжиренной, не обладать токсическим действием. Для культивирования клеток используют пробирки, матрасы на 50, 100, 250, 500, 1 000 и 1 500 мл, роллерные колбы на 500, 1000, 2000 мл, различные пипетки, флаконы для пита-

тельных сред и растворов, колбы различной вместимости, воронки и др.

Предложено много способов обработки посуды, и в каждой лаборатории применяют один из них, наиболее экономичный, удобный и дающий наилучшие результаты. При культивировании клеток особенно большие требования предъявляют к подготовке и стерилизации посуды, пробок и др.

Во многих случаях неправильная их мойка и стерилизация служат причиной неприкрепления клеток к стеклу или быстрой дегенерации клеточного монослоя.

При обработке посуды необходимо учитывать высокую чувствительность клеток к токсическому действию солей тяжелых металлов. Одним из обязательных условий успешной работы с клетками является высокое качество воды. Для ополаскивания посуды используют дистиллированную, а лучше бидистиллированную или деионизированную воду.

9. Преимущества культуры клеток. В настоящее время ни одна вирусологическая лаборатория не может обойтись без культуры клеток.

Культуры клеток имеют следующие преимущества перед лабораторными животными и куриными эмбрионами:

- можно добиться заражения практически всех культур клеток, что позволяет получать вирусосодержащий материал с наивысшей концентрацией вируса при наименьшем содержании белкового балласта;
- поскольку можно получить культуры клеток любого вида животного, снимаются видовые ограничения культивирования вирусов;
- возможно вмешательство в инфекционный процесс в любой момент, не нарушая целостности живой системы;
- можно непрерывно контролировать ход инфекционного процесса;
- возможно получение готовой суспензии вируса в виде культуральной жидкости;
- соблюдается полная стерильность культуральной жидкости в отношении грибов и бактерий;
- предельно проста техника заражения и получение вирусосодержащего материала; относительная дешевизна.

Культуры клеток — наиболее совершенная из лабораторных систем для культивирования вирусов. В вирусологической практике

культуры клеток чаще всего используют для первичного обнаружения вирусов и их выделения из патологического материала, накопления вируса при изготовлении вакцин и диагностикумов, поддержания вирусных штаммов в лаборатории, титрования вирусов и как тест-объект в реакции нейтрализации.

Для успешного выделения вируса необходимо соблюдать следующие требования:

- используемая культура клеток должна быть чувствительной к предполагаемому вирусу. Чувствительность ее повышается, если клетки получены от молодых животных (лучше эмбрионов);
- инокулируемый вирус не должен быть старым, долго хранившимся, так как определенная часть инактивированного вируса в популяции подавляет размножение вирулентных частиц. Вирулентность вируса повышается в результате серийных, быстро чередующихся пассажей предельных разведений;
- культивирование проводят при определенном соотношении вируса и клеток, то есть при определенной множественности заражения. В качестве средней величины рекомендуется 10^6 – 10^4 ТЦД₅₀ на 10 млн клеток;
- поддерживающую среду добавляют после того, как вирус прикрепится к клеткам – адсорбируется (обычно это происходит через 1–2 часа при 22 или 37 °С в зависимости от вируса). Распределение вируса в монослое при заражении должно быть равномерным; оптимальная температура для размножения вируса 36–38 °С. Длительное нахождение образовавшегося свободного вируса в теплой среде приводит к его инаktivации.

Лучше всего получать вирус при 75 % цитопатического действия.

10. Культивирование вирусов в культуре клеток. Методика его сводится к следующему: подбору культуры клеток; получению вирусосодержащего материала; подготовке для заражения; заражению клеток вирусосодержащим материалом; культивированию вируса в клетках; индикации вируса в культуре клеток; сбору культуральной жидкости и идентификации в ней вируса.

Заражение клеток

Для этого отбирают пробирки (или матрасы) со сплошным клеточным монослоем, просматривая их под малым увеличением микроскопа. Ростовую питательную среду сливают, клетки 1–2 раза промывают раствором Хенкса, чтобы удалить сывороточные антитела и ин-

гибиторы. В каждую пробирку вносят по 0,1–0,2 мл вирусосодержащего материала и покачиванием распределяют его равномерно по слою клеток. В таком виде пробирки (матрасы) оставляют от 1 до 2 часов при 22 или 37 °С для адсорбции вируса на поверхности клеток. Затем вирусосодержащий материал удаляют из пробирок (матрасов) и наливают поддерживающую среду (в пробирку 1–2 мл, в матрасы около 10 % его объема). При выделении вируса из патологического материала некоторые пробы (фекалий и др.) могут оказывать токсическое действие на клетки, поэтому после адсорбции вируса монослой клеток отмывают 1–2 раза раствором Хенкса (или питательной средой) и затем наливают поддерживающую среду.

Культивирование вируса

Пробирки (матрасы) закрывают герметически резиновыми пробками и ставят на инкубацию в термостат при 37 °С. Наиболее широко применяют стационарное инкубирование. При этом матрасы кладут в горизонтальном положении, пробирки – под углом 5° так, чтобы монослой клеток оказался под питательной средой (чертой вверх). В ряде лабораторий зараженные культуры клеток инкубируют на вращающейся системе – роллерах. Используя этот метод, удастся получить большой выход вируса, имеющего более высокий инфекционный титр, чем при стационарном культивировании.

Для каждой пробы материала обычно используют не менее 4–10 пробирок с культурой клеток. Для контроля оставляют 4–6 пробирок с незараженной культурой клеток, в которых заменяют ростовую среду на поддерживающую.

В культурах клеток, зараженных вирусом, питательную среду можно не менять в течение 7 дней, а рН среды (6,9–7,4) поддерживать с помощью 7,5%-го раствора бикарбоната натрия. При более длительном культивировании инфицированных клеток (аденовирусы и др.) среду меняют.

Все пробирки (матрасы) после заражения клеток ежедневно исследуют под малым увеличением микроскопа, сравнивая культуры клеток, зараженные вирусом, с контрольными.

В термостате адсорбировавшиеся на клетках вирусные частицы проникают внутрь их, и начинается их репродукция. Новые вирусные частицы покидают (полностью или частично) клетки, в которых они образовались, проникают в непораженные клетки, репродуцируются в них, переходят в новые клетки и поражают их. Так продолжается до

тех пор, пока есть живые неповрежденные клетки. В результате этого процесса практически все клетки в матрасе или пробирке поражаются вирусом, хотя абсолютно все почти никогда не поражаются.

Вирус накапливается в основном в культуральной жидкости, но часть вирионов может оставаться и внутри не разрушенных вирусом клеток. Чтобы оставшийся в клетках вирус освободить, клетки тщательно разрушают многократным замораживанием – оттаиванием (2–3 раза) или с помощью ультразвука.

Индикация (обнаружение) вируса в культуре клеток

Цитопатическое действие (ЦПД)

Наиболее широко и часто о размножении вируса в культуре клеток судят по цитопатическому эффекту (ЦПЭ) или цитопатическому действию. ЦПД называются любые изменения клеток под влиянием размножающегося в культуре клеток вируса. Физиологические изменения клеток установить довольно сложно, а морфологические изменения обнаруживаются довольно легко. Для этого достаточно положить на предметный столик микроскопа пробирку или матрас слоем клеток вверх и, используя малое увеличение (объектив $\times 8-10$, окуляр $\times 7-10$), осмотреть слой. Полезно сравнить клетки, зараженные вирусом, с такими же клетками в пробирке, не подвергавшимися заражению (так называемым контролем). В этом случае практически любые наблюдаемые в микроскоп отличия зараженной культуры клеток от контрольной можно считать проявлением ЦПД. Эти отличия могут захватывать весь монослой или отмечаться только в виде небольших очажков измененных клеток в слое нормальных клеток. Интенсивность ЦПД выражается тем, какая часть клеточного монослоя изменена вирусом. Хотя общепринятой системы оценки интенсивности ЦПД нет, ее часто оценивают в крестах или баллах. Так, если изменению (по сравнению с контролем) подвергся весь монослой в пробирке или матрасе, ЦПД оценивают на четыре креста, если $\frac{3}{4}$ – на три, если $\frac{1}{2}$ – на два креста, $\frac{1}{4}$ – на один крест. Но эти оценки весьма условны.

Формы ЦПД зависят от биологических свойств вируса, вида клеток, дозы заражения, условий культивирования и т. д. Одни вирусы проявляют ЦПД через 2–3 суток после заражения (энтеровирусы), другие – через 1–2 недели (аденовирусы).

Ряд авторов пытались сгруппировать сходные формы ЦПД. У одних получилось 23 формы, у других – 11, у третьих – 5 и т. д. Но наиболее существенно различаются между собой три формы ЦПД: фрагментация клеток, округление клеток, симпластообразование (рис. 7, 8). Фрагментация – разрушение клеток на отдельные фрагменты, которые отделяются от стекла и переходят в культуральную жидкость в виде клеточного детрита (вирус везикулярного стоматита).

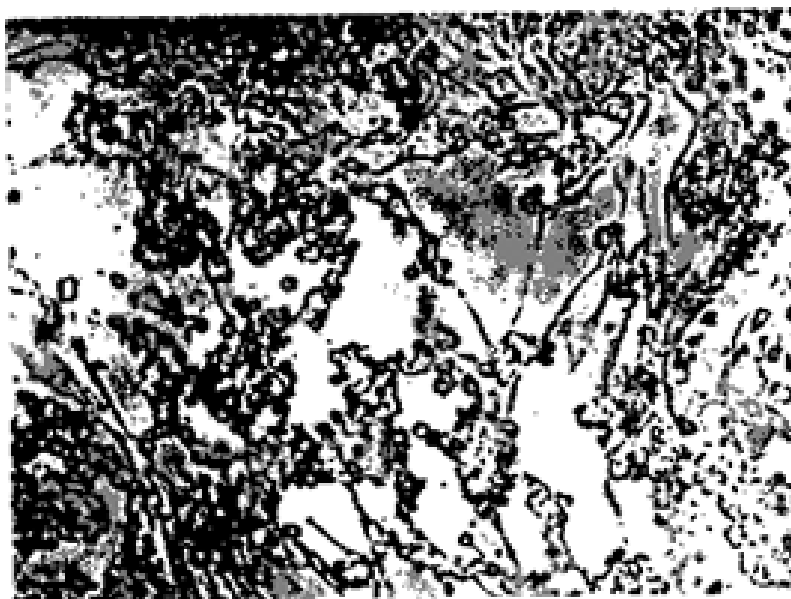


Рисунок 7 – Цитопатическое действие аденовируса крупного рогатого скота в культуре клеток тестикул бычка



Рисунок 8 – Цитопатическое действие вируса оспы овец в культуре клеток легких эмбриона овцы (по Н. И. Троценко)

Округление – потеря клетками способности прикрепляться к стеклу, вследствие чего клетки, обычно распластанные по стеклу, принимают шаровидную форму, отделяются от стекла и свободно плавают в культуральной жидкости, где и погибают (энтеровирусы, аденовирусы и др.).

Симпластообразование – растворение клеточных оболочек, вследствие чего цитоплазмы соседних клеток сливаются, образуя одно целое, в котором располагаются (главным образом по периферии) ядра клеток. Такие образования из цитоплазматической массы с многими клеточными ядрами называются симпластами (гигантские многоядерные клетки) (рис. 9).

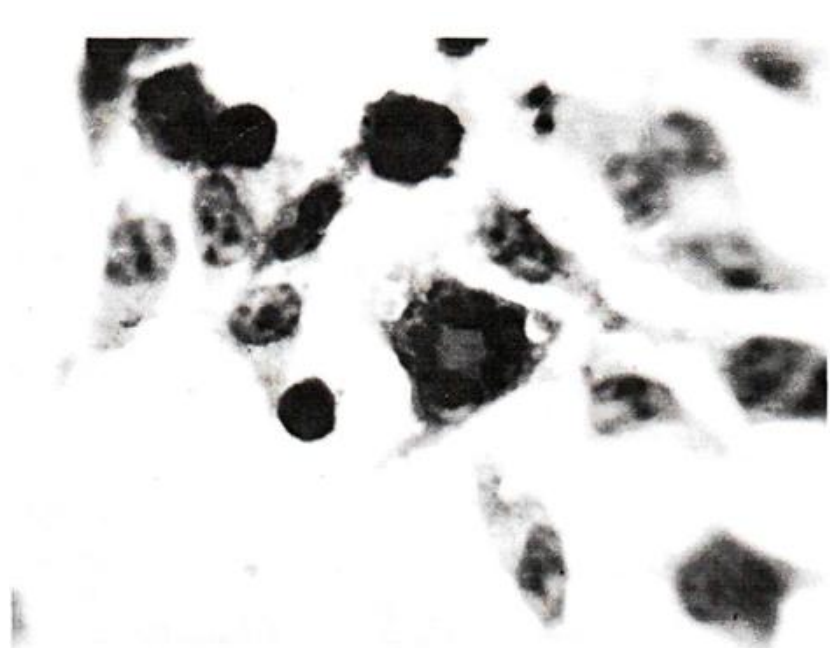


Рисунок 9 – Культура клеток FLK на 6 сутки после заражения штаммом «РС-Б» РСВ КРС, х 1200.

На фоне пораженного монослоя видны небольшие симпласты, состоящие из 5 ядер, расположенных по периферии цитоплазмы. Гематоксилин-эозин.

Их образование объясняют двояко: нарушением процесса деления клеток под влиянием вируса или тем, что некоторые вирусы содержат фермент (лецитиназу), который растворяет клеточные оболочки, в результате цитоплазмы расположенных рядом клеток сливаются. ЦПД в культуре клеток способно вызывать большинство вирусов, поэтому этот метод индикации вирусов в культуре клеток применяют очень широко. Однако есть вирусы, которые, размножаясь в культуре клеток, ЦПД не вызывают (вирусы бешенства, класси-

ческой чумы свиней, некоторые штаммы вируса диареи крупного рогатого скота и др.). Клетки остаются жизнеспособными, но интенсивность клеточного деления понижается, со временем изменяется и их морфология.

При неопластической трансформации пораженных клеток в монослое образуются плотные фокусы трансформации различной величины и формы, белого цвета (вирус саркомы Рауса).

Формы цитопатического действия вирусов в культуре клеток

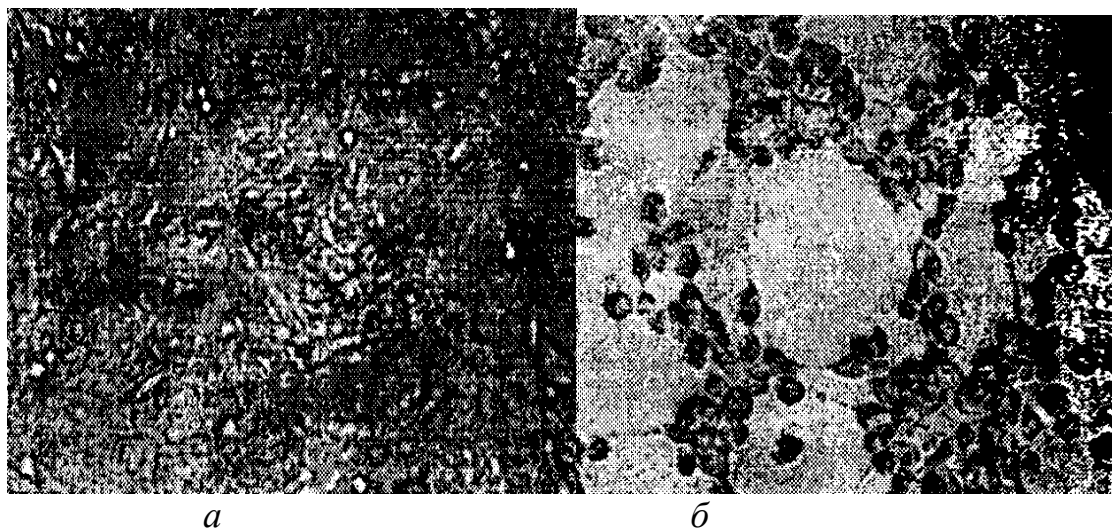


Рисунок 10 – а – перевиваемая культура клеток Т-1, не зараженная вирусом (контроль); б – перевиваемая культура клеток Т-1, зараженная аденовирусом первого типа крупного рогатого скота

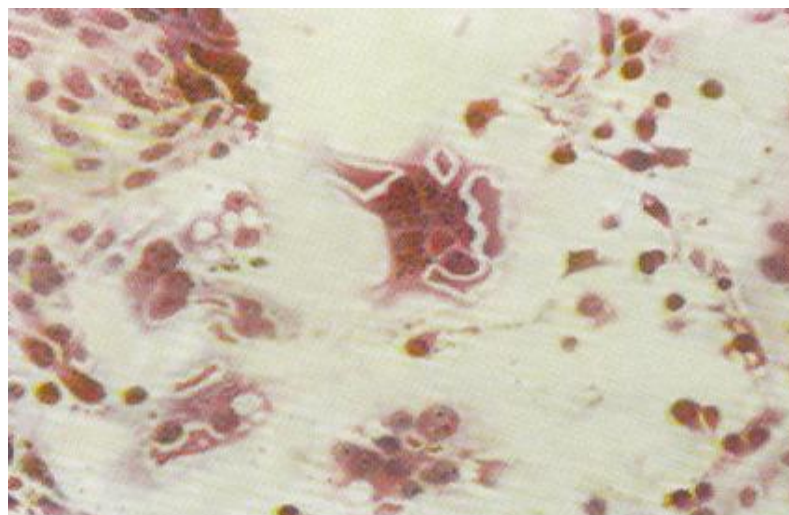


Рисунок 11 – Перевиваемая культура почки теленка через 7 дней после заражения вирусом чумы крупного рогатого скота: виден небольшой синцитий с ацидофильными цитоплазматическими включениями (гематоксилин – эозин)

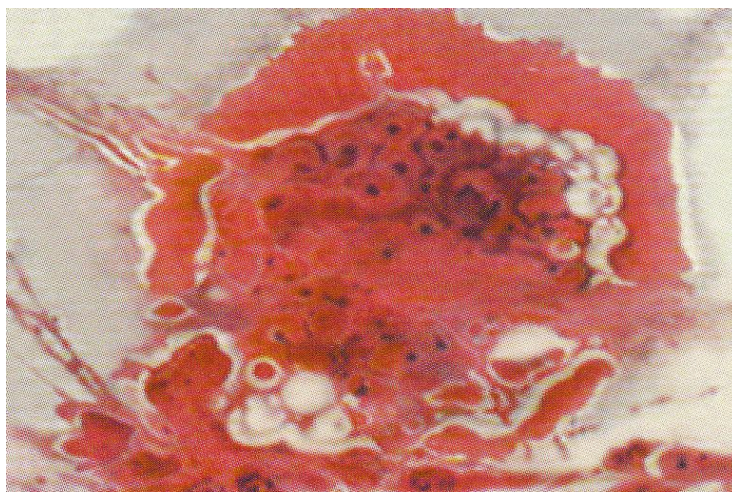


Рисунок 12 – Субкультура почки щенка через 12 дней после заражения вирусом чумы плотоядных: многоядерный синцитий содержит ацидофильные включения (гематоксилин – эозин).

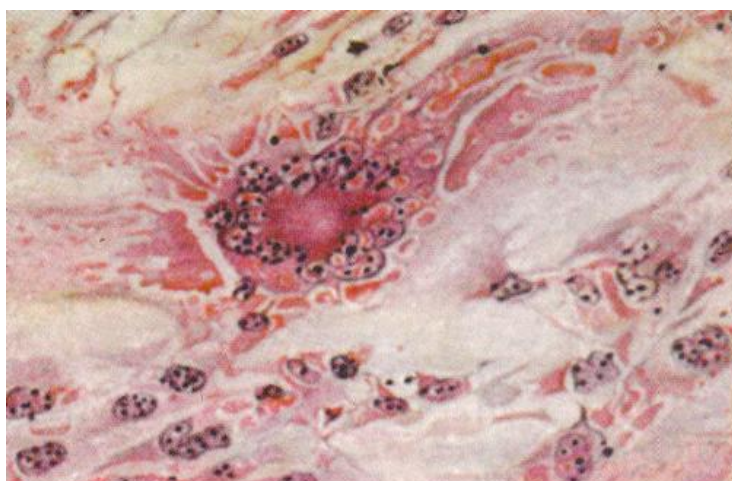


Рисунок 13 – Поражение культуры клеток почки теленка вирусом парагриппа крупного рогатого скота: виден большой синцитий, содержащий ацидофильные цитоплазматические включения разного размера и небольшие внутриядерные включения

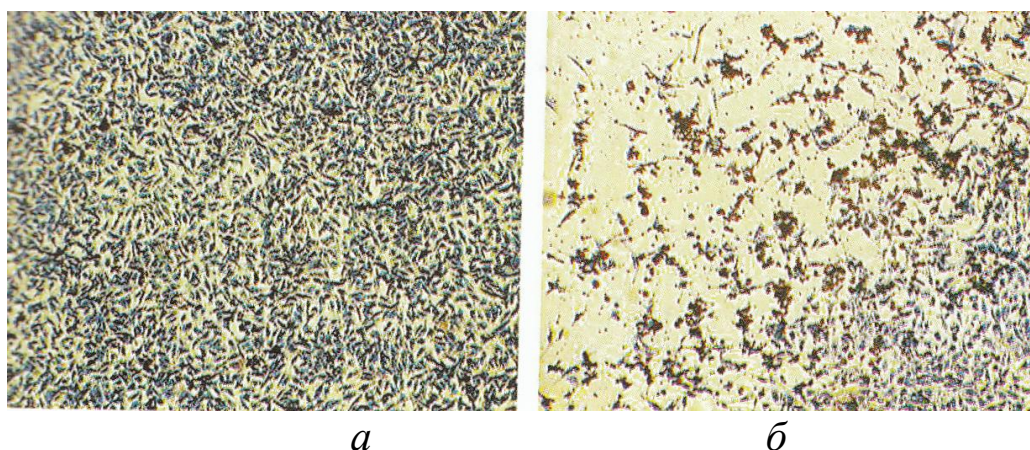
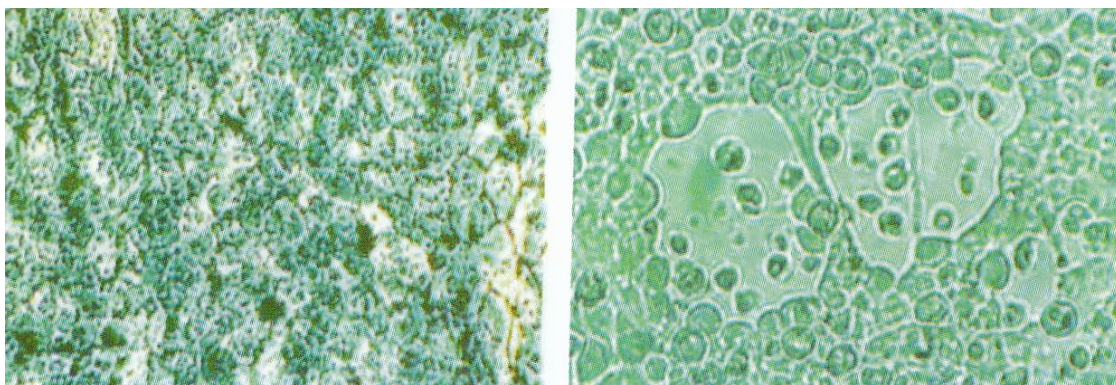


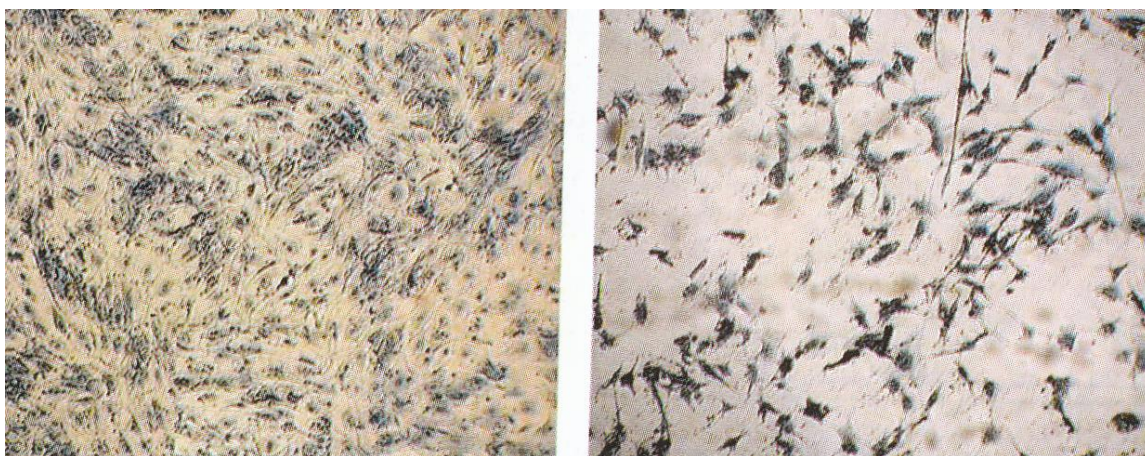
Рисунок 14 – Перевиваемая культура клеток (почка кошки): а – незараженная (контроль); б – зараженная вирусом ринотрахеита кошек



а

б

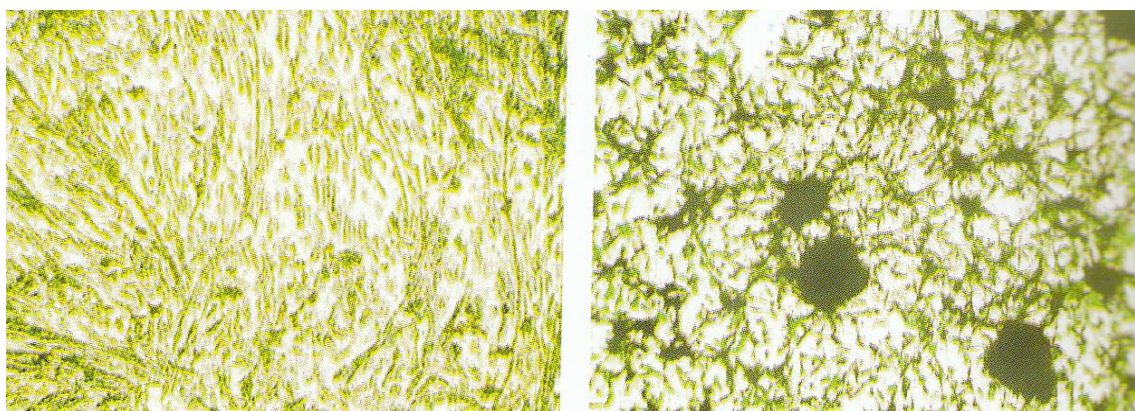
*Рисунок 15 – Перевиваемая культура клеток (почка теленка, ПТ80):
а – незараженная (контроль); б – зараженная респираторно-синцитиальным
вирусом крупного рогатого скота*



а

б

*Рисунок 16 – Перевиваемая культура клеток (легкое эмбриона коровы): а –
незараженная (контроль); б – зараженная вирусом парагриппа-3 крупного
рогатого скота*



а

б

*Рисунок 17 – Перевиваемая культура клеток (куриные фибробласты):
а – незараженная (контроль); б – зараженная вирусом гриппа А(Н9N2)*

Фрагментация (рис. 14) – разрушение клеток на отдельные фрагменты (вирус везикулярного стоматита и др.). *Округление* (рис. 10) – клетки принимают шаровидную форму и отделяются от стекла (адено-, пикорнавирусы и др.). *Симпластообразование* (рис. 11–13, 15–17) – образование гигантских клеток: цитоплазма соседних клеток сливается вследствие растворения клеточных оболочек и образуется одна большая клетка со многими ядрами (вирус ПГ-3, чумы крупного рогатого скота, РС-вирус крупного рогатого скота и др.).

Отсутствие ЦПД в первом пассаже еще не говорит об отсутствии вируса, который не всегда размножается настолько быстро, чтобы вызвать ярко выраженное ЦПД. Поэтому и прибегают к «слепым» пассажам. Необходимо провести не менее трех «слепых» пассажей, прежде чем судить о наличии вируса в исследуемом материале.

Размножающиеся в культурах клеток вирусы частично или полностью (в зависимости от степени разрушения клеток) выходят в культуральную жидкость, которая и используется как готовая суспензия вируса. Если не все клетки культуры разрушились в результате размножения в них вируса, то их разрушают путем 2–3-кратного замораживания и оттаивания или ультразвуком.

Реакция гемадсорбции (РГАд)

Реакция гемадсорбции (РГАд) – соединение эритроцитов с поверхностью пораженных вирусом клеток – впервые была обнаружена Фогелем и Щелоковым (1957) на культуре ткани, инфицированной вирусом гриппа. В последующем выяснилось, что этой способностью обладает ряд других вирусов: парагриппозные, осповакцины и оспы, ньюкаслской болезни, гриппа млекопитающих и птиц. Наиболее ценным оказалось применение этой реакции для выявления и идентификации парагриппозных вирусов животных (ПГ-3 крупного рогатого скота, парагриппа овец, вируса Сендай). В основе этого явления лежит родство рецепторов вируса, находящихся на поверхности пораженной клетки, с рецепторами эритроцита, что приводит к их взаимному сцеплению аналогично реакции гемагглютинации. Преимущество этой реакции состоит в том, что она становится положительной еще до появления отчетливых цитопатических изменений в инфицированных клетках. Для постановки реакции используют эритроциты морской свинки, обезьян, человека (группы О) и другие эритроциты, чувствительные к гемагглютинирующему действию изучаемого вируса.

Методика РГАд состоит в следующем. На 3–4-й день после инфицирования клеток берут две пробирки с одинаковой культурой клеток, из которых одна заражена вирусосодержащим материалом, а вторая контрольная. Из обеих пробирок сливают культуральную жидкость и вносят в обе по 2–3 капли 0,5%-й суспензии отмытых эритроцитов. Обе пробирки оставляют на 5–10 минут так, чтобы эритроциты были на поверхности клеток (кладут горизонтально на стол), а затем слегка споласкивают физраствором и исследуют под микроскопом (малое увеличение). В контрольной пробирке эритроциты полностью удаляются с физраствором, а некоторые из оставшихся плывут вместе с жидкостью. Если в зараженной пробирке эритроциты не удалились с физраствором и не плывут, а прикреплены к поверхности клеток, следует считать РГАд положительной.

В зависимости от вируса и вида клеток расположение эритроцитов может быть трояким:

- эритроциты адсорбированы только по периферии клеточного пласта в виде «ожерелья» (вирус африканской чумы свиней);
- эритроциты расположены на слое клеток очагами или скоплениями (вирус гриппа);
- эритроциты расположены на слое клеток диффузно (вирус парагриппа).

Каждый вирус способен адсорбировать эритроциты крови животных определенных видов. Если вирус на данной культуре клеток вызывает и ЦПД, и РГАд, то гемадсорбция проявляется раньше, чем ЦПД. Метод этот пригоден для индикации в культурах клеток только некоторых вирусов, поэтому применяется нечасто. Однако для индикации ряда вирусов (вирусы африканской чумы свиней, парагриппа-3 крупного рогатого скота и др.) он незаменим.

При отсутствии гемадсорбции на 3–4-й день после инфицирования через каждые 2–3 дня берут следующие пробирки с инфицированной культурой клеток и ставят РГАд по описанной выше методике. Пробирки с культурой клеток находятся под наблюдением в течение 14–20 дней. При отрицательной реакции гемадсорбции в первом пассаже проводят следующий пассаж и РГАд.

РГАд широко используется при диагностике ПГ-3 крупного рогатого скота, при этом используют эритроциты морской свинки (рис. 18).

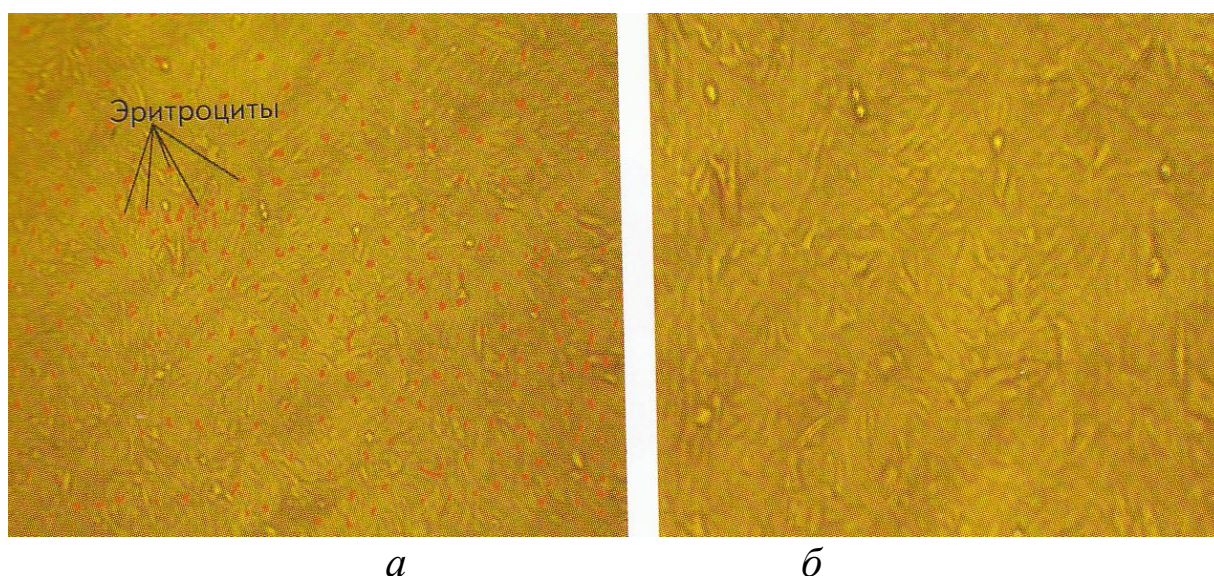


Рисунок 18 – РГАд: а – культура клеток, инфицированная вирусом ПГ-З крупного рогатого скота; б – культура клеток, неинфицированная вирусом

РГАд используют для обнаружения вируса в культуре клеток, для титрования его и при постановке реакции нейтрализации с целью определения титра антител в сыворотках крови животных.

Метод образования бляшек

Этот метод обнаружения вирусов технически сложнее других и применяется главным образом для титрования вирусов.

Дальбекко и Фогт в 1954 году впервые предложили методику получения бляшек под агаром в культуре куриных фибробластов с вирусом западного лошадиного энцефаломиелита. В последующие годы многие авторы с успехом применяли этот метод при изучении различных вирусов: ящура, везикулярного стоматита, ньюкаслской болезни, чумы птиц, полиомиелита, Коксаки и др. Метод бляшек стали широко применять в вирусологии для получения чистых популяций вируса, особенно при изучении их генетических свойств. Методику получения бляшек, предложенную Дальбекко и Фогтом, модифицировали, и в настоящее время есть целый ряд отличных друг от друга методов, связанных с изучением различных вирусов.

Метод бляшек основан на образовании вирусом в однослойных культурах, залитых агаровой средой, содержащей витальный краситель – нейтральрот, негативных колоний или бляшек (рис. 19, 20).

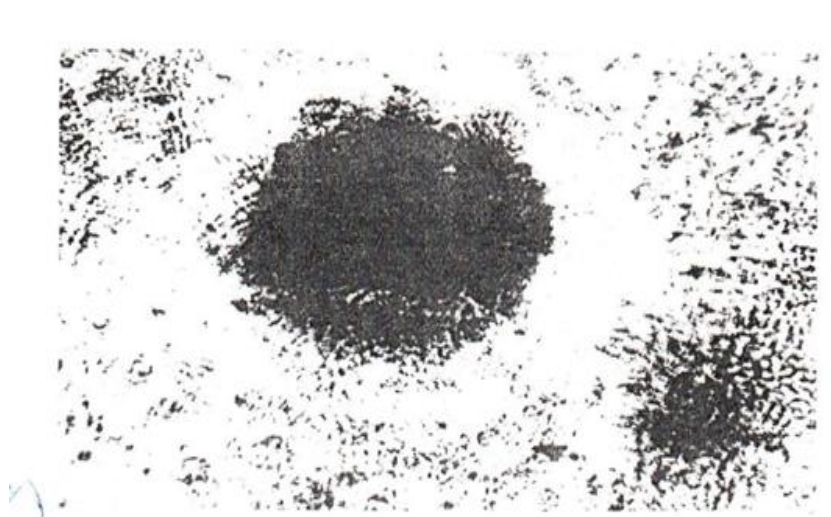


Рисунок 19 – Бляшки в культуре клеток FLK, зараженной штаммом «РС-Б» РСВ КРС (x200)

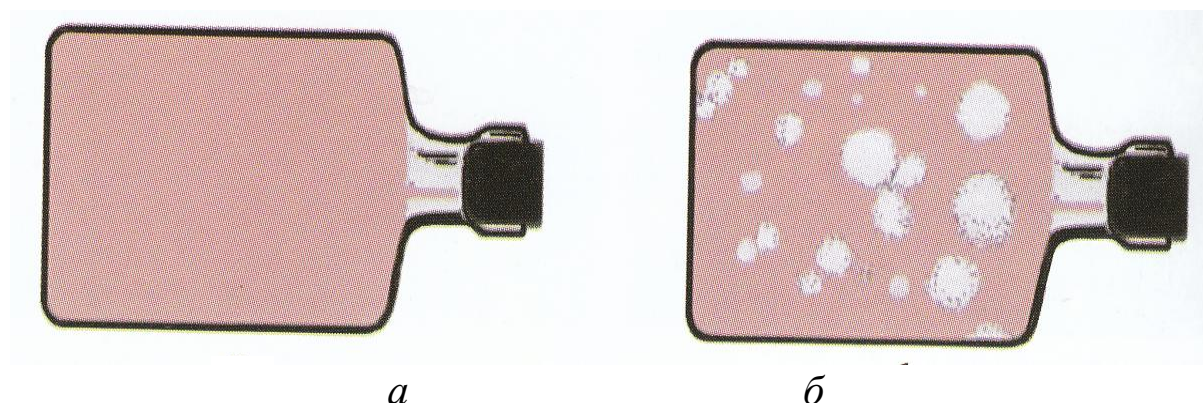


Рисунок 20 – «Бляшки»: а – контроль-культура клеток, незараженная вирусом; б – «Бляшки» – культура клеток, зараженная вирусом

Бляшки представляют собой обесцвеченные участки культуры, состоящие из погибших под действием вируса клеток. Кроме агара в целях предотвращения переноса вируса на другие места можно использовать крахмал и метилцеллюлозу. Некоторые вирусы дают бляшки без покрытия слоем агара, например вирус чумы крупного рогатого скота, осповакцины, некоторые представители вирусов герпеса и др.

При постановке бляшек особое внимание должно быть обращено на качество культуры, она должна иметь сплошной рост клеток без признаков дегенерации. Лучше всего использовать культуры, выращенные во флаконах или матрасах различного типа. На клетки, промытые средой или раствором Хенкса, наносят вирус в определенных разведениях и обеспечивают контакт вируса с клетками при пе-

риодическом покачивании в точно установленный отрезок времени (1–2 часа) при 37–38 °С. Неадсорбировавшийся вирус удаляют путем промывания раствором Хенкса или отсасывают пастеровской пипеткой, затем на слой клеток наносят специальное агаровое покрытие. Выбор среды покрытия определяется видом клеток и вируса.

Обычные компоненты агарового покрытия: агар, раствор Эрла, телячья сыворотка, нейтральный красный, раствор соды (NaHCO_3), среда, антибиотики.

После застывания (30–60 минут) с поверхности агара сливают конденсированную влагу, флаконы переносят в термостат и инкубируют клетками вверх. Время инкубации и температура должны быть оптимальными для бляшкообразования, вызываемого данным вирусом. Наблюдение за появлением бляшек проводят в течение нескольких дней. За это время вирусы, адсорбировавшиеся на клетках, проникают в последние, проходят цикл репродукции, выходят из клеток и поражают соседние клетки. В сплошном слое живых клеток возникают островки мертвых, погибших вследствие репродукции в них вируса, клеток. Раствор красителя окрашивает только живые клетки. Поэтому в матрасе на ровном красновато-розовом фоне появляются бесцветные пятна, которые и называются негативными пятнами Дальбекко или бляшками. Каждая бляшка соответствует островку мертвых клеток. Бляшки в культуре клеток образуют многие вирусы. При большой плотности (соответствующей низким разведениям вируса) они часто сливаются друг с другом. Время появления, морфология бляшек зависит от вида и штамма вируса, типа клеток и условий культивирования.

В основу титрования вирусов положены наблюдения Дальбекко и Фогта, показавших линейную зависимость между дозой внесенного вируса и количеством образующихся бляшек. Они показали, что для образования одной бляшки достаточно одной инфекционной вирусной частицы. Однако это положение верно при определенных условиях и при внесении в культуру больших разведений вирусов, исключаящих возможность множественного заражения клеток.

Цветная проба

Цветную пробу для лабораторных исследований впервые предложили Солк, Янгнер и Уорд в 1954 году. Предпосылкой для разработки данного метода явились наблюдения Эндерса, Уэллера и Роббинса, которые отметили, что в незараженных тканевых культурах

под влиянием продуктов метаболизма рН среды сдвигается в кислую сторону, что улавливается по пожелтению фенолроты, добавленного в питательную среду. В то же время жидкость в тканевых культурах, зараженных вирусом, убивающим живые клетки, сохраняла свой красный цвет.

Наиболее отчетливые результаты дают вирусы с высокой скоростью размножения при культивировании их на медленно растущих клетках.

Так как метод цветной пробы не отличается высокой достоверностью, его в практике используют редко.

Обнаружение внутриклеточных включений

При многих вирусных заболеваниях в клетках (в цитоплазме или ядре) различных органов и тканей появляются особые образования, называемые тельцами-включениями. Их классифицируют по локализации в клетке, составу нуклеиновой кислоты, тинкториальным свойствам и гомогенности.

Тельца-включения локализуются избирательно: при оспе, гриппе, бешенстве, парагриппе и других болезнях, как правило, развиваются цитоплазматические включения; при ринотрахеите крупного рогатого скота, ларинготрахеите птиц, аденовирусной инфекции и других – ядерные (рис. 21).

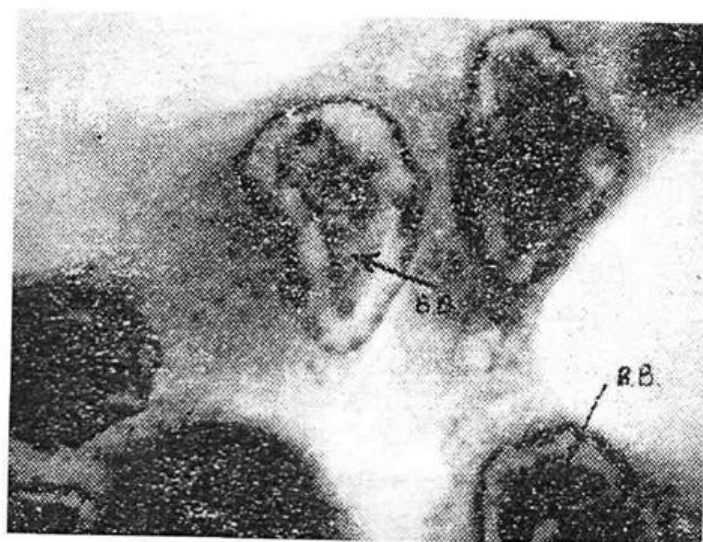


Рисунок 21 – Внутриядерные включения при заражении культуры ПТ вирусом ИРТ. 24 часа. (Ув. 7х2,5х90). Гематоксилин-эозин

Для приготовления препаратов культур клеток с целью выявления телец-включений клетки выращивают на покровных стеклах в пробирках или пенициллиновых флаконах, заражают испытуемым материалом и через определенные сроки инкубации при 37 °С (что зависит от свойств инокулированного вируса) стекла вынимают, промывают в теплом растворе Хенкса или физиологическом растворе (рН 7,0–7,2), подсушивают фильтровальной бумагой и фиксируют в одной из фиксирующих смесей: растворе Буэна – 10–15 минут, фиксаторе Карнуа – 10, Ценкера – 20–30, метиловом спирте – 15 минут или в других фиксаторах. Затем препараты окрашивают.

Вирусные тельца-включения хорошо обнаруживаются в препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином. Для этого фиксированные на покровных стеклах клетки промывают в дистиллированной воде и погружают на 5–15 минут в раствор гематоксилина (гематоксилин Майера, Эрлиха, Карацци и др.). Время окрашивания подбирают эмпирически для каждой культуры клеток и краски. Затем препараты отмывают водой и помещают на 1–2 минуты в аммиачную воду (на 200 мл дистиллированной воды добавляют 2–3 капли аммиака). В щелочной среде ядра клеток приобретают синий цвет. Далее препараты окрашивают 0,1%-м водным раствором эозина 30–60 с, удаляют лишнюю влагу фильтровальной бумагой, проводят по спиртам возрастающей концентрации: 70, 80, 96 (первый раз), 96 (второй раз), 100° + ксилол (1:1), заключают в бальзам. В каждом из спиртов и ксилоле препараты держат не более 1 минуты. Перед перенесением препаратов в следующую бюксу обязательно снимают с него фильтровальной бумагой лишнюю влагу, иначе спирт будет обводняться. При окраске гематоксилин-эозином ядра клеток окрашиваются в синий цвет, цитоплазма – в розовый, а тельца-включения – в синий или розовый в зависимости от вируса (рис. 22).



Рисунок 22 – Перезиваемая культура клеток почки эмбриона овцы (FLK) на 6 сутки после заражения штаммом «РС-Б» РСВ КРС, х 1200. Клетка не слившаяся в симпласт с ярко выраженными цитоплазматическими включениями. Гематоксилин-эозин

Обнаружение вирусов в реакции иммунофлуоресценции (РИФ)

В том случае, если размножение вируса в культуре клеток не сопровождается цитопатическим эффектом, гемадсорбцией, его присутствие можно обнаружить с помощью флуоресцирующих антител. Этот метод широко используют при диагностике классической чумы свиней, парвовирусной инфекции свиней и других болезней.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ) известна также под названиями: метод флуоресцирующих антител, метод иммунофлуоресценции, метод меченых антител. Она может быть поставлена прямым методом и непрямым.

Принцип РИФ основан на использовании явления флуоресценции, которое состоит в испускании света атомами вещества, поглотившими избыточную внешнюю энергию (обычно в виде квантов света) и пришедшими в состояние возбуждения. Атомы одних веществ обладают высокой способностью флуоресцировать (таких веществ немного), а других – низкой и даже нулевой (таких веществ большинство). Если высокофлуоресцирующее вещество обладает способностью вступать в химическую связь с нефлуоресцирующим, то его можно использовать для обнаружения этого нефлуоресцирующего вещества, которое называют флуорохромом.

Так, например, ФИТЦ сильно флуоресцирует желто-зеленым светом при облучении его сине-фиолетовыми лучами и одновременно способен вступать в химическую связь с белками, не изменяя их антигенных свойств (белки сами не обладают способностью к флуоресценции). Это позволяет, обрабатывая белоксодержащие материалы (например, сыворотку крови) раствором ФИТЦ, придавать им способность флуоресцировать, иначе говоря, метить белки флуорохромом ФИТЦ.

Так как антитела к любым антигенам (в том числе и вирусным) представляют собою разновидность белков и содержатся в сыворотке крови, обрабатывая такую сыворотку флуорохромом, можно получить флуоресцирующие («меченные» флуорохромом) антитела, которые сохраняют способность к флуоресценции и после того, как войдут в состав комплекса антиген + антитело. При этом немаловажно то, что сыворотки крови (а значит, и все их белки) легко вымываются из препаратов физиологическим раствором, а комплекс антиген + антитело не вымывается.

Чтобы с помощью метода флуоресцирующих антител об-

наружить в каком-либо патологическом материале антигены определенного вируса, из этого материала готовят мазки или отпечатки на предметных стеклах, которые после фиксации обрабатывают сывороткой, содержащей меченые антитела, гомологичные тому вирусу, наличие которого предполагается. Если в мазке или отпечатке содержатся антигены, гомологичные антителам сыворотки, то образуются комплексы антиген + антитело. Затем препараты тщательно отмывают буферным физраствором. Все сывороточные белки (а они оказываются мечеными флуорохромом) вымываются, а комплексы антиген + антитело остаются. Препараты сушат и исследуют под люминесцентным микроскопом, который устроен так, что на исследуемый препарат падает пучок сине-фиолетовых лучей, а в глаз наблюдателя попадают только желто-зеленые лучи, которые испускают комплексы антиген + антитело. По этому свечению и судят о наличии в материале антигенов, гомологичных антителам меченой сыворотки. Это так называемый прямой метод иммунофлуоресценции.

Непрямой метод состоит в том, что животных одного вида иммунизируют определенным вирусом и получают от них антивирусные сыворотки. Сывороткой крови этого же вида животных иммунизируют животное другого вида и получают от него антивидовую сыворотку, которую и метят флуорохромом (например, ФИТЦ). Исследуемый препарат обрабатывают дважды: вначале немеченой антивирусной сывороткой, а затем после отмывания – меченой антивидовой. После второго отмывания препарат высушивают и исследуют под люминесцентным микроскопом. Если в препарате были антигены, гомологичные антителам антивирусной сыворотки, то они образуют комплексы антиген + антитело, которые не вымываются из препарата. При его обработке второй (меченой) сывороткой содержащиеся в ней антитела вступают в связь с противовирусными антителами (как антигенами по отношению к антителам антивидовой меченой сыворотки) и образуются сложные комплексы, состоящие из вирусных антигенов, гомологичных им противовирусных и антивидовых антител. Эти сложные комплексы после второго отмывания сохраняются в препарате. Они обладают способностью флуоресцировать, так как в их состав входят флуоресцирующие антивидовые антитела. Обнаружение в препаратах специфической флуоресценции указывает на наличие в материале препарата антигенов, гомологичных использованной противовирусной сыворотке.

По эффективности непрямой метод РИФ не уступает прямому, но имеет следующие преимущества:

- вместо метки флуорохромом каждой антивирусной сыворотки (что довольно сложно и трудоемко) достаточно иметь меченую только одну антивидовую сыворотку;
- позволяет обнаруживать не только гомологичные данной сыворотке антигены, но и антитела, гомологичные взятому (в препарат) антигену.

В целом метод флуоресцирующих антител обладает следующими достоинствами:

- сочетает точность микроскопии со специфичностью серологических реакций;
- позволяет обнаруживать самые минимальные (микроскопические) количества антигенов или антител;
- отличается простотой техники и быстротой получения результата;
- пригоден для исследования прозрачных и непрозрачных препаратов;
- возможно фотографирование результата.

Обнаружение вирусов с помощью иммунопероксидазной реакции (иммуноферментного анализа) (ИФА)

Он отличается от РИФ тем, что сыворотку конъюгируют (метят) не флуорохромом, а ферментом (пероксидазой или щелочной фосфатазой) и этим конъюгатом обрабатывают мазки, отпечатки или срезы исследуемого материала. Затем избыток конъюгата отмывают, а на препарат наносят раствор так называемого субстрата (диаминобензидинтетрахлорида), который под действием фермента изменяет окраску. Учитывают результат под световым микроскопом. Метод ИФА отличается универсальностью, очень высокой чувствительностью и может быть поставлен в прямом и непрямом вариантах.

Сейчас чаще стали применять разновидность этого метода – твердофазный ИФА. Его особенность состоит в том, что исследуемый материал в виде суспензии вносят в лунки полистироловых микропанелей, которые предварительно сами сенсibilизированы гамма-глобулином, содержащим антитела к исследуемому антигену. После отмывания несвязавшихся антител на эти комплексы наносят имму-

ноферментный конъюгат (антитела, меченные пероксидазой или щелочной фосфатазой), который присоединяется к уже образовавшимся комплексам (непрореагировавший конъюгат отмывают). Затем необходимо обнаружить эти тройные комплексы по содержащемуся в них ферменту. Для этого во все лунки добавляют индикатор, который под действием фермента приобретает цветную окраску. В контрольных лунках такая окраска отсутствует. Метод позволяет автоматизировать процесс и довести производительность исследований до 2000 образцов в час.

Обнаружение вирусов с помощью электронного микроскопа

Электронная микроскопия используется в основном в исследовательских целях. Электронный микроскоп — сложный и дорогой прибор, в диагностических ветеринарных лабораториях его нет. Если в материале содержится менее 10^7 вирионов на 1 мл, он требует дополнительных методов очистки и концентрации исследуемого материала.

Электронная микроскопия — один из важных методов идентификации вирусов и диагностики вирусных инфекций. Важное преимущество электронной микроскопии перед другими методами диагностики — быстрота получения ответа и возможность дифференциации вирусов по их морфологии. В отдельных случаях метод электронной микроскопии незаменим. Это относится к труднокультивируемым вирусам, к смешанным и латентным инфекциям. Незаменим он при расшифровке этиологии некоторых вирусных инфекций, выделении новых вирусов и контроле на контаминацию биопрепаратов.

Широкое использование электронной микроскопии в диагностике вирусных инфекций сдерживается ограниченной доступностью высокоразрешающих электронных микроскопов для лабораторий и их технического обслуживания.

Среди различного типа электронных микроскопов наиболее пригодны электронные микроскопы просвечивающего типа с разрешением 0,2–0,14 нм (рис. 23).

В электронном микроскопе просвечивающего типа пучок электронов проходит через исследуемый препарат и его изображение проецируется на люминесцентный экран. Источником электронов яв-

ляется вольфрамовая нить (катод), при нагревании которой током в несколько сот микроампер происходит термоэлектронная эмиссия. Электронное облачко собирается и формируется защитным экраном катода, на котором поддерживается относительно катода отрицательное напряжение. Электроны ускоряются и направляются вниз по колонне в связи с разницей напряжения в несколько десятков тысяч вольт между катодом и анодом.

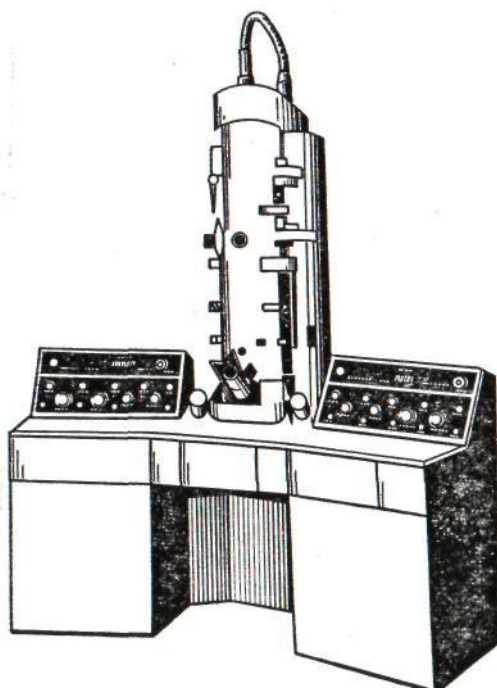


Рисунок 23 – Электронный микроскоп

Электронный луч, сфокусированный первой магнитной конденсорной линзой, проходит через объект, благодаря различной электронной плотности частей объекта происходит рассеивание электронов из их общего электронного луча. В результате после прохождения объекта однородность пучка электронов изменяется в зависимости от электронной плотности частей объекта. Такой измененный пучок электронов фокусируется и увеличивается второй объективной магнитной линзой. Это изображение еще раз увеличивается третьей магнитной проекционной линзой и попадает на люминесцентный экран. На экране возникает видимое изображение объекта, которое можно сфотографировать. Обычно просмотр и фотографирование происходит при увеличении в 30–100 тыс. раз. В дальнейшем при фотопечати изображение еще увеличивается в 5–10 раз.

Метод негативного контрастирования. Идентификация вирусов

проводится путем определения их формы, размеров и морфологии. Размер вирионов и их морфологических частей определяют путем деления размеров, вычисленных на электроннограмме, на общее увеличение микроскопа и фотопечати. Размеры определяют в нанометрах (нм). Структура вириона специфична для каждой группы вирусов.

Метод негативного контрастирования, разработанный С. Бре-щером и Р. Уорном (1959), обеспечивает получение детальной информации о морфологии вирусных частиц в суспензионном материале. Таким материалом могут быть носоглоточные секреты и смывы, моча, фекалии, везикулярная и пустулезная жидкость, сыворотка, вирусодержащая культуральная жидкость культуры клеток, аллантоисная жидкость зараженного эмбриона кур, срезы кожи, верхушки оспин, оспенные корочки, соскобы слизистой кишечника и кусочки органов и тканей вынужденно убитых и павших животных.

Для негативного контрастирования применяются следующие вещества: 2–4%-й водный раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) pH 6,8; 2–4 % водные растворы молибденовокислого аммония, кремне-вольфрамовокислого натрия pH 7,2; 0,5–2%-й водный раствор уксуснокислого уранила (уранил-ацетата) при pH 4,5; 0,5%-й водный раствор щавелевокислого уранила (уранил-оксалата); 1%-й водный раствор муравьинокислого уранила (уранил-формиата).

Подготовка вирусодержащего материала для изготовления препаратов методом негативного контрастирования зависит от концентрации вируса в суспензии, ее чистоты от посторонних балластных веществ и морфологии вируса. Такие материалы, как вирусодержащая жидкость пустул и везикул, суспензия корочкового материала, культуральная жидкость инфицированной культуры клеток, аллантоисная жидкость эмбриона кур, носовые секреты, могут исследоваться в нативном виде. Соскобы слизистых оболочек носовой перегородки, кишечника, оспенные корочки, кусочки органов и тканей растирают на поверхности стекла в 1–2-х каплях дистиллированной воды. На каплю такой суспензии накладывают сетку пленкой-подложкой вниз для адсорбции вируса на ее поверхность.

Однако обычно морфологически идентифицировать многие вирусы в таких препаратах трудно из-за большого количества балластных веществ. Для электронно-микроскопической диагностики оспенных инфекций сельскохозяйственных животных, в том числе птиц, с успехом используют биопсийный материал от клинически больных, убитых или недавно павших животных.

Материал берут, срезая лезвием безопасной бритвы верхушки оспин (эпидермис кожи) или делают срез оспенного поражения кожи вместе с отеком собственно кожей и подкожной клетчаткой (папула, пустула) (рис. 24).

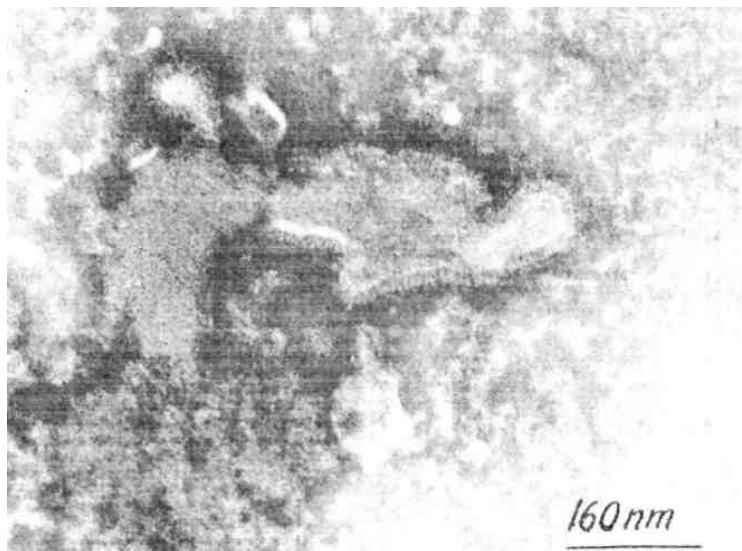


Рисунок 24 – Поврежденный вирион штамма РС-Б РСВ КРС. Культура клеток Л₅Э, негативное контрастирование. Увеличение 125000

Метод давленных препаратов. Кусочек среза эпидермиса кладут на предметное стекло срезом вверх и на его поверхность наносят 2–3 капли дистиллированной воды. Тупым концом глазного скальпеля (непосредственно через воду) осторожно ударяют по срезу, не вызывая чрезмерного помутнения воды. На поверхность суспензии на 2 минуты прикладывают сеточку пленкой-подложкой вниз. Затем промывают ее 2–3 каплями дистиллированной воды, негативно контрастируют, удаляют излишек контрастирующего раствора и просматривают в электронном микроскопе.

Метод давленных препаратов используется при подозрении на оспу голубей, кур, свиней, коров, буйволов, верблюдов; оригинальную оспу свиней; оспу свиней, вызванную вирусом осповакцины; контагиозный пустулезный стоматит (дерматит) овец и коз (эктиму); оспу вымени («узелки доярок») крупного рогатого скота, вызываемую вирусом паравакцины «ауздык» (эктиму) верблюдов.

Метод отпечатков применяют при наличии у животных выраженных отековых оспенных поражений собственно кожи и подкожной клетчатки. Для этого проводят биопсию оспенного поражения кожи вместе с собственно кожей до мышечного слоя. Затем биопсированный участок разрезают лезвием безопасной бритвы перпендикулярно

к коже. К поверхности свежего разреза осторожно прикладывают сеточку со стороны пленки-подложки. Остатки берут с поверхности среза собственно кожи и отечной подкожной клетчатки, используя каждый раз новые участки. Далее сеточки готовят тем же методом, что и давленных препаратов.

При исследовании на эктиму с внутренней стороны корочек делают отпечатки или корочки дробят в капле воды, из которой вирионы адсорбируют на сеточки.

Метод, основанный на интерференции вирусов. Построен на том, что некоторые вирусы в культуре клеток снижают способность размножаться в ней других вирусов. Например, вирус чумы свиней снижает инфекционную активность вируса ящура, вирус ньюкаслской болезни – вирус везикулярного стоматита и т. д.

Обычно этот метод применяют для обнаружения вирусов, которые не вызывают ЦПД в культуре клеток. Для обнаружения вируса чумы свиней в культуре клеток (он не вызывает ЦПД) эту инфицированную культуру заражают вторым вирусом (ящура) в дозе не менее 100 ТЦД₅₀ и инкубируют в термостате при 37 °С.

Через несколько дней проводят учет под микроскопом. Если в культуре клеток не обнаруживают ЦПД, значит, в ней находится вирус чумы свиней. Если во всех пробирках ЦПД, значит, вируса чумы нет, вирус ящура проявляет цитопатогенное действие. Метод интерференции используют даже для титрования вирусов, не вызывающих ЦПД.

Обнаружение вирусов с помощью ДНК-зондов

Метод состоит в том, что готовят так называемый молекулярный зонд, представляющий собой нити ДНК или РНК, комплиментарные нуклеиновой кислоте того вируса, который необходимо обнаружить.

Зонд метят биотином или радиоактивным фосфором (P³²). После денатурации нуклеиновых кислот в исследуемом материале (например, прогреванием), последний осаждают на специальном фильтре. Затем через него пропускают растворенный зонд, в результате чего на фильтре 1-спиральные молекулы нуклеиновых кислот материала и 1-спиральные молекулы зонда соединяются в 2-спиральные на участках, где они оказываются комплиментарными (молекулярная гибридизация). Не подвергшиеся гибридизации 1-спиральные нуклеиновые кислоты зонда вымываются из фильтра. Гибридные 2-спиральные молекулы

нуклеиновых кислот на фильтре обнаруживают в случае метки зонда биотином по изменению окраски после добавления авидина (биотин с авидином дают цветное окрашивание), а в случае метки радиоактивным фосфором – с помощью счетчика радиационных импульсов.

По степени чувствительности этот метод не имеет себе равных среди других диагностических тестов. Кроме того, он позволяет обнаруживать в материале любые формы вирусов, включая и интегрированные в геноме клеток.

Обнаружение вирусов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ПЦР в США (1983) использовали в генетике, судебной медицине.

В ПЦР другой подход, в пробирке накапливают нуклеиновые кислоты. В двухспиральной ДНК 3 миллиарда нуклеотидных пар: А-Г, Т-У и т. д. В какой последовательности они расположены? Есть уникальные участки нуклеиновой кислоты, только один у каждого семейства – 35-36 тыс. нуклеотидных пар.

1. При нагревании пробирки до 92–95 °С водородные связи разрываются, происходит денатурация, плавление.

2. При нагревании той же пробирки до 50–65 °С образуется двухцепочная ДНК, связи восстанавливаются.

Суть метода: амплификация, то есть увеличение числа копий строго определенных фрагментов ДНК в пробирке (*in vitro*) с помощью фермента ДНК-полимеразы, который осуществляет синтез взаимокompенсаторных цепей ДНК, начиная с двух праймеров (затравки). Этот фрагмент ДНК состоит из 20–30 нуклеотидов (синтезируют искусственно).

ПЦР состоит из 20–40 циклов, каждый включает три этапа:

1. Денатурация происходит при температуре 92–95 °С 1 минуту (отсоединение цепей).

2. Отжиг (присоединение праймеров) происходит при температуре 50–60 °С 1 минуту.

3. Элонгация происходит при температуре 68–72 °С (достраивание цепей ДНК).

Все повторить, получится 4 фрагмента двухцепочной $2^n - 2^{20} - 2^{40}$ много, их можно найти любым методом (первые служат матрицей и т. д.).

Метод электрофореза в агаровом геле чаще:

1. Из патматериала выделяют нуклеиновые кислоты (фенол, хлородюрон, спирт), адсорбируют 100 мкл (0,1 мл) в эпиндорф время 2 часа.

2. В пробирку добавляют нуклеиновую кислоту, амплификационную смесь: буфер, 4 вида нуклеотидов (А, Г, У, Т), ДНК-полимеразу, 2 вида праймеров, MgCl (для работы фермента) и диоинезированную воду, сверху вносят минеральное масло (для предотвращения испарения смеси).

3. Пробирки вносят в программированный термостат (меняет температуру) на 2–3 часа. Одновременно ставят положительный и отрицательный контроли.

Регистрация результатов (детекция амплификантов) проводится методом электрофореза в агаровом геле в присутствии бромистого этидия, который соединяется с фрагментами ДНК и выявляется в виде светящейся полосы при ультрафиолетовом облучении на трансэлюминаторе.

Метод, основанный на интерференции вирусов

Построен на том, что некоторые вирусы в культуре клеток снижают способность размножаться в ней других вирусов.

Например, вирус чумы свиней снижает инфекционную активность вируса ящура, вирус ньюкаслской болезни – вирус везикулярного стоматита и т. д.

Обычно этот метод применяют для обнаружения вирусов, которые не вызывают ЦПД в культуре клеток. Для обнаружения вируса чумы свиней в культуре клеток (он не вызывает ЦПД) эту инфицированную культуру заражают вторым вирусом (ящура) в дозе не менее 100 ТЦД₅₀ и инкубируют в термостате при 37 °С.

Через несколько дней проводят учет под микроскопом. Если в культуре клеток не обнаруживают ЦПД, значит, в ней находится вирус чумы свиней. Если во всех пробирках ЦПД, значит, вируса чумы нет, вирус ящура проявляет цитопатогенное действие. Метод интерференции используют даже для титрования вирусов, не вызывающих ЦПД.

Контрольные вопросы

1. Использование культур клеток в вирусологии.
2. Цитопатическое действие (ЦПД) вирусов в культуре клеток.
3. Первично-трипсинизированная культура клеток.
4. Перечислить признаки размножения вирусов в культуре клеток.
5. Диплоидные культуры клеток и их преимущества.
6. Методика заражения культуры клеток вирусом.
7. Субкультуры и их получение.
8. Реакция гемадсорбции (РГАд).
9. Культуры клеток.
10. Методы культивирования культуры клеток. Посуда, используемая для культивирования культуры клеток.
11. Методика реакции гемадсорбции (РГАд).
12. Питательные среды и растворы, применяемые для культивирования культуры клеток.
13. Цветная проба.
14. Хранение клеточных культур.
15. Обнаружение вируса при помощи электронной микроскопии.
16. Диплоидные и перевиваемые культуры клеток (определение).
17. Метод бляшек.
18. Культуры клеток. Из чего получают и как называют культуры клеток.
19. Понятие монослоя, контактной ингибиции.
20. Основные методы индикации вируса в культуре клеток.
21. Первично-трипсинизированные культуры клеток и субкультуры.
22. Метод негативных колоний.
23. Диспергирующие растворы и их применение.
24. Виды ЦПД.
25. Перевиваемые линии клеток, их получение, достоинства и недостатки.
26. С помощью чего учитывают ЦПД.
27. Перечислить признаки присутствия вируса в культуре клеток.
28. Культуры клеток и их хранение.
29. Первично-трипсинизированные культуры клеток.

- 30. Методика получения первично-трипсинизированных культур клеток.
- 31. Обнаружение вируса в полимеразной цепной реакции.
- 32. Контаминация культур клеток.
- 33. Преимущества культур клеток.
- 34. Обнаружение вирусов в реакции иммунофлуоресценции.
- 35. Обнаружение вируса в иммуноферментном анализе.
- 36. Метод, основанный на интерференции вирусов.
- 37. Обнаружение внутриклеточных включений.

Библиографический список

1. Троценко, Н.И. Практикум по ветеринарной вирусологии / Н.И. Троценко, Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская. – М.: Колос, 2000. – 272 с.
2. Белоусова, Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии / Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В. Третьякова. – М.: КолосС, 2007. – 280 с.
3. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев. – М.: КолосС, 2006. – 288 с.
4. Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных. Т. 2. / А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Е.А. Непоклонов. – М.: Академкнига, 2006. – 807 с.
5. Сюрин, В.Н. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Б.В. Соловьев [и др.] – М.: Агропромиздат, 1986. – 351 с.
6. Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре: методы и применение в биотехнологии / Л.П. Дьяконов. – М.: Спутник+, 2009. – 656 с.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

Методические указания

И.Я. Строганова, А.А. Трухоненко

Редактор А.М. Зубарева

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 24.49.04.953.П. 000381.09.03 от 25.09.2003 г.

Подписано в печать 25.10.2013. Формат 60х84/16. Бумага тип. № 1.

Печать – ризограф. Усл. печ. л. Тираж 110 экз. Заказ №

Издательство Красноярского государственного аграрного университета
660017, Красноярск, ул. Ленина, 117