

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КИШЕЧНЫХ ВИРУСОВ

MECHANISMS OF SAMPLING FOR ELECTRONIC MICROSCOPIC INVESTIGATION OF INTESTINAL VIRUSES

A. Kashnikov

Summary. The aim of the study is to increase the sensitivity of the method of electron microscopic detection of intestinal viruses, which are difficult to detect due to low content in the sample or small size. To solve the task, the preparation of viral preparations was supplemented by some methodical methods, concerning the concentration of viruses and the immobilization on the substrate of electron microscope mesh. The use of techniques that make it possible to detect the intestinal virus in the sample more likely was based on the use of information on the value of the Ct threshold cycle, determined by real-time PCR. To a virus with a low content in the sample ($C_t \geq 20$), a modified concentration variant was used to maximize the collection of the virus for detection in an electron microscope. For viruses that are small in size ($d \leq 40$ nm), which are difficult to detect by ordinary electron microscopy, special conditions have been created to facilitate their detection among the minor inclusions accompanying them. These conditions contributed to the formation of nonspecific complexes of viral particles. When preparing viral preparations intended for viewing in an electron microscope, conditions were also created that made it easier to search for the virus. For this purpose, the surface of the substrate of the electron microscope mesh was treated with techniques that not only increase the level of adsorption of the virus on the mesh, but also change the nature of its immobilization on it. The positive effect of the proposed methodical techniques is illustrated by electronograms of intestinal viruses.

Keywords: transmission electron microscopy, intestinal viruses, methods of virus concentration, threshold cycle.

Кашников Александр Юрьевич

*Н.с., ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И. Н. Блохиной Роспотребнадзора. Россия
a.kashn@yandex.ru*

Аннотация. Целью исследования является повышение чувствительности метода электронно-микроскопической детекции кишечных вирусов, которые сложно выявить по причине низкого содержания в пробе или малого размера. Для решения поставленной задачи, процесс приготовления вирусных препаратов был дополнен некоторыми методическими приемами, касающимися концентрирования вирусов и иммобилизации на подложке электронно-микроскопической сеточки. Применение приемов, позволяющих с большей вероятностью обнаружить кишечный вирус в пробе, было основано на использовании информации о значении порогового цикла C_t , определяемого методом ПЦР в режиме реального времени. К вирусу с низким содержанием в пробе ($C_t \geq 20$), применялся модифицированный вариант концентрирования, позволяющий максимально собрать вирус для обнаружения в электронном микроскопе. Для вирусов, обладающих малыми размерами ($d \leq 40$ нм), которые сложно обнаружить методом обычной электронной микроскопии, создавались специальные условия, облегчающие их выявление среди сопутствующих им мелких включений. Эти условия способствовали образованию неспецифических комплексов вирусных частиц. При приготовлении вирусных препаратов, предназначенных для просмотра в электронном микроскопе также создавались условия, облегчающие поиск вируса. Для этого поверхность подложки электронно-микроскопической сеточки обрабатывали с помощью приемов, способствующих не только повышению уровня адсорбции вируса на сеточке, но и изменению характера его иммобилизации на ней. Положительный эффект применения предложенных методических приемов проиллюстрирован электронограммами кишечных вирусов.

Ключевые слова: просвечивающая электронная микроскопия, кишечные вирусы, методы концентрирования вирусов, пороговый цикл.

Введение

Гарантированная детекция кишечных вирусов в клинических фекальных пробах методом обычной просвечивающей электронной микроскопии (ОПЭМ), является важной практической задачей не только для детекции вируса, вызвавшего инфекцию, но и для получения его фотографического изображения. Эта задача не всегда разрешима из-за относительно низкой чувствительности метода [14], который не позволяет обнаружить кишечные вирусы при концентрации их в пробах менее 10^7 частиц в 1 мл [1]. Однако вирусы не всегда присутствуют в пробе в такой концентрации.

Ниже этого порога концентрации вирус можно обнаружить только с использованием более чувствительных методов детекции. По чувствительности ОПЭМ уступает иммуноэлектронной микроскопии [2,3,5], методу иммунохроматографического анализа (ИХА), методу электрофореза вирусной нуклеиновой кислоты в ПААГ и тем более методу ПЦР в режиме реального времени. Однако, применение иммуноэлектронной микроскопии требует набора сывороток ко всему спектру выявляемых вирусов, что не всегда возможно. То же можно заметить и относительно недавно появившегося способа повышения чувствительности ОПЭМ за счет использования подложек, сенсibilизированных синтетически-

ми полимерами [15]. Поэтому использование ОПЭМ без привлечения специфических средств детекции представляется наиболее доступным методом для поиска кишечных вирусов в клинических пробах. Однако, чтобы вирус можно было с уверенностью обнаружить с помощью ОПЭМ необходимо повысить чувствительность данного метода путем концентрирования вируса и максимальной его очистки от посторонних частиц, мешающих просмотру [3,4]. Особенно это важно для детекции мелких кишечных вирусов, о чем уже было отмечено нами ранее [10]. Даже после концентрирования вирусы, диаметр которых не превышает 35–40 нм, сложно выявить в ОПЭМ, в отличие от частиц большего диаметра. Поэтому методы, оптимальные для концентрирования ротавирусов и аденовирусов, диаметр которых более 50 нм, оказываются неэффективными при выявлении норовирусов, астровирусов и энтеровирусов. Присутствуя в фекальных пробах в недостаточных для электронной микроскопии количествах, кишечные вирусы малого диаметра имеют еще и менее выраженную морфологию, что делает их практически неотличимыми от сопутствующих им мелких включений (мембранных образований, рибосом и др.). Это делает их детекцию в ОПЭМ чрезвычайно сложной без применения специальных приемов, облегчающих их поиск.

Исходя из этих соображений, целью настоящей работы стало: повышение уровня чувствительности электронно-микроскопической детекции кишечных вирусов, без применения специфических сывороток и бакет-ротора для их концентрирования; доведение чувствительности метода до уровня, равного средним значениям количества ДНК/РНК вируса в пробе, определяемым методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Real-time PCR). Эти значения соответствуют примерно 10–25 условным единицам «порогового цикла» *Ct*. В пределах этого диапазона значений находится возможность выявления ротавирусной РНК методом электрофореза в ПААГ (позволяет обнаружить присутствие вируса при *Ct* не выше 25). Для достижения заданного уровня детекции кишечных вирусов методом ОПЭМ были разработаны некоторые методические приемы, с помощью которых удалось добиться решения поставленной задачи. Результатом стала возможность детекции вирусов в пробе с показателем *Ct*, при котором обнаружить их в электронном микроскопе проблематично.

Материалы и методы. В работе использованы образцы фекалий детей с диареей из коллекции кишечных вирусов лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной. В этих образцах с использованием наборов реагентов для выявления вирусов в режиме реального времени («АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL», «АмплиСенс ОКИ

скрин-FL», «АмплиСенс Enterovirus-FL», производства ЦНИИЭ, Москва) были обнаружены кишечные вирусы, включая ротавирусы, аденовирусы, а также более мелкие вирусы, такие как норовирусы, астровирусы и энтеровирусы. Для электронной микроскопии 10%-ную вирусную суспензию осветляли центрифугированием при 7000 об/мин в течение 30 минут [7]. Затем с помощью способа «микрокапли» [9,13] готовили препарат для просмотра в трансмиссионном электронном микроскопе на предмет наличия вируса в пробе. В работе использовали медные сеточки с парлодиевой подложкой с ячейками в 400 меш. Образцы просматривали в электронном микроскопе просвечивающего типа «HT7700» («Hitachi», Япония) в режиме «высокого разрешения». Если вируса оказывалось недостаточно, его концентрировали с помощью методов, описанных ниже. В каждом конкретном случае применяли наиболее приемлемый способ концентрирования. Для ротавирусов и соизмеримых с ними аденовирусов, использовали преципитацию полиэтиленгликолем (ПЭГ 6000) в присутствии 0,1М NaCl и ультрацентрифугирование [4]. Для преципитации осветленную пробу с вирусом выдерживали при 4°C в течение ночи, собирая затем осадок низкоскоростным центрифугированием при 8000 об/мин и 4°C в течение 40 минут. Супернатант осторожно сливали, а осадок ресуспендировали в 100 мкл деионизированной воды, сконцентрировав исходную пробу в 10 раз. Для концентрирования вирусов использовали и ультрацентрифугирование. Образцы мелких по размеру норовирусов, астровирусов и энтеровирусов готовили, применяя специальные приемы, направленные на создание дополнительных условий, облегчающих детекцию.

Результаты и обсуждение

Методом электронной микроскопии были получены электроннограммы как крупных кишечных вирусов с четко выраженной морфологией, диаметр которых превышает 50 нм, (ротавирусов, аденовирусов, коронавирусов), так и мелких, диаметром до 30–40 нм. При подготовке проб был использован ряд дополнительных приемов, облегчающих поиск вируса в электронном микроскопе. Одни из них направлены на повышение выхода вируса, содержащегося в пробе, путем его концентрирования. Другие способствуют повышению уровня адсорбции на подложке электронно-микроскопической сеточки и более равномерному распределению вируса на ней.

Пробоподготовка клинических образцов для детекции крупных вирусов ($d > 50$ нм). По этой схеме проводили концентрирование ротавирусов и аденовирусов. Для повышения выхода вирусов 10% вирусную суспензию в 1% водном растворе ацетата аммония в объеме 2400–4800 мкл гомогенизировали в течение

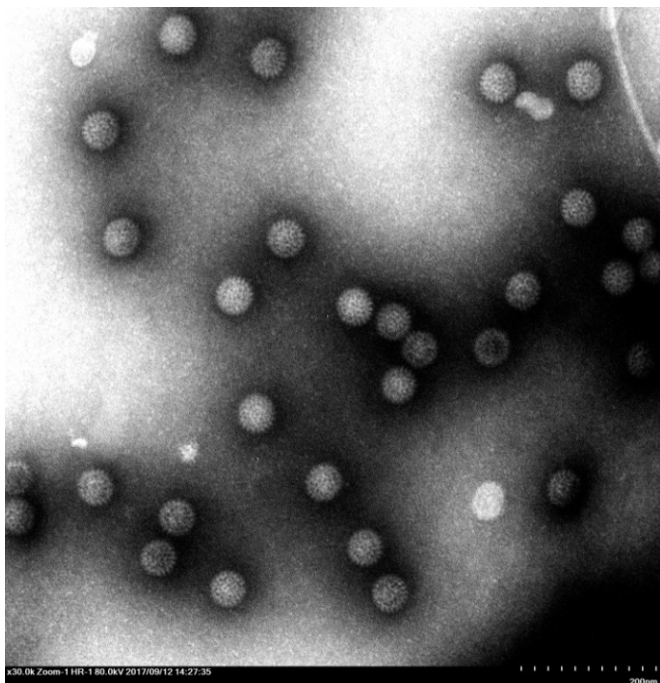


Рис. 1. Частицы ротавируса $d=65\text{nm}$ на подложке из парлодия. Негативный контраст, окраска 3% ФВК pH 6,8. Препарат сконцентрирован в 16 раз, сначала преципитацией ПЭГ 6000, затем ультрацентрифугированием. Ct = 14. Увеличение 80000.

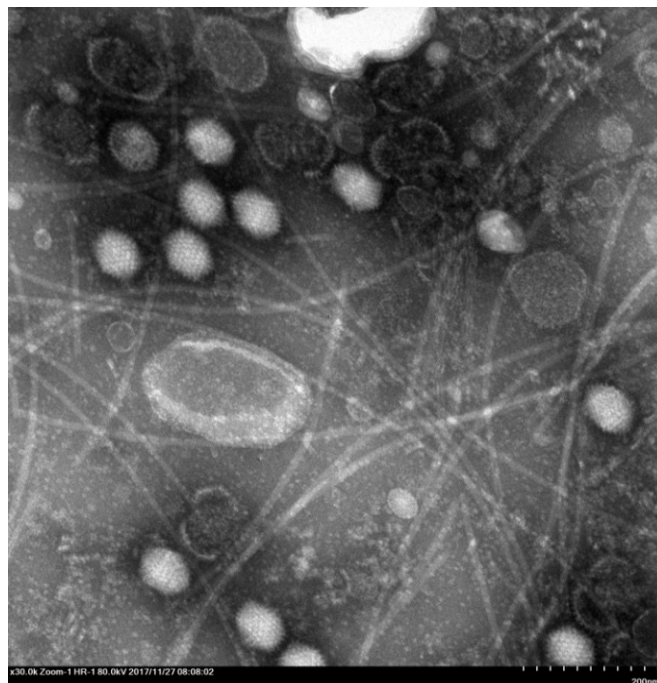


Рис 2. Частицы аденовируса $d = 80 \text{ nm}$. Негативный контраст, окраска 3% ФВК pH 6,8. Препарат сконцентрирован в 16 раз. Ct = 20. Увеличение 80000

10 минут для максимального извлечения вируса из фекалий. Далее вирус концентрировали преципитацией ПЭГ6000. Когда требовалось ускорить процесс, применяли ультрацентрифугирование. Этот метод, кроме сокращения времени, является незаменимым при концентрировании вируса из малого объема (до 1 мл). Если в пробе по результатам ОТ-ПЦР в режиме реального времени содержание вирусной НК находилось в интервале Ct 10–15, то для обнаружения вируса в электронном микроскопе достаточно было 1 мл 10% вирусной суспензии. Вирус концентрировали с помощью 1 цикла ультрацентрифугирования. В работе использовали микро-ультрацентрифугу Sorvall MX 150 с ротором S140-AT и центрифужные пробирки объемом 2 см³. Осветленную вирусную суспензию в объеме 0,8 мл наслаивали в центрифужной пробирке на подушку 30%-й сахарозы объемом 400 мкл в TN-буфере (0,02M Трис, 1M NaCl pH7,4). Осаждали в течение 120 минут при 36000 об/мин и 4°C (или 90 минут при 43000 об/мин). Этот режим способствовал очищению проб от лишних включений, мешающих их исследованию в электронном микроскопе. Если показатель Ct вирусной пробы соответствовал диапазону значений ($15 < \text{Ct} < 25$), то для обнаружения в электронном микроскопе требовалась большая концентрация вируса. В этом случае

использовали усложненную схему концентрирования, состоящую из 2-х циклов. Брали 5 мл осветленной 10%-й вирусной суспензии и осаждали в ультрацентрифуге в 5 пробирках (2 см³) на подушке 30% сахарозы в TN-буфере. Осадок в каждой пробирке ресуспендировали в 120 мкл буфера TN и объединяли в общий объем 600 мкл (5 x 120). Далее этот объем наслаивали в центрифужной пробирке на подушку 30%-й сахарозы в TN-буфере объемом 400 мкл и снова центрифугировали (в угловых роторах заполнение поликарбонатных центрифужных пробирок допускается на половину для пробирок без крышек и на 2/3 для пробирок с крышками [17]). Осадок после 2-го цикла ультрацентрифугирования растворяли в 50 мкл дистиллированной воды, сконцентрировав в итоге пробу в 80 раз. С помощью данной схемы концентрирования были обнаружены в электронном микроскопе ротавирусы и аденовирусы (рисунки 1, 2), а также такие крупные кишечные вирусы, как коронавирусы (рис 3), которые были выявлены в пробе с ротавирусами, как сопутствующие им.

Пробоподготовка клинических образцов для детекции мелких вирусов ($d < 40\text{nm}$). Разработка методических приемов, обеспечивающих неспеци-

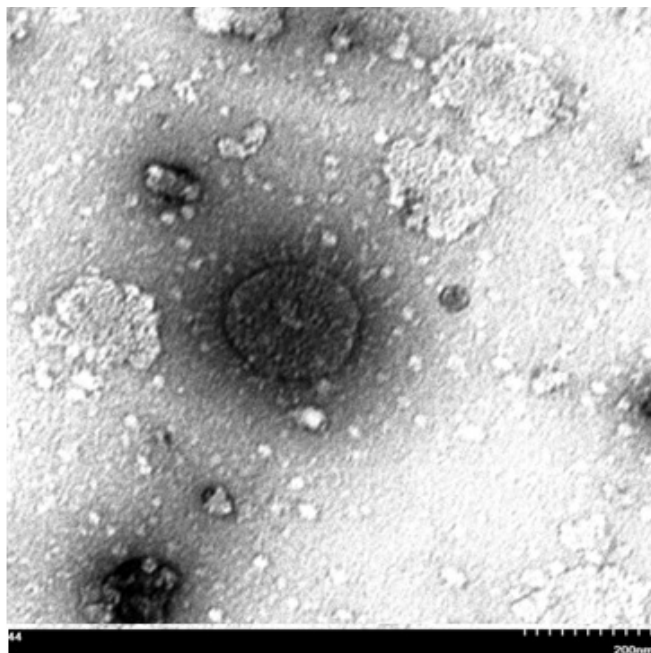


Рис 3. Частица коронавируса $d = 160$ нм. На поверхности видны булавовидные отростки, характерные для представителей этого семейства. Оказался случайно в пробе с ротавирусами. Позитивный контраст, окраска 2% ФВК рН 6,8. Увеличение 80000

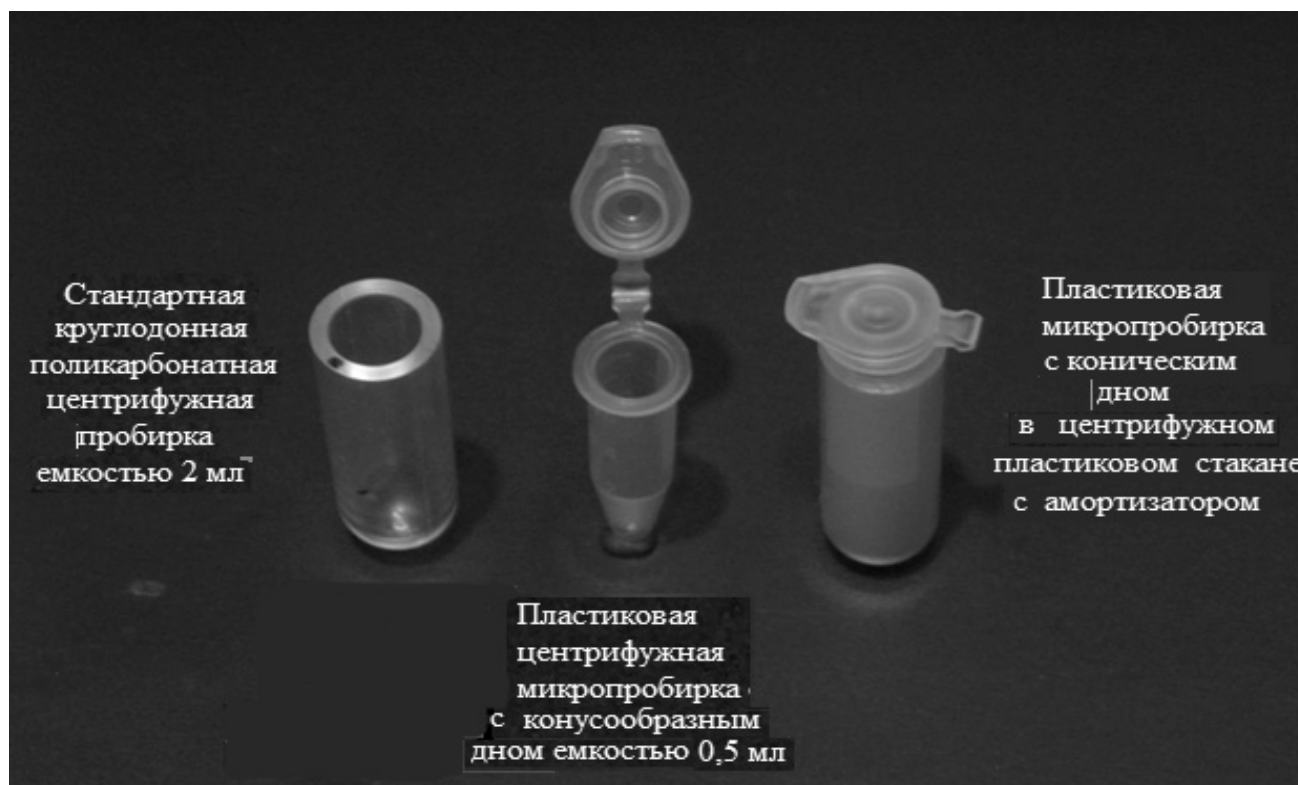


Рис. 4. Центрифужные пробирки использованные в работе. Слева стандартная ультрацентрифужная поликарбонатная круглодонная пробирка. В центре экспериментальная маломерная пластиковая пробирка с конусообразным дном емкостью 0,5мл. Справа пластиковый стакан с адаптером со вставленной микропробиркой.

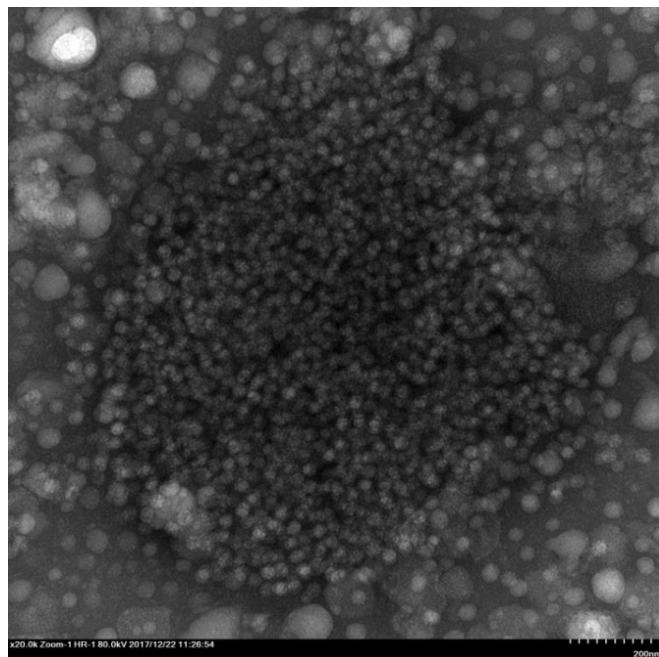
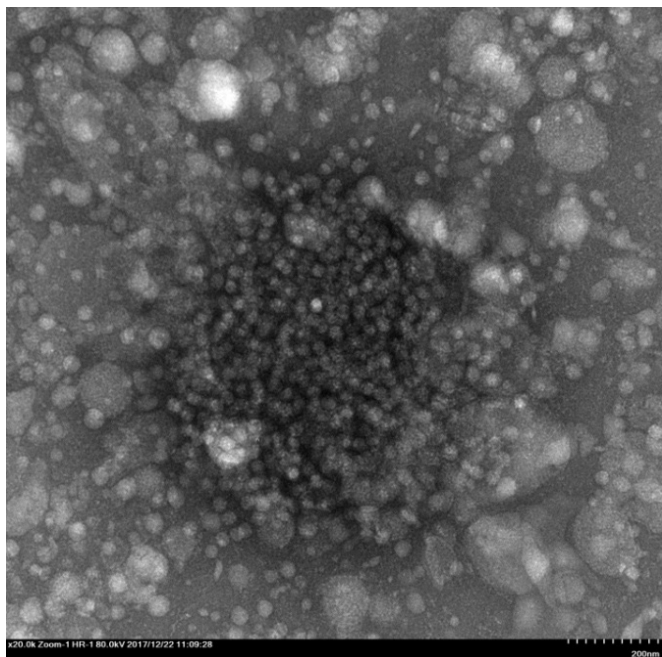


Рис. 5, 6. Неспецифические комплексы из астровирусов $d = 35$ нм. Получены двукратным ультрацентрифугированием в стандартной 2см^3 пробирке (рис 5) и в мини-пробирке $0,5\text{см}^3$ (рис 6) В первом случае препарат сконцентрирован в 90 раз, $C_t = 20$, а во втором в 150 раз, $C_t = 20$. В обоих случаях подложка смочена 70% спиртом для придания ей гидрофильных свойств. Контрастирование смешанное 1% раствором уранилацетата в 70% этиловом спирте. Увеличение 55000.

фическую агрегацию мелких вирусов. Способ приготовления препаратов ротавирусов и аденовирусов для детекции в электронном микроскопе оказался неэффективен при обнаружении более мелких вирусов таких, как астровирусы, норовирусы и энтеровирусы, которые встречаются в значительно меньшей концентрации в фекальных пробах и которые сложно рассмотреть на фоне соизмеримых с ними включений. Эти вирусы легче обнаружить в электронном микроскопе в том случае, когда они располагаются на подложке группами, так называемыми неспецифическими комплексами, которые можно рассматривать, как необходимое условие при детекции мелких вирусов. В связи с этим, препараты кишечных вирусов малого диаметра готовили с помощью способов, приводящих к образованию таких комплексов. Для концентрирования мелких вирусов использовали метод ультрацентрифугирования. Этот метод приводит к образованию вирусных скоплений при скорости вращения ротора выше 15000 об /мин и низкой ионной силе среды, содержащей вирусные частицы. Поэтому вирусы осаждали в 0,002M Трис-буфере рН 7,0 или деионизованной воде — средах с низкой ионной силой. В качестве дополнительной меры для минимизации потерь вируса при концентрировании применили специальный прием, позволивший более эффективно собрать вирус в объеме 30 мкл. Для этой цели были приспособлены малоразмерные пластиковые пробирки с коническим дном объ-

емом 0,5 мл. Под эти пробирки изготовили мини-стаканы из круглодонных пластиковых пробирок емкостью 2см^3 с резиновыми адаптерами (рис 4).

Использование пробирок малого размера увеличивает эффективность и скорость разделения при работе с образцами малого объема [17]. Для сравнения по эффективности использования примененных мини-пробирок и стандартных поликарбонатных емкостью 2см^3 был проведен эксперимент, в котором пробу с астровирусом ($C_t 15$) параллельно осаждали в контрольной стандартной круглодонной пробирке и в опытной малоразмерной пробирке.

Схема концентрирования была следующая. Фекальные пробы (0,5–1,0г) ресуспендировали в 5,0 мл 1% ацетата аммония. После встряхивания (10 минут), вирусную суспензию разливали в 5 пробирок ($1,5\text{см}^3$) и осветляли при 7000 об /мин в течение 30 минут. Осветленный супернатант 0,9 мл помещали в центрифужную пробирку (объемом 2см^3) на 20% сахарозную подушку в ТН-буфере (объем 0,3мл). Центрифугировали 90 минут при 43000 об /мин и 4°C . Осадок с вирусом растворили в 0,002M Трис-буфере в общем объеме 500 мкл и проводили 2-й цикл ультрацентрифугирования через подушку 20% сахарозы (300 мкл) в контрольной центрифужной пробирке 2см^3 . Параллельно во 2-м цикле центрифугировали ту же пробу и в опытной маломерной пробирке с коническим

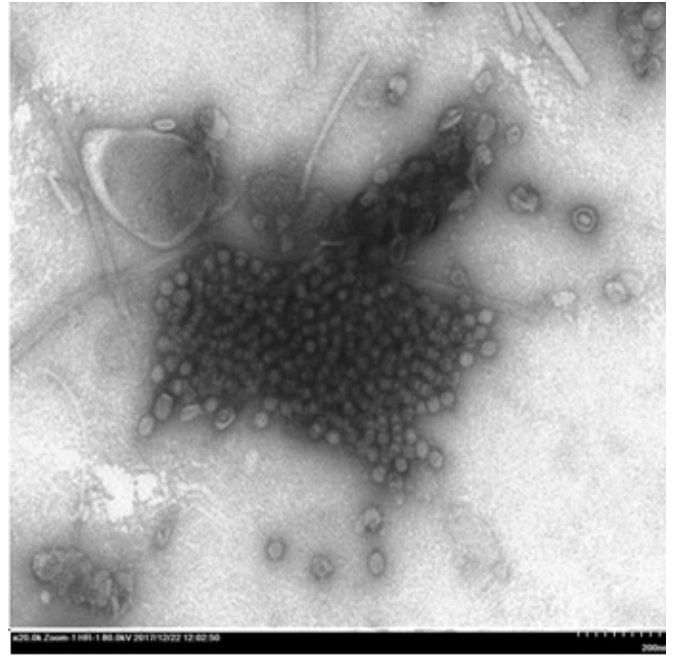
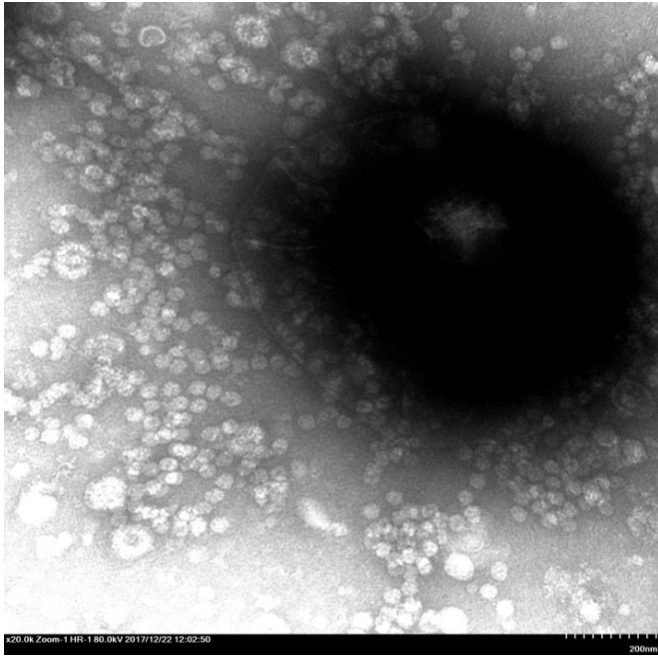


Рис 7, 8. Неспецифические комплексы из норовирусов $d = 27-38$ нм (рис 7) и энтеровирусов $d = 20-30$ нм (рис 8). Получены двукратным ультрацентрифугированием с использованием во 2-м цикле осаждения малоразмерной пробирки с коническим дном. Препараты сконцентрированы в 150 раз. $St = 18$. Подложка гидрофилизирована 70% спиртом. Смешанное контрастирование 1% раствором уранилацетата в 70% этиловом спирте. Увеличение 55000.

дном. Разница заключалась в том, что в опыте осадки вируса после 1-го цикла растворяли в 250 мкл Трис-буфера (а не в 500) и помещали в маломерную пробирку на слой 100 мкл 20% сахарозы в TN-буфере. Осаждение проходило в том же режиме. После осаждения в контрольной пробирке осадок растворяли в 50 мкл воды, а в мини-пробирке в 30 мкл. В итоге, в первом случае вирус сконцентрировали в 90 раз, а во втором — в 150 раз. При исследовании этих препаратов в электронном микроскопе были обнаружены и сфотографированы скопления вирусов, представленные на рисунках 5 и 6.

На этих фото изображены крупные скопления астро-вирусов, сконцентрированные в мини-пробирке и стандартной поликарбонатной пробирке емкостью 2см³. Используемый нами прием с применением малоразмерных пробирок с коническим дном продемонстрировал положительный эффект при сборе вирусов из очень малого объема. С применением данной модификации были обнаружены в электронном микроскопе вирусы с более низким содержанием в пробе (St 20–25) — норовирусы и энтеровирусы. Неспецифические скопления этих вирусов представлены на рисунках 7 и 8.

Без применения подобной схемы концентрирования обнаружить мелкие вирусы в электронном микроскопе при St 20–25 было бы нелегко.

Оптимизация приготовления электронно-микроскопических препаратов вирусов. На этапе приготовления вирусных препаратов для детекции в электронном микроскопе с целью улучшения визуализации объекта и повышения вероятности его обнаружения на подложке электронно-микроскопической сеточки были также применены дополнительные приемы. Нанесение вирусов на сеточки проводили по методу «микрочапли». Окрашивание вирусов проводилось способами негативного и смешанного контрастирования [14], наиболее точно воспроизводящими морфологические особенности вирусного капсида. Достоинство этих способов в том, что они не вызывают искажений геометрических размеров вирусной частицы. Кроме того, негативно контрастирующие вещества способны проникать вглубь объекта и выявлять дополнительные его детали. В качестве контрастера использовали 1%-й раствор уранилацетата в 70%-м этиловом спирте и 2%-й или 3%-й водный раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) pH 6,8. Для повышения уровня адсорбции и улучшения характера распределения вирусных частиц на подложке были предприняты специальные меры [13,14]. Адгезивные свойства подложки усиливали ее гидрофилизацией (большей смачиваемостью) с помощью 70%-го этилового спирта. Сеточку перед нанесением вируса помещали на каплю 70%-го этилового спирта (на 3–5 минут). Гидрофилизация также является одним из главных условий

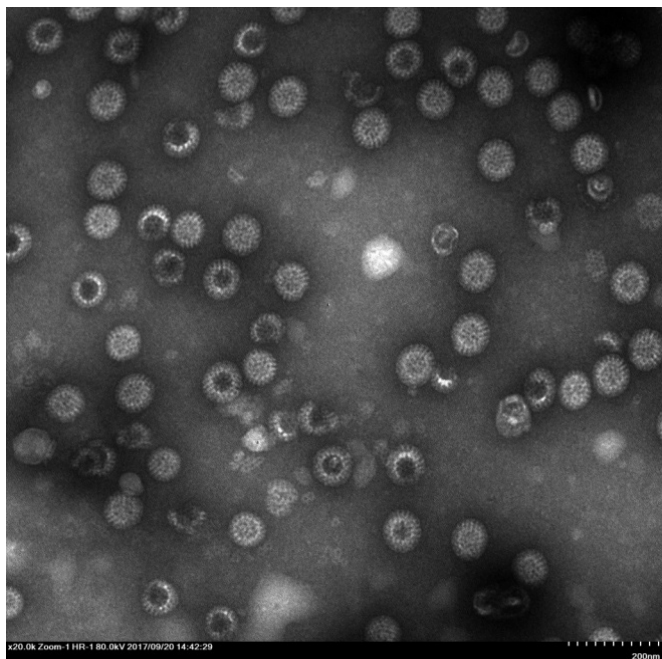


Рис 9. Препарат ротавируса. Сконцентрирован в 80 раз двукратным ультрацентрифугированием. $Ct = 23$. Подложка гидрофилизирована 70% спиртом. Негативное контрастирование 1% раствором уранилацетата в 70% этиловом спирте. Присутствуют пустые вирионы, у которых контрастером прокрашена внутренняя полость. Увеличение 55000.

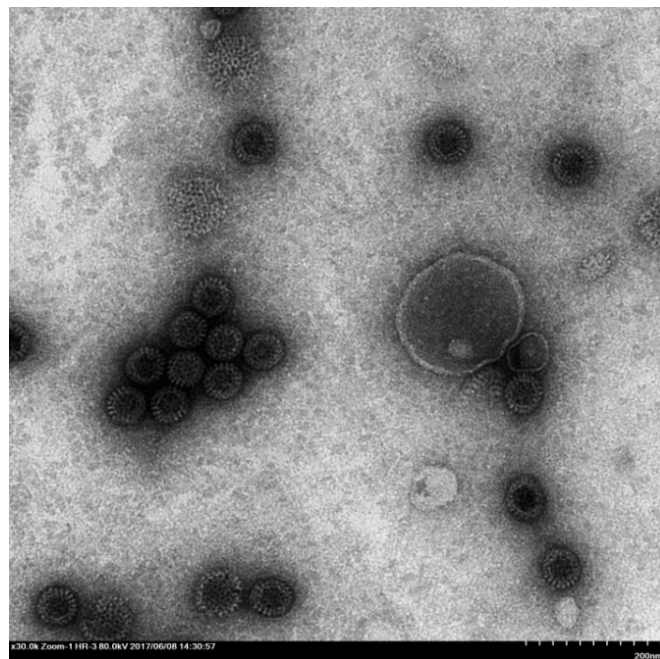


Рис 10. Частицы ротавируса $d = 70$ нм. Позитивное контрастирование 2% ФВК pH 3,0. Препарат сконцентрирован ультрацентрифугированием в 16 раз. $Ct = 16$. В условиях непродолжительного воздействия кислой среды некоторые вирусы успели деструктурироваться. Увеличение 55000.

получения негативного контраста, и способствует более равномерному распределению отдельных частиц или целых групп вирусов по всей поверхности подложки. После обработки спиртом на подложку наносили 6 мкл вирусного концентрата для адсорбции в течение 3–4 минут. Далее капельку отсасывали уголком фильтровальной бумаги и после промывки в деионизованной воде, сеточку помещали на 40 секунд на каплю контрастера. После сушки препарат просматривали в электронном микроскопе. Приготовление вирусных препаратов по описанной схеме дало положительный результат. На рисунках 9, 10 для сравнения приведены снимки кишечных вирусов, окрашенных негативным и позитивным способами.

Мелкие кишечные вирусы контрастировали также негативным способом. Осаждение этих вирусов в ультрацентрифуге в условиях благоприятствующих их агрегации (высокое число оборотов ротора, низкая ионная сила буфера) создавали условия, способствующие образованию неспецифических комплексов. Кроме того, вирусы наносили на подложку в среде с низкой ионной силой (деионизованной воде или 0,002М трис-буфере pH

7,0). Обработку ионами Mg, способствующую при концентрации 0,05М комплексообразованию [6,16,18,19], не использовали в целях улучшения чистоты препарата. Так были обнаружены крупные комплексы астровирусов, норовирусов и энтеровирусов (рис 6–9).

Заключение. В работе показана возможность повышения чувствительности метода ОПЭМ в детекции кишечных вирусов, которые с трудом поддаются обнаружению этим методом либо вследствие низкого содержания в пробе, либо по причине малого размера вируса, маскирующего его на фоне соизмеримого с ним клеточного дебриса. Снижение порога обнаружения вируса в ОПЭМ возможно с применением дополнительных мер при пробоподготовке. К таким мерам относятся: применение при концентрировании вирусных частиц с помощью ультрацентрифугирования центрифужных пробирок с минимальной емкостью для более полного сбора вируса, а также создание при приготовлении вирусных препаратов условий, способствующих образованию на подложке электронно-микроскопической сеточки скоплений вирусных частиц, облегчающих их поиск в электронном микроскопе. Образование вирус-

ных скоплений необходимо, прежде всего, для детекции мелких кишечных вирусов, обнаружить которые в обычном просвечивающем электронном микроскопе довольно сложно. Формирование неспецифических вирусных комплексов позволяет повысить порог обнаружения мелких вирусов в электронном микроскопе при низкой их концентрации в пробе без применения иммунной сыворотки. Руководствуясь этим соображением, предложены дополнительные приемы, которые предус-

матривают образование таких комплексов в процессе концентрирования вирусов и их обнаружение после иммобилизации на подложке электронно-микроскопической сеточки. Описанные приемы помогут отделить малоразмерные вирусные частицы от маскирующего фона и тем упростят их детекцию в электронном микроскопе. Данные приемы также могут быть использованы для поиска в фекальном материале вирусов, для которых отсутствуют коммерческие тест-системы на основе ПЦР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альбертсон П. (1974) Разделение клеточных частиц и макромолекул. М.: Мир, С. 256–282.
2. Анджапаридзе А.Г., Балаян М. С., Савинская С. С., Мамедов М. К., Анненков А. Е., Горюнова Н. А. (1984) Вирусы в фекалиях больных вирусным гепатитом и другими энтеровирусными инфекциями. Вопросы вирусологии, 5: 559–566
3. Анцупова А.С., Трофимова М. Н., Елифанова Н. В., Троицкая М. В. (1984) Электронномикроскопическая диагностика вирусных заболеваний. Вопросы вирусологии, № 3, С. 316–319.
4. Баррет Т. и др., (1988) Вирусология. Методы. Под ред. Б. Мейхи. М.: Мир, 344 с.
5. Галко Н.В., Макарова Н. Г., Вашукова С. С., Сафонова Н. В., Суханин В. П., Сироткин А. К. (1984) Обнаружение ротавируса в фекалиях детей, больных диареей. Вопросы вирусологии, 5: 596–599
6. Гринин А.С., Титов И. Н. (1971) Очистка, концентрирование и фракционирование вирусов животных. М.: Колос, С 42–148.
7. Дроздов С.Г., Покровский В. И., Шекоян Л. А. и др. (1982) Ротавирусный гастроэнтерит. Монография. М.: Медицина, 160 с.
8. Зинченко А.И., Паруль Д. А. (2003) Основы молекулярной биологии вирусов и антивирусной терапии. Минск, МГЭУ, С. 20–28.
9. Карупу В.Я. (1984) Электронная микроскопия. Схема подготовки микроорганизмов для просвечивающей электронной микроскопии. Киев.
10. Кашников А.Ю. (2016) Некоторые методические аспекты приготовления электронно-микроскопических препаратов кишечных вирусов. Нижний Новгород, 23с. Рукопись деп. в ВИНТИ, № 50-B2016
11. Королев М.Б. (1987) Идентификация вирусов и диагностика вирусных инфекций с помощью электронно-микроскопических методов исследования: Автореф. . . дис. . . д-ра биол. наук. М., 411 с.
12. Матвеева И.Н. (2008) Промышленные технологии изготовления компонентов моно- и комплексных диагностикумов инфекционных заболеваний животных. Автореф. . . дис. . . д-ра биол. наук. Щелково, 52 с.
13. Миронов А.А., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А. (1994) Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. Методическое руководство. СПб.: Наука, 400 с.
14. Пономарев А.П., Мищенко В. А. (2005) Электронная микроскопия вирусов животных и некоторых условно — патогенных микроорганизмов. Владимир, Фолиант, 160 с.
15. Сироткин А.К. (2004) Применение углеродно — полимерных подложек в изучении адсорбции вирусных частиц и определении этиологии вирусных гастроэнтеритов у детей методами электронной микроскопии: Автореф. дис. . . канд биол. наук. СПб., 27 с.
16. Соколов П.А. (2014) Разработка способов фиксации ДНК на различных поверхностях и исследование свойств сформированных структур. Автореф. . . дис. канд. физ.-мат. наук. — СПб.: СПбГУ, 171 с.
17. Ультрацентрифуги компании Beckman Coulter. Использование пробирок малого размера [Электронный ресурс]. Режим доступа: ftp://site.helicon.ru/BeckmanCoulter_Ultracentrifuges.pdf.
18. Helen G., Hansma and Daniel E. (1996) Laney DNA Binding to Mica Correlates with Cationic Radius: Assay by Atomic Force Microscopy. Biophysical Journal, V. 70, P. 1933–1939.
19. Vesenkaa J., Gutholda M., Tanga C. L., Kellerb D., Delainec E., Bustamante C. (1992) Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope. Ultramicroscopy, V.42–44, P. 1243–1249.

© Кашников Александр Юрьевич (a.kashn@yandex.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»