

**ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ ПОСТОЯННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ
ІСО ЯИЧНИКОВ НЕПОЛОВОЗРЕЛОГО КАРПА, *CYPRINUS CARPIO***

Т.И. Щелкунова, И.С. Щелкунов

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии
и микробиологии Россельхозакадемии, г. Покров, Владимирская обл.,
shchelkun@yahoo.com

Приводятся данные о получении, морфологической и кариологической характеристиках, параметрах культивирования, видовой принадлежности, использовании для выявления вируснейтрализующих антител у рыб и спектра чувствительности к ихтиовирусам постоянной линии клеток ІСО яичников неполовозрелого карпа.

Ключевые слова: постоянная линия клеток, карп, характеристика

Развитие отечественной аквакультуры осложняется распространением имеющих и появлением новых вирусных болезней рыб. Установление этиологии, разработка методов их диагностики и профилактики невозможны без наличия культур клеток, чувствительных к широкому кругу вирусов.

Основным объектом выращивания в аквакультуре в России традиционно является карп. По нашим данным, за рубежом получено около 90 постоянных клеточных линий от 16 видов рыб семейства карповых (*Cyprinidae*). Первые линии клеток рыб этого семейства были получены

из хвостового стебля черного толстоголова, *Pimephales promelas*, (FHM) [1] и плавника золотой рыбки, *Carassius auratus*, (CAR) [2]. От карпа, *Cyprinus carpio*, получено 22 клеточные линии из 10 видов донорского материала. Чаще всего в качестве источника тканей использовали плавники. Из них получено 6 клеточных линий. Из жабр – три, по две из гонад, гипофиза, мозга, эмбрионов и мальков и по одной - из папилломы, лейкоцитов и хвостового стебля. Одной из наиболее популярных и широко используемых в мире клеточных линий рыб является линия клеток EPC, полученная из папилломы карпа [3].

Настоящая работа посвящена описанию первой отечественной постоянной линии клеток рыб, полученной из яичников неполовозрелого карпа, названной ICO (immature carp ovaries) и предназначенной для вирусологических исследований рыб.

Материал и методы

Культуры клеток. Чувствительность клеточной линии ICO к вирусам рыб определяли по сравнению с референсными линиями клеток, полученными из разных источников от зарубежных коллег: эпидермальных новообразований большого оспой карпа, *Cyprinus carpio* (EPC) [3]; хвостового стебля черного толстоголова, *Pimephales promelas* (FHM) [1]; хвостового стебля синезаберного солнечника, *Lepomis macrochirus* (BF-2) [4]; сердца кеты, *Oncorhynchus keta* (CHN-1) [5]; кожи белого осетра, *Acipenser transmontanus* (WSSK-1) [6]. Клетки выращивали в питательной среде Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (Игла 2MEM) и 10% фетальной сыворотки KPC при температуре 25°C (EPC, FHM, BF-2), 21,5°C (WSSK-1) и 19°C (CHN-1).

В качестве доноров ткани яичников для получения первичной культуры клеток ICO использовали четырехгодовалых самок карпа с гонадами второй стадии зрелости по шкале Киселевича [13].

Вирусы. Чувствительность референсных клеточных линий и линии ICO определяли к следующим вирусам: SVCV - вирус весенней виремии карпа, штамм M2 [7]; IHNV - вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых, штамм FU/0204 [8]; VHSV - вирус вирусной геморрагической септицемии, штамм ЧФ 1,2 [8]; EVEX - вирус европейского угря, *Rhabdovirus anguilla*, изолят УФ [9]; PFRV - рабдовирус мальков щуки, ELTV - вирус европейской озерной кумжи и "Hecht"- везикуловирус IV геногруппы [10]; IPNV - бирнавирус инфекционного некроза поджелудочной железы (получен от д-ра E. Neuvonen, Ветеринарный

институт, Хельсинки); CCIV - иридовирус карпа, штамм 4БЖ [11]; SbSHV - герпесвирус сибирского осетра, штамм SK1/0406 [12].

Сыворотки крови. Свежеотобранная нормальная сыворотка крови карпа (комплемент), карповая антисыворотка к вирусу SVC.

Приготовление препаратов для исследования морфологических и кариологических характеристик клеток. Для изучения морфологических особенностей клеток проводили регулярное, в течение всего срока инкубации, микроскопирование нативных и окрашенных по Паппенгейму препаратов [13] под инвертированным микроскопом при разном увеличении. Для кариологических исследований использовали культуру через 3-5 суток после посева. После добавления колхицина в ростовую среду (10 мкг/см³) культуру инкубировали 4-6 ч при 25°C. В качестве гипотонического раствора использовали среду Игла 2MEM, разведенную дистиллированной водой 1:7. Через 25-30 мин суспензию центрифугировали (60g, 5 мин). Осадок клеток фиксировали 20-30 мин при 4°C фиксатором ледяная уксусная кислота: метиловый спирт в соотношении 1:3. Препараты окрашивали в течение 8 мин 1%-ным красителем Гимза на фосфатном буфере (pH 6,8). Фотографировали по 100 метафазных пластинок и подсчитывали в каждой число хромосом, используя компьютерную программу ACD Photo Editor 3.1.

Криоконсервация. Клетки через 7-10 суток инкубации в оптимальных условиях диспергировали стандартным способом, ресуспендировали в ростовой питательной среде с 10% сыворотки крови плода коровы (СПК), подсчитывали концентрацию живых клеток, центрифугировали в рефрижераторной центрифуге (60g, 10 мин). Осадок клеток ресуспендировали в таком объеме ростовой питательной среды (с 20% СПК), чтобы их концентрация была не ниже 10⁶ кл./см³. Затем медленно, по каплям, тщательно перемешивая суспензию, добавляли диметилсульфоксид (10% от объема клеточной суспензии). Разливали суспензию клеток по 1,8 см³ в криопробирки и ставили на 1 час в холодильник при 4°C. После этого пробирки помещали в толстостенную пенопластовую коробку и переносили в низкотемпературный морозильник (-70°C), а через сутки - в жидкий азот (-196°C).

Размораживание клеток проводили быстро, помещая пробирку с культурой в водяную баню с температурой 20°C и интенсивно встряхивая её. Клетки ресуспендировали в ростовой питательной среде, подсчитывали концентрацию живых клеток, разводили до посевной концентрации, разливали в культуральные флаконы и инкубировали при оптимальной температуре. Через сутки питательную среду заменяли свежей и продолжали инкубацию.

Контроль на контаминанты. Использовали микробиологический, цитологический, цитохимический методы и ПЦР-метод (14, 15).

Выявление антител к вирусу весенней виремии карпа проводили с помощью принятого в ихтиовирусологии метода [16].

Статистическую обработку данных производили с помощью общепринятого метода [17].

Результаты и обсуждение

Получение первичных культур клеток

Дезагрегирование ткани яичника карпа вели при комнатной температуре на магнитной мешалке щадящим методом дробной дезагрегации, чередуя 10-15-минутные обработки 0,5% раствором трипсина с такими же обработками средой Игла MEM. В качестве ростовой среды использовали: 1) среду, состоящую из равных частей 0,5% раствора гидролизата лактальбумина и среды Игла основной с добавлением 15% СПК и антибиотиков (пенициллин 100 ЕД/см³ и стрептомицин 100 мкг/см³); 2) среду Игла основную с 15% СПК и антибиотиками; 3) среду Игла MEM с 10% СПК и антибиотиками; 4) среду Игла MEM с 20% СПК и антибиотиками; 5) среду Игла MEM с 10% СПК, 0,02М Нерес-буфером (рН 7,0) и антибиотиками; 6) среду Игла MEM с 10% СПК, 5% триптозофосфатного бульона (ТФБ) и антибиотиками.

Посевная концентрация составляла 6×10^5 – 1×10^6 кл./см³. Культуры клеток инкубировали при четырех разных температурах (21°, 24°, 28°, 33°C).

Через двое суток после посева в культурах, инкубировавшихся при 28°C в среде Игла MEM с 20% СПК, образовывался монослой, состоявший преимущественно из фибробластоподобных клеток. В других питательных средах и при других температурах рост был заметно хуже. В отдельных пробирках на 9 сутки после посева появились островки эпителиоподобных клеток.

Субкультивирование первичных культур клеток

Для субкультивирования использовали первичные культуры клеток спустя разное время после посева клеток. Диспергирование клеточного монослоя первичных культур клеток осуществляли смесью растворов трипсина (0,25) и версена (0,02%) в соотношении 4:1. В качестве ростовой среды в первом пассаже использовали среду Игла MEM с 10% СПК, 2% ТФБ и антибиотиками. Коэффициент первого субкультивирования - 1:1. Температура инкубации 28°C. Через сутки, как правило, образовывался монослой, состоявший из

фибробластоподобных клеток. Однако дальнейшее субкультивирование не приводило к формированию монослоя.

Для одной из попыток субкультивирования была взята первичная культура через 12 суток после посева, в которой отмечали островковый рост эпителиоподобных клеток. После внесения диспергирующего раствора все клетки, кроме клеток, образующих эти островки, легко снимались с поверхности. Добавление в эти пробирки свежей ростовой среды Игла МЕМ с 10% СПК и 2% ТФБ способствовало увеличению размеров островков эпителиоподобных клеток и их постепенному слиянию с образованием конфлюэнтного монослоя. Первый и второй пассажи были проведены с интервалом один месяц и коэффициентом субкультивирования 1:1 (соотношение трипсин:версен 4:1). Монослой формировался за 10 суток. В дальнейшем пересев проводили с интервалом 8-14 дней. Коэффициент субкультивирования постепенно увеличивали, и к 6-му пассажиру он достиг значения 1:4.

С увеличением количества пассажей соотношение трипсин:версен в составе диспергирующего раствора изменяли в сторону уменьшения доли трипсина и к 20-му пассажиру оно равнялось 5:7. Таким образом, была получена постоянная линия клеток яичников неполовозрелого карпа, получившая название ICO (immature carp ovaries).

К настоящему времени клеточная линия прошла более 700 пассажей и культивируется в среде Игла 2МЕМ с 10% СПК без антибиотиков.

Характеристика и применение постоянной линии клеток ICO

Морфология. После посева клетки культуры группируются по 5-10 клеток, спустя 3-4 часа распластаются на поверхности субстрата, образуя островки, являющиеся очагами роста. Островки затем сливаются с образованием ровного монослоя. Клетки эпителиоподобные, преимущественно однородные, их форма близка к кубической. Ядра крупные округлые, число ядрышек от 1 до 3, чаще 1. Ядрышки крупные, при окраске по Паппенгейму окружены зоной просветления. Цитоплазма гомогенная.

Кариологическая характеристика. Кариологические исследования клеточной линии проведены на 59-м и 690-м пассажах. Было установлено, что модальный класс клеточной линии 59-го пассажа представлен клетками, содержащими 100 хромосом, при достаточно узком интервале варьирования - от 95 до 104 (рис. 1А). Доля клеток модального класса равнялась 56%. Хромосомный набор донорского вида – $2n = 100$ [18].

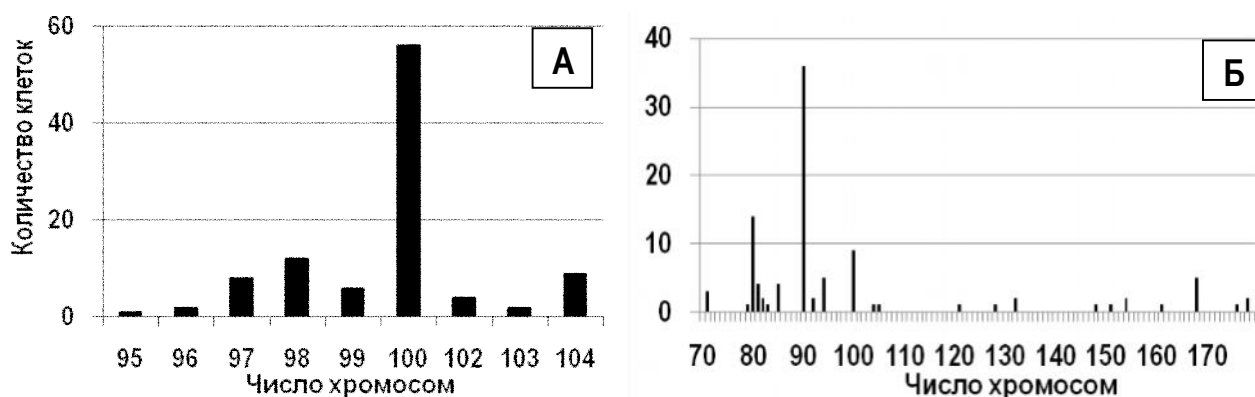


Рис. 1. Гистограмма распределения числа хромосом в 100 клетках постоянной линии ICO 59-го (А) и 690-го (Б) пассажей

На 690-м пассаже клеточной линии ICO её модальный класс был представлен клетками, содержащими 90 хромосом, доля таких клеток снизилась до 36%. При этом интервал варьирования числа хромосом резко возрос - от 71 до 178 (рис. 1Б).

Влияние посевной плотности на рост клеток. Посевная плотность влияет как на время формирования монослоя, так и на индекс пролиферации клеток (ИП). При культивировании клеток линии ICO при температуре 25°C в среде 2MEM с 10% СПК с разными посевными плотностями были получены следующие результаты (табл. 1).

Таблица 1. Влияние посевной плотности клеток на показатели роста клеточной линии ICO

Показатели	Посевная плотность, $\times 10^3$ кл./см ²						
	758 $\pm$ 2	505 $\pm$ 2	303 $\pm$ 1	190 $\pm$ 1	95 $\pm$ 1	47 $\pm$ 1	24 $\pm$ 1
Время формирования монослоя, сут.	1/6	1	1	2	6	12	н.с.
ИП	1,5 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1*

Примечание: н.с. – монослой полностью не сформировался в течение всего срока наблюдения (16 сут.); ИП – индекс пролиферации; *подсчитан через 14 сут после посева.

Высокая посевная плотность (758×10^3 кл./см²) приводила к формированию очень плотного монослоя уже через 4 часа после посева. Спустя 3 суток появлялось большое количество округлых клеток, как на поверхности монослоя, так и во взвешенном состоянии, а на 5 сутки монослой начинал отделяться от субстрата. Количество клеток при этом увеличивалась всего в 1,5 раза. При снижении посевной плотности примерно в 16 раз (до 47×10^3 кл./см²) монослой формировался очень медленно и не уплотнялся. Клетки были очень крупными, распластанными, а их количество увеличивалось всего в 1,8 раза. Наибольший ИП был достигнут при посевной плотности 303×10^3 кл./см², при этом монослой формировался за сутки.

Таким образом, посевную концентрацию необходимо выбирать в зависимости от поставленной задачи. Если требуется быстрое формирование монослоя, посевную плотность клеток можно увеличить, но не выше 3×10^5 кл./см². Эту величину следует считать оптимальной для данной линии клеток. Установлено, что с целью увеличения интервала между пересевами, после образования монослоя дальнейшую инкубацию культуры необходимо вести при пониженной примерно до 15°C температуре.

Особенности роста клеток в средах разного состава. Суспензию клеток с посевной плотностью 3×10^5 кл./см² готовили в средах разного состава с 10% СПК, высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали при 25°C.

В среде Игла 2MEM уже через двое суток отмечали увеличение плотности клеток, тогда как в остальных испытанных средах даже через трое суток после посева плотность клеток была заметно ниже посевной, особенно в основной среде Игла (рис. 2). Такая разница в темпах роста клеток в первые дни после посева обусловила разные сроки формирования монослоя в разных питательных средах (табл. 2).

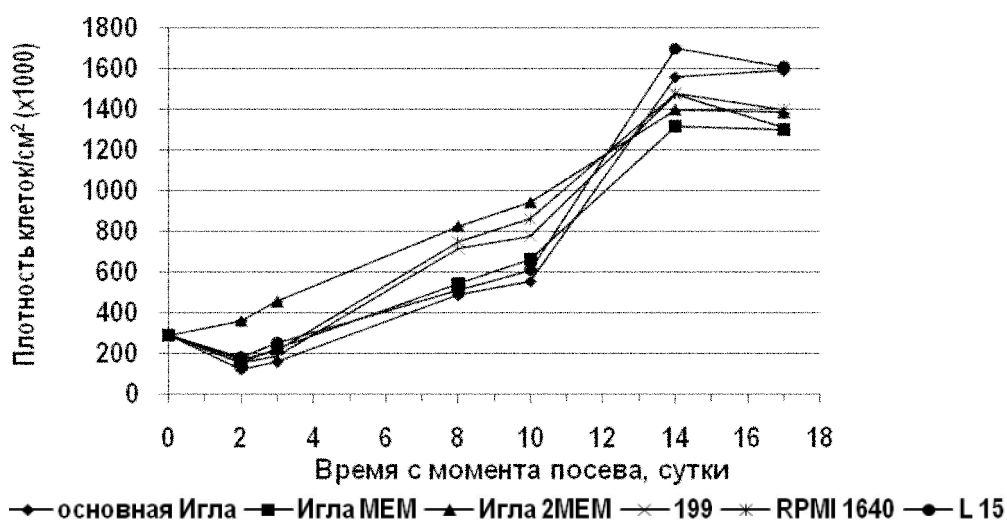


Рис. 2. Влияние состава среды на рост клеток линии ICO

Таблица 2. Влияние состава среды на показатели роста клеток линии ICO

Показатели	Питательная среда					
	Игла основная	Игла MEM	Игла 2MEM	199	RPMI 1640	L15
Время формирования монослоя, сут.	6	4	1	6	6	2
Индекс пролиферации	5,5±0,1	4,6±0,1	4,9±0,2	5,1±0,1	5,2±0,1	5,9±0,2

Ускоряющийся рост клеток на всех средах продолжался в течение 14 суток, после чего прекращался. Наивысшую плотность и ИП клеток в это время отмечали в среде L15. В то же время на 10 сутки и позднее в этой культуре клеток были выявлены признаки дегенерации монослоя - очаги темных клеток с вакуолизированной цитоплазмой, а также большое количество округлых клеток на поверхности монослоя и во взвешенном состоянии.

В среде Игла 2MEM, на которой клеточную линию ICO постоянно пассировали, максимальный ИП составил 4,9. Близкие к этому результаты были получены и на средах Игла основная и Игла MEM. При этом признаков дегенерации монослоя не отмечали: – монослой был ровным и состоял из клеток с гомогенной цитоплазмой.

В средах 199 и RPMI 1640 получены примерно одинаковые результаты, как по скорости формирования монослоя (6 сут), так и по ИП (5,1 – 5,2). Однако на них, как и при выращивании в среде L15, к 17 суткам эксперимента отмечали заметную дегенерацию монослоя.

Результаты испытаний показали, что клетки линии ICO могут расти во всех использованных средах, но среда Игла 2MEM обеспечивала наилучший стартовый рост клеток после посева, достаточно высокий ИП и хорошую сохранность клеточного монослоя. Поэтому среда Игла 2MEM рекомендована нами для культивирования этой линии клеток.

Рост клеток в среде с разным содержанием сыворотки. Суспензию клеток с посевной плотностью 2×10^5 кл./см² готовили в ростовой среде Игла 2MEM с разным содержанием СПК (от 2 до 20%), высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали при 25°C.

В результате было установлено, что пролиферация клеток происходила во всех вариантах опыта, однако концентрация сыворотки влияла на динамику роста клеток, скорость образования монослоя и ИП (рис. 3, табл. 3).

При культивировании клеток в среде с 2-15% СПК скорость роста клеток возрастала с увеличением содержания сыворотки, и плотность клеток достигала максимальных значений к 14 суткам (17 суткам для 2% СПК). Дальнейшее увеличение содержания сыворотки до 20% было избыточным и приводило к снижению темпов роста клеток (ИП $4,0 \pm 0,1$) и более ранней дегенерации культуры. Появлялись округлые клетки, количество которых с увеличением концентрации сыворотки повышалось. Они переходили во взвешенное состояние. В среде с 2% СПК пролиферация клеток продолжалась в течение всего срока наблюдения, округлые клетки отсутствовали, однако ИП оставался невысоким – $2,7 \pm 0,2$.

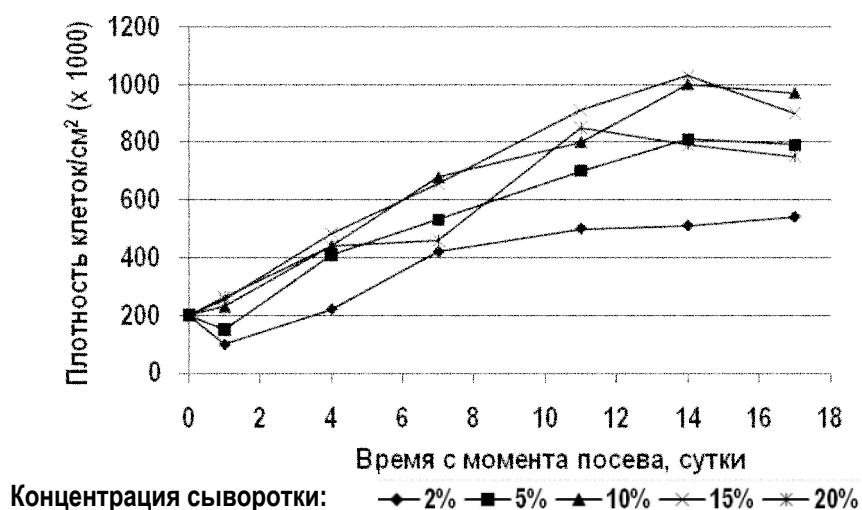


Рис. 3. Влияние концентрации сыворотки на рост клеток линии ICO

Таблица 3. Влияние концентрации сыворотки в ростовой среде на показатели роста клеток линии ICO.

Показатели	Концентрация сыворотки, %				
	2	5	10	15	20
Время формирования монослоя, сут	3	2	1	1	1
Индекс пролиферации	2,7±0,2	4,1±0,2	5,0±0,1	5,1±0,2	4,0±0,1

Таким образом, изменяя концентрацию сыворотки в ростовой среде можно в зависимости от практической потребности менять скорость образования монослоя и урожай клеток. Оптимальной концентрацией сыворотки, обеспечивающей максимальный ИП ($5,0 \pm 0,1$) и наибольший прирост количества клеток, является 10%.

Пролиферативная активность клеток при разных температурах инкубации. Готовили суспензию клеток с посевной плотностью 290×10^3 кл./см² в среде Игла 2MEM с 10% СПК, высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали при температурах от 10° до 35°C.

Исследования показали, что клетки линии могут расти в диапазоне температур от 15° до 30°C, однако динамика роста, время формирования монослоя и ИП при этом значительно различаются (рис. 4, табл. 4).

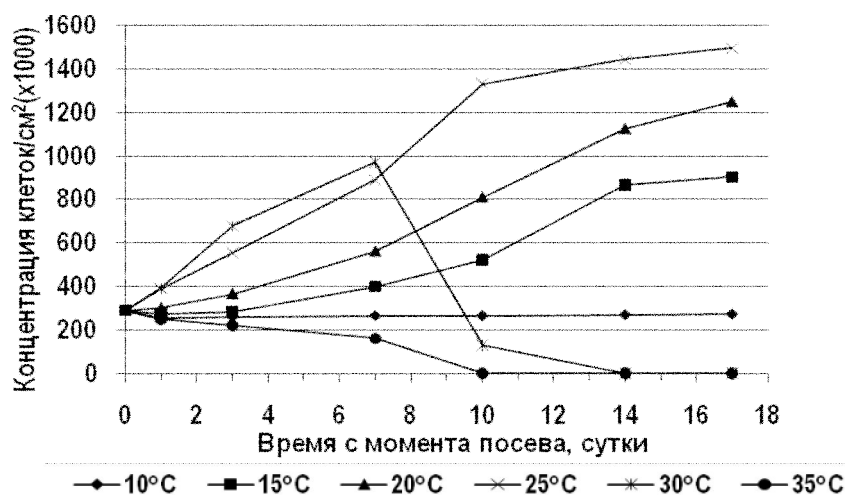


Рис. 4. Влияние температуры инкубации на рост клеток линии ICO

Инкубация при 10°C не приводила к увеличению концентрации клеток. При посеве не все клетки прикреплялись, часть их оставалась во взвешенном состоянии. Очень тонкий монослой формировался за счет того, что клетки, расплываясь, увеличивались в размерах, однако он сохранялся в течение всего срока наблюдения. При 35°C наблюдалось непродолжительное переживание клеток, монослой образовывался, но через семь суток начиналась его дегенерация, и к 10 суткам все клетки отделялись от поверхности субстрата.

Таблица 4. Влияние температуры инкубации на показатели роста клеток линии ICO.

Показатели	Температура инкубации, °C					
	10	15	20	25	30	35
Время формирования монослоя, сут.	3	2	2	1	1	2
Индекс пролиферации	0,94±0,2	3,1±0,1	4,3±0,1	5,2±0,1	3,4±0,2	0,86±0,2

В диапазоне температур 15-30°C темп роста культуры ускорялся с ростом температуры. Это происходило в течение семи суток, после чего наблюдали резкую дегенерацию культуры, инкубировавшейся при 30°C, тогда как при остальных трех температурах (15°, 20° и 25°C) тенденции роста сохранялись до конца эксперимента.

Максимальный прирост клеток наблюдался при 25°C (ИП 5,2). При 20°C он был ниже (ИП 4,3). Инкубация культуры при 15°C приводила к увеличению количества клеток всего лишь в 3,1 раза, однако в течение всего срока наблюдения признаков дегенерации не отмечали - монослой был ровным, состоял из крупных клеток с гомогенной цитоплазмой.

Таким образом, клетки линии ICO растут в диапазоне температур более чем 15°C с

оптимумом около 25°C, близким к температурному оптимуму донорского вида.

Жизнеспособность клеток после криоконсервации. Жизнеспособность клеток по тесту витального окрашивания трипановым синим после хранения при температуре минус 70°C составила 75-80%. При оптимальных условиях культивирования клетки восстанавливают исходные ростовые и морфологические свойства в течение 2 пассажей.

Контроль клеточной линии ICO на посторонние контаминанты. При исследовании клеточной линии ICO на наличие бактерий, грибов и микоплазм по ГОСТу 28085 путем посевов на жидкие и плотные питательные среды МПБ, МПА и Сабуро и с помощью тест-системы «МИК-КОМ» для диагностики микоплазмоза методом полимеразной цепной реакции получены отрицательные результаты.

Видовая идентичность подтверждена молекулярно-генетическим анализом фрагмента митохондриального гена цитохром-оксидазы длиной 172 п.н. с помощью ПЦР-амплификации, секвенирования ампликонов и определения идентичности полученных последовательностей эталонным образцам из GenBank. Установленная идентичность составила 93%.

Чувствительность к вирусам рыб. Установлено, что полученная клеточная линия высокочувствительна почти ко всем испытанным рабдовирусам рыб за исключением ELTV (табл. 5). Она также чувствительна к CCIV и не чувствительна к IPNV и SbSHV.

Таблица 5. Сравнительная чувствительность клеточной линии ICO и референсных клеточных линий к вирусам рыб

Вирус	Референсная клеточная линия	Титр вируса, Ig ТЦД ₅₀ /г ткани или см ³ культуральной жидкости			
		в референсной клеточной линии		в ICO	
Рабдовирусы					
SVCV	EPC	7,10±0,11*	8,10±0,12**	7,10±0,13*	9,10±0,14**
IINV	EPC	9,10±0,11*	7,85±0,21**	8,10±0,11*	7,35±0,10**
VHSV	EPC	6,35±0,12*	9,10±0,11**	6,35±0,20*	8,60±0,15**
EVEX	FHM	7,10±0,11***	7,85±0,14**	9,10±0,12***	9,10±0,11**
PFRV	EPC	8,60±0,14***	8,35±0,12**	7,35±0,11***	9,10±0,10**
“Hecht”	EPC	8,10±0,13***	8,35±0,15**	н.и.	н.и.
ELTV	BF-2	н.и.	7,10±0,11**	-	-
Бирнавирус					
IPNV	CHN-1	4,35±0,12*	8,10±0,12**	-	-
Иридовирус					
CCIV	EPC	н.и.	6,00±0,12**	5,70±0,15*	5,70±0,13**
Герпесвирус					
SbSHV	WSSK-1	6.10±0,13*	5.60±0,13**	-	-

Примечание: * - титр вируса в патматериале; ** - титр вируса после 3 пассажей в культуре клеток; *** - титр вируса, накопленного в референсной линии клеток; н.и. – не исследовали; - – признаков цитопатогенного действия вируса не обнаружено.

Из таблицы видно, что по чувствительности выявления вирусов SVCV, VHSV и EVEX в патологическом материале или референсной линии клеток клеточная линия ICO не уступает референсным линиям, тогда как эффективность выявления вируса IHNV и PFRV заметно ниже. После адаптации вирусов к клеткам линии ICO путем проведения 3 пассажей такие вирусы, как вирус SVCV, EVEX и PFRV накапливаются на ней в более высоких титрах, чем на соответствующих референсных клеточных линиях.

Выявление антител к вирусу весенней виремии карпа (SVCV) в реакции комплемент-зависимой нейтрализации. При выявлении антител в сыворотке экспериментально зараженного четырехлетка карпа с использованием пяти образцов комплемента (10% в реакционной смеси), полученных от разных рыб-доноров, установлена значительно более высокая чувствительность выявления антител в культуре клеток ICO по сравнению с референсной линией клеток EPC (в 6-52 раза)(табл. 6).

Таблица 6. Титры SVCV-нейтрализующих антител в сыворотке крови зараженного четырехлетка карпа, полученные в клеточных линиях EPC и ICO.

Линия клеток	Титр антител с пятью образцами комплемента карпа				
	1	2	3	4	5
EPC	1:100	1:16	1:128	1:136	1:37
ICO	1:724	1:827	1:1575	1:813	1:215

Клеточная линия ICO запатентована в России и депонирована в Специализированной коллекции перевиваемых соматических культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных при Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко (СХЖ РАСХН) Российской коллекции клеточных культур.

Благодарности. Авторы выражают признательность руководителю Центра молекулярно-генетической идентификации СИТЕС (ВНИРО) В.А. Барминцеву за помощь в видовой идентификации клеточной линии и сотруднику ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства О.А. Емельяновой за морфологический анализ хромосом линии клеток ICO.

Список литературы

1. **Gravell M., Malsberger R.C.** A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Ann. N.Y. Acad. Sci. 1965, 126: 555-565.
2. **Clem L.W, Sigel M.M., Friis R.R.** An orphan virus isolated in marine fish cell tissue culture. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1965, 126: 343-361.
3. **Fijan N., Sulimanovic D., Bearzotti M., Muzinic D., Zwillenberg L.O., Chilmonczyk S., Vaunterot J.F., De Kinkelin P.** Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. Ann. Virol. (Inst. Pasteur). 1983, 134 E: 207-220.
4. **Wolf K., Quimby M.C.** Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. Science. 1966, 151: 1004-1005.
5. **Lannan C.N., Winton J.R., Fryer J.L.** Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. In Vitro. 1984, 20: 671-676.
6. **Hedrick R.P., McDowell T.S., Groff J.M., Yun S., Wingfield W.F.** Characteristics of two viruses isolated from white sturgeon *Acipenser transmontanus*. In: "Proceedings Second Intern. Symp. on Virus. Lower Verteb." Corvallis: Oregon State University Press. 1991: 165-174.
7. **Щелкунов И.С., Юхименко Л.Н., Тромбицкий И.Д., Щелкунова Т.И., Манчу А.П.** Выделение вируса от белого толстолобика с синдромом краснухи. Экспресс-информ. ЦНИИТЭИРХ. 1984, 4: 3-7.
8. **Щелкунов И.С.** Эпизоотическая ситуация по вирусным болезням культивируемых рыб. Ветеринария. 2006, 4: 22-25.
9. **Щелкунов И.С., Скурат И.К., Сиволоцкая В.А., Сапотько В.А., Шимко В.В., Линник В.Я.** *Rhabdovirus anguilla* у угря в СССР и его патогенность для рыб. Вопросы вирусологии. 1989, 1: 81-84.
10. **Stone D.M., Ahne W., Denham K.L., Dixon P.F., Liu C.T., Sheppard A.M., Taylor G.R., Way K.** Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. Dis. Aquat. Org. 2003, 53: 203-210.
11. **Попкова Т.И., Щелкунов И.С.** Выделение вируса от карпов, больных жаберным некрозом. Рыбное хоз-во. 1978, 4: 4-38.
12. **Щелкунов И.С., Щелкунова Т.И., Щелкунов А.И., Колбасова Ю.П., Диденко Л.В., Быковский А.Ф.** Герпесвирусная болезнь у осетровых рыб в России. Российский ветеринарный журнал (Сельскохозяйственные животные). 2007, 1: 10-12.
13. Лабораторный практикум по болезням рыб. Под ред. В.А. Мусселиус. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983, 296 с.
14. **Михайлова Г.Р., Новохатский А.С., Родова М.А.** Методические рекомендации по способу выявления микоплазм в культурах перевиваемых клеток. М, 1983, 8 с.
15. Наставление по применению тест-системы «МИК-КОМ» для диагностики микоплазмоза методом полимеразной цепной реакции: утверждена Деп. ветеринарии Минсельхозпрод России 17 августа 1998 г., 11с.
16. Методические указания по идентификации и лабораторной диагностике вирусных болезней рыб. Вирусные болезни. Сб. инструкций по борьбе с болезнями рыб. М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998, 1: 60-113.
17. **Лакин Г.Ф.** Биометрия. М.: Высшая школа, 1990, 352 с.
18. **Васильев В.П.** Эволюционная кариология рыб. М.: Наука, 1985, 300 с.