

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 578.824.11:578.242].083.2

Генералов С.В., Ерохин П.С., Красовская Т.Ю., Осина Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Щербакова С.А.

ИЗУЧЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК ЛИНИИ VERO, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ БЕШЕНСТВА (RABV, LISSAVIRUS, RHABDOVIRIDAE)

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора, 410005, г. Саратов

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучены особенности влияния аттенуированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» на морфологические параметры клеток перевиваемой линии Vero. Для подтверждения специфичности взаимодействия и определения инфекционной активности вируса бешенства использовали методы, основанные на фазово-контрастной микроскопии и иммунофлюоресценции. Получены изображения интактных и инфицированных вирусом бешенства клеток Vero в различные сроки культивирования вируса. Установлен характер изменения геометрических размеров клеток (длины, ширины, высоты) и шероховатости клеточной мембраны в зависимости от времени культивирования вируса бешенства. На протяжении наблюдения регистрировали как увеличение, так и уменьшение размеров клеток, при этом размеры инфицированной клетки превышали размеры интактной. Возрастание значений шероховатости клеточной мембраны при воздействии вируса бешенства наблюдалось в течение всего наблюдения, начиная с первых часов взаимодействия вируса с клеткой, при этом у интактных клеток Vero отмечали лишь незначительные изменения шероховатости мембраны, которые не зависели от возраста культуры. Установлена зависимость увеличения шероховатости клеточной мембраны от заражающей дозы вируса бешенства. Полученные результаты открывают перспективу разработки методического подхода к количественной оценке вируса бешенства *in vitro* с применением АСМ, при этом наиболее показательным параметром для учета результата представляется изменение шероховатости клеточной мембраны.

Ключевые слова: вирус бешенства; клеточная культура Vero; атомно-силовая микроскопия; шероховатость, ультраструктура поверхности клетки.

Для цитирования: Генералов С.В., Ерохин П.С., Красовская Т.Ю., Осина Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Щербакова С.А. Изучение ультраструктуры поверхности клеток линии Vero, инфицированных вирусом бешенства (RABV, *Lissavirus*, *Rhabdoviridae*). *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(5): 227-232.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-227-232>

Generalov S.V., Erokhin P.S., Krasovskaya T.Yu., Osina N.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Shcherbakova S.A.

A STUDY OF THE ULTRASTRUCTURE OF THE SURFACE OF THE TRANSPLANTABLE LINE VERO CELLS INFECTED WITH THE RABIES VIRUS (RABV, LISSAVIRUS, RHABDOVIRIDAE)

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, 410005, Russian Federation

Characteristics of the effect of attenuated rabies virus strain «Moscow 3253» on morphological parameters of transplantable line Vero cells were studied by atomic force microscopy (AFM). Methods based on phase contrast microscopy and immunofluorescence were used to confirm the specificity of interaction and to identify the infectious activity of the rabies virus. Images of intact Vero cells and Vero cells infected with rabies virus were obtained at different periods of cultivation. The character of changes in the cell dimensions (length, width, height) and the cell membrane roughness depending on the rabies virus cultivation time was determined. During the observation period both increases and decreases in the size of the cells were recorded. The size of the infected cells exceeded that of the intact. An increase in the membrane roughness in cells exposed to rabies occurred during the entire period of observation, since the first hours of the interaction of the virus with the cell, while the intact Vero cells exhibited only minor changes in the membrane surface roughness, which were not dependent on the age of the culture. The dependence of the increase in the cell membrane roughness on the infecting dose of the rabies virus was determined. The obtained results open up the prospect of developing a methodological approach to the quantitative *in vitro* evaluation of the rabies virus using AFM. Changes in the cell membrane roughness appear to be the most indicative parameter for such evaluation.

Key words: Rabies virus; cell culture Vero; atomic force microscopy; roughness; surface ultrastructure of cells.

For citation: Generalov S.V., Erokhin P.S., Krasovskaya T.Yu., Osina N.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Shcherbakova S.A. A study of the ultrastructure of the surface of the transplantable line Vero cells infected with the rabies virus (RABV, *Lissavirus*, *Rhabdoviridae*). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(5): 227-232. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-227-232>

For correspondence: Sergey V. Generalov, Candidate of biological sciences, leading researcher of the Prophylactic Immunoglobulin Laboratory, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: svgeneraloff@gmail.com

Information about authors:

Generalov S.V., <http://orcid.org/0000-0003-1461-5383>; Erokhin P.S., <http://orcid.org/0000-0001-9525-8327>; Krasovskaya T.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-7663-5502>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 03 February 2017
Accepted 28 February 2017

Для корреспонденции: Генералов Сергей Вячеславович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории профилактических иммуноглобулинов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, 410005, г. Саратов. E-mail: svgeneraloff@gmail.com

Введение

Вирус бешенства, принадлежащий к семейству *Rhabdoviridae* и роду *Lyssavirus*, способен вызывать смертельно опасное заболевание, характеризующееся поражением центральной нервной системы. Проникновение вируса бешенства в клетку происходит главным образом путем эндоцитоза, а размножение — в цитоплазме клеток восприимчивого организма или тканевой культуры [1]. При изучении взаимодействия вируса бешенства и клеточных культур экстраневрального происхождения методом фазово-контрастной микроскопии далеко не всегда наблюдается цитопатическое действие [2, 3], которое обычно предполагает деструктивные изменения отдельных клеток и клеточного монослоя. Тем не менее некоторые штаммы вируса бешенства проявляют цитопатические свойства, которые обнаруживаются методом фазово-контрастной микроскопии в поздние сроки культивирования вируса [4]. На наш взгляд, при исследовании цитопатического действия вируса бешенства методом фазово-контрастной микроскопии инфицированный клеточный монослой в ряде случаев сложно отличить от интактного, особенно в поздние сроки культивирования, когда происходит отмирание и не инфицированных вирусом клеток.

Более полную характеристику взаимодействия вируса с клеткой позволяют получить методы атомно-силовой микроскопии (АСМ), которые в последние годы находят все большее применение для изучения поверхностной структуры микрообъектов: бактерий [5—7], вирусов и эукариотических клеток [8—12]. Эта технология дает возможность изучить процессы, происходящие на поверхности микрообъектов (экспрессию биомолекул, адгезивные свойства, упругость и шероховатость) при различных условиях, а также оценить и описать изменение морфофункциональных характеристик микрообъекта в целом в зависимости от влияния различных условий (изменение pH, температуры, присутствие антибиотиков и т. д.) [5, 7]. Методы АСМ широко используются для изучения процессов взаимодействия вирусов как с эукариотическими, так и с прокариотическими клетками [6, 8—12].

Цель исследования заключалась в изучении изменения ультраструктуры поверхности клеток перевиваемой линии Vero, инфицированных вирусом бешенства, методом АСМ в зависимости от длительности и степени воздействия вируса на клетку.

Материал и методы

Вирусы. Для исследования использовали аттенуированный штамм вируса бешенства «Москва 3253», используемый в производстве антирабического иммуноглобулина. Штамм изначально получен из коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского применения (Москва) и адаптирован в РосНИПЧИ «Микроб» к репродукции на перевиваемой линии клеток Vero.

Клетки. В работе использовали перевиваемую клеточную линию Vero (клетки почек зеленой мартишки), проверенную на отсутствие микоплазм. Клеточная линия получена из коллекции компании «Биолот» (Санкт-Петербург).

Культивирование клеток и вируса осуществляли на питательной среде Игла МЕМ с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (КРС) во флаконах с площадью поверхности 25 см², а также 24- и 96-луночных

планшетах при 37°C и 5% CO₂. Состояние клеточного монослоя оценивали методом фазово-контрастной микроскопии с помощью инвертированного микроскопа Биомед-3И (Россия). После формирования монослоя, занимающего от 80 до 90% ростовой поверхности, клетки открепляли от поверхности флакона раствором трипсина и версена, взятых в соотношении 1:2, и суспендировали в питательной среде. Затем к клеточной суспензии добавляли вирусодержащую жидкость. Для инфицирования клеток вирус вносили в дозе от 0,01 до 1 ИД₅₀/кл. Конечная концентрация клеток при этом составляла от 1,5 • 10⁵ до 2,2 • 10⁵ кл/мл. Отрицательным контролем являлась культура клеток, подготовленная аналогичным образом, но без добавления вирусодержащей жидкости. Активность вирусодержащей жидкости (титр) и специфичность взаимодействия вируса с клеточной культурой Vero оценивали методом иммунофлюоресценции с помощью люминесцентного микроскопа Nikon (Япония) [13, 14]. Для окрашивания использовали специфичный к вирусу бешенства иммуноглобулин, меченный ФИТЦ (г. Владимир).

Атомно-силовая микроскопия. Исследования проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия) в режиме прерывистого контакта полуконтактным методом и методом расогласования [5]. При этом использовали кремниевые зонды серии NSG01 (NT-MDT, Россия) жесткостью 5,1 Н/м с радиусом кривизны 10 нм и резонансной частотой 150 кГц. Исследования проводили при оптимальных значениях основных параметров сканирования: амплитуды колебаний кантилевера Resonance 22 ед., начальной фазы его колебаний Phase 240°, скорости сканирования Frequency 0,75 Гц, коэффициента усиления цепи обратной связи FB Gain 0,3 ед., Set Point 19 ед. (величина Set Point и начальный уровень сигнала DFL определяли величину силы взаимодействия зонда с поверхностью образца). Среднюю арифметическую шероховатость поверхности клеточной стенки определяли методом Roughness analysis по 10 значениям, полученным в эксперименте, с указанием абсолютной погрешности [7].

Образцы для исследования методом АСМ готовили следующим образом. В стерильную пробирку из флакона переносили питательную среду, на которой культивировали клетки. Затем клетки промывали раствором DPBS, открепляли раствором трипсина и версена (1:2) и переносили в указанную пробирку. После центрифугирования при 1500 об/мин удаляли супернатант, а осадок для фиксации суспендировали в растворе глутарового альдегида (2,5%) и инкубировали в течение 2 ч при 4°C. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин, удаляли надосадочную жидкость и добавляли бидистиллированную воду в объеме 1 мл, ресуспендировали и повторно центрифугировали. На покровное стекло наносили 4 мкл суспензии и высушивали при комнатной температуре.

Обработку и анализ изображений проводили с использованием программы Image Analysis (NT-MDT, Россия). Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Nova (NT-MDT, Россия), Microsoft Excel.

Результаты

На первом этапе эксперимента оценивали динамику изменений исследуемых параметров с момента инфицирования клеточного монослоя до гибели клеток. Среднее время наблюдения составляло 96 ч.

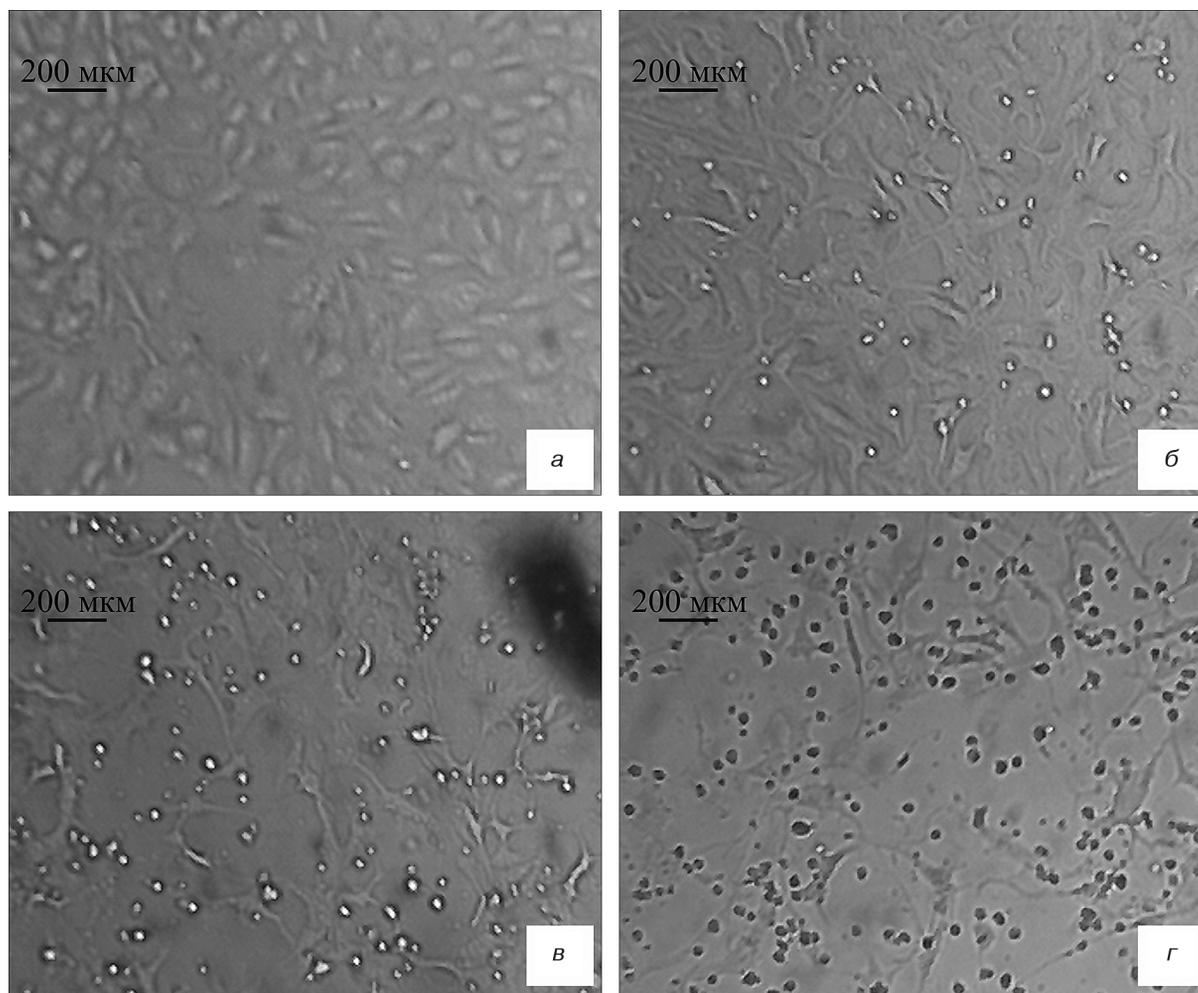


Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия интактного и инфицированного вирусом бешенства монослоя клеточной культуры Vero (ув. 100): *а* — интактный монослой (отрицательный контроль), 72 ч культивирования; *б* — интактный монослой (отрицательный контроль), 96 ч культивирования; *в* — инфицированный монослой, 72 ч культивирования; *г* — инфицированный монослой, 96 ч культивирования.

При оценке клеточного монослоя методом фазово-контрастной микроскопии через 48 ч культивирования не установлено различий между интактными и инфицированными клетками. Начало отмирания клеток инфицированного монослоя регистрировали на 3—4-е сутки культивирования (рис. 1). В интактном монослое мертвые клетки появлялись на 1 или 2 сут позже, при этом процесс отмирания инфицированного клеточного монослоя происходил быстрее. Методом люминесцентной микроскопии обнаруживали появление фокусов флуоресценции в инфицированном монослое через 48 ч после заражения, что свидетельствовало о репродукции вируса в клетке (рис. 2).

При анализе клеток Vero методом АСМ установлено, что вирус бешенства вызывал изменение ультраструктуры поверхности клетки (рис. 3). Уже после нескольких часов инфицирования на поверхности клетки регистрировали изменения, вызванные адсорбцией вируса и его внедрением в клетку. Через несколько суток после инфицирования наблюдали выпячивания клеточной мембраны, разрушения мембранной границы и экструзию содержимого клетки. Размеры инфицированной клетки варьировали на протяжении всего периода наблюдения в сторону как увеличения, так и

уменьшения, превышая при этом размеры интактной клетки (табл. 1).

Значения шероховатости клеточной стенки возрастали при воздействии вируса бешенства на протяжении всего эксперимента начиная с первых часов взаимодействия вируса с клеткой (рис. 4).

В первые 4 ч значение шероховатости инфицированных клеток возрастало в 2,5 раза относительно интактных клеток. К завершению эксперимента шероховатость инфицированных клеток увеличивалась более чем в 8 раз относительно исходного значения. При этом у интактных клеток Vero происходило незначительное изменение шероховатости. Таким образом, возраст культуры практически не оказывал влияния на состояние шероховатости клеточной мембраны.

Следующим этапом эксперимента являлся анализ изменений исследуемых параметров в зависимости от дозы вируса. Для заражения клеток использовали вирусосодержащую жидкость, активность которой составила 4,8 lg ИД₅₀/мл. Из указанной вирусосодержащей жидкости готовили серию десятикратных разведений на питательной среде Игла MEM с 10% содержанием сыворотки

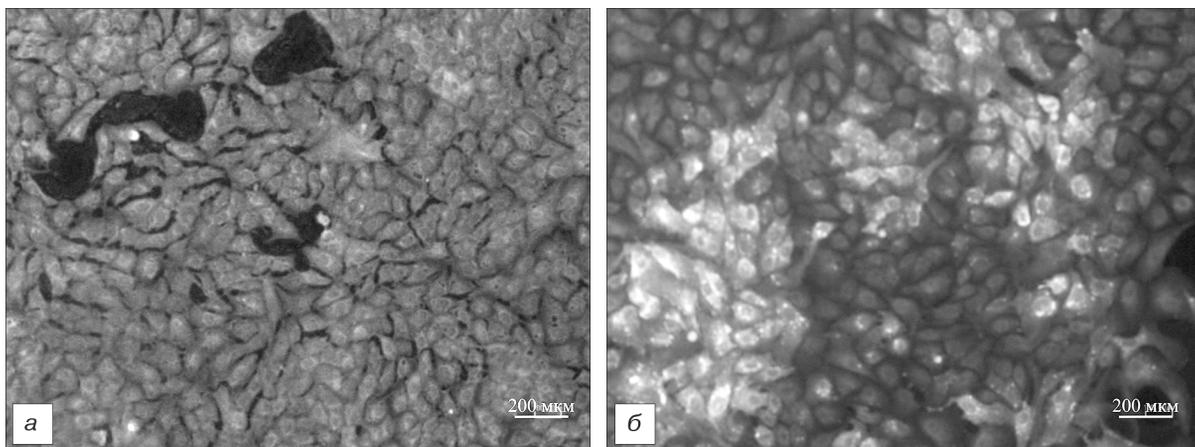


Рис. 2. Люминесцентная микроскопия intactного (а) и инфицированного вирусом бешенства монослоя (б) клеточной культуры Vero после 48 ч культивирования (ув. 200; окрашивание специфической сывороткой, меченной ФИТЦ).

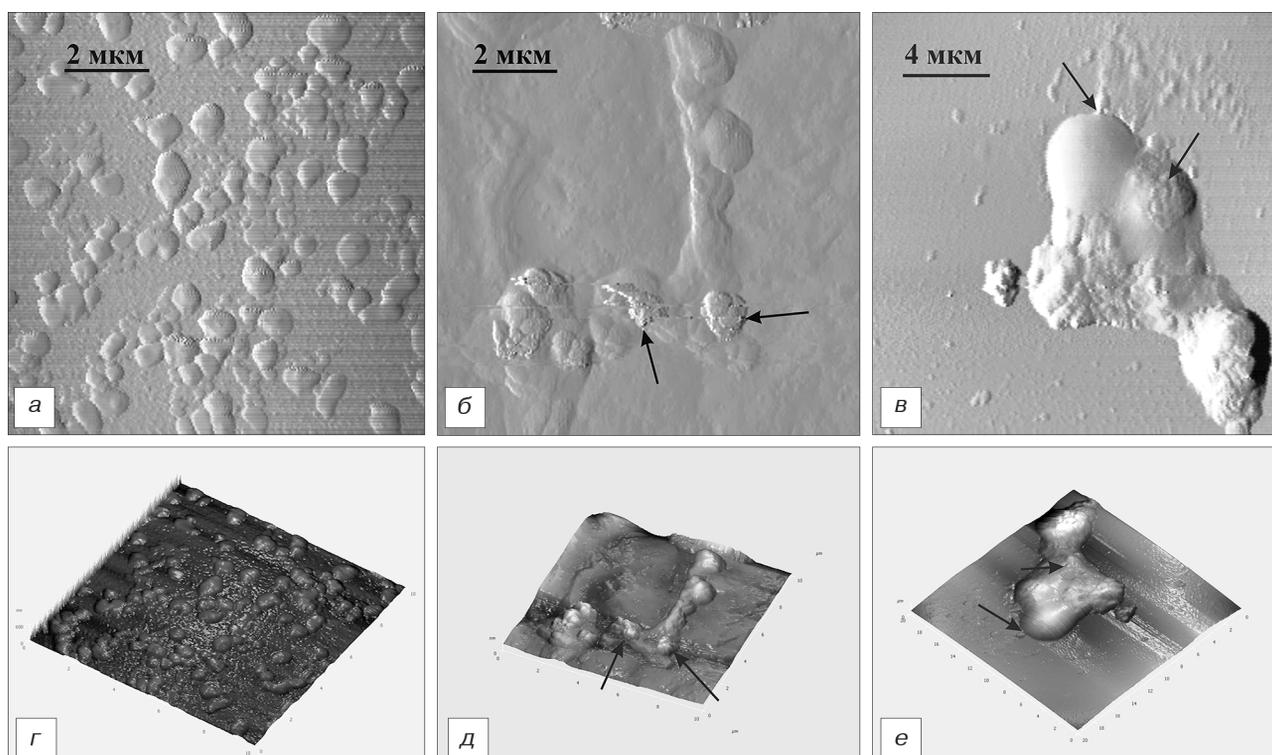


Рис. 3. АСМ intactного и инфицированного вирусом бешенства монослоя клеточной культуры Vero: а, г — intactные клетки Vero (отрицательный контроль) после 72 ч культивирования; б, д — клетки Vero через 4 ч после инфицирования; в, е — клетки Vero через 72 ч после инфицирования.

Стрелками показаны изменения на поверхности клеток, вызванные вирусом бешенства.

КРС в разведениях от 10^0 до 10^{-7} . Затем к вирусосодержащей жидкости в указанных выше разведениях добавляли клеточную суспензию до конечной концентрации от $0,5 \cdot 10^5$ до $1,0 \cdot 10^5$ кл/мл. Значения геометрических размеров клетки и шероховатости поверхности клеточной мембраны оценивали через 4 ч. Результаты представлены в табл. 2 и на рис. 5.

Обсуждение

Проведенное исследование с использованием методов АСМ показало, что фиксированный вирус бешенства «Москва 3253» при заражении клеток перевиваемой

линии Vero способствовал изменению их размеров. Установлено, что увеличение инфицирующей дозы приводило к более резким изменениям геометрических размеров клеток. Следует отметить, что увеличение размеров эукариотических клеток при их взаимодействии с вирусами, зарегистрированное методами АСМ, описано в ряде работ [10, 11]. Так, G. Lee и соавт. [10] наблюдали увеличение диаметра и периметра клеток Sf9 при инфицировании бакуловирусами, M. Moloney и соавт. [11] описывают увеличение геометрических размеров клетки ВНК-21, инфицированной вирусами леса Семлики и энцефаломиелита мышей. Увеличение размеров ин-

Таблица 1

Характеристика размеров клеток Vero в зависимости от времени культивирования вируса бешенства «Москва 3253»

Время, ч	Длина ($M \pm m$), мкм		Ширина ($M \pm m$), мкм		Высота ($M \pm m$), мкм	
	интактные клетки	инфицированные клетки	интактные клетки	инфицированные клетки	интактные клетки	инфицированные клетки
0	8,5 ± 0,8	8,5 ± 0,8	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	0,80 ± 0,01	0,80 ± 0,01
1	8,5 ± 0,9	8,5 ± 0,7	3,0 ± 0,1	5,5 ± 0,2	1,70 ± 0,03	2,00 ± 0,01
4	9,0 ± 1,0	9,5 ± 1,1	5,5 ± 0,2	4,3 ± 0,1	1,90 ± 0,02	1,60 ± 0,01
24	13,0 ± 0,5	25,0 ± 1,1	6,5 ± 0,3	8,0 ± 0,3	2,10 ± 0,02	3,20 ± 0,04
48	15,0 ± 0,9	23,0 ± 1,3	4,0 ± 0,2	8,5 ± 0,1	1,70 ± 0,02	8,50 ± 0,03
72	7,0 ± 0,5	12,5 ± 0,8	3,0 ± 0,1	7,5 ± 0,2	1,40 ± 0,01	6,40 ± 0,02
96	7,0 ± 0,5	9,0 ± 0,5	3,2 ± 0,1	9,0 ± 0,3	2,20 ± 0,02	5,50 ± 0,04

Таблица 2

Характеристика размеров клеток Vero в зависимости от инфицирующей дозы вируса бешенства (штамм «Москва 3253»)

Исследуемый образец	Длина ($M \pm m$), мкм	Ширина ($M \pm m$), мкм	Высота ($M \pm m$), мкм
Исходная (интактная) культура клеток Vero	7,0 ± 0,1	3,6 ± 0,1	0,80 ± 0,01
Отрицательный контроль (интактная культура клеток Vero)	6,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	0,80 ± 0,01
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении 10^0	41,0 ± 1,1	1,3 ± 0,1	2,8 ± 0,06
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении 10^{-1}	37,0 ± 1,5	9,2 ± 0,3	1,5 ± 0,03
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении 10^{-2}	33,0 ± 1,0	11,5 ± 0,4	2,5 ± 0,04
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении 10^{-3}	18,0 ± 0,7	11,0 ± 0,2	2,5 ± 0,03
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении 10^{-4}	12,0 ± 0,3	8,5 ± 0,2	1,7 ± 0,03
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении 10^{-5}	6,0 ± 0,1	2,5 ± 0,1	1,0 ± 0,01
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении 10^{-6}	8,5 ± 0,3	3,5 ± 0,1	1,5 ± 0,01
Культура клеток Vero, инфицированная вирусом в разведении 10^{-7}	6,5 ± 0,2	2,5 ± 0,1	1,7 ± 0,02

фицированной клетки, по-видимому, связано с изменением структуры клеточной мембраны и как следствие с нарушением водно-солевого обмена. Увеличение размеров клетки также может быть обусловлено изменениями строения цитоскелета, нарушением цикла деления клетки, накоплением и выходом вирусных частиц [9, 12].

Интересным фактом, выявленным при изучении поверхности инфицированной клетки Vero, является резкое возрастание ее шероховатости в течение первых часов после заражения. Значительное увеличение шероховатости, на наш взгляд, можно объяснить адсорбцией вируса и проникновением его в клетку, а дальнейшее повыше-

ние значений шероховатости связано с выходом вируса из клетки и разрушением мембраны. В аналогичных исследованиях, посвященных изучению взаимодействия вирусов с клетками методами АСМ, также зарегистрированы различные изменения в морфологии мембраны [8—12], в том числе факт увеличения ее шероховатости [10, 11]. При этом М. Moloney и соавт. [11] отмечали сначала уменьшение значений шероховатости в течение первых часов взаимодействия клетки ВНК-21 с вирусом, а затем ее возрастание, связав это с репродукцией вирусов. В исследованиях G. Lee и соавт. [10] также продемонстрировано увеличение шероховатости клеточной мембраны при культивировании бакуловируса на клетках Sf9, при этом авторы предложили использовать изменения значенной шероховатости мембраны клетки для оценки выхода образующихся вирусных частиц.

В настоящем исследовании изменение шероховатости клеточной мембраны наглядно демонстрирует зависимость данного показателя от дозы заражения: ее повышение приводило к более заметному увеличению шероховатости. При анализе исследуемых образцов вирусосодержащей жидкости установлено, что максимальное разведение, которое вызвало достоверное изменение шероховатости мембраны клетки, соответствовало 10^{-5} . Следует отметить, что аналогичный результат был получен при исследовании вышеуказанных образцов вирусосодержащей жидкости методом иммунофлюоресценции. Наибольшие разведения, при которых обнаруживали

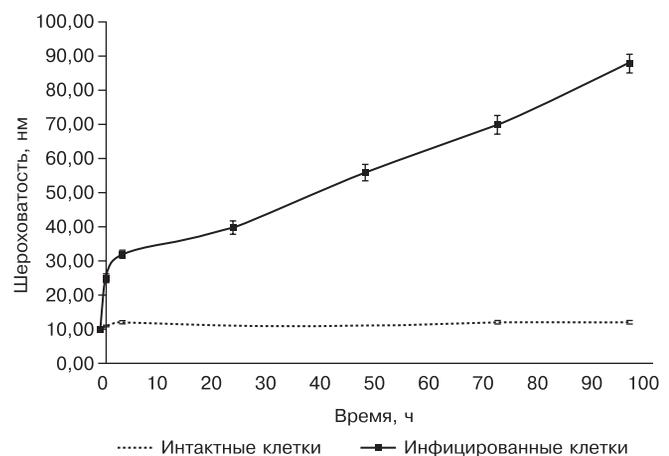


Рис. 4. Изменение шероховатости мембраны клеток Vero в процессе культивирования вируса бешенства.

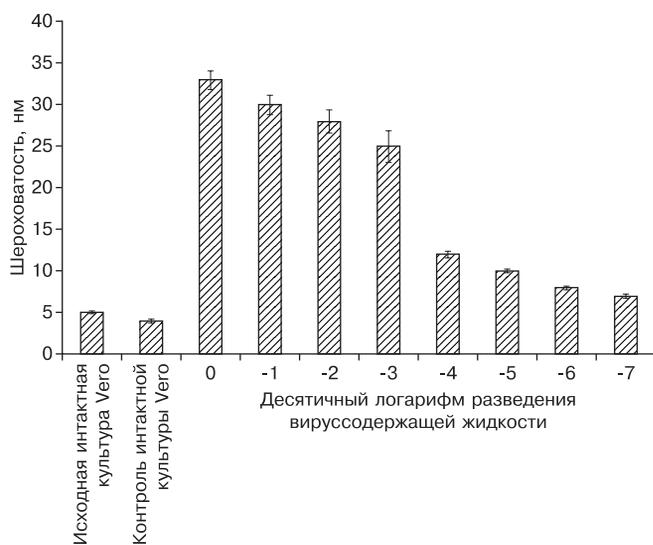


Рис. 5. Влияние заражающей дозы вируса бешенства на шероховатость мембраны клеток Vero.

фокусы флуоресценции при учете результата через 48 ч после инфицирования, также имели значения от 10^{-4} до 10^{-5} . Полученные результаты свидетельствуют о том, что параметр шероховатости клеточной мембраны является перспективным для разработки метода количественной оценки содержания вируса с применением АСМ.

Выводы

1. Исследована ультраструктура поверхности клеток перевиваемой линии Vero при взаимодействии с аттенуированным штаммом вируса бешенства «Москва 3253» методом АСМ, получены изображения интактных и инфицированных вирусом бешенства клеток Vero в различные сроки культивирования вируса.

2. При исследовании влияния вируса бешенства на структуру клеточной мембраны в течение инфекционного процесса установлена зависимость изменения размеров клетки и шероховатости клеточной мембраны от заражающей дозы и времени культивирования вируса на клеточной культуре.

3. Полученные данные открывают перспективу для разработки методического подхода к количественной оценке вируса бешенства *in vitro*, при этом наиболее показательным параметром для учета результата представляется изменение шероховатости клеточной мембраны.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 9—12, 14 см. В REFERENCES)

- Барышников П.И., Грязин В.Н., Зайковская А.В. *Современные проблемы бешенства животных*. М.: КолосС; 2007.
- Груздев К.Н., Недосеков В.В. *Бешенство животных*. М.: Аквариум; 2001.
- Сливко И.А., Недосеков В.В., Жестерев В.И., Горшкова Т.Ф., Курильчук Ю.Н., Анисимова Л.И. и др. Способ титрования антирабических вируснейтрализующих антител. Патент РФ 2254575; 2005.
- Уткин Д.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Спицын А.Н., Волох

О.А., Осина Н.А. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней с использованием атомно-силовой микроскопии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; (2): 62—4.

- Уткин Д.В., Ерохин П.С., Осина Н.А., Коннов Н.П. Оценка фаголизальности штаммов холерных вибрионов с использованием атомно-силовой микроскопии. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2013; 13(3): 81—4.
- Артамонова М.Н., Потатуркина-Нестерова Н.И. Исследование топографии поверхности *Bacillus subtilis* в условиях гипотермии. *Фундаментальные исследования*. 2014; 11(5): 1035—9.
- Яковлева В.А., Лисицын Ф.В., Манькин А.А., Коньшева Т.А. Использование атомно-силовой микроскопии для исследования цитоморфологических признаков папилломовирусной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2009; (4): 32—6.
- Баркова И.П., Нагиева Ф.Г., Никулина В.Г., Лисаков А.Н. Быстрый культуральный метод для индикации антигенов вируса бешенства в инфицированных клеточных культурах. *Инфекция и иммунитет*. 2013; 3(4): 323—6.

REFERENCES

- Baryshnikov P.I., Gryazin V.N., Zaykovskaya A.V. *Current Problems of Rabies in Animals [Sovremennye problemy beshenstva zhivotnykh]*. Moscow: KolosS; 2007. (in Russian)
- Gruzdev K.N., Nedosekov V.V. *Animal Rabies [Beshenstvo zhivotnykh]*. Moscow: Akvarium; 2001. (in Russian)
- Nagarajan T., Ramya R., Sivakumar S. The mouse neutralisation test. In: Rupprecht C., Nagarajan T., eds. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Vol 2*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2015: 189—98.
- Slivko I.A., Nedosekov V.V., Zhesterev V.I., Gorshkova T.F., Kuril'chuk Yu.N., Anisimova L.I. et al. Method for titration of antirabic virus-neutralizing antibodies. Patent RF 2254575; 2005. (in Russian)
- Utkin D.V., Kuznetsov O.S., Erokhin P.S., Spitsyn A.N., Volokh O.A., Osina N.A. Development of methodological approaches for examination of particularly dangerous infectious diseases agents by means of atomic force microscopy. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2012; (2): 62—4. (in Russian)
- Utkin D.V., Erokhin P.S., Osina N.A., Konnov N.P. Assessment of phage lysis of cholera vibrios strains using atomic force microscopy. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya*. 2013; 13(3): 81—4. (in Russian)
- Artamonova M.N., Potaturkina-Nesterova N.I. Research of *Bacillus subtilis* surface topography in hypothermia. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 11(5): 1035—9. (in Russian)
- Yakovleva V.A., Lisitsyn F.V., Manykin A.A., Konyshcheva T.A. Use of atomic force microscopy to study the cytomorphological signs of papillomavirus infection. *Voprosy virusologii*. 2009; (4): 32—6. (in Russian)
- Lee J.V., Ng M.L. A nano-view of West Nile virus-induced cellular changes during infection. *J. Nanobiotechnology*. 2004; 2(1): 6.
- Lee G., Lee S., Young J., Quan F. Nanostructural Characterization of S19 Cells During Virus-Like Particles Generation. *Scanning*. 2016; 38(6): 735—42.
- Moloney M., McDonnell L., O'Shea H. Atomic force microscopy analysis of enveloped and non-enveloped viral entry into, end egress from, cultured cells. *Ultramicroscopy*. 2004; 100: 163—9.
- Tiwari P.M., Eroglu E., Buyoglu-Barnum S., He Q., Willing G.A., Vig K. et al. Atomic force microscopic investigation of respiratory syncytial virus infection in Hep-2 cells. *J. Microsc.* 2014; 253(1): 31—41.
- Barkova I.P., Nagieva F.G., Nikulina V.G., Lisakov A.N. The rapid culture method for the indication of rabies virus antigen in infected cell cultures. *Infektsiya i immunitet*. 2013; 3(4): 323—6. (in Russian)
- Dacheux L., Bourhy H. Virus isolation in cell culture: the rabies tissue culture infection test. In: Rupprecht C., Nagarajan T., eds. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Vol 2*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2015: 25—31.

Поступила 03.02.17

Принята в печать 28.02.17