

онную активность в течение 2 мес, а иммуногенную – в течение 4 мес. Температура -20°C обеспечивала сохранность вируса без снижения инфекционной и иммуногенной активности в течение 6 мес. Вирус, хранившийся при -50°C в течение 1 и 2 лет, не изменял инфекционных, иммуногенных и протективных свойств.

Полученные данные могут быть использованы при разработке вакцинных и диагностических препаратов из штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР, а также в процессе их производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балышев В.М., Жуков А.Н., Грачев Д.В., Саттаров И.Т., Болгова М.В. *Аттенуированный штамм вируса оспы коз. Патент РФ № 2325437*, 1996.
2. Колян Ф.И. *Разработка и совершенствование технологии изготовления инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота*: Дисс. ... д-ра вет. наук. Покров; 1998.
3. Колян Ф.И. *Моделирование иммунного ответа и анализ факторов эпизоотического процесса*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Щелково; 2012.
4. Румянцева Е.А., Балышев В.М., Жуков А.Н., Ногина И.В., Сафонов Г.А. *Аттенуированный штамм вируса болезни Найроби. Патент РФ № 2348692*, 2006.
5. Сергеев В.А. *Культивирование и репродукция вирусов животных*. М.: Колос; 1976.

6. Pepin M., Bouloy M., Bird B.H., Kemp A., Paweska J. Rift Valley fever virus (Bunyavi ridae : Plebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet. Res.* 2010; 41(6): 61.

REFERENCES

1. Balyshev V.M., Zhukov A.N., Grachev D.V., Sattarov I.T., Bolgova M.V. *The attenuated virus strain Goatpox. Patent RF N 2325437*, 1996. (in Russian)
2. Zakutskiy N.I. *Development and improvement of technology for production of inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis*: Diss. Pokrov; 1998. (in Russian)
3. Kolyan F.I. *Modeling and analysis of immune response factors epizootic process*. Diss. Shchelkovo; 2012. (in Russian)
4. Rumyantseva E.A., Balyshev V.M., Zhukov A.N., Nogina I.V., Safonov G.A. *Attenuating disease virus strain Nairobi; Patent RF N 2348692*, 2006. (in Russian)
5. Sergeev V.A. *Cultivation and reproduction of animal viruses [Kul'tivirovanie i reproduktiya virusov zhivotnykh]*. M.: Kolos; 1976. (in Russian)
6. Pepin M., Bouloy M., Bird B.H., Kemp A., Paweska J. Rift Valley fever virus (Bunyavi ridae : Plebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet. Res.* 2010; 41 (6): 61.

Поступила 19.02.14

Received 19.02.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 578.842.083.2

Балышева В.И.¹, Прудникова Е.Ю.¹, Гальбек Т.В.², Балышев В.М.¹

Перевиваемая сублиния клеток A₄C₂/9K и ее использование в исследованиях с вирусом африканской чумы свиней

¹ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» Россельхозакадемии, 601120, г. Покров; ²ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии» Россельхозакадемии, 109428, г. Москва

Получена новая высокочувствительная к вирусу африканской чумы свиней (АЧС) перевиваемая сублиния клеток A₄C₂/9K. Все испытуемые штаммы этого вируса, выделенные в Российской Федерации в 2008 – 2013 гг., размножались в этой культуре клеток с проявлением гемадсорбции (Гад) и накапливались в титре до 6,5 lg ГАЕ₅₀/см³. Культуру клеток A₄C₂/9K можно применять для выделения, определения инфекционной активности и серотиповой принадлежности вируса АЧС. Культуральные варианты штамма Ставрополь 01/08 вируса АЧС 24-го и 33-го пассажей в культуре клеток A₄C₂/9K утратили патогенность для свиней.

Ключевые слова: африканская чума свиней; вирус; культура клеток; гемадсорбция; антитела; вирулентность; иммуногенность.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 43–47.

Balysheva V.I.¹, Prudnikova E.Yu.¹, Galnbek T.V.², Balyshev V.M.¹

Continuous cell subline A₄C₂/9K and its application to the african swine fever virus study

¹ National Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology of Russia, Russian Academy of Agricultural Sciences, 601120, Pokrov, Russia; ² All-Russia Scientific Research Institute for Experimental Veterinary Medicine, 109428, Moscow, Russia

A new continuous cell subline A₄C₂/9K highly sensitive to the african swine fever virus (ASFV) was prepared. All the tested ASFV strains isolated in the Russian Federation in 2008-2013 proliferated in this cell culture exhibiting hemadsorption and accumulated at a titer of up to 6.5 lg HAU₅₀/cm³. The cell culture A₄C₂/9K can be used for ASFV isolation or determination of its infectious activity and serotype identity. The culture versions of the ASFV strain Stavropol 01/08 at passages 24 and 33 in the cell culture A₄C₂/9K lost their pathogenicity for pigs.

Key words: african swine fever; virus; cell culture; hemadsorption; antibody; virulence; immunogenicity.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 43–47. (In Russ.)

For correspondence: Vera Balysheva, MD, PhD, ScD, Prof.; e-mail: balyvi@rambler.ru

Для корреспонденции: Балышева Вера Ивановна, д-р биол. наук, проф.; e-mail: balyvi@rambler.ru

Африканская чума свиней (АЧС) является одной из наиболее опасных и трудно контролируемых болезней свиней. Заболевание наносит свиноводству огромный экономический ущерб, связанный с убоем всех животных в эпизоотическом очаге и первой угрожаемой зоне, проведением жестких ветеринарно-санитарных и карантинных мероприятий, ограничивающих производственные связи хозяйств [1].

Особенно острой проблема АЧС для России стала в 2007 г. после заноса болезни из Грузии в Чеченскую Республику, а оттуда и в другие регионы страны [2]. По данным Россельхознадзора, в 2013 г. зарегистрировано 199 вспышек АЧС в 15 субъектах Центрального, Северо-Западного, Южного, Северо-Кавказского и Приволжского федеральных округов (ФО) [3] Российской Федерации.

В связи с особенностями биологических свойств возбудителя средства специфической профилактики АЧС не разработаны, поэтому быстрая лабораторная диагностика имеет решающее значение в борьбе с болезнью. Выделение вируса АЧС из образцов патматериала проводят в культурах клеток костного мозга свиней (КМС) и лейкоцитов свиней (ЛС), в которых вирус размножается с проявлением гемадсорбции (ГАд), характеризующейся образованием вокруг инфицированных клеток короны красного цвета из эритроцитов свиней [4, 5]. Однако жизнеспособность таких культур клеток зависит от свиней-доноров, что затрудняет стандартизацию получаемого сырья.

Перспективными для культивирования вируса АЧС являются перевиваемые линии клеток, обеспечивающие получение однородного вирусосодержащего материала в больших объемах, который применяется при изучении биологических, молекулярно-генетических свойств вируса, а также используется в качестве лабораторной модели для исследования эволюции вируса АЧС [6–10].

Однако вирус АЧС размножается в перевиваемых культурах клеток только после адаптации без проявления ГАд, что не позволяет использовать их при проведении рутинных вирусологических и диагностических исследований.

В связи с изложенным целью наших исследований было получение новой высокочувствительной к вирусу АЧС перевиваемой культуры клеток и определение области ее применения при работе с этим возбудителем.

В качестве исходной культуры клеток использовали перевиваемую гибридную линию клеток СПЭВ ТК со спленоцитами свиньи (A_4C_2), полученную в 1996 г. в ГНУ ВИЭВ РАСХН (Москва) Л.П. Дьяконовым с соавт. [11]. Как показали наши исследования, после предварительной адаптации вирус АЧС размножается в этой культуре клеток с проявлением специфической ГАд [12].

Материалы и методы

Вирусы. Использовали эпизоотические штаммы вируса АЧС в виде вирусосодержащей крови Ставрополь 01/08, Североморск 01/11, Волгоград-Калач 2012, Тверь-Завидово 2012, Ярославль 2013, Родезия серотипа 8; Лиссабон-57 (Л-57) – серотипа 1; Конго-49 (К-49), МНИ серотипа 2; культуральный аттенуированный штамм ФК-135 – серотипа 4. Инфекционная активность полученных из музея микроорганизмов штаммов вируса АЧС составляла $6,0 - 7,5 \lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$.

Культура клеток. Первичные культуры клеток КМС и ЛС, выращенные на пластиковых культуральных флаконах и планшетах, получали в Лаборатории биотехнологии ВНИИВВиМ.

Гибридную линию A_4C_2 получали из коллекции культур клеток ГНУ ВИЭВ РАСХН.

Животные. Клинически здоровых подсвинков крупной белой породы и породы мини-пиги 2,5–4-месячного возраста получали из Сектора подготовки подопытных животных ВНИИВВиМ. Свиней кормили и содержали в соответствии с существующими требованиями.

Среды и сыворотки. Использовали среду Игла (MEM), фетальную сыворотку крупного рогатого скота (КРС) фирм «Sigma» (США) и «Hy Clone» (США), сыворотки крови КРС и свиней фирмы «Биолот».

Инфекционный титр вируса АЧС определяли общепринятым методом в культуре клеток КМС и ЛС. Результаты титрования оценивали по феномену ГАд и выражали в $\lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$.

Вирус АЧС культивировали в односуточной культуре клеток $A_4C_2/9к$, выращенной в среде Игла MEM с 10% сыворотки крови свиньи. Перед заражением из культуральных сосудов удаляли ростовую среду и вносили вирус с множественностью заражения $0,1 \text{ГAE}_{50}/\text{кл}$. Адсорбцию вируса проводили при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 60 мин. Затем в культуральные сосуды вносили поддерживающую среду Игла MEM с 2% сыворотки крови свиньи. Инфицированную культуру клеток инкубировали при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 6–8 сут.

Типовую принадлежность вируса АЧС определяли в реакции задержки гемадсорбции (РЗГАд) согласно Методическим положениям по типизации вируса африканской чумы свиней в реакции задержки гемадсорбции [13].

Патогенность испытуемых материалов определяли на подсвинках, которых внутримышечно инфицировали культуральным вирусом в дозе $4,5 - 6,0 \lg \text{ГAE}_{50}$.

Иммуногенные свойства аттенуированных вариантов вируса АЧС изучали на подсвинках, иммунизированных культуральным вирусом двукратно с интервалом 14 сут. На 28–30-е сутки после первого введения животных заражали вирулентным штаммом Ставрополь 01/08 в дозе 100ЛД_{50} . За животными вели клиническое наблюдение с ежедневной термометрией.

Накопление вирусспецифических антигенов и антител у иммунизированных подсвинков определяли в реакциях прямой и непрямой иммунофлюоресценции и путем твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА) согласно ГОСТу 28573–90 [5].

Результаты и обсуждение

Как было показано нами ранее, штамм Ставрополь 01/08 вируса АЧС на уровне 12–14 пассажей был адаптирован к перевиваемым культурам клеток A_4C_2 , ПСГК-60, ППК-666 и CV-1. Максимальное накопление вируса наблюдалось в культурах клеток A_4C_2 и ПСГК-60 и составляло $4,75 - 5,25 \lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$. При культивировании вируса АЧС в культуре клеток A_4C_2 с 0,5% взвеси эритроцитов свиньи в цельных материалах наблюдали специфическую ГАд. В то же время в других перевиваемых культурах клеток при аналогичных условиях культивирования ГАд не обнаруживали [12].

В связи с этим были проведены исследования, посвященные направленной модификации культуры клеток A_4C_2 с целью повышения ее продуктивности в отношении вируса АЧС. В морфологических исследованиях было установлено, что перевиваемая культура клеток A_4C_2 состоит из двух видов клеток – эпителиоподобных и лимфоцитоподобных, которые содержатся в монослое примерно в равных количествах. Однако при проведении последовательных пассажей в монослое начинали преобладать эпителиоподобные клетки, тогда как лимфоцитоподобные клетки, в которых вирус АЧС репродуцировался с проявлением специфической

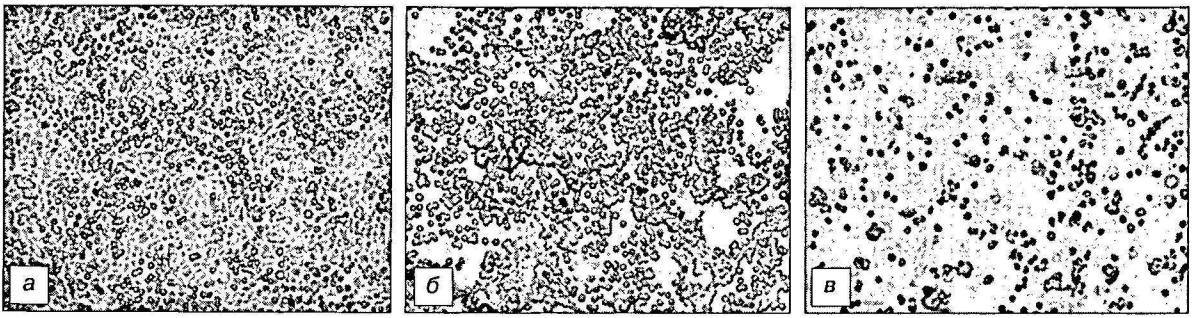


Рис. 1. Цитопатогенное действие штамма Ставрополь 01/08 вируса АЧС в перевиваемой сублинии клеток $A_4C_2/9k$. а – контрольная культура клеток; б – инфицированная культура клеток, 3-й день после заражения; в – инфицированная культура клеток, 7-й день после заражения. Световая микроскопия. Ув. 100.

ГАд, накапливались преимущественно в культуральной жидкости.

При проведении селективных пассажей перевиваемую культуру клеток A_4C_2 адаптировали к росту в питательной среде с сывороткой крови свиньи. Учитывая способность лимфоцитоподобных клеток переходить в процессе культивирования в суспензию по мере зарастания монослоя, их количество в популяции увеличивали путем осаждения центрифугированием. Концентрацию клеток доводили до посадочной 80–100 тыс. кл/см³ и культивировали в течение 7 последовательных пассажей в питательной среде Игла MEM с 10% фетальной сыворотки КРС. В результате количество лимфоцитоподобных клеток в монослое увеличивалось до 75–85% по сравнению с исходной популяцией. Затем в течение 10 последовательных пассажей проводили адаптацию культуры клеток A_4C_2 к выращиванию со свиной сывороткой. С этой целью в ростовую среду вносили свиную сыворотку, постепенно увеличивая ее содержание с 1 до 10%, т. е. до полной замены фетальной сыворотки КРС. С 9-го пассажа культура клеток A_4C_2 размножалась в среде Игла MEM с сывороткой крови свиньи.

В течение 15 последовательных пассажей (срок наблюдения) культура клеток сохраняла свои основные цитоморфологические свойства. Клетки при пересеве с коэффициентами 1:3–1:5 формировали на 2–3-и сутки монослой, который сохранялся в течение 10–14 сут. Полученная сублиния перевиваемой культуры клеток депонирована в коллекции клеточных культур ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии за № 87 с названием $A_4C_2/9k$.

Штамм Ставрополь 01/08 вируса АЧС без предварительной адаптации размножался в культуре клеток $A_4C_2/9k$ с проявлением цитопатогенного действия, которое характеризовалось отслоением клеток от субстрата и образованием «кокон» в монослое. Максимальные деструктивные изменения наблюдали через 6–7 сут после

заражения, при этом титр вируса составлял $6,50 \pm 0,22 \lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$ (рис. 1).

При внесении в культуральную среду 0,5% взвеси эритроцитов свиней в сублинии клеток $A_4C_2/9k$ через 24–48 часов на поверхности инфицированных клеток наблюдали ГАД, которая характеризовалась многослойным прикреплением к ним эритроцитов свиней (рис. 2).

Представлялось целесообразным изучить чувствительность перевиваемой сублинии клеток $A_4C_2/9k$ к другим штаммам вируса АЧС, а также возможность ее использования для определения инфекционной активности вируса.

С этой целью перевиваемую сублинию культуры клеток $A_4C_2/9k$ инфицировали вирусосодержащей кровью, а также 20 % суспензией селезенки, печени и смеси лимфатических узлов (подчелюстных, желудочных, порталных, мезентериальных), полученными от свиней, зараженных штаммами Североморск 2010, Волгоград-Калач 2012, Тверь-Завидово 2012, Ярославль 2013 вируса АЧС, выделенными в различных регионах РФ. Инфицирование культуры клеток проводили с адсорбцией вируса на клетках в течение 60 мин при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

В культуре клеток $A_4C_2/9k$, инфицированной вирусосодержащей кровью и суспензией органов и тканей, через 24–72 ч наблюдали специфическую ГАД на инфицированных клетках. Аналогично этому ГАД наблюдали и в культуре клеток ЛС, использованной в качестве контроля.

Эти данные указывают на то, что все испытуемые штаммы вируса АЧС, выделенные в РФ в 2008–2013 гг., размножались в перевиваемой сублинии культуры клеток $A_4C_2/9k$ без предварительной адаптации с проявлением специфической ГАД.

Сравнительное титрование вируса АЧС в виде вирусосодержащей крови (штаммы Ставрополь 01/08, Североморск 2010, Волгоград-Калач 2012, Тверь-Завидово

2012, а также Конго-49 и ФК-135 в перевиваемой сублинии клеток $A_4C_2/9k$ и первичной культуре клеток КМС показало, что титр вируса АЧС, определяемый в сублинии клеток $A_4C_2/9k$, составлял $5,0–6,5 \lg \text{ГAE}_{50}/\text{см}^3$. Это на $0,75–1,25 \lg$ было ниже, чем в культуре клеток КМС. Результаты опыта представлены в табл. 1.

Коэффициент корреляции титра вируса АЧС, определяемого в перевиваемой сублинии клеток $A_4C_2/9k$ и культуре клеток КМС составлял 0,93.

Для определения типовой при-

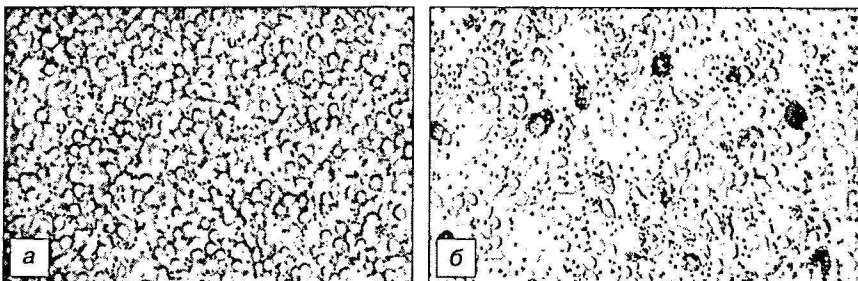


Рис. 2. Реакция ГАД в перевиваемой сублинии клеток $A_4C_2/9k$. а – контрольная культура клеток; б – инфицированная культура клеток. Световая микроскопия. Ув. 200.

Таблица 1

Результаты определения инфекционной активности вируса АЧС в вирусосодержащей крови в культурах клеток $A_4C_2/9k$ и КМС ($n = 3-5$)

Штаммы вируса АЧС	$A_4C_2/9k$		КМС	
	наличие ГАД	титр вируса, $Ig\text{ ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$	наличие ГАД	титр вируса, $Ig\text{ ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$
Ставрополь 01/08	+	$6,0 \pm 0,19$	+	$7,2 \pm 0,17$
Североморск 2010	+	$6,5 \pm 0,17$	+	$7,7 \pm 0,19$
Волгоград-Калач 2012	+	$5,0 \pm 0,14$	+	$6,0 \pm 0,22$
Тверь-Завидово 2012	+	$5,2 \pm 0,12$	+	$6,4 \pm 0,12$
Конго-49	+	$6,0 \pm 0,21$	+	$7,0 \pm 0,19$
ФК-135	+	$6,0 \pm 0,24$	+	$7,25 \pm 0,28$

надлежасти гемадсорбирующих штаммов вируса АЧС применяют РЗГАд. Она основана на торможении феномена ГАД, индуцированной вирусом АЧС в культуре клеток ЛС или КМС гомологичной типовой гипериммунной сывороткой. Получение таких культур от свиней трудоемко и связано с убоем доноров костномозговой ткани. Поэтому нами была изучена возможность использования с этой целью перевиваемой сублинии клеток $A_4C_2/9k$. При постановке реакции использовали специфические РЗГАд-сыворотки серотипов 1, 2, 3, 4 и 8, которые получали из коллекции микроорганизмов института. Результаты опытов приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, штаммы Ставрополь 01/08, Волгоград-Калач 2012, Тверь-Завидово 2012, Родезия по результатам РЗГАд относятся к серотипу 8, а штаммы Л-57, МНИ и ФК-135 – к серотипам 1, 2 и 4 соответственно. Аналогичные результаты получены при постановке РЗГАд в культуре клеток КМС. Эти данные подтверждают, что циркулирующий в РФ вирус АЧС относится к серотипу 8.

На следующем этапе исследований была изучена патогенность культуральных вариантов штамма Ставрополь 01/08 вируса АЧС различных пассажных уровней в культуре клеток $A_4C_2/9k$. Культуральный вариант штамма Ставрополь 01/08 14-го пассажа сохранял вирулентные свойства. Инфицированные этим материалом подсывинки погибали от АЧС с признаками острой формы болезни. При патолого-анатомическом вскрытии у них наблюда-

Таблица 2

Определение типовой принадлежности вируса АЧС в РЗГАд в культуре клеток $A_4C_2/9k$

Штамм вируса АЧС	Контроль вируса	Типовые референс-сыворотки серотипов					Серотип вируса
		1	2	3	4	8	
Ставрополь 01/08	+	+	+	+	+	-	8
Волгоград-Калач 2012	+	+	+	+	+	-	8
Тверь-Завидово 2012	+	+	+	+	+	-	8
Родезия	+	+	+	+	+	-	8
Л-57	+	-	+	+	+	+	1
МНИ	+	+	-	+	+	+	2
ФК-135	+	+	+	+	-	+	4

Примечание. «+» – наличие ГАД; «-» – отсутствие ГАД.

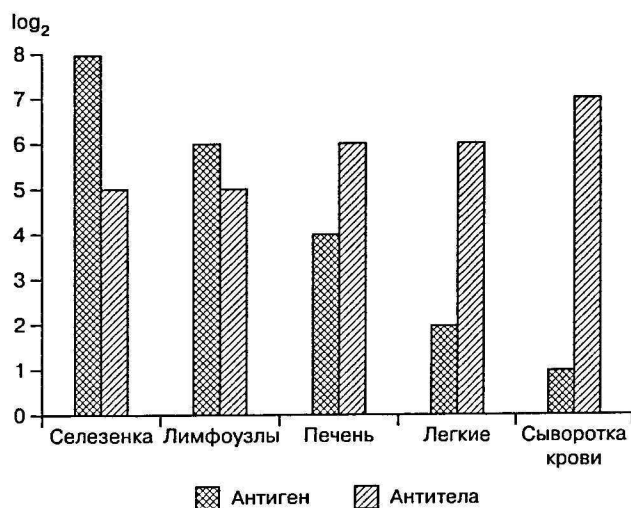


Рис. 3. Накопление антител и антигена вируса АЧС и антител к нему в органах подсывинки, инфицированной культуральным штаммом Ставрополь 01/08 33-го пассажа в сублинии клеток $A_4C_2/9k$.

ли геморрагический синдром в органах и тканях, отек легких, гиперплазию селезенки и лимфатических узлов. Накопление вируса в крови павших животных составляло $7,0-7,5\text{ Ig ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$.

Культуральные варианты 24-го и 33-го пассажей утратили патогенность для свиней: у инфицированных подсывинков отмечали только повышение температуры тела до $40,5-40,7^\circ\text{C}$ в течение 3–6 сут. В пробах крови, полученных от этих животных, вирус АЧС выявляли в культуре клеток $A_4C_2/9k$ в низких титрах – до $2,5\text{ Ig ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$.

На 28-е сутки один из трех подсывинков иммунизированных культуральным вариантом штамма Ставрополь 01/08 33-го пассажа в культуре клеток $A_4C_2/9k$, был обескровлен. Патологоанатомических изменений, характерных для АЧС, у него не обнаружено. Однако в легких наблюдали единичные очаговые кровоизлияния.

Методом ТФ ИФА установлено, что наиболее высокое накопление специфических антигенов вируса АЧС выявлено в селезенке (1:256) и низкое – в легких (1:4) (рис. 3). В реакции прямой иммунофлюоресценции антигены вируса АЧС обнаруживали только в лимфатических узлах.

Накопление вирусспецифических антител в сыворотке крови, суспензиях селезенки, печени, легких, лимфатических узлов в реакции непрямой иммунофлюоресценции составляло 1:32–1:64.

Двукратная иммунизация подсывинков аттенуированными вариантами вируса 24-го и 33-го пассажей в перевиваемой сублинии клеток $A_4C_2/9k$ не защищала их от контрольного заражения вирулентным вирусом АЧС штамма Ставрополь 01/08 в дозе $3,0\text{ Ig ЛД}_{50}$. Привитые животные погибали от АЧС с признаками острой формы болезни.

Заключение

Установлена высокая чувствительность перевиваемой сублинии клеток $A_4C_2/9k$ к вирусу АЧС, в которой он размножается с проявлением специфической ГАД и накапливается до $6,5\text{ Ig ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$.

Перевиваемую сублинию клеток $A_4C_2/9k$ можно использовать для выделения, определения инфекционной активности и серотиповой принадлежности вируса АЧС, а также получения аттенуированных вариантов вируса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Инструкция о мероприятиях по предупреждению и ликвидации африканской чумы свиней. М.; 1980.
2. Куриннов В.В., Колбасов Д.В., Цыбанов С.Ж., Васильев А.П., Шендрик А.Г., Балышев В.М. и др. Африканская чума свиней – главная проблема для свиноводства России. *Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие*. 2010; 3: 8–7.
3. Эпизоотическая ситуация по АЧС на территории Российской Федерации в 2013 г. Официальный сайт Россельхознадзора: 2013. Available at: <http://www.fsvps.ru/news/7210.html>.
4. Коваленко Я.Р. *Африканская чума свиней*. М.: Колос; 1972.
5. *ГОСТ 28573–90. Методы лабораторной диагностики африканской чумы свиней*. М.; 1990.
6. Селянинов Ю.О., Балышев В.М., Цыбанов С.Ж. Вирус африканской чумы свиней: физическое картирование генома штаммов. *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2000; 5: 75–6.
7. Almendral J.M., Blasco R., Ley V., Beloso A., Talaver A., Vinuela E. Restriction site map of African swine fever virus DNA. *Virology*. 1984; 133: 258–70.
8. Carrascosa A.L., Bustos M.J., de Leon P. Methods for Growing and Titrating African Swine Fever Virus: Field and Laboratory Samples. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2011; 53: 26.14.1–26.14.25.
9. Carrascosa A.L., Bustos M.J., Nogal M.L., Gonzalez de Buitrago G., Revilla Y. Apoptosis induced in an early step of African swine virus entry into Vero cell does not require virus replication. *Virology*. 2002; 294: 372–82.
10. Tabares E., Olivares I., Santurde C., Garcia M.J., Martine E., Camero M.E. African swine fever virus DNA: deletion and addition during adaptation to growth in monkey kidney cells. *Arch. Virol.* 1987; 97: 333–46.
11. Дьяконов Л.П., Гальнбек Т.В., Щекалова И.В. Внутривидовая гибридная культура клеток СПЭВ ТК×лимфоциты свиньи. *Сельскохозяйственная биология*. 1996; 2: 25–30.
12. Прудникова Е.Ю., Балышев В.М., Юрков С.Г., Гальнбек Т.В., Балышева В.И. Адаптация вируса африканской чумы свиней к перевиваемым культурам клеток. *Научный журнал КубГАУ Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского аграрного университета*. 2012; 80 (06). Available at: <http://ej.kubagro.ru/2012/06/pdf/32.pdf>.
13. Балышев В.М., Болгова М.В., Черятников Л.Л., Калантаенко Ю.Ф., Юрков С.Г. *Методические положения по типизации вируса африканской чумы свиней в реакции задержки гемадсорбции*. ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. Покров, 2010.
2. Kurinnov V.V., Kolbasov D.V., Tsybanov S.Zh., Vasilyev A.P., Shendrik A.G., Balyshv V.M. et al. African swine fever – a major problem for pig production of Russia. *Zhizn' bez opasnostey. Zdorov'e. Profilaktika. Dolgoletie*. 2010; 3: 82–7. (in Russian)
3. Epidemiological situation on ASF in the Russian Federation in 2013. Rossel'khoznadzor/Official site of Rosselkhoznadzor. Available at: <http://www.fsvps.ru/news/7210.html> (in Russian)
4. Kovalenko Ya.R. *African Swine Fever [Afrikanskaya Chuma Sviney]*. Moscow: Kolos; 1972. (in Russian)
5. State Standart 28573–90. *The methods of laboratory diagnostic of African swine fever*. Moscow, 1990. (in Russian)
6. Selyaninov Yu.O., Balyshv V.M., Tsybanov S.Zh. African swine fever virus: the physical mapping of strains genome. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Sel'skokhozyaystvennykh Nauk*. 2000; 5: 75–6. (in Russian)
7. Almendral J.M., Blasco R., Ley V., Beloso A., Talaver A., Vinuela E. Restriction site map of African swine fever virus DNA. *Virology*. 1984; 133: 258–70.
8. Carrascosa A.L., Bustos M.J., Leon P. Methods for Growing and Titrating African Swine Fever Virus: Field and Laboratory Samples. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2011; 53: 26.14.1–26.14.25.
9. Carrascosa A.L., Bustos M.J., Nogal M.L., Gonzalez de Buitrago G., Revilla Y. Apoptosis induced in an early step of African swine virus entry into Vero cell does not require virus replication. *Virology*. 2002; 294: 372–82.
10. Tabares E., Olivares I., Santurde C., Garcia M.J., Martine E., Camero M.E. African swine fever virus DNA: deletion and addition during adaptation to growth in monkey kidney cells. *Arch. Virol.* 1987; 97: 333–46.
11. Dyakonov L.P., Galnbek T.V., Shchekalova I.V. Intraspecific hybrid cell culture SPEV TK- × porcine lymphocytes. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya*. 1996; 2: 25–30. (in Russian)
12. Prudnikova E.Yu., Balyshv V.M., Yurkov S.G., Galnbek T.V., Balyshva V.I. Adaptation of African swine fever virus in continuous cell cultures. *Nauchnyy zhurnal KubGAU. Politematicheskiy setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal Kubanskogo agrarnogo universiteta*. 2012; 80 (06): Available at: <http://ej.kubagro.ru/2012/06/pdf/32.pdf> (in Russian)
13. Balyshv V.M., Bolgova M.V., Cheryatnikov L.L., Kalantaenko Yu.F., Yurkov S.G. Methodical provisions for typing of African swine fever virus in hemadsorption delay test. *State Scientific Institution All-Russian Research Institute for Veterinary and Microbiology, Russian Academy of Agricultural [Metodicheskie polozheniya po tipizatsii virusa afrikanskoy chumy sviney v reaktsii zaderzhki gemadsorbtsii]*. GNU VNIIVViM Rossel'khokademi. Pokrov, 2010. (in Russian).

REFERENCES

1. Instructions on activities for the prevention and elimination of African swine fever. Moscow, 1980. (in Russian)

Поступила 15.04.14

Received 15.04.14