

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ДВУХ ПОСТОЯННЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК ПЛАВНИКОВ СИБИРСКОГО ОСЕТРА, *ACIPENSER BAERII*

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, морфологических особенностях, параметрах культивирования, подтверждении видовой принадлежности и спектре чувствительности к ихтиовирусам постоянных линий клеток SSF-1 и SSF-2 плавников сибирского осетра.

Ключевые слова: сибирский осетр, плавник, постоянная линия клеток, характеристика.

В настоящее время в мире насчитывается около двух десятков постоянных линий клеток осетровых рыб [1], основное предназначение которых – вирусологические исследования выращиваемых осетровых. Их относительную немногочисленность можно объяснить тем, что интерес к разведению этих рыб в мировой аквакультуре возник сравнительно недавно – примерно 30 лет назад. Первые публикации о получении клеточных линий осетровых - сердца атлантического осетра, *Acipenser oxyrhynchus*, – SH [2] и плавников гибрида белуги и стерляди, *Huso huso* x *Acipenser ruthenus*, – SF [3] – увидели свет в 1985 г., но широкого применения эти линии не нашли. Сегодня за рубежом вирусологи наиболее часто используют линии клеток селезенки (WSS-2) и кожи (WSSK-1) белого осетра, *Acipenser transmontanus* [4], а в нашей стране - пула паренхиматозных органов (SSO-2) сибирского осетра, *Acipenser baerii* [5].

Настоящая работа посвящена получению и характеристике постоянных клеточных линий, полученных из плавников сибирского осетра, *Acipenser baerii*.

Материал и методы

Рыба. В качестве доноров ткани для получения первичной культуры клеток использовали сеголетков сибирского осетра, полученных из благополучного по инфекционным болезням рыбоводного хозяйства.

Питательные среды, сыворотки и растворы. В работе использовали питательные среды и растворы производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова (0,02% р-р версена и 0,25% р-р трипсина, среды: 199, Игла основная, Игла MEM,

Игла 2MEM – с двойным набором аминокислот и витаминов), ГНУ ВНИИВВиМ (RPMI 1640) и Invitrogen-Gibco (среда L15 Лейбовица и фетальная сыворотка KPC).

Линии клеток рыб. Использовали постоянные линии клеток пула почки, печени и селезенки сибирского осетра SSO-2 [5], хвостового стебля синежаберного солнечника BF-2 [6]; сердца кеты СНН-1 [7]; эпидермальных новообразований больного оспой карпа EPC [8] и хвостового стебля черного толстоголова FHM [9]. Клетки выращивали в питательной среде 199 (SSO-2) или в среде Игла 2MEM (остальные) с 10% фетальной сыворотки при температуре 25°C (EPC, FHM, BF-2) и 19°C (СНН-1, SSO-2) без добавления антибиотиков.

Вирусы рыб. Чувствительность линий клеток SSF-1 и SSF-2 определяли к следующим вирусам: SVCV - вирус весенней виремии карпа, штамм M2 [10]; IHNV - вирус инфекционного некроза гемопозитической ткани лососевых, штамм FU/0204 [11]; VHSV - вирус вирусной геморрагической септицемии, штамм ЧФ 1,2 [11]; EVEX - вирус европейского угря, *Rhabdovirus anguilla*, изолят УФ [12]; PFRV - рабдовирус мальков щуки [13], ELTV - вирус европейской озерной кумжи [14], "Hecht"- везикуловирус IV геногруппы [13]; IPNV - бирнавирус инфекционного некроза поджелудочной железы (получен от д-ра E. Neuvonen, Ветеринарный институт, Хельсинки); CCIV - иридовирус карпа, штамм 4БЖ [15]; SbSHV - герпесвирус сибирского осетра, штамм SK1/0406 [16].

Приготовление препаратов для исследования морфологических характеристик клеток. Для изучения морфологических особенностей клеток проводили регулярное, в течение всего срока инкубации, микроскопирование нативных и окрашенных по Паппенгейму [17] препаратов при разном инструментальном увеличении.

Подсчет клеток вели в четырех полных камерах Горяева, используя для оценки их жизнеспособности 0,5% раствор трипанового синего [17]. Плотность клеток рассчитывали как количество клеток, приходящееся на 1 см² рабочей поверхности и выражали в виде среднего значения ± среднее квадратическое отклонение.

Результаты и обсуждение

Получение постоянных клеточных линий плавников сибирского осетра, *Acipenser baerii*.

Специалистам хорошо известно, что плавники рыб обладают высокой регенеративной способностью. Наиболее выделяется в этом отношении хвостовой плавник. Этот факт, а также то, что наибольшее количество известных на сегодня клеточных линий рыб получено именно из плавников [1], вселяли надежду на положительный исход работы. Выбор плавников

был обусловлен еще и тем, что значительная часть их тканей представлена кожей, которая является основной мишенью ряда опасных вирусов осетровых рыб [18, 19].

У восьми клинически здоровых сеголетков осетра отрезали хвостовой плавник, помещали в среду Игла MEM с антибиотиками (1000 ЕД/см³ пенициллина, 1000 мкг/см³ стрептомицина и 200 ЕД/см³ нистатина) в соотношении 1:10 и выдерживали при комнатной температуре в течение 10 минут при регулярном встряхивании. Такую отмывку повторяли еще 2 раза, а затем на 5-7 сек плавники помещали в 70° этанол, после чего трехкратно отмывали в среде Игла MEM с 300 ЕД/см³ пенициллина, 300 мкг/см³ стрептомицина и 100 ЕД/см³ нистатина.

Обработанные плавники измельчали ножницами до величины 1-2 мм и вновь трижды отмывали средой того же состава. К полученной ткани добавляли раствор трипсина в соотношении 1:10. После 15-минутной дезагрегации на магнитной мешалке при комнатной температуре надосадочную жидкость отбрасывали, трижды промывали ткань средой Игла MEM, добавляли свежую порцию раствора трипсина и дальнейшую дезагрегацию проводили на магнитной мешалке в течение ночи при температуре 6°С, а затем 1 час при комнатной температуре (21°С). Взвесь клеток центрифугировали при 60g в течение 15 минут, подсчитывали, готовили суспензию в ростовой среде с концентрацией около 10⁶ кл./см³, разливали в пробирки по 1 см³ и инкубировали при 21,5°С. В качестве ростовой среды использовали:

1) среду 199 с 20% фетальной сыворотки и антибиотиками (пенициллин 100 ЕД/см³ и стрептомицин 100 мкг/см³);

2) среду Игла MEM с 20% фетальной сыворотки и антибиотиками.

Через двое суток после посева наблюдали образование монослоя, состоявшего из смеси фибробласто- и эпителиоподобных клеток. За первичными культурами вели длительное (около 5 месяцев) наблюдение. По мере закисления среды производили ее смену на свежую.

В ходе инкубации культур было отмечено изменение морфологии монослоя в отдельных пробирках: в одних стали преобладать эпителиоподобные клетки, в других появлялись островки фибробластоподобных клеток.

Субкультивирование первичных культур проводили в разные сроки с момента посева (от 22 дней до 5 месяцев). Для диспергирования клеточного монослоя использовали смесь растворов трипсина и версена в соотношении 1:1,5. В качестве ростовой среды использовали среды того же состава, что и при получении первичных культур. Легко удавалось получать субкультуры и пассировать их 2-8 раз. Однако, после этого клетки погибали.

В одной из пробирок с первичной культурой клеток после четырех месяцев инкубации произошло почти полное вытеснение фибробластоподобных клеток эпителиоподобными. Многократное субкультивирование этой культуры в среде 199 с 20% фетальной сыворотки было успешным, однако монослой ее оставался неоднородным, хотя и был представлен преимущественно эпителиоподобными клетками. С 25-го пассажа культуру перевели на среду Игла 2MEM с 20% фетальной сыворотки. Последующее субкультивирование дало начало перевиваемой клеточной линии SSF-1 (Siberian sturgeon fins - 1). На протяжении примерно 100 пассажей морфология культуры не менялась. В дальнейшем стали наблюдать ее изменение в интервалах между пересевами, сохраняющееся и по настоящее время. Оно состоит в переходе от эпителиоподобных клеток, доминирующих в монослое вскоре после посева клеток, к фибробластоподобным, преобладающим в “зрелой” культуре перед очередным ее пересевом. К настоящему времени клеточная линия SSF-1 прошла более 280 пассажей.

Из пробирок с первичными культурами, в которых в процессе длительной инкубации (около 4 месяцев) появились островки фибробластоподобных клеток, диспергирующим раствором вышеуказанного состава удалось удалить все клетки кроме клеток этих островков. Добавление свежей порции среды 199 с 20% фетальной сыворотки и инкубация при 21,5°C привели к формированию монослоя, состоявшего только из фибробластоподобных клеток. Дальнейшее субкультивирование оказалось успешным и дало начало клеточной линии SSF-2 (Siberian sturgeon fins - 2). Эта линия прошла уже более 280 пассажей без изменения морфологии клеток.

Содержание сыворотки в ростовой среде для обеих клеточных линий было постепенно снижено до 10%, а добавление антибиотиков прекращено.

Характеристика постоянных клеточных линий плавников сибирского осетра,
Acipenser baerii

Морфология. Популяция клеток линии SSF-1 представлена как эпителио- так и фибробластоподобными клетками. В первые 7 суток после посева преобладают в основном эпителиоподобные клетки (рис. 1). При окраске по Паппенгейму эти клетки отросчатые, распластанные по субстрату, с размытыми краями. Контакты между клетками неплотные, с большим межклеточным пространством. Ядра средних размеров, овальной формы, с четко очерченными границами. Цитоплазма и кариоплазма гомогенны. Количество ядрышек от 1 до 7, чаще 2-3 на клетку. С увеличением возраста культуры морфология клеток постепенно

меняется на фибробластоподобную. Образующиеся фибробласты представляют собой тонкие длинные нитеподобные клетки.

Монослой линии SSF-2 состоит из рыхло лежащих фибробластоподобных клеток, расположенных пучками (рис. 1). При окраске по Паппенгейму цитоплазма клеток выглядит неоднородной, с интенсивно и слабоокрашенными участками. Ядра клеток крупные, кариоплазма гомогенная. Количество ядрышек от 1 до 6, чаще 3-4 на клетку.

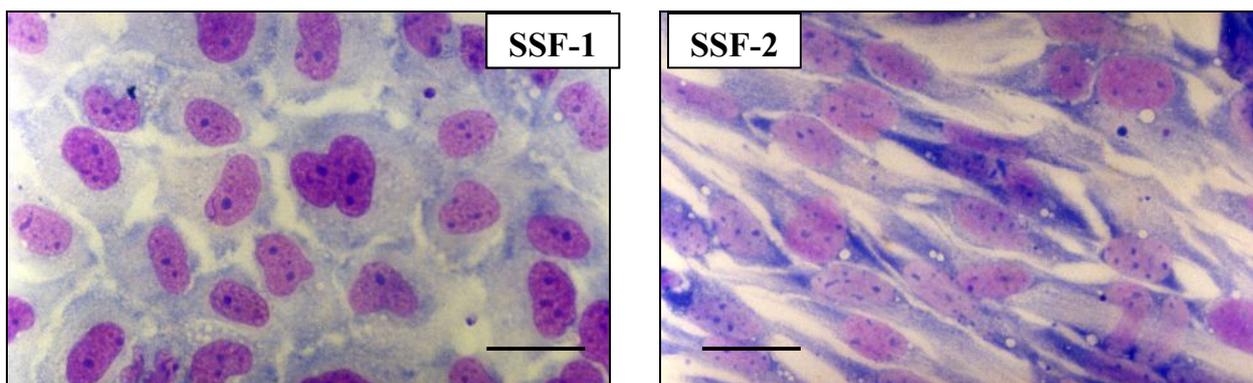


Рис. 1. Морфология клеточных линий плавников сибирского осетра
Окраска по Паппенгейму. Масштабная линейка - 20 мкм.

Влияние посевной плотности на рост клеток. Сформировавшуюся для очередного пассажа культуру клеток ресуспендировали в исходном объеме среды роста (Игла 2MEM для SSF-1 и среда 199 для SSF-2 с 10% фетальной сыворотки) и после приготовления двукратных разведений в ней высевали в 24-луночные планшеты (Linbro) и культивировали при температуре 20°C. При образовании плотного монослоя количество выросших клеток подсчитывали, объединяя по 5 лунок с культурой (табл. 1).

Таблица 1. Влияние посевной плотности клеток на показатели роста культур SSF-1 и SSF-2

Линия клеток	Посевная плотность, тыс.кп./см ² *	Индекс пролиферации / время образования монослоя (сутки) при разных коэффициентах субкультивирования					
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
SSF-1	340±9	1,7/0,25	2,5/0,5	4,6/1	3,5/6	3,0/22	1,2/н.с.
SSF-2	460±11	2,1/0,5	3,5/1	4,0/1	3,9/8	2,5/н.с.	1,1/н.с.

Примечание: * - приведена плотность клеток при посеве с коэффициентом субкультивирования 1:1; н.с. – конфлюэнтный монослой не сформировался в течение всего срока наблюдения (22 суток).

Установлено, что клеточные линии SSF-1 и SSF-2 одинаково реагировали на изменение посевной плотности клеток. При повышенных плотностях посева клеток монослой достигал состояния насыщения уже через 6 - 12 ч (табл. 1). При этом вступало в действие контактное

торможение, и индекс пролиферации был низким (1,7-2,1). Много клеток не прикреплялось к субстрату, и культуры быстро начинали дегенерировать. Низкие плотности посева удлинляли срок образования монослоя. Индекс пролиферации при этом также был низким, клеточный монослой оставался тонким и не достигал состояния насыщения, несмотря на продолжительный (22 суток) срок инкубации. Можно предположить, что клетки обеих линий вырабатывают какие-то ростовые факторы, и низкая посевная плотность клеток не обеспечивает той концентрации этих факторов в среде, которая необходима для их нормального роста. На основании полученных данных был сделан вывод, что оптимальными плотностями посева клеток изучаемых линий, которые обеспечивали высокий индекс пролиферации, наибольший урожай клеток и продолжительную сохранность их в культуре, были плотности 8–9 $\times 10^4$ кл./см² для линии SSF-1 и 11–12 $\times 10^4$ кл./см² для линии SSF-2.

Особенности роста клеток в средах разного состава. Суспензию клеток с посевной плотностью 8 $\times 10^4$ кл./см² для культуры SSF-1 и 14 $\times 10^4$ кл./см² для SSF-2 готовили в указанных ниже средах разного состава с 10% фетальной сыворотки, высевали в 24-луночные планшеты и инкубировали при 20°C.

Пролиферация клеток линий SSF-1 и SSF-2 отмечалась во всех испытанных средах. Монослой формировался уже через сутки, однако динамика роста клеточных линий на разных средах различалась (рис. 2). Наибольший прирост клеток линии SSF-1 наблюдался в средах Игла MEM, Игла 2MEM и RPMI 1640 (индекс пролиферации соответственно 4,4, 4,6 и 4,7). В то же время в среде RPMI 1640 отмечали повышенную гибель клеток. Клетки линии SSF-2 значительно лучше росли в среде 199 (индекс пролиферации 4), чем в других питательных средах. К тому же в процессе культивирования клеток линии SSF-2 в средах Игла MEM, Игла 2MEM, RPMI 1640 и L15 происходило изменение морфологии клеток. Из фибробластоподобных они превращались в эпителиоподобные.

Анализ особенностей роста в средах разного состава показал, что наилучший рост клеток (в смысле динамики прироста, максимального урожая клеток и продолжительности сохранения монослоя) полученных клеточных линий имел место в тех средах, на которых они были получены, т.е. в среде Игла 2MEM – для SSF-1 и среде 199 – для SSF-2. Вероятно, это явилось результатом продолжительной адаптации клеточных линий к “своим” питательным средам.

Вместе с этим, адаптация клеток к росту в определенной среде вовсе не означает, что их рост в других средах будет заведомо хуже. Это прекрасно демонстрирует линия клеток SSF-

1, полученная с использованием малокомпонентной среды Игла 2MEM, она давала наибольший прирост клеток в многокомпонентной среде RPMI-1640. Отмеченные при этом повышенная гибель и переход клеток во взвешенное состояние, по нашему мнению, могли быть явлением временным, обусловленным адаптацией культуры к изменившимся условиям существования. Весьма вероятно, что дальнейшее пассирование клеток на этой среде могло бы привести к появлению новой перевиваемой линии клеток с иными фенотипическими признаками.

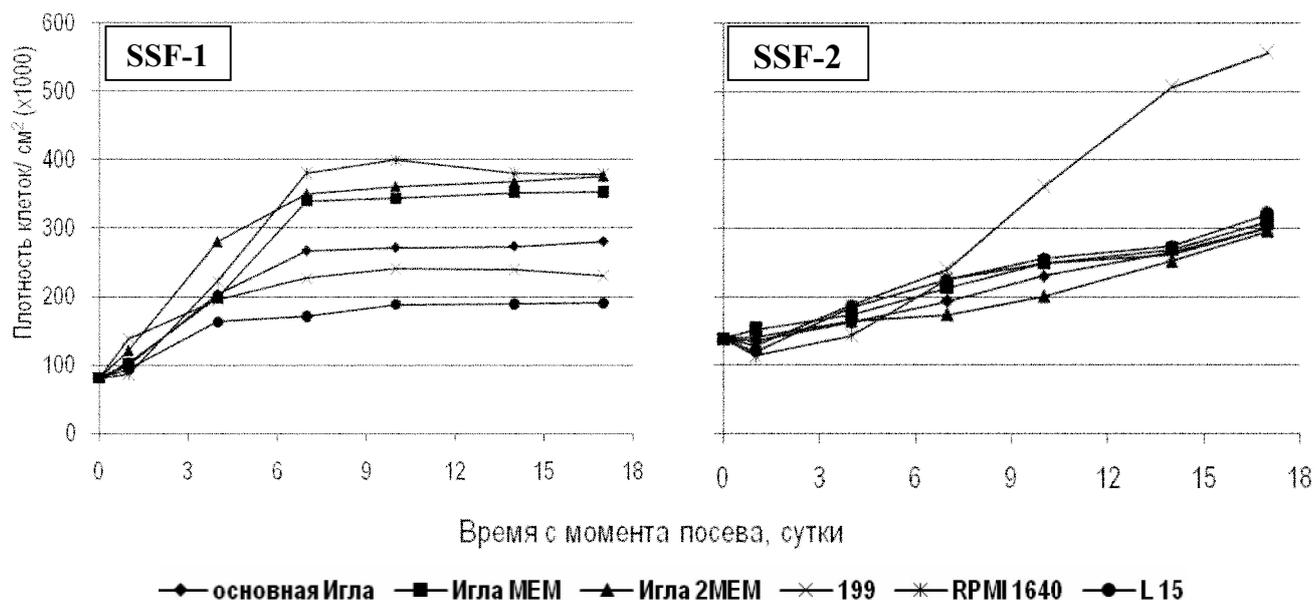


Рис. 2. Пролиферативная активность клеточных линий плавников сибирского осетра в средах разного состава

Пролиферативная активность клеток при разных температурах инкубации. Суспензию клеток линий SSF-1 и SSF-2 готовили в оптимальной для каждой линии среде (Игла 2MEM для SSF-1 и среда 199 для SSF-2) с 10% фетальной сыворотки, высевали в 24-луночные планшеты (посевная плотность 9×10^4 кл./см² для культуры SSF-1 и 13×10^4 кл./см² для SSF-2) и инкубировали при разных температурах (10° - 30°C). В результате проведенных исследований было показано, что температурно-ростовые характеристики обеих линий существенно различались (рис. 3). Если клетки линии SSF-1 начинали активно расти сразу после посева при всех испытанных температурах, то клетки линии SSF-2 в первые сутки практически не росли ни при одной из них. В дальнейшем при двух экстремальных температурах (10° и 30°C) роста у них также не было, хотя образование монослоя происходило. Динамика роста клеток в диапазоне 15-25°C была схожей, но клетки линии SSF-1 росли активнее клеток линии

SSF-2. У обеих линий температурный оптимум находится около 20°C. При 30°C монослой клеток линии SSF-1 до окончания срока наблюдения (14 сут) оставался полным, хотя на его поверхности и в культуральной среде появлялось большое количество округлых клеток. Инкубация клеток линии SSF-2 при 30°C не приводила к увеличению концентрации клеток, однако монослой также сохранялся в течение всего срока наблюдения.

Проведенные исследования показали, что обе линии обладают уникальными температурными характеристиками роста. При этом установленная оптимальная температура роста клеток линий (20°C) была близка к температурным оптимумам рыб-доноров, от которых эти клеточные линии были получены: 20-26°C [20]. Температуры, не сильно превышавшие оптимальную, стимулировали бурный рост клеток, вскоре сменявшийся дегенерацией культур, вероятно, вследствие истощения физиологических ресурсов клеток. При дальнейшем повышении температуры инкубации культуры либо не росли вообще, либо наблюдали краткосрочный умеренный рост, сопровождавшийся скорой гибелью клеток.

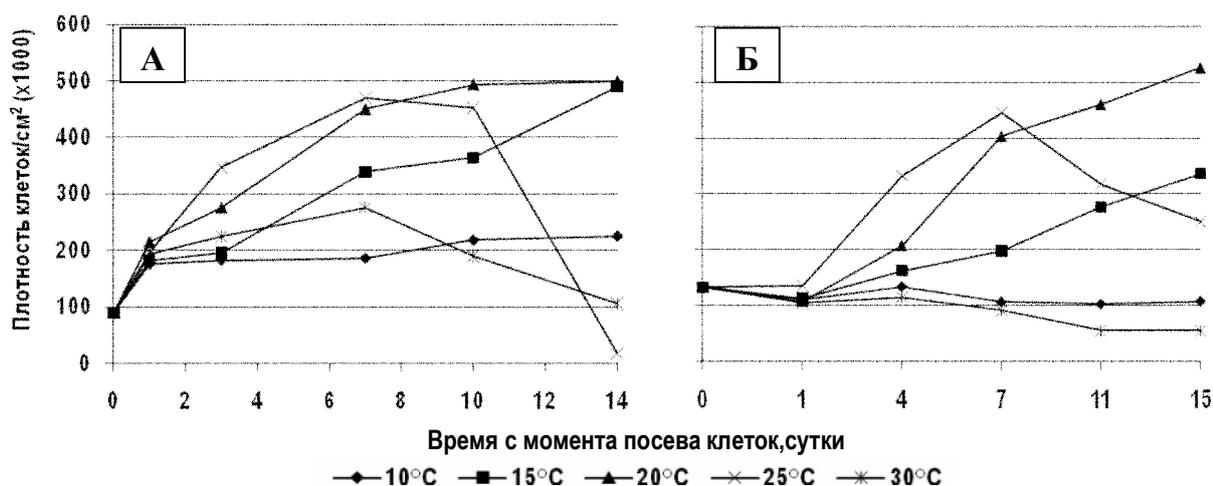


Рис. 3. Пролиферативная активность клеток постоянных линий SSF-1 (А) и SSF-2 (Б) при разных температурах инкубации

Гораздо лучше клетки переносили понижение температуры инкубации: при 10°C все клеточные линии демонстрировали либо замедленный рост, либо переживали на протяжении всего срока наблюдения. Толерантность клеточных линий рыб к пониженным температурам с успехом используют для продолжительного (месяцы и годы) хранения их в лабораторных условиях [21].

Данные по определению температурных особенностей роста клеточных линий рыб как пойкилотермных животных имеют не просто описательное значение, позволяющее

охарактеризовать их еще с одной стороны. Они могут быть использованы для управления ростом клеток в рамках решения конкретных экспериментальных задач.

Контроль клеточных линий на контаминацию микроорганизмами. При исследовании клеточных линий 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 [22] получены отрицательные результаты.

Чувствительность к вирусам рыб. Спектры чувствительности клеточных линий SSF-1 и SSF-2 к вирусам рыб схожи, но в то же время индивидуальны. Обе клеточные линии чувствительны к герпесвирусу сибирского осетра и почти ко всем испытанным рабдовирусам рыб, за исключением вируса IHN (табл. 2). Они не чувствительны также к бирнавирусу IPNV и иридовирусу карпа CCIV.

Таблица 2. Результаты определения чувствительности клеточных линий SSF-1, SSF-2 и референсных к вирусам рыб

Вирусы	Референсная линия клеток	Титр вируса					
		Референсная линия клеток		SSF-1		SSF-2	
<i>Рабдовирусы</i>							
SVCV	EPC	7,10±0,11*	8,10±0,12**	7,35±0,10*	6,10±0,12**	7,35±0,13*	8,60±0,12**
IHN	EPC	9,10±0,11*	7,85±0,21**	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
VHSV	EPC	6,35±0,12*	9,10±0,11**	5,10±0,10*	н.о.	н.о.	5,10±0,11**
EVEX	FHM	7,10±0,11■	7,85±0,14**	7,35±0,11■	6,85±0,12**	7,85±0,11■	7,35±0,10**
PFRV	EPC	8,60±0,14■	8,35±0,12**	7,85±0,12■	8,35±0,10**	7,35±0,11■	8,85±0,12**
“Hecht”	EPC	8,10±0,13■	8,35±0,15**	7,10±0,13■	7,35±0,12**	7,10±0,12■	7,35±0,12**
ELTV	BF-2	7,00±0,15■	7,10±0,11**	5,10±0,11■	4,35±0,11**	7,35±0,11■	6,10±0,11**
<i>Бирнавирус</i>							
IPNV	CHN-1	4,40±0,12*	8,10±0,12**	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Иридовирус</i>							
CCIV	EPC	н.и.	6,00±0,12**	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Герпесвирус</i>							
SbSHV	SSO-2	6,10±0,13*	6,10±0,13**	5,85±0,12*	5,85±0,13**	5,35±0,12*	5,35±0,13**

Примечание: * - титр вируса в патматериале, lg ТЦД₅₀/г ткани; ** - титр вируса после 3-х пассажей на культуре клеток, lg ТЦД₅₀/см³ культуральной жидкости; ■ - титр вируса, накопленного на референсной линии клеток, lg ТЦД₅₀/см³ культуральной жидкости; н.и. – не исследовали; н.о. – признаков ЦПД не обнаружено.

Примечательно, что линия клеток SSF-1 выявляла вирус VHS при заражении её патологическим материалом от больных рыб, однако к третьему пассажу *in vitro* цитопатогенное действие (ЦПД) вируса утрачивалось. Линия клеток SSF-2 вела себя прямо противоположным образом. При инокуляции её патологическим материалом ЦПД не

наблюдали, однако дальнейшее пассирование приводило к адаптации вируса, и после 3-х пассажей его титр достигал $5,1 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$.

Наиболее чувствительной линия SSF-2 оказалась к антигенно-родственным между собой вирусам SVCV и PFRV. Титры, в которых эти вирусы в ней накапливались ($8,60$ и $8,85 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$, соответственно), превосходили таковые для референсной линии ($8,10$ и $8,35 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$, соответственно). Клеточная линия SSF-1 эффективно выявляла вирус SVCV в патологическом материале, превосходя по чувствительности референсную линию клеток ($7,35$ и $7,10 \lg \text{TCID}_{50}/\text{г}$ ткани, соответственно). Однако дальнейшее пассирование на ней приводило не к увеличению титра, как это отмечалось для референсной линии, а к снижению с $7,35$ до $6,10 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. Вирусрепродуцирующая активность этой линии к вирусу PFRV не отличалась от таковой для референсной линии клеток. Время появления и характер ЦПД вирусов SVCV и PFRV в этих и референсной клеточных линиях в целом не различались. ЦПД проявлялось в виде округления клеток, разрежения монослоя и появления клеток с длинными тонкими отростками, придающими пораженной культуре клеток вид сеточки (рис. 4А).

Первые признаки ЦПД герпесвируса сибирского осетра в SSF-1 и SSF-2 появлялись в те же сроки, что и на SSO-2, однако полная деструкция монослоя наступала позже – на 11-14 сутки и только при заражении высокими дозами вируса. Отличительной особенностью герпесвирусного ЦПД в культуре клеток SSF-2 было слияние клеток и образование многоядерных симпластов. Количество ядер в симпластах нередко исчислялось несколькими десятками. На поздних стадиях инфекции симпласты постепенно округлялись, приобретая форму шара, который крепился к субстрату длинными отростками (рис. 4Б). Постепенно симпласты утрачивали связь с субстратом и переходили во взвешенное состояние.

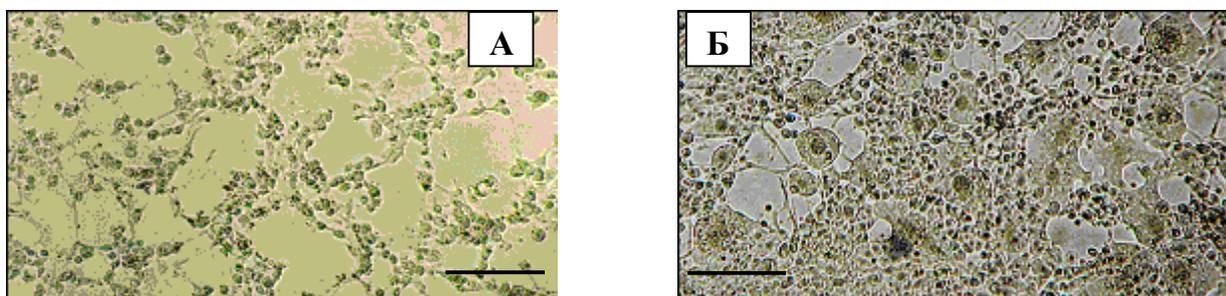


Рис. 4. ЦПД в культуре клеток SSF-2 рабдовируса весенней виремии карпа (А) и герпесвируса сибирского осетра (Б)
Неокрашенные препараты. Масштабная линейка - 80 мкм.

Видовая идентичность полученных клеточных линий подтверждена полимеразной цепной реакцией с праймерами AVRМ (TGTCTGTCTAGAACATATG) и ANR (TATACACCATTATCTCTATGT), специфически связывающимися с определенными локусами D-петли митохондриальной ДНК сибирского осетра [23]. Наличие двух ПЦР-продуктов длиной 138 и 215 п.н. указывало на видовую принадлежность исследованных образцов клеточных линий сибирскому осетру (*A. baerii*).

Таким образом, из одного образца донорской ткани получены две различных по свойствам линии клеток, которые могут стать полезным инструментом в работе с ихтиовирусами.

Благодарности. Авторы выражают признательность руководителю Центра молекулярно-генетической идентификации СИТЕС В.А. Барминцеву (ВНИРО) за помощь в видовой идентификации клеточных линий и заведующей лабораторией бактериологии ГНУ ВНИИВВиМ И.Ю. Егоровой за контроль контаминации линий микоплазмой.

Список литературы

1. **Щелкунова Т.И.** Перевиваемые линии карпа (*Cyprinus carpio*) и сибирского осетра (*Acipenser baeri*), их использование в ихтиовирусологии. Диссертация канд. биол. наук. Псков. 2007, 154 с.
2. **Li M.F., Marragatt V., Annand C., Obense P.** Fish cell culture: two newly developed cell lines from atlantic sturgeon, (*Acipenser oxyrinchus*) and guppy (*Poecilia reticulata*). *Canad. J. Zool.* 1985, 63: 2867-2874.
3. **Sano T.** Herpesvirus cyprini: biological and oncogenic properties/ T. Sano, H. Fukuda, M. Furukawa. *Fish Pathology.* 1985, 20(2/3): 381-388.
4. **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: Fryer J.L. (Ed.) "Proceedings of the Second International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates". Corvallis, OR: Oregon State University Press. 1991: 165-174.
5. **Щелкунова Т.И., Купинская О.А., Мащенко Н.А., Щелкунов И.С.** Клеточные линии из тканей сибирского осетра. Первый конгресс ихтиологов России: тез. докл. - Астрахань, сентябрь 1997: 302-303.
6. **Wolf K., Quimby M.C.** Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. *Science.* 1966, 151: 1004-1005.
7. **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.
8. **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.
9. **Gravell M., Malsberger R.C.** A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1965, 126: 555-565.
10. **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.

11. **Щелкунов И.С.** Эпизоотическая ситуация по вирусным болезням культивируемых рыб. Ветеринария. 2006, 4: 22-25.
12. **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.
13. **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.
14. **Koski P., Hill B.J., Way K., Neuvonen E., Rintamäki P.** A rhabdovirus isolated from brown trout (*Salmo trutta m. lacustris* L.) with lesions in parenchymatous organs. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 1992, 12: 177-180.
15. **Попкова Т.И., Щелкунов И.С.** Выделение вируса от карпов, больных жаберным некрозом. Рыбное хоз-во. 1978, 4: 4-38.
16. **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.
17. Лабораторный практикум по болезням рыб/ под ред. В.А. Мусселиус. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983, 296 с.
18. **Hedrick R.P., McDowell T.S., Rosenmark R., Aronstein D., Lannan C.N.** Characteristics of two viruses isolated from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Proceedings Second Intern. Symp. Virus. Lower Verteb. Ed.: J.L. Fryer -Corvallis, OR: Oregon State Univer. Press, 1991: 165-174.
19. **Watson L.R., Yun S.C., Groff J.M., Hedrick R.P.** Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and sub adult white sturgeon *Acipenser transmontanus*. Dis. Aquat. Org. 1995, 22: 199 -210.
20. **Щербина М.А. Гамыгин Е.А.** Кормление рыб в пресноводной аквакультуре. М. ВНИРО. 2006, 360 с.
21. **Wolf K., Quimby M.C.** Fish cell and tissue culture. Fish Physiology Eds.: W.S. Hoar and D.J. Randall. N.Y. Acad. Press. 1969, 3: 253-305.
22. Наставление по применению тест-системы «МИК-КОМ» для диагностики микоплазмоза методом полимеразной цепной реакции: утверждена Деп. ветеринарии Минсельхозпрода России 17 августа 1998 г., 11с.
23. **Н.С.Мюге, А.Е. Барминцева.** Набор олигонуклеотидных праймеров для определения видовой принадлежности осетровых рыб и продукции из них. Патент № 2 332 463, Россия; заявлено 25.01.2007; опубл. 27.08.2008, Бюл. № 24, 11с.