

Оригинальная статья / Original article

УДК: 619:578.842.1:616-076

DOI: 10.18470/1992-1098-2026-2-7



Выделение вируса африканской чумы свиней в первичной культуре клеток тестикул свиньи

Данила С. Моисеенко, Роман С. Чернышев, Ольга С. Пузанкова,

Вера Л. Гаврилова, Алексей С. Иголкин

Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир, Россия

Контактное лицо

Данила С. Моисеенко, аспирант, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней, Федеральный центр охраны здоровья животных; 600901 Россия, г. Владимир, ул. Гвардейская, 6.
Тел. +79191963812

Email moiseenko_ds@ARRIAH.RUORCID <https://orcid.org/0009-0003-4465-0179>

Формат цитирования

Моисеенко Д.С., Чернышев Р.С., Пузанкова О.С., Гаврилова В.Л., Иголкин А.С. Выделение вируса африканской чумы свиней в первичной культуре клеток тестикул свиньи // Юг России: экология, развитие. 2026. Т.21, N 2. С. 81-89.

DOI: 10.18470/1992-1098-2026-2-7

Получена 10 февраля 2026 г.

Прошла рецензирование 3 марта 2026 г.

Принята 25 апреля 2026 г.

Резюме

Разработка и валидация альтернативного метода выделения вируса АЧС из биологического материала от домашних свиней и диких кабанов в первичной культуре клеток тестикул свиньи.

Культуру клеток тестикул свиньи можно использовать для вирусывыделения в случае невозможности приобретения доноров, несмотря на меньшую аналитическую чувствительность (от 4.33 ± 0.33 до 5.76 ± 0.13 lg ГАД_{E50}/см³) при сравнении со спленоцитами свиньи (от 5.0 ± 0.12 до 6.0 ± 0.14 lg ГАД_{E50}/см³). Разработанный метод обладает 100 % специфичностью, 90.91 % диагностической чувствительностью при выделении вируса АЧС как из биологического материала от домашних свиней, так и от диких кабанов.

Проведенные исследования позволили расширить арсенал методов вирусологической диагностики АЧС. Оценка альтернативной культуры клеток, подходящей для выделения, позволила установить оптимальную посевную концентрацию клеток, при которой максимальный титр вируса АЧС может достигать 6.33 ± 0.06 lg ГАД_{E50}/см³. Валидированный метод выделения вируса АЧС позволяет применять его в ветеринарных лабораториях при невозможности использования доноров.

Ключевые слова

АЧС, вирусологический метод, культура клеток, тестикулы свиньи.

Isolation of the African swine fever virus in primary cultures of pig testicular cells

Danila S. Moiseenko, Roman S. Chernyshev, Olga S. Puzankova,
Vera L. Gavrilova and Alexey S. Igolkin

Federal Centre for Animal Health Protection, Vladimir, Russia

Principal contact

Danila S. Moiseenko, Postgraduate student, veterinarian, ASF Reference Laboratory, Federal Center for Animal Health; 6 Gvardeyskaya St, Vladimir, Russia 600901.

Tel. +79191963812

Email moiseenko_ds@ARRIAH.RU

ORCID <https://orcid.org/0009-0003-4465-0179>

How to cite this article

Moiseenko D.S., Chernyshev R.S., Puzankova O.S., Gavrilova V.L., Igolkin A.S. Isolation of the African swine fever virus in primary cultures of pig testicular cells. *South of Russia: ecology, development*. 2026; 21(2):81-89. (In Russ.)
DOI: 10.18470/1992-1098-2026-2-7

Received 10 February 2026

Revised 3 March 2026

Accepted 25 April 2026

Abstract

Development and validation of an alternative method for isolating ASFV from biological materials from domestic pigs and wild boar in primary cultures using pig testes.

Pig testis cell culture can be used to isolate viruses if donors are not available, despite lower sensitivity (4.33 ± 0.33 – 5.76 ± 0.13 lg GAdE₅₀/cm³) compared to pig spleen cells (5.0 ± 0.12 – 6.0 ± 0.14 lg GAdE₅₀/cm³). The developed method has 100 % specificity and 90.91 % diagnostic sensitivity when isolating the ASFV from both biological material from domestic pigs and wild boars.

The studies conducted have made it possible to expand the arsenal of methods for virological diagnosis of ASF. Evaluation of an alternative cell culture suitable for isolation allowed us to establish the optimal inoculation concentration of cells, at which the high titer of the ASFV can reach 6.33 ± 0.06 lg GAdE₅₀/cm³. The validated method of ASFV isolation allows it to be used in veterinary laboratories when donors cannot be used.

Key Words

ASFV, virus isolation, cell culture, swine testicular (ST).

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозная, трансграничная болезнь, наносящая огромные экономические убытки во многих странах мира, вызываемая оболочечным вирусом с двухцепочечной ДНК (dsDNA). Вирус АЧС – единственный ДНК-содержащий арбовирус и представитель рода *Asfivirus* семейства *Asfarviridae* [1]. Из доклада Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ) с января 2022 г. по февраль 2026 г., болезнь зарегистрирована в 72 странах. Число случаев среди домашних свиней составило 1 184 575 и 47 510 среди диких кабанов. В связи с неблагополучием по АЧС с января 2022 г. по февраль 2026 г. 2 490 557 голов домашних свиней было уничтожено [2].

Первое описание АЧС датируется 1921 годом (Кения). В 1957 году вирус был занесен из Африки в Португалию, что впоследствии привело к вспышкам болезни в различных европейских странах [3–5]. Занос вируса АЧС II генотипа в Россию произошел в 2007 году из Закавказья на территорию Чеченской республики [6]. К 2013 году эпизоотические очаги АЧС зарегистрированы на территории всех федеральных округов европейской части России. Летом 2019 года впервые обнаружили АЧС у домашних свиней, павших на территории крестьянско-фермерского хозяйства Приморского края [7]. По данным Россельхознадзора, на конец 2024 года зарегистрировано 2344 очагов АЧС (1398 среди домашних свиней и 946 среди дикого кабана) в 74 субъектах Российской Федерации. В период с 2025 по 2026 гг. вспышки АЧС в России не notificировали.

Ввиду отсутствия эффективных вакцин против АЧС в России специфическая профилактика остается невозможной, поэтому своевременная лабораторная диагностика является основным направлением в борьбе с распространением АЧС. Важной особенностью АЧС является инфекционный процесс: свиньи с подострым и хроническим течением обычно вырабатывают антитела против вируса АЧС через 11–14 суток после заражения. Синтез специфических антител в высоких титрах против структурных и неструктурных белков вируса АЧС не обеспечивает его элиминацию из инфицированного организма свиней [8]. Однако высокий титр антител и короткий срок сероконверсии позволяет проводить эффективную серологическую диагностику в выявлении животных с подострым и хроническим течениями АЧС, используя тест-системы преимущественно на основе иммуноферментного анализа (ИФА).

Важную роль в своевременном обнаружении вируса АЧС играет молекулярная диагностика. ДНК вируса АЧС выявляют с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), обладающего высокой чувствительностью, специфичностью, экспрессностью и воспроизводимостью. ПЦР позволяет с высокой скоростью обнаружить геном вируса на ранних этапах заболевания животных в тканях и органах. Однако важно отметить, данный метод не может выявить инфекционно-активный вирусный агент. Это достигается за счет заражения чувствительных культур клеток (вирусовыделение и определение титра вируса) или естественно-восприимчивых животных (биопроба на свиньях). Комплекс представленных методов позволяет оценить культуральные, иммуно- и

молекулярно-биологические свойства изолятов вируса АЧС.

Выделение вируса АЧС в первичных культурах клеток свиней до сих пор остается актуальным методом из-за высокой чувствительности и достоверности постановки диагноза. В свою очередь, отсутствие фенотипического проявления вирусной репродукции в культуре клеток не всегда указывает на отрицательные результаты вирусовыделения. Отсутствие вируса АЧС должно подтверждаться вспомогательными методами (ПЦР, РПИФ и др.). Культивирование в первично-трипсинизированной культуре клеток спленоцитов свиньи (СС) позволяет получить материал с высоким титром вируса АЧС (более $6.0 \lg \text{ГАдE}_{50}/\text{см}^3$) в течение 12–24 ч. Процесс накопления вируса АЧС в культурах клеток костного мозга свиньи (КМС) и почки свиньи (СП) составляет 48 ч, а в тестикулах свиньи (ТС) – 48–72 ч, что подчеркивает предпочтительность использования СС в диагностике болезни [9]. Однако получение первичных культур клеток СС и КМС – трудозатратный и дорогостоящий процесс, требующий регулярной поставки животных-доноров. При этом клетки мононуклеарного ряда получают при отборе лёгких, почек, трубчатых костей или селезёнки исключительно от туш поросят-доноров. В культуре клеток ТС также присутствуют мононуклеары, но отбор тестикул поросят можно осуществлять при кастрации, необязательна эвтаназия животных [10].

В связи с этим целью исследования являлась разработка и валидация метода выделения вируса АЧС из биологического материала от домашних свиней и диких кабанов в первичной культуре клеток ТС. Данный метод должен обладать чувствительностью и специфичностью в пределах значений, позволяющих достоверно поставить диагноз на АЧС (80–100 %), и удовлетворять требованиям этики по использованию животных-доноров. Научная новизна заключается в расширении арсенала методов вирусологической диагностики АЧС, использовании в выделении вируса АЧС альтернативных культур клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вирусы. В исследовании использовали вирулентные штаммы вируса АЧС: Мозамбик-78 V генотипа, Arm 07 II генотипа, Конго-49 I генотипа, Лиссабон-57 I генотипа, рекомбинантный штамм ASFV/Primorsky_2023/DP-4560.Rec I/II генотипов. При проверке аналитической специфичности метода использовали образцы вирусов классической чумы свиней (штамм Ши-мынь); репродуктивно-респираторный синдром свиней (штамм Иркутский 2007), болезни Ауески (штамм ВК). Исходный материал в форме лиофилизата импортировали из Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Культивирование и титрование вируса АЧС осуществляли в культуре клеток СС согласно методическим рекомендациям ФГБУ «ВНИИЗЖ» [11].

Стабилизированные эритроциты в рабочей концентрации 1:100 получали на физиологическом растворе для проведения реакции гемадсорбции (РГАД). У свиней кровь отбирали стерильно из сердца в объёме не менее $50\text{--}100 \text{ см}^3$ во флакон со стеклянными бусами, диаметром 5 мм. После взятия производили дефибрирование в течение 10–15 минут до образования кровяного сгустка. В ламинарном шкафу

биологической безопасности II класса осторожно отбирали кровь вокруг фибринового сгустка стерильной пипеткой в центрифужные пробирки объемом 50 см³ и затем добавляли к крови физиологический раствор 1/3 или 1/4 части от общего объема. Далее центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10–15 минут. Надосадочную жидкость удаляли, а к осадку эритроцитов добавляли физиологический раствор. Отмывку эритроцитов производили 3–4 раза.

Культура клеток ТС. Для получения первично-трипсинизированной культуры клеток ТС использовали естественно восприимчивых клинически здоровых поросят-сосунков не старше 3–4 недельного возраста живой массой 6–12 кг, полученных из хозяйств, благополучных в отношении АЧС, КЧС и других инфекционных болезней. Также допустимо использование в качестве донорского материала тестикул хрячков (не старше 2-х месячного возраста), полученных при кастрации.

Эвтаназию поросят проводили в соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. В экспериментах были соблюдены институциональные и национальные стандарты по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use. Тестикулы хрячков извлекали с помощью стерильных хирургических инструментов (ножниц, скальпеля и пинцета), изолируя мошонку, мышечно-эластическую оболочку, фасции семенника и препарируя до общей влажной оболочки, затем помещали в стерильные флаконы, транспортируя в биксе к помещению класса С.

Транспортировка тестикул хрячков, отобранных при кастрации, осуществлялась в стерильном физиологическом растворе с содержанием NaCl до 0.9 %, предварительно охлажденным до 4 °С.

Тестикулы освобождали от общей влажной оболочки, после этого 2–3 раза органы омывали питательной средой Игла (или физиологическим раствором) с добавлением бензилпенициллина натриевой или калиевой соли (1 млн ЕД) и стрептомицина сульфата (1 г), гентамицина (80 мкг). Затем измельчали органы на кусочки величиной 3–6 мм, помещали в культуральный флакон с площадью поверхности 75 см².

Кусочки тестикул трипсинизировали во флаконах площадью 75 см², для этого использовали раствор трипсина 0.25 % на солевой среде Эрла, заранее подогретого до 37 °С. Трипсинизацию проводили методом встряхивания органной суспензии в термостатируемом шейкере (при температуре 37±5 °С, 30 минут).

Суспензию клеток после первого цикла трипсинизации центрифугировали в течение 20 минут при 500 g. После удаления супернатанта осажденные клетки ресуспендировали в небольшом количестве ростовой питательной среды (5–10 мл) с добавлением 20 % фетальной сыворотки КРС. Трипсинизацию проводили 4–5 циклов.

Полученную суспензию клеток фильтровали через 8 слоев марли, нейлоновый фильтр для

деагрегации клеток с размером пор 40 мкм, доводили до экспериментально-оптимизированной посевной концентрации 400 тыс. кл/см³ и производили посев в культуральные планшеты на 96 лунок, затем инкубировали 22–26 ч при 37±5 °С в атмосфере 5 % CO₂. Через 24 ч меняли ростовую питательную среду Игла на поддерживающую (с 10 % содержанием фетальной сыворотки КРС) и добавляли суспензию дефибринированных эритроцитов свиньи до конечной концентрации 0.1–0.2 %.

Подготовка исследуемых проб. Образцы биологического материала для исследования поступали из эпизоотических очагов для подтверждения диагноза. Они передавались на вирусологические исследования после предварительного подтверждения диагноза в ПЦР. Перед работой материал гомогенизировали с помощью горизонтального прибора QIAGEN (Германия). Затем к измельченному биологическому материалу добавляли стерильный физиологический раствор для получения 10 % суспензии.

Данную суспензию переносили в стерильные пробирки и осветляли центрифугированием (3000 g, 5 мин), затем отбирали супернатант и пропускали его через фильтры (размер пор 0.45 мкм). В фильтрат вносили противомикробные средства (пенициллин 500 ЕД/см³, стрептомицин 500 мг/см³ или гентамицина сульфат 500 мкг/см³). Инкубировали при температуре от 2 до 8 °С в течение 60±10 минут.

Инфицирование культуры клеток. Для проведения анализа использовали культуральные 96-луночные планшеты с суточным субконфлюэнтным монослоем клеток тестикул свиньи из расчета 8 лунок (повторностей) на каждую испытываемую и две повторности – на контрольные образцы (1 отрицательный (ОКО) и 1 положительный (ПКО) образцы).

В качестве испытываемых проб выступали 10 % суспензии биологического материала (селезенки, лимфатических узлов и др.), приготовленные на физиологическом растворе. Наличие отрицательного контроля необходимо для выявления спонтанной гемадсорбции (неспецифической реакции). В качестве положительного контрольного образца использовали вируссодержащую суспензию референтного штамма Artn 07 с титром не менее 5.0 lg ГАД_{Е50}/см³.

В первые лунки с клетками и культуральной средой вносили по 0.01 см³ 10 % вируссодержащей суспензии, положительный и отрицательный контрольные образцы (по 0.01 см³) и затем пипетировали в каждой лунке (проводили последовательные 10-кратные разведения). Инкубацию осуществляли в течение 96 ч при температуре 37.0±0.5 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Учет и интерпретация результатов. Оценку гемадсорбции проводили методом световой инвертированной микроскопии. Репродукция вируса АЧС в культуре клеток характеризовалась морфологическими изменениями инфицированных клеток, на поверхности которых адсорбировалось от 5 до 50 эритроцитов (рис. 1. А, В, С).

Если хотя бы в одной из повторности обнаруживали феномен гемадсорбции, то исследуемый образец признавали положительным на наличие вируса АЧС. При отсутствии гемадсорбирующих клеток планшеты подвергались заморозке при температуре не менее минус 50 °С в течение 3 часов, после чего суспензию культуры клеток размораживали и проводили следующий пассаж на ТС.

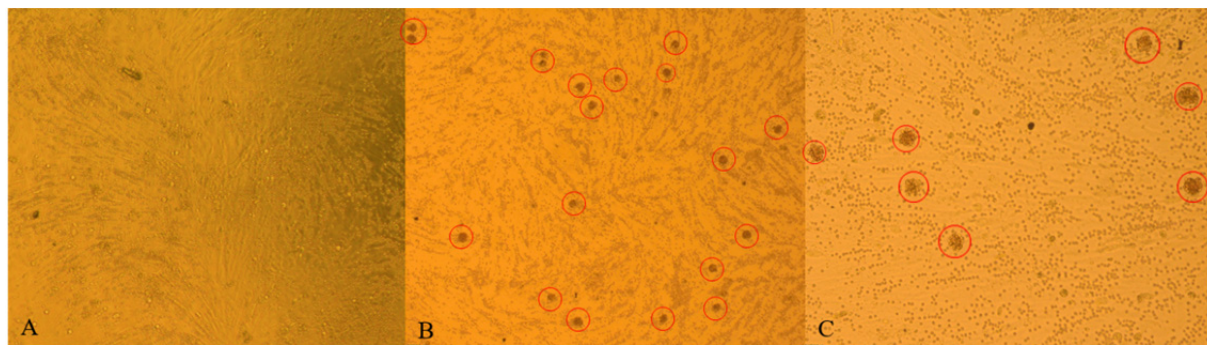


Рисунок 1. Результаты РГАд в культуре клеток ТС:

А – отрицательный результат (образец не содержит вируса АЧС, увеличение $\times 100$);

В – положительный результат (образец содержит вирус АЧС, увеличение $\times 100$);

С – гемадсорбирующие клетки (образец содержит вирус АЧС, увеличение $\times 200$)

Примечание: гемадсорбирующие инфицированные клетки обведены красным курсивом

Figure 1. Results of RGAd in ST cell culture:

A – negative result (sample does not contain ASFV, magnification $\times 100$);

B – positive result (sample contains ASFV, $\times 100$ magnification);

C – haemadsorbent cells (sample containing ASFV $\times 200$ magnified)

Note: haemadsorbent infected cells are highlighted in red italics

При отсутствии эффекта гемадсорбции в ТС на протяжении 5 пассажей, суспензию культуры клеток с 3, 4 и 5 пассажей исследовали методом ПЦР-РВ тест-системой ФГБУ «ВНИИЗЖ» согласно инструкции производителя. На протяжении 3–5 пассажей должно наблюдаться уменьшение показателя Ct (признака роста репликативной активности). Также образец считали отрицательным на наличие вируса АЧС при условии отсутствия Ct при исследовании материала 3, 4 и 5 пассажей.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пермиссивностью к вирусу АЧС обладают клетки мононуклеарного ряда и эндотелиоциты свиньи [12]. Однако тропизм могут иметь стромальные и клетки Лейдига тестикул свиньи [13]. В связи с этим увеличение титра вируса возможно благодаря расширению чувствительного компартмента (преимущественно, гистиоцитов, а также стромальных и клеток Лейдига) в гетерогенной клеточной популяции. Поскольку превалирующую часть культуры ТС занимают клетки сперматогенного эпителия, то необходима оптимизация условий культивирования, обеспечивающая снижение числа эпителиоподобных клеток, которые формируют конфлюэнтный монослой, и увеличение мононуклеарных [14]. Контактная

ингибция между эпителиальными и клетками другого ряда отрицательно влияет на накопление вируса. Предотвратить это явление можно благодаря сегрегации (фракционированию) клеточных субпопуляций методами селективной фильтрации/деградации или разделению временных интервалов роста клеток [15–16]. Крупным макрофагам требуется меньше времени для адгезии на субстрате, чем эпителиальным клеткам для образования конфлюэнтного монослоя [17]. Поскольку достижение 100 % конфлюэнтности в культуре ТС происходит на 3–4 сутки, а прикрепление макрофагов – через 6–20 часов после посева, то оптимальным временем заражения вирусом АЧС является 22–26 часов после начала культивирования ТС.

Оптимизация посевной концентрации клеток ТС для инфицирования вирусом АЧС

В качестве стандартных образцов вируса АЧС использовали вирусосодержащую суспензию референс-штамма Arm 07 в титре $6.0 \lg \text{ГАдЕ}_{50}/\text{см}^3$. Результаты приведены в таблице 1. Срок культивирования вируса – 96 ч, так как через 120 ч после инфицирования наблюдалась дезадгезия целевых клеток и значительная их ингибция конфлюэнтным монослоем эпителиоцитов.

Таблица 1. Результаты подбора посевной концентрации клеток ТС для увеличения титра вируса АЧС, $n=3$

Table 1. Results of selecting the seed concentration of ST cells to increase the ASFV titer, $n=3$

Посевная концентрация, клеток/ см^3 Inoculum concentration, cells/ cm^3	Титр вируса АЧС ($\lg \text{ГАдЕ}_{50}/\text{см}^3 \pm \text{SD}$)
	через 96 ч после заражения ASFV titer ($\lg \text{HAD}_{50}/\text{cm}^3 \pm \text{SD}$) 96 hours after infection
30 тыс./30k cells	$3,67 \pm 0,13$
50 тыс./50k cells	$4,54 \pm 0,13$
100 тыс./100k cells	$5,89 \pm 0,06$
200 тыс./200k cells	$5,68 \pm 0,13$
300 тыс./300k cells	$5,48 \pm 0,06$
400 тыс./400k cells	$6,33 \pm 0,06$
500 тыс./500k cells	$5,96 \pm 0,13$
600 тыс./600k cells	$5,87 \pm 0,21$
700 тыс./700k cells	$5,48 \pm 0,13$
800 тыс./800k cells	$5,76 \pm 0,06$

Из таблицы 1 следует, что при посевной концентрации клеток ТС 30–50 тыс./см³ происходило умеренно-низкое накопление вируса АЧС (от 3.67±0.13 до 4.54±0.13 lg ГАД_{Е50}/см³), при 100–300 тыс/см³ – стабильное накопление (от 5.89±0.06 до 5.48±0.06 ГАД_{Е50}/см³), а при 500–800 тыс/см³ характерен стационарный темп репродукции вируса (от 5.96±0.13 до 5.76±0.06 ГАД_{Е50}/см³). Оптимальной посевной концентрацией было 400 тыс/см³, при которой титр вируса АЧС несколько превосходил исходный (> 6.0 lg ГАД_{Е50}/см³) и

составил 6.33±0.06 lg ГАД_{Е50}/см³.

Определение аналитической специфичности

Разработанный метод выделения вируса АЧС показал достоверность и не демонстрировал ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Так, для оценки аналитической специфичности была выбрана панель образцов вирусосодержащего материала. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Аналитическая специфичность разрабатываемого метода, n=3

Table 2. Analytical specificity of the developed method, n=3

№ No.	Характеристика образца Sample Characteristics	Результат на наличие вируса АЧС Result for Presence of ASFV
1.	Вирус болезни Ауески, штамм «ВК» –ДЕП «VK»-DEP strain of pseudorabies virus	Отрицательный Negative
2.	Вирус классической чумы свиней, штамм «Ши-мынь» Classical swine fever virus, strain "Shimen"	Отрицательный Negative
3.	Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней, штамм «Иркутский 2007» Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain "Irkutsk 2007"	Отрицательный Negative
4.	Вирус АЧС, штамм «Мозамбик–78» V генотип ASFV, strain "Mozambique-78", genotype V	Положительный Positive
5.	Вирус АЧС, штамм «Arm 07» II генотипа ASFV, strain "Arm07", genotype II	Положительный Positive
6.	Вирус АЧС, штамм «Конго–49» I генотипа ASFV, strain "Congo-49", genotype I	Положительный Positive
7.	Вирус АЧС, штамм «Лиссабон–57» I генотипа ASFV, strain "Lisbon-57", genotype I	Положительный Positive
8.	Вирус АЧС, рекомбинантный штамм «ASFV/Primorsky-4560.Rec» I/II генотипов Recombinant ASFV strain "Primorsky 2023/DP-4560.Rec", genotypes I/II	Положительный Positive

Как показано в таблице 2, метод обладал специфичностью и позволил выявить гемадсорбирующие варианты вируса АЧС различных генотипов. В случае мониторинга циркуляции негемадсорбирующих вариантов в популяциях восприимчивых животных (диких кабанов и домашних свиней) рекомендована идентификация репродукции в ПЦР-РВ на 3–5 пассаже с определением динамики репликативной активности.

После проведения пяти пассажей исследуемых образцов суспензию культуры клеток исследовали в ПЦР-РВ. По результатам тестирования образцов геном вируса АЧС обнаруживали только в суспензии культуры клеток, где ранее наблюдали феномен гемадсорбции.

Определение сравнительной аналитической чувствительности первичных культур клеток ТС и СС к вирусу АЧС

Для этапа количественной оценки вирусосодержащего материала предпочтительно использование высокочувствительной биологической модели, способной поддерживать репродукцию вируса даже при небольшом числе его инфекционных частиц. С целью определения наличия потенциала культуры клеток ТС для титрования вируса АЧС проведена оценка аналитической чувствительности первичных культур

клеток ТС и СС (в качестве наиболее чувствительной) микрометодом в РГАД.

Готовили 8 последовательных 10-кратных разведений культуральной вирусосодержащей суспензии 4 изолятов вируса АЧС, выделенных на базе референтной лаборатории по АЧС. Заражение культур клеток ТС и СС выполняли из расчета 12 повторностей на 1 разведение. Учет реакции проводили ежедневно в реакции гемадсорбции (РГАД) методом регистрации специфического для вируса АЧС феномена под контролем световой инвертированной микроскопии. Окончательный результат детектировали на 120 ч после инфицирования (таблица 3). Титр вируса вычисляли по формуле Кербера в модификации Ашмарина.

Для всех изолятов титр вируса АЧС (4/4, 100 %), определенный в культуре клеток СС, превосходил показатели, полученные в культуре клеток ТС, что говорит о более низкой чувствительности последней. Дисперсия генеральной совокупности между титрами вируса АЧС в культурах клеток СС и ТС составила 0.23 lg ГАД_{Е50}/см³. Несмотря на незначительное расхождение, нельзя рекомендовать культуру клеток ТС для титрования вируса АЧС, так как для получения точных и достоверных результатов количественной оценки предпочтительнее использовать более чувствительные биологические модели.

Таблица 3. Результаты сравнительной аналитической чувствительности культур ТС и СС к изолятам вируса АЧС, n=3
Table 3. Results of comparative analytical sensitivity of ST and PS cultures to ASFV isolates, n=3

Изолят Isolate	Титр вируса АЧС (lg ГАД ₅₀ /см ³ ± SD) ASFV titer (lg HAD ₅₀ /cm ³ ± SD)	
	Результат на ТС Result on ST	Результат на СС Result on PS
ASFV/LNR/42–1	5.76 ± 0.13	6.0 ± 0.14
ASFV/DNR/894	5.0 ± 0.11	5.35 ± 0.10
ASFV/Chelyabynsk/4833	5.0 ± 0.17	5.33 ± 0.17
ASFV/Krasnodar/774–4	4.33 ± 0.33	5.0 ± 0.12

Определение диагностической чувствительности

Для определения диагностической чувствительности разрабатываемой методики проведены исследования 110 положительных на наличие вируса АЧС проб биологического материала от домашних свиней и диких кабанов (кровь, селезёнка, печень, лимфатические

узлы, костный мозг, мышечная ткань, лёгкие, продукция свиноводства: котлетное мясо). Образцы параллельно исследовали в культуре клеток СС (в качестве референтного метода). Результаты вирусовыделения представлены на рисунке 2.

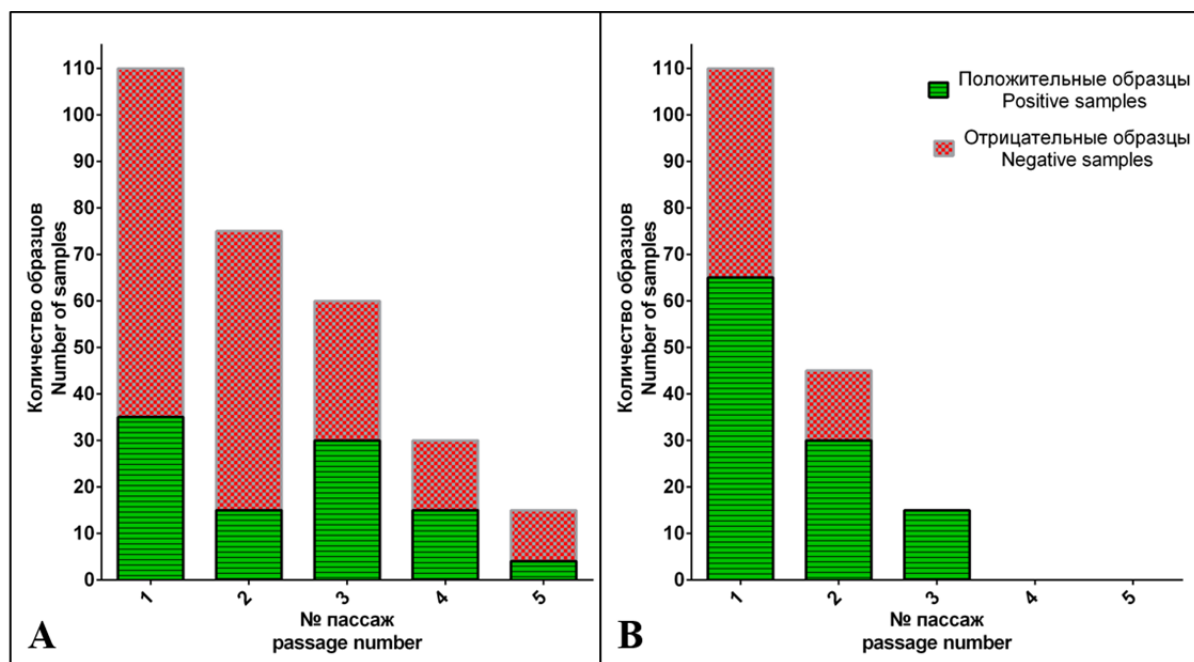


Рисунок 2. Диагностическая чувствительность выделения вируса АЧС в культуре клеток ТС из образцов биологического материала, n=110

A – выделение биологических образцов в культуре клеток ТС;

B – выделение биологических образцов в культуре клеток СС

Figure 2. Diagnostic sensitivity of ASFV isolation from biological material samples in ST cell culture, n=110

A – Isolation of biological samples using ST cells;

B – Isolation in PS cell cultures

При сравнительном анализе перmissивности первичных культур клеток установлено, что СС является более чувствительной биологической моделью для выделения вируса АЧС. Как показано на рисунке 1, для успешной изоляции вируса АЧС в культуре клеток ТС необходимо проводить пять пассажей, тогда как при аналогичном процессе вирусывыделения в СС – три пассажа. Диагностическая чувствительность метода выделения вируса АЧС в культуре клеток ТС составила 90.91 %, доля ложноотрицательных результатов – 9.09 %. Несмотря на это, показатель чувствительности > 80 % признается как удовлетворительный, что позволяет использовать систему культивирования ТС в диагностике АЧС и получении изолятов для научных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный метод выделения вируса АЧС в культуре клеток ТС обладает аналитической специфичностью, диагностической чувствительностью в 90.91 %. Однако данный метод не подходит для количественного анализа вследствие меньшей аналитической чувствительности по сравнению с титрованием вируса АЧС в культуре клеток СС.

В случае трудностей по получению культур клеток моноклеарного происхождения в выделении вируса из образцов биологического материала может использоваться культура клеток ТС. Данный вариант позволил расширить арсенал методов вирусологической диагностики АЧС, использовать в изоляции вируса АЧС альтернативную культуру клеток, отвечающую стандартам биоэтики неиспользования животных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Galindo I., Alonso C. African swine fever virus: A review // *Viruses* 2017. V. 9. 103 p.
- African Swine Fever (ASF) Situation Report 74. URL: <https://www.woah.org/app/uploads/2026/03/asf-report-74.pdf> (дата обращения: 16.02.2026)
- Costard S., Mur L., Lubroth J., Sanchez-Vizcaino J. M., Pfeiffer D. U. Epidemiology of African swine fever virus // *Virus Res.* 2013. V. 173. N 1. P. 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.030>
- Dixon L.K., Sun H., Roberts H. African swine fever // *Antivir Res.* 2019. V. 165. P. 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.018>
- Eustace M.R. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony) // *J. Comp Pathol Ther.* 1921. V. 34. P. 159–191. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(21\)80031-4](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(21)80031-4)
- Beltrán-Alcrudo D., Lubroth J., Depner K., Rocque S. African swine fever in the Caucasus // *EMPRES Watch*. 2008. V. 1. P. 1–8. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3579.1200>
- Шотин А.Р., Иголкин А.С., Мазлум А., Шевченко И.В., Бардина Н.С., Морозова Е.О., Шевцов А.А. Африканская чума свиней в Приморском крае: эпизоотическая ситуация и молекулярно-биологические свойства изолята, выделенного из трубчатой кости от дикого кабана // *Ветеринария сегодня*. 2022. Т. 11. N 4. С. 347–358. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-347-358>
- Netherton C.L., Goatley L.C., Reis A.L., Portugal R., Nash R.H., Morgan S.B., Gault L., Nieto R., Norlin V., Gallardo C., Ho C.S., Sánchez-Cordón P.J., Taylor G., Dixon L.K. Identification and immunogenicity of african swine fever virus antigens // *Front. Immunol.* 2019. V.10. Article number: 1318. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01318>
- Шарыпова Д.В., Жуков И.Ю., Власова Н.Н., Пузанкова О.С., Гаврилова В.Л., Иголкин А.С., Коропова Н.Н., Жбанова Т.В. Сравнительный анализ репродукционных свойств вируса африканской чумы свиней изолята Одинцово 02/14 в первичных культурах клеток // *Ветеринария сегодня*. 2017. Т. 20. N 1. С. 5–9.
- Takenouchi T., Masujin K., Suzuki S., Haraguchi S., Hiramatsu K., Kokuho T., Uenishi H. Establishment and characterization of the immortalized porcine lung-derived mononuclear phagocyte cell line // *Front Vet Sci.* 2022. V. 9. Article number: 1058124. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1058124>
- Мазлум А., Шарыпова Д.В., Гаврилова В.Л., Пузанкова О.С., Жуков И.Ю., Аронова Е.В., Власова Н.Н., Иголкин А.С. Выделение и титрование вируса Африканской чумы свиней в культуре клеток селезенки свиньи: метод. рекомендации. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2019. 24 с.
- Wilkinson P.J., Lawman M.J., Johnston R.S. African swine fever in Malta, 1978 // *Vet Rec.* 1980. V. 106. N 5. P. 94–97. <https://doi.org/10.1136/vr.106.5.94>
- Roszyk H., Franzke K., Breithaupt A., Deutschmann P., Pikalo J., Carrau T., Blome S., Sehl-Ewert J. The Role of Male Reproductive Organs in the Transmission of African Swine Fever-Implications for Transmission // *Viruses*. 2021. V. 14. N 1. <https://doi.org/10.3390/v14010031>
- Perrard-Sapori M.H., Chatelain P.C., Rogemond N., Saez J.M. Modulation of Leydig cell functions by culture with Sertoli cells or with Sertoli cell-conditioned medium: effect of insulin, somatomedin-C and FSH // *Mol Cell Endocrinol.* 1987. V. 50. P. 193–201. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(87\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0303-7207(87)90017-7)
- Bernier M., Gibb W., Haour F., Collu R., Saez J.M., Ducharme J.R. Studies with purified immature porcine Leydig cells in primary culture // *Biol Reprod.* 1983. V. 29. N 5. P. 1172–1178. <https://doi.org/10.1095/biolreprod29.5.1172>
- Renier G., Gaulin J., Gibb W., Simard P., Leung T.K., Collu R., Ducharme J.R. Isolation, purification and culture of Sertoli cells from immature piglet testes // *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1986. V. 111. N 1. P. 411–418. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1110411>
- Dores C., Rancourt D., Dobrinski I. Stirred suspension bioreactors as a novel method to enrich germ cells from pre-pubertal pig testis // *Andrology*. 2015. V. 3. N 3. P. 590–597. <https://doi.org/10.1111/andr.12031>

REFERENCES

- Galindo I., Alonso C. African swine fever virus: A review. *Viruses*. 2017, vol. 9, 103 p.
- African Swine Fever (ASF) Situation Report 74. Available at: <https://www.woah.org/app/uploads/2026/03/asf-report-74.pdf> (accessed: 16.02.2026)
- Costard S., Mur L., Lubroth J., Sanchez-Vizcaino J. M., Pfeiffer D. U. Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res.*, 2013, vol. 173, no. 1, pp. 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.030>
- Dixon L.K., Sun H., Roberts H. African swine fever. *Antivir Res.*, 2019, vol. 165, pp. 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.018>
- Eustace M.R. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp Pathol Ther.*, 1921, vol. 34, pp. 159–191. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(21\)80031-4](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(21)80031-4)
- Beltrán-Alcrudo D., Lubroth J., Depner K., Rocque S. African swine fever in the Caucasus. *EMPRES Watch*, 2008, vol. 1, pp. 1–8. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3579.1200>
- Shotin A.R., Igolkin A.S., Mazloun A., Shevchenko I.V., Bardina N.S., Morozova E.O., Shevtsov A.A. African swine fever in the Primorsky Krai: disease situation and molecular and biological properties of the isolate recovered from a wild boar long bone. *Veterinary Science Today*, 2022, vol. 11, no. 4, pp. 347–358. (In Russian) <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-347-358>
- Netherton C.L., Goatley L.C., Reis A.L., Portugal R., Nash R.H., Morgan S.B., Gault L., Nieto R., Norlin V., Gallardo C., Ho C.S., Sánchez-Cordón P.J., Taylor G., Dixon L.K. Identification and immunogenicity of african swine fever virus antigens. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10, article number: 1318. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01318>
- Sharypova D.V., Zhukov I.Yu., Vlasova N.N., Puzankova O.S., Gavrilova V.L., Igolkin A.S., Koropova N.N., Zhanova T.V. Comparative analysis of the reproductive properties of the African swine fever virus isolate Odintsovo 02/14 in primary cell cultures. *Veterinariya segodnya [Veterinary Science Today]*. 2017, vol. 20, no. 1, pp. 5–9. (In Russian)
- Takenouchi T., Masujin K., Suzuki S., Haraguchi S., Hiramatsu K., Kokuho T., Uenishi H. Establishment and characterization of the immortalized porcine lung-derived mononuclear phagocyte cell line. *Front Vet Sci.*, 2022, vol. 9, article number: 1058124. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1058124>
- Mazlum A., Sharypova D.V., Gavrilova V.L., Puzankova O.S., Zhukov I.Yu., Aronova E.V., Vlasova N.N., Igolkin A.S. *Vydelenie i titrovaniye virusa Afrikanской chumy svinei v kul'ture kletok selezenki svini: metod. rekomendatsii* [Isolation and titration of African swine fever virus in pig spleen cell culture: Methodological recommendations]. Vladimir, FGBI «ARRIAH», 2019, pp. 24. (In Russian)
- Wilkinson P.J., Lawman M.J., Johnston R.S. African swine fever in Malta, 1978. *Vet Rec.* 1980, vol. 106, no. 5, pp. 94–97. <https://doi.org/10.1136/vr.106.5.94>
- Roszyk H., Franzke K., Breithaupt A., Deutschmann P., Pikalo J., Carrau T., Blome S., Sehl-Ewert J. The Role of Male Reproductive Organs in the Transmission of African Swine Fever-Implications for Transmission. *Viruses*, 2021, vol. 14, no. 1. <https://doi.org/10.3390/v14010031>
- Perrard-Sapori M.H., Chatelain P.C., Rogemond N., Saez J.M. Modulation of Leydig cell functions by culture with Sertoli cells or with Sertoli cell-conditioned medium: effect of insulin, somatomedin-C and FSH. *Mol Cell Endocrinol.*, 1987, vol. 50, pp. 193–201. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(87\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0303-7207(87)90017-7)
- Bernier M., Gibb W., Haour F., Collu R., Saez J.M., Ducharme J.R. Studies with purified immature porcine Leydig cells in primary culture. *Biol Reprod.*, 1983, vol. 29, no. 5, pp. 1172–1178. <https://doi.org/10.1095/biolreprod29.5.1172>
- Renier G., Gaulin J., Gibb W., Simard P., Leung T.K., Collu R., Ducharme J.R. Isolation, purification and culture of Sertoli cells from immature piglet testes. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1986, vol. 111, no. 1, pp. 411–418. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1110411>
- Dores C., Rancourt D., Dobrinski I. Stirred suspension bioreactors as a novel method to enrich germ cells from pre-pubertal pig testis. *Andrology*, 2015, vol. 3, no. 3, pp. 590–597. <https://doi.org/10.1111/andr.12031>

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Ольга С. Пузанкова и Вера Л. Гаврилова получали первично-трипсинизированную культуру клеток тестикул свиней. Данила С. Моисеенко и Роман С. Чернышев оптимизировали посевную концентрацию. Роман С. Чернышев определял способность к репродукции вируса АЧС в культуре клеток ТС. Данила С. Моисеенко, Роман С. Чернышев и Алексей С. Иголкин проанализировали данные, написали рукопись. Все авторы в равной степени несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Olga S. Puzankova and Vera L. Gavrilova obtained primary trypsinized culture of pig testicle cells. Danila S. Moiseenko and Roman S. Chernyshev optimised the seeding concentration. Roman S. Chernyshev determined the ability of ASFV to reproduce in ST cell culture. Danila S. Moiseenko, Roman S. Chernyshev and Alexey S. Igolkin analysed the data and wrote the manuscript. All authors are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism and other ethical transgressions.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Данила С. Моисеенко / Danila S. Moiseenko <https://orcid.org/0009-0003-4465-0179>

Роман С. Чернышев / Roman S. Chernyshev <https://orcid.org/0000-0003-3604-7161>

Ольга С. Пузанкова / Olga S. Puzankova <https://orcid.org/0000-0003-1584-3169>

Вера Л. Гаврилова / Vera L. Gavrilova <https://orcid.org/0000-0001-5843-2779>

Алексей С. Иголкин / Alexey S. Igolkin <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>