ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель Председателя
Госкомсанэпиднадзора РФ

Г.Г.Онищенко

"28" ноября 1994 г.

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСАМИ ГРУППЫ ГЕРПЕСА

Методические рекомендации

Екатеринбург, 1995 г.

gost.e-ecolog.ru

Методические рекомендации разработаны в Екатеринбургском НИИ вирусных инфекций, рассмотрены и одобрены Ученым Советом института.

Авторы-составители: Г.Г.Колесникова, В.К.Савушкина, В.П.Устьянцев, А.А.Бахарев, Н.А.Шмелева, А.Н.Поршаева, Н.П.Глинских

Настоящие методические рекомендации предназначены для вирусологических лабораторий центров госсанэпиднадзора и научно-исследовательских институтов.

© Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций, 1995

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторная диагностика герпесвирусных инфекций с использованием клеточных культур - это один из основных методов в практической работе, так как морфологические изменения, выявляемые в зараженных культурах, являются специфическими.

Одни штаммы вирусов герпеса вызывают образование гигантских синцитиальных клеток, другие - округление и образование клеточных конгломератов. Очаги цитопатического действия вирусов проявляются в виде гладких округлых клеток, значительно увеличенных в размере. Спектр клеточных культур, используемых для изучения вирусов группы герпеса, по данным литературы, достаточно обширен. Широко применяются как первично-трипсинизированные культуры, полученные из различных органов и тканей человека и животных, так и перевиваемые линии клеток - СПЭВ, СОЦ, D-6, HeLa и другие.

Для диагностики цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ), в основном, используются первичные и диплоидные культуры клеток человеческого происхождения, а перевиваемые клеточные линии, по данным литературы, малочувствительны и для накопления вирусного антигена непригодны, что побуждает исследователей проводить постоянный поиск новых культур.

С целью отбора наиболее оптимальных клеточных культур для накопления герпесвирусов были изучены клеточные линии и штаммы коллекции низкотемпературного банка-музея Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций.

Настоящие методические рекомендации обобщают данные литературы и собственный опыт по использованию клеточных культур в лабораторной диагностике инфекций, вызываемых вирусами группы герпеса. Описаны методы выделения вирусов простого герпеса и цитомегаловируса, а также прямой и непрямой иммунофлюоресцентной микроскопии для их индикации в клеточной культуре.

I. Методы лабораторной диагностики с использованием клеточных культур

I. Выделение вируса.

Для выделения вируса простого герпеса (ВПГ) используют первичные культуры фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ), диплоидные клетки легкого эмбриона человека (ЛЭЧ), перевиваемые клетки почки зеленой мартышки (Vero). Для изоляции цитомегаловируса пригодны культуры ФЭЧ, ЛЭЧ и перевиваемые клетки RD.

Для работы обычно используют 36-48-часовую клеточную культуру с полностью сформированным монослоем. Конкретные сведения по культивированию и контролю качества клеток для вирусологических исследований изложены в "Методических рекомендациях по стандартизации работы с клеточными культурами для вирусологических исследований" (Свердловск, 1990 г.).

Перед заражением сливают среду роста, монослой клеток промывают подогретым до 37°С раствором Хенкса или средой поддержания. В каждую пробирку вносят по 0,1 мл исследуемого материала в разведении 1:10 и оставляют его на 60 мин при 37°С для контакта с клетками, после чего сливают, а в пробирки вносят среду поддержания и помещают их в термостат. Наблюдение за клетками ведут ежесуточно, до наступления дегенерации в контрольной культуре. Наибольший интерес представляют клетки, в которых цитопатическое действие (ЦПД) проявляется на 3-5 сутки с момента заражения.

Для приготовления антигена вирус вносят с множественностью заражения 0,01-1,0 $ТЦД_{50}$/кл. Через 4-6 часов после заражения происходит набухание ядер и ядрышек клеток, а через 24 часа отмечается нарушение структуры монослоя и перераспределение хроматина ядер. В отдельных клетках образуются включения. ЦПД проявляется через 24-48 часов с момента заражения, монослой разрушается. Клетки в процессе дегенерации располагаются отдельными группами, формируя небольшие симпласты. Вирус простого герпеса вызывает маргинацию хроматина ядер и фрагментацию ядрышек, разрежение и лизис цитоплазмы клеток. Через 72 часа на стекле остаются лишь отдельные клетки с поздней стадией дегенерации.

Репликативный цикл ЦМВ длительнее, чем ВПГ. При внесении вируссодержащего материала изменения монослоя наблюдаются через 72-96 часов и выражаются в появлении гигантских клеток шарооб-

разной формы с типичными эозинофильными включениями, занимающими значительную часть ядра. Ядерные включения окружены светлым ободком, что придает клетке вид "птичьего глаза". Формы таких "цитомегалов" различны: округлые, овально-вытянутые, яйцеобразные, что связано со скоростью размножения вируса. Через 96 часов внутриядерные включения вакуолизируются и распадаются, начинается клеточная деструкция.

Нередко для выделения инфекционного вируса необходимо проведение хотя бы одного-двух "слепых" пассажей вируса в культуре, прежде чем инфекционная активность персистирующего вируса проявится в виде типичного цитопатического действия.

2. Метод иммунофлюоресценции (ИФ).

Этот метод является одним из экспрессных методов лабораторной диагностики, обладающий рядом преимуществ: достаточно прост, позволяет сократить сроки исследования в 3-5 раз, по сравнению с общепринятым. По чувствительности и специфичности не уступает другим.

Иммунофлюоресцентный метод используется в следующих основных вариантах: прямой, непрямой, непрямой метод с добавлением комплемента и "интенсивний" метод флюоресцирующих антител (вариант непрямого метода). Чаще всего применяют первые два варианта.

Прямой метод иммунофлюоресценции. Реакцию иммунофлюоресценции ставят по методу Кунса. Приготовление "клеточных" тест-препаратов осуществляют следующим образом: культуру клеток разливают по 1 мл в пробирки с покровными стеклами и инкубируют при 37°С. После формирования монослоя клетки промывают дважды стерильным раствором Хенкса и заражают вируссодержащим материалом в объеме 0,1 мл в разведении 1:10 или вирусами ВПГ и ЦМВ в дозе 0,01-1,0 $ТЦД_{50}$/кл. Через 24 часа инкубирования при 37°С стекла извлекают, ополаскивают в физиологическом растворе, подсушивают, фиксируют охлажденным ацетоном в течение 10 минут и монтируют на предметном стекле с помощью лейкопластыря.

Приготовленные таким образом тест-препараты используют как для прямого, так и непрямого вариантов ИФ. В первом случае непосредственно на тест-препараты наносят люминесцирующие иммуноглобулины к ВПГ или ЦМВ в рабочем разведении, указанном на этикетке, помещают их во влажную камеру и выдерживают при 37°С

30 минут, затем дважды по 10 минут промывают охлажденным забуференным физиологическим раствором (pH 7,2-7,4), ополаскивают дистиллированной водой и подсушивают.

При непрямом варианте вначале наносят исследуемую сыворотку, а на втором этапе используют ФИТЦ - конъюгаты против иммуноглобулинов человека или животных, выпускаемые Институтом эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи РАМН.

Окрашенные препараты просматривают в люминесцентном микроскопе "Люмам" (фильтры ФС-2, СЗС-7, ВВ-15, запирающий №2, объектив МИх90, окуляр х4), используя масляную (диметилфталат) или водную иммерсию - объектив ВИх70. Интенсивность флюоресценции в препаратах оценивают по общепринятой четырехкрестовой шкале:

4 - (++++) - сияющая флюоресценция включений;
3 - (+++) - яркая флюоресценция включений;
2 - (++) - отчетливая флюоресценция включений меньшей яркости;
1 - (+) - слабая, неотчетливая флюоресценция.

При оценке результатов учитывают лишь клетки с сохраненной структурой (ясно различимыми ядром и цитоплазмой) и отчетливой желтовато-зеленой специфической флюоресценцией в виде гранулярных включений в ядре или диффузным свечением цитоплазмы на 2+. При отрицательном результате наблюдается слабое желтоватое (фоновое) свечение на 1+ и менее.

II. Характеристика клеточных культур, рекомендуемых для использования

1. Первично-трипсинизированные культуры.

Первично-трипсинизированные культуры являются доступным субстратом для выделения и накопления ВПГ и ЦМВ.

В таблице 1 и 2 представлены результаты оценки чувствительности этих культур к указанным вирусам с помощью метода иммунофлюоресценции.

Таблица I

Чувствительность к ВПГ первично-трипсинизированных культур клеток человеческого и животного происхождения

Клеточная культура	Время проявления ЦПД (час)	Титр вируса (lg $ТЦД_{50}$/мл)	Выявление вирусного антигена в ИФ(час)			Кратность пассирования
			12	24	48	
I	2	3	4	5	6	7
ФЭЧ-фибробласты мышечной ткани эмбриона человека	24	5,0-5,5	+	++ я	+++ я ц	I пассаж
ЛЭЧ-клетки легкого эмбриона человека	20-22	5,5-6,0	+	++ я	+++ я ц	4 пассажа
ПЭЧ-клетки почки эмбриона человека	48	4,5-5,0	+	++ я	++ я ц	2-3 пассажа
ФЭК-фибробласты эмбриона кур	48	4,0	+	++ я	++ я ц	3-4 пассажа
ЛЭК-клетки легкого эмбриона кролика	48	2,5-3,0	+	++ я	+++ я ц	2 пассажа
ПЭК-клетки почечной ткани эмбриона кролика	24-36	3,0-3,5	+	++ я ц	+++	2 пассажа
СЭК-клетки сердечной мышцы эмбриона кролика	48	4,0-4,5	+	++	+++	4 пассажа
МЭК-клетки мышцы эмбриона кролика	48	3,0-3,5	+	++ я	+++ я ц	4 пассажа
ПТ-клетки почки теленка	48	2,0-2,5	+	++ я	++ я	3 пассажа
ЛЭТ-клетки легкого эмбриона теленка	36-48	3,0-3,5	+	+ я	++ я ц	3 пассажа
СЭО-клетки сердца эмбриона овцы	48	3,5	-	+ я	++ я	3 пассажа
ЛЭО-клетки легкого эмбриона овцы	48	2,0-2,5	-	+ я	++ я	3 пассажа

Обозначение: участки локализации свечения - ц - цитоплазма, я - ядро.

Таблица 2

Чувствительность к ЦМВ первично-трипсинизированных культур

Клеточная культура	Время проявления ЦПД (час)	Титр вируса (lg $ТЦД_{50}$/мл)	Выявление вирусного антигена в ИФ(час)			Кратность пассирования
			12	24	48	
ФЭЧ-фибробласты мышечной ткани эмбриона человека	48	5,0	-	+ я	++ я ц	I пассаж
ЛЭЧ-клетки легкого эмбриона человека	20-22	4,5-5,0	+	++ я	+++ я ц	2-3 пассажа

2. Характеристика диплоидных клеточных штаммов, рекомендуемых для работы с БПГ и ЦМВ.

Штамм ПЭО-83 (а.с. I304403 от I5.I2.86).

Штамм полуперевиваемых клеток почки эмбриона овцы (ПЭО-83) получен в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ, ко времени проведения опытов прошел более 50 пассажей. Цитопатических агентов в клетках не выявлено. Культура представлена полигональными клетками крупного размера, с выраженными границами и мелкозернистой цитоплазмой. Кратность прироста на 4-5 сутки роста - 5-6 раз, митотический индекс на 3 сутки роста - 30-40‰.

Доза посадки:

- на пробирки - 90-I00 тыс.кл./мл;
- на матрасы - 50-60 тыс.кл./мл.

Среда культивирования: смесь сред I99 и Игла в равных количествах, с добавлением 7% сыворотки крови КРС. Антибиотики: пенициллин, стрептомицин в дозе соответственно I00 и 50 Ед/мл. Снятие клеток со стекла проводят 0,02% раствором версена.

При заражении клеток ПЭО-83 в дозе 0,0I-I,0 $ТЦД_{50}$/кл. специфические включения выявлялись в ядре и цитоплазме через 72 часа. Титр вируса составляет до 5,0 lg $ТЦД_{50}$/мл.

Штамм ПЭК-86 (а.с. №4459837/30-I3 от 0I.06.88.).

Штамм полуперевиваемых клеток новорожденного кролика полу-

чен в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ. Культура представляет собой плотный монослой полигональных клеток с выраженной структурой. Цитоплазма клеток светлая, с мелкой зернистостью. Ядра округлой формы, содержит 2-6 ядрышек. Кратность прироста на 3-4 сутки - 4,5-5,0 раз. Митотическая активность на третьи сутки роста - 30-34%.

Доза посадки: на матрасы - 60-80 тыс.кл./мл; на пробирки - 100-120 тыс.кл./мл.

Среда культивирования: смесь равных объемов сред 199 и Игла с добавлением сыворотки КРС - 10%. Антибиотики: пенициллин, стрептомицин в дозе соответственно 100 и 50 Ед/мл.

ВПГ штамм Л-2 размножается в клетках, вызывая дегенерацию при первичном заражении через 48 часов, а при пассировании-через 24 часа после заражения. Титр инфекционной активности вируса составляет до 3,0-4,0 lg $ТЦД_{50}$/мл.

При иммунофлюоресцентном анализе клеток ПНК-86 через 24 часа после заражения антиген вируса определяется в 50% клеток.

Штамм ПВО-88 - полуперевиваемые клетки почки взрослой зеленой мартышки.

Получен в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ и прошел более 50 пассажей. Культура формирует монослой полигональных клеток с четкой структурой и мелкозернистой цитоплазмой. Ядра овальные, содержат 3-5 ядрышек.

Доза посадки:

- на пробирки - 100-110 тыс.кл./мл;
- на матрасы - 50-60 тыс.кл./мл.

Кратность рассева 1:5-1:6. Монослой формируется на 3-4 сутки роста. Клетки снимают со стекла смесью версен-трипсин в соотношении 1:1.

Среда культивирования: смесь равных объемов сред 199 и Игла с добавлением сыворотки КРС - 5%. Антибиотики - по общепринятой схеме.

Культура чувствительна к ВПГ:титр вируса 4,5-5,0 lg $ТЦД_{50}$/мл.

Штамм ФЛЭЧ - клетки фибробластов легкого эмбриона человека.

Получен в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ из ткани легкого 16-ти недельного эмбриона человека. Клеточная культура представляет собой монослой однородных фибробластоподобных клеток, обладающих ориентированным ростом. Цитоплазма светлая, с легкой зернистостью. Ядра содержат от 1 до 4 ядрышек.

Кариотип клеток соответствует клеткам человеческого происхождения, 87% клеток на 25 пассаже сохраняют диплоидный набор хромосом, относительное количество клеток с аберрациями не превышало 3,5-4%. Клетки свободны от контаминирующих агентов, не обладают туморогенной активностью.

Доза посадки:

- на пробирки-400 тыс.кл./мл.;
- на матрасы-150-200 тыс.кл./мл.

Кратность прироста - 2,0-2,5 раза на 4-5 сутки роста. Митотическая активность на 4 сутки роста 18-20%.

Среда культивирования: среда Игла с добавлением 10% сыворотки КРС. Антибиотики - пенициллин, стрептомицин по общепринятой схеме. Клетки снимают со стекла смесью растворов версена и трипсина в соотношении 1:1.

Культура чувствительна к ВПГ - титр до 6,0 lg $ТЦД_{50}$/мл и ЦМВ - титр до 5,0 lg $ТЦД_{50}$/мл.

В таблицах 3 и 4 представлены данные по чувствительности к ВПГ и ЦМВ полуперевиваемых клеточных культур.

Таблица 3

Чувствительность к ВПГ полуперевиваемых штаммов клеточных культур

Клеточная культура	Время проявления ЦПД (час)	Титр вируса (lg $ТЦД_{50}$/мл)	Выявление вирусного антигена в ИФ (час)		
			12	24	48
ПЭО-83	48	5,0	-	+ я	++ я ц
ПНК-86	20-22	4,0	+	++ я	+++ я ц
ПВО-88	36-48	4,5-5,0	+	++ я	+++ я ц
ФЛЭЧ	20-22	4,5-6,0	+ я	++ я ц	+++ я ц

Таблица 4

Чувствительность к ЦМВ полуперевиваемых штаммов клеточных культур

Клеточная культура	Время проявления ЦПД (час)	Титр вируса (lg $ТЦД_{50}$/мл)	Выявление вирусного антигена в ИФ (час)		
			12	24	48
ПЭО-83	96	5,0	-	+	++ я
ФЛЭЧ	24-48	5,0	+	++ я	+++ я ц

3. Перевиваемые культуры клеток.

Культура клеток RD.

Получена из рабдосаркомы таза 7-летней девочки в 1968 г. В ЕНИИВИ поступила из ВСКК (Институт цитологии РАН). В лаборатории прошла более 20 пассажей. Культура состоит из веретеновидных, полигональных и крупных многоядерных клеток. Ядра овальные, ядрышки мелкие, многочисленные. Цитоплазма светлая, мелкозернистая, границы клеток выражены нечетко.

Доза посадки:

- на пробирки - 100 тыс.кл./мл.;
- на матрасы - 50-70 тыс.кл./мл.

Клетки снимают со стекла смесью версен-трипсин в соотношении 3:1.

Среда культивирования: смесь сред 199 и Игла в равных пропорциях с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров.

Культура чувствительна к ВПГ - инфекционные титры до 6,0 lg $ТЦД_{50}$/мл и к ЦМВ - инфекционный титр до 5,0 lg $ТЦД_{50}$/мл.

Культура клеток РН.

Получена из ткани почки эмбриона человека. В ЕНИИВИ поступила в 1969 году из МНИИВП; в лаборатории прошла более 100 пассажей. Клетки однородные, полигональные, границы четко выражены. Монослой плотный.

Доза посадки:

- на пробирки - 100 тыс.кл./мл;
- на матрасы - 40-50 тыс.кл./мл.

Среда культивирования: среда 199 с 7-10% сыворотки КРС, без антибиотиков.

Кратность прироста 5-6 - на 4-е сутки.

Культура чувствительна к ВПГ типа 2: титр - до 4,0 lg $ТЦД_{50}$/мл.

Культура клеток Vero.

Получена из почечной ткани африканской зеленой мартышки. В ЕНИИВИ получена в 1983 году из ВСКК (Институт цитологии РАН); в лаборатории прошла более 20 пассажей. Фибробластоподобные клетки с мелкозернистой цитоплазмой. В ходе роста возможно образование трехмерных структур.

Доза посадки:

-на пробирки - 100 тыс.кл./мл;

-на матрасы - 50 тыс.кл./мл.

Кратность прироста 5-7 на пятые сутки.

Среда культивирования: среда 199 с 5% КРС, без антибиотиков.

Культура чувствительна к ВПГ - титр 6,5-7,0 lg $ТЦД_{50}$/мл, к ЦМВ - титр до 2,0-3,0 lg $ТЦД_{50}$/мл.

Культура клеток СОЦ.

Получена из тканей сердца обезьяны циномольгус. В ЕНИИВИ получена в 1970 году. К моменту исследования прошла более 100 пассажей. Клетки вытянутой формы с четкой структурой.

Доза посадки:

- на пробирки - 100-120 тыс.кл./мл;

- на матрасы - 50-70 тыс.кл./мл.

Кратность прироста - 4-5 на 5 сутки роста.

Среда культивирования: смесь сред 199 и Игла в равных объемах с добавлением 10% сыворотки КРС и антибиотиков по общепринятой схеме. Культура чувствительна к ВПГ - инфекционный титр до 4,5 lg $ТЦД_{50}$/мл.

Культура клеток Таурус-1.

Перевиваемый штамм гетероплоидных клеток почки теленка получен во ВНИИ гриппа РАМН в 1992 г. До начала опытов культура прошла в лаборатории ЕНИИВИ 8 пассажей.

Монослой полигональных клеток с четкой архитектоникой. Цитоплазма мелкозернистая, светлая. Ядра округлые, содержащие 2-4 ядрышка.

Доза посадки:

- на пробирки - 450-500 тыс.кл./мл;

- на матрасы - 250-300 тыс.кл./мл.

Кратность прироста на 5-7 сутки - 2, митотический индекс

на 3 сутки - 23-25‰.

Среда культивирования: среда Игла МЕМ - 90%, сыворотка КРС - 10%. Антибиотики - по общепринятой схеме.

Клетки снимают со стекла смесью раствора химопсина и 0,02% раствора версена в соотношении I флакон химопсина на 0,4 литра версена.

Клетки чувствительны к ВПГ - титр до 4,5-5,0 lg $ТЦД_{50}$/мл и к ЦМВ - титр до 5,0-5,5 lg $ТЦД_{50}$/мл.

В таблицах 5 и 6 представлены данные по исследованию чувствительности перечисленных выше клеточных культур к ВПГ и ЦМВ.

Таблица 5

Чувствительность к ВПГ перевиваемых культур клеток

Клеточная культура	Время проявления ЦПД (час)	Титр вируса (lg $ТЦД_{50}$/мл)	Выявление вирусного антигена в ИФ (час)		
			I2	24	48
RH	48	3,5-4,0	-	++ я	+++ я ц
Vero	24	6,5-7,0	+ я	++ я ц	+++ я ц
СОЦ	24-36	4,5	+ я	++ я ц	+++ я ц
Тауруо-I	48	4,5-5,0	+ я	++ я ц	+++ я ц

Таблица 6

Чувствительность к ЦМВ перевиваемых культур

Клеточная культура	Время проявления ЦПД (час)	Титр вируса (lg $ТЦД_{50}$/мл)	Выявление вирусного антигена в ИФ (час)		
			I2	24	48
RD	72	5,0	+ я	++ я ц	+++
Vero	46-72	2,0-3,0	-	+ я	+++ я ц
Тауруо-I	48	I-2	-	+ я	++ я ц
ЧЕр-2	72	I-2	-	+ я	++ я ц
-4I	96	2,0-2,5			+ я

Заключение

Проведенные исследования по анализу чувствительности клеточных культур низкотемпературного банка - музея ЕНИИВИ к ВПГ и ЦМВ позволяют рекомендовать культуры клеток, описанные в настоящих рекомендациях, для лабораторной диагностики герпетической и цитомегаловирусной инфекций.

Имея отработанный в течение ряда лет опыт транспортировки клеточных культур на дальние расстояния, Екатеринбургский НИИВИ может обеспечить регулярное снабжение необходимыми культурами практических вирусологических лабораторий Госкомсанэпиднадзора и Минздравмедпрома Российской Федерации, что позволит в известной степени упростить и стандартизировать работу по дифференциальной диагностике заболеваний, вызываемых вирусами группы герпеса.

Отрывной лист учета эффективности использования
методических рекомендаций

Направить в отделение планирования и внедрения Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций (620030, г.Екатеринбург, ул.Летняя,23)

I. Методические рекомендации: "Клеточные культуры в диагностике вирусных инфекций, вызываемых вирусами группы герпеса"

2. Заместителем Председателя ГК СЭН РФ Онищенко Г.Г. 28.II.94г.
(кем и когда утвержден)

3. _____
(кем и когда получен)

4. Количество центров госсанэпиднадзора и лечебно-профилактических учреждений, которые внедрили методы, предложенные документом _____

5. Формы внедрения (семинары, подготовка и переподготовка специалистов, сообщения и пр.) и результаты применения методов (количество наблюдений за 1 год и эффективность)

_____

_____

_____

_____

_____

6. Замечания и пожелания _____

_____

_____

Подпись _____
(должность, Ф.И.О. лица, заполнившего карту)

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСАМИ ГРУППЫ ГЕРПЕСА

Методические рекомендации

Лицензия на издательскую
деятельность
ЛР № 020672
7 декабря 1992 г.

ПОДПИСАНО К ПЕЧАТИ 29.08.95 г. ФОРМАТ 60 x 84 1/16
ОБЪЕМ 0,94 ПЕЧ.Л. ТИРАЖ 150 экз. ЗАКАЗ 811

Цех № 4 АО "Полиграфист", 620219 Екатеринбург,ул.Тургенева,20

gost.e-ecolog.ru