



Сортировка клеток, инфицированных вирусом африканской чумы свиней, методом проточной цитометрии

А. С. Першин¹, И. В. Шевченко², Т. Н. Комова³, Али Мазлум⁴, Н. Н. Власова⁵, Е. О. Морозова⁶, А. С. Иголкин⁷, К. Н. Груздев⁸

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-5099-3050>, e-mail: daredron@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0001-6482-7814>, e-mail: shevchenko@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-9580-9299>, e-mail: komova@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>, e-mail: mazlum@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0002-0955-9586>, e-mail: morozova_eo@arriah.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

⁸ <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>, e-mail: gruzdev@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Панзоотия африканской чумы свиней продолжает свое распространение, а число пораженных стран и материальные потери увеличиваются. Так, в 2020–2021 гг. к перечню неблагополучных по африканской чуме свиней стран добавились Индия, Папуа – Новая Гвинея, Малайзия, Греция и Бутан. Борьбу с заболеванием затрудняет отсутствие коммерчески доступных и эффективных вакцин, что, в свою очередь, обуславливается недостатком знаний о патогенезе и иммунной защите при африканской чуме свиней. Детальное изучение факторов, влияющих на вирулентность вируса африканской чумы свиней и вызываемого им иммунного ответа, становится возможным при использовании его аттенуированных вариантов. Для этого применяют как естественно аттенуированные варианты вируса, так и варианты, аттенуированные в ходе длительного пассирования вируса на культурах клеток. Однако гетерогенность по признаку вирулентности, свойственная популяции вируса африканской чумы свиней, требует проведения дополнительного отбора инфицированных клеток с целью клонирования вируса. Классические культуральные методы клонирования вирусных частиц достаточно длительны и трудоемки, поэтому для отбора и клонирования инфицированных вирусом клеток с целью получения гомологичных вирусных линий целесообразно использовать сортировку клеток методом проточной цитометрии. В данной работе показаны результаты сортировки зараженных вирусом африканской чумы свиней клеток почки африканской зеленой мартишки CV-1 и костного мозга свиньи с помощью клеточного сортера MoFlo Astrios EQ в 96-луночные культуральные планшеты с целью получения популяции вируса, происходящего из одной зараженной клетки. После проведения сортировки инфицированных культур клеток по одной клетке в лунки 96-луночных планшетов частота обнаружения положительных на африканскую чуму свиней клеток в лунках составила 30% для клеток костного мозга свиньи и 20% – для CV-1.

Ключевые слова: африканская чума свиней, цитометрия, сортировка клеток, культура клеток

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Першин А. С., Шевченко И. В., Комова Т. Н., Мазлум Али, Власова Н. Н., Морозова Е. О., Иголкин А. С., Груздев К. Н. Сортировка клеток, инфицированных вирусом африканской чумы свиней, методом проточной цитометрии. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (2): 114–120. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-114-120.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Иголкин Алексей Сергеевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий референтной лабораторией по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: igolkin_as@arriah.ru.

Flow cytometry sorting of cells infected with African swine fever virus

A. S. Pershin¹, I. V. Shevchenko², T. N. Komova³, Ali Mazloun⁴, N. N. Vlasova⁵, E. O. Morozova⁶, A. S. Igolkin⁷, K. N. Gruzdev⁸

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0002-5099-3050>, e-mail: daredron@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0001-6482-7814>, e-mail: shevchenko@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-9580-9299>, e-mail: komova@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>, e-mail: mazlum@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0002-0955-9586>, e-mail: morozova_eo@arriah.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

⁸ <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>, e-mail: gruzdev@arriah.ru

SUMMARY

The African swine fever panzootic is continuing to spread, and the number of affected countries and material losses are increasing. In particular, India, Papua New Guinea, Malaysia, Greece and Bhutan joined the list of ASF infected countries in 2020–2021. The disease control is hindered by the lack of commercially available and effective vaccines, which, in its turn, is attributable to the insufficient knowledge of ASF pathogenesis and immune defense against the disease. The use of attenuated virus variants enables a thorough investigation of the factors influencing the virulence of African swine fever virus and the immune response to it. This involves the use of naturally attenuated virus variants, as well as of the variants attenuated by a long-term passaging of the virus in cell cultures. However, virulence heterogeneity characteristic of the ASF virus population, necessitates the additional selection of infected cells for the virus cloning. Conventional culture-based techniques for virus particle cloning are rather time- and labour-consuming; it is therefore appropriate to use flow cytometry cell sorting for the selection and cloning of virus infected cells with a view of selecting homologous virus lineages. The paper presents the results of sorting of African green monkey kidney cells (CV-1) and porcine bone marrow cells infected with African swine fever virus; the cells were sorted into the 96-well culture plates using a MoFlo Astrios EQ cell sorter in order to isolate a population of the virus originating from one infected cell. After the single cell sorting of the infected cell cultures into the 96-well plates, ASF positive cell detection rates in the plate wells were 30% for porcine bone marrow cells and 20% for CV-1.

Keywords: African swine fever, cytometry, cell sorting, cell culture

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Pershin A. S., Shevchenko I. V., Komova T. N., Mazloum Ali, Vlasova N. N., Morozova E. O., Igolkin A. S., Gruzdev K. N. Flow cytometry sorting of cells infected with African swine fever virus. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (2): 114–120. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-114-120.

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

For correspondence: Alexey S. Igolkin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: igolkin_as@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) – контагиозная септическая болезнь, поражающая как домашних, в том числе декоративных, свиней, так и диких кабанов. У восприимчивых животных болезнь может проявляться остро, подостро, хронически и бессимптомно [1, 2]. Характер проявления болезни зависит как от биологических свойств вируса, вызвавшего ее развитие, так и от индивидуальных особенностей строения иммунной системы животного. Глобальная ситуация по АЧС продолжает ухудшаться, угрожая мировой продовольственной безопасности. На данный момент болезнью поражено более 50 стран и к их числу постоянно добавляются новые. В 2019 г. АЧС зарегистрировали в Монголии, Вьетнаме, Камбодже, Северной и Южной Корее, Лаосе, Словакии, Сербии, Мьянме, Индонезии, на Филиппинах и Тиморе. В 2020 г. к ним прибавились Греция, Папуа – Новая Гвинея, Индия и Германия, а в 2021 г. – Малайзия и Бутан. Таким образом, АЧС продолжает распространение по всему миру, поражая страны на разных континентах, различающиеся по численности населения, уровню развития сельского хозяйства и ветеринарного законодательства. Вместе с числом пострадавших от АЧС стран возрастает и ущерб, причиненный болезнью. В частности, продолжающаяся эпизоотия в Китае, где уже уничтожено и погибло более 100 млн свиней, серьезно затронула мировое свиноводство [3–5].

Несмотря на достигнутые в последнее время успехи в изучении возбудителя АЧС и создании средств специфической профилактики болезни, коммерчески до-

ступные и эффективные вакцины все еще отсутствуют. Одной из причин этого является недостаток знаний о патогенезе и иммунной защите при АЧС. В то же время сам вирус АЧС обладает целым рядом механизмов для ускользания от иммунного ответа носителя, в числе которых способность эффективно размножаться в макрофагах, изменять выработку цитокинов и интерлейкинов, а также избегать нейтрализации специфическими антителами [6, 7].

Для исследования данных процессов применяют штаммы вируса АЧС, различающиеся по вирулентности, контагиозности, реактогенности и выраженности клинических признаков, в том числе аттенуированные естественным путем либо в ходе длительного пассирования вируса на культурах клеток. Такие штаммы необходимы как для определения факторов вирулентности и патогенности вируса АЧС, так и при разработке на их основе вакцинных препаратов [8–11]. Однако, согласно литературным свидетельствам, популяция вируса АЧС даже в пределах одного географического региона или крупного очага болезни может быть неоднородна по своим биологическим свойствам и одновременно включать штаммы, различающиеся по вирулентности и гемадсорбирующей активности в культурах клеток. Об этом косвенно свидетельствуют как данные, полученные при изучении изолятов, выделенных из клещей, так и нарастающее выявление сероположительных проб у кабанов в Восточной Европе [12, 13]. Для получения достоверных результатов требуется проведение анализа свойств не всей разнородной популяции вируса, а гомогенных по своему

составу образцов вирусного материала. Таким образом, перед исследователями стоит задача по выделению клонов или однородных по своим биологическим свойствам чистых линий вируса.

В основе всех методик, применяемых при получении подобных клонов, лежит разделение гетерогенной вирусной смеси на отдельные пробы и определение их биологических свойств для выделения субпопуляций вируса с их последующей изоляцией и размножением единичных инфицированных клеток или вирусных частиц. Тем не менее классические культуральные методы клонирования вирусных частиц имеют ряд недостатков, в частности, они достаточно длительны и трудоемки. Поэтому для упрощения и автоматизации отбора и клонирования инфицированных вирусом клеток целесообразно использовать их сортировку методом проточной цитометрии. Кроме этого, сортировка клеток может применяться при обогащении или очистке клеточных препаратов в различных научно-исследовательских работах, а цитометрия – также для определения абсолютного числа клеток в исследуемом образце с применением специальных калибровочных счетных частиц или при помощи волюметрического метода [14–16].

Для достижения всех этих целей могут быть применены различные методы, основанные на определенных физических принципах, которые можно классифицировать как активные и пассивные. Активные системы обычно используют внешние силы (акустические, механические, электрические, магнитные и оптические воздействия) для перемещения клеток при сортировке, в то время как пассивные системы используют силы инерции, фильтры с различным размером пор и механизмы адгезии [16–18].

Метод флуоресцентной сортировки (fluorescence-activated cell sorting, FACS) позволяет обнаруживать и очищать специфические популяции клеток, основываясь на их фенотипических маркерах, таких как относительный размер, гранулярность, наличие на их поверхности или в пространстве, ограниченном клеточной мембраной, специфических кластеров дифференциации, определяемых методом проточной цитометрии. Этот метод позволяет исследователям лучше понять характеристики целевой популяции без влияния других клеток.

На данный момент методы флуоресцентной сортировки автоматизированы и надежны. Современные проточные системы способны анализировать и сортировать частицы по различным критериям со скоростью более 50 000 клеток в секунду. В традиционных FACS-системах клетки с флуоресцентной меткой, передвигаясь в ламинарном потоке жидкости, проходят через сфокусированный лазерный луч, который попадает на один или несколько фотодетекторов. Затем полученный флуоресцентный сигнал анализируется, чтобы сопоставить каждому зарегистрированному событию пересечения лазерного луча определенный тип клетки. После типирования каждая отдельная клетка может быть направлена в индивидуальную лунку культурального планшета в ходе дискретной сортировки. Для этого частица инкапсулируется в каплю аэрозоля, которой придается электрический заряд. При прохождении заряженной капли через заряженные пластины она электростатически сортируется [14, 16].

Чувствительность метода FACS настолько высока, что позволяет сортировать даже единичные клетки для проведения их последующего секвенирования. Тем не менее данный метод имеет и свои недостатки. Сортировка может быть затруднена в случае, если целевые клетки или частицы имеют высокий уровень автофлуоресценции. Кроме того, связывание флуоресцентно-конъюгированных антител с их специфическими лигандами, расположенными на клетках, может изменять функциональную активность отсортированных клеток, влияя таким образом на результаты последующих экспериментов. Поэтому для первичной сортировки культуры клеток, зараженной вирусом АЧС, были выбраны методы, основанные на оценке клеток по их размеру и гранулярности. И, наконец, для правильной эксплуатации системы проточной сортировки обычно требуется высококвалифицированный персонал [17].

Необходимо отметить, что метод флуоресцентной сортировки может быть использован для работы не только с клетками, но и для сортировки иных дискретных частиц, в том числе внутриклеточных везикул, и даже для выделения отдельных вирионов. Тем не менее практическая реализация этой идеи вызывает ряд затруднений, связанных как с особенностями морфологии вирионов, так и со строением оптической системы прибора [18–22].

Прежде всего необходимо наработать вирус в культуре клеток в достаточном титре, после чего зараженные клетки требуется разрушить для высвобождения из них вирионов. Для разрушения клеток могут быть применены различные методы, в том числе циклическая заморозка и оттаивание, ультразвуковая соникация, лизис клеточных мембран или разрушение клеток посредством изменения осмотического давления [23]. В результате образуется суспензия, содержащая в своем составе остаточные живые, мертвые и гибнущие клетки, клеточный дебрис, размеры которого могут варьировать, и вирионы. При этом фракция вирионов также будет неоднородна по своему составу, поскольку в нее войдут как зрелые вирионы, способные инфицировать живые клетки, так и незрелые вирионы, не обладающие инфекционной активностью, а кроме того, разрушенные фрагменты вирионов, высвобожденная вирусная нуклеиновая кислота и пустые вирусные капсиды, не прошедшие до конца процесс сборки. При изучении вируса АЧС к этому перечню добавятся также зрелые вирионы, приобретшие суперкапсидную оболочку из клеточной мембраны после завершения ими отпочковывания от клетки. Таким образом, получаемая после разрушения клеток вирусосодержащая суспензия требует ее дополнительной очистки от остатков клеточного детрита и нефункциональных вирионов.

В дополнение к вышеназванному ограничению на сортировку отдельных вирионов накладываются особенности строения оптической системы используемого сортера. Ввиду того что размер вириона составляет лишь сотни нанометров, в то время как средние размеры эукариотических клеток достигают от 10 до 50 мкм, для обнаружения отдельного вириона необходимо применение высокочувствительной системы детекции, способной не только регистрировать даже малейшие изменения яркости лазерного луча, вызванные прохождением через него вирусной частицы, но и обладающей высоким соотношением «сигнал – шум», необходимым для того, чтобы эффективно отделять целевые

сигналы от фонового шума, неизбежно возникающего в процессе анализа из-за ряда причин физического характера, в том числе взаимного перекрывания частот флуоресценции применяемых красителей, электронного шума датчиков и рассеивания света при его попадании на молекулы воды. Использование меченных флуорохромами антител к вирусу также не позволяет в полной мере решить проблему детекции отдельного вириона, поскольку из-за малой площади поверхности вириона на его поверхности физически может разместиться лишь ограниченное количество антител, конъюгированных с красителем. Так, размер зрелого вириона вируса АЧС может достигать не более чем 200 нм. Кроме того, указанные антитела будут связываться с их специфическими лигандами, расположенными не только на зрелых и инфекционных вирионах, но и на поверхности вирионов-пустышек и особенно их обломков, что может приводить к росту уровня фоновой флуоресценции и затруднению детекции [22, 24].

На основании вышеизложенного в ходе данной работы была поставлена цель – отработать метод сортировки из гетерогенных по составу культур клеток костного мозга свиньи (КМС) и перевиваемой культуры клеток почки африканской зеленой марышки (CV-1) единичных клеток, инфицированных вирусом АЧС, в 96-луночные планшеты для отбора наиболее перспективных клонов вируса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для заражения чувствительных культур клеток применяли штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» вируса АЧС, который был получен в результате адаптации вируса АЧС штамма «8 № 2/Одинцово-02/14» с помощью последовательных пассажей в перевиваемой культуре клеток CV-1. Данный штамм характеризуется умеренной инфекционной активностью, способен накапливаться в культурах клеток КМС и CV-1 в титрах от 6,0 до 7,0 Ig ГАД₅₀/см³, при этом его летальность для свиней всех возрастных групп не превышает 37,5%. Также важно отметить, что данный вариант вируса сохранил способность инфицировать первичные культуры клеток свиньи [25].

Культивирование штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» вируса АЧС в первичной и перевиваемой культурах клеток проводили в лабораторных условиях ФГБУ «ВНИИЗЖ», предназначенных для работ с возбудителями II–IV групп патогенности. Штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» вируса АЧС получали в лиофилизированном виде из Государственной коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». В ходе выполнения работ применяли две культуры клеток: первичную культуру клеток КМС, которую выращивали в питательной среде Игла с добавлением в нее 20% по объему бычьей фетальной сыворотки, а также перевиваемую культуру клеток CV-1, которую выращивали в питательной среде Игла с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки.

Для получения заражающей вирусосодержащей жидкости штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» вируса АЧС культивировали в пластиковых культуральных матрицах объемом 25 см³ при температуре +37 °С. После инкубирования в течение 72 ч культуры клеток, инфицированной вирусом АЧС, монослой снимали с помощью раствора трипсина, затем переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали его для осаждения клеточного дебриса, удаляли супернатант и ресуспенди-

ровали в физиологическом растворе. Полученные образцы использовали для сортировки.

Титр вируса в испытуемом образце определяли при помощи реакции гемадсорбции (РГАД) по стандартной методике. Инфекционный титр вируса вычисляли по методу Кербера или Рида и Менча и выражали в Ig ГАД₅₀/см³ [26].

Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали «Тест-систему для диагностики африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» согласно инструкции производителя.

Сортировку клеток проводили с использованием клеточного сортера MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter, США) после его соответствующей калибровки.

Для дискриминации так называемых клеточных дублетов, представляющих собой агрегаты из двух или более клеток, особенно при исследовании недостаточно дезагрегированных образцов, а также когда при сортировке используются более высокие скорости потока жидкости, использовали программный анализ высоты, площади и ширины импульса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку в первичных культурах клеток свиней возбудитель АЧС способен репродуцироваться без предварительной адаптации, их широко используют для работы с вирусом. В настоящих исследованиях была выбрана первичная культура клеток КМС, которая обладает высокой чувствительностью к вирусу АЧС, а его размножение в ней сопровождается проявлением гемадсорбции и деструкцией инфицированных клеток.

Первоначально проводили сбор не менее 50 тысяч событий (реакций фотоэлемента на изменение интенсивности лазерного луча в результате пролета частицы), затем дискриминировали дублеты клеток,

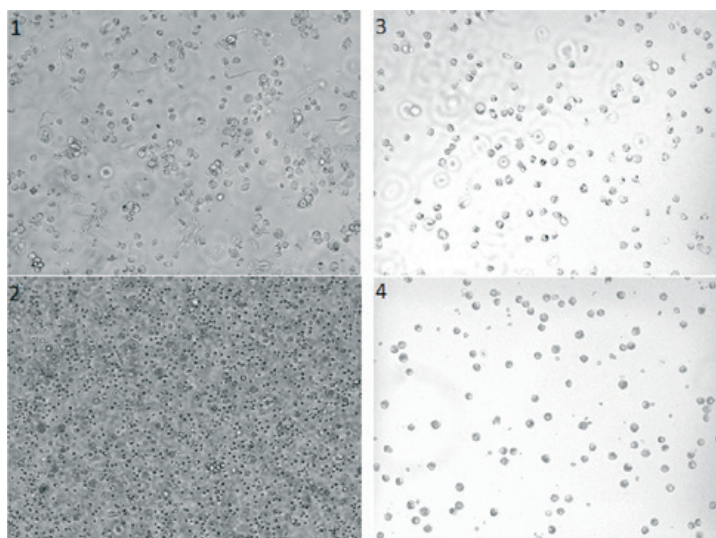


Рис. 1. Микрофотография суспензии клеток до (1; 2) и после (3; 4) ее сортировки, полученная с помощью оптического микроскопа (увеличение 460х): сверху – культура клеток КМС; внизу – культура клеток CV-1

Fig. 1. Cell suspension micrographs taken through an optical microscope (460× magnification) before (1; 2) and after (3; 4) its sorting: upper images – PBM cell culture; lower images – CV-1 cell culture

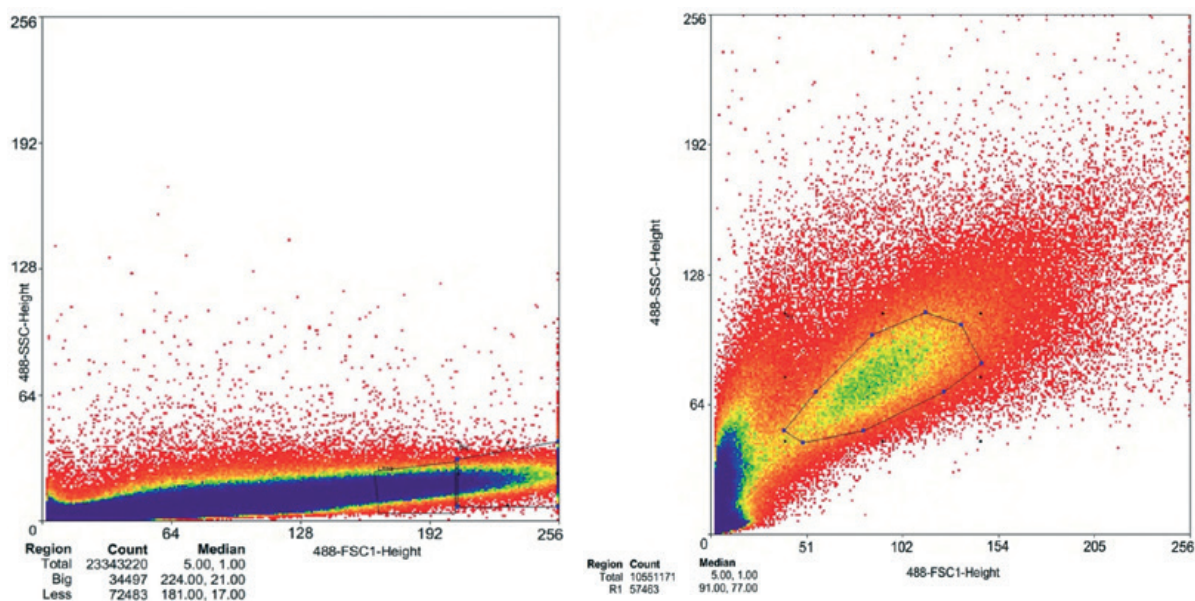


Рис. 2. График распределения клеток КМС (слева) и CV-1 (справа) согласно соотношению бокового (ось ординат) и прямого (ось абсцисс) светорассеивания. Области сортировки выделены рамками

Fig. 2. Side (ordinate) versus forward scatter (abscissa) plots for PBM cells (left image) and CV-1 cells (right image). Gated regions are shown

гейтировали клеточную популяцию по параметрам прямого и бокового светорассеивания и сортировали клетки на предметное стекло для их визуального изучения под микроскопом при увеличении 460x. Для ускорения сортировки на данном этапе выставляли низкую чистоту сортировки, позволяющую сортировать капли с двойными и неправильно расположенными частицами. Как видно из результатов, представленных на рисунке 1, полученная суспензия имеет практически однородный по морфологическим признакам клеточный состав.

Далее сортировку проводили по одной клетке в 96-луночный культуральный планшет, заполненный по 0,01 см³ на лунку средой Игла с добавлением 20% бычьей фетальной сыворотки, оставляя 16 лунок для контроля. При этом чистоту сортировки увеличивали таким образом, чтобы прибор отбрасывал капли, в которых присутствует несколько частиц, либо частица смещена от центра, что соответствует режиму сортировки Single 0,5. Целевая область отбора представлена на рисунке 2.

Для получения и клонирования новых вариантов аттенуированного вируса АЧС со стабильными культурально-биологическими свойствами, предназначенного для дальнейшего изучения особенностей иммуногенеза при АЧС и проведения генетических модификаций, проводили сортировку вируса, адаптированного к культуре клеток CV-1. При этом использовали аналогичные параметры сортировки.

После проведения сортировки культуры клеток КМС частота обнаружения лунок, положительных на АЧС в РГАД, составила 30%. Так как гемадсорбция проявляется только на первичных культурах клеток, клетки CV-1 исследовали в ПЦР на наличие фрагментов генома вируса. Для образцов, полученных с культуры клеток CV-1, с использованием метода ПЦР положительные лунки были обнаружены в 20% случаев. Наличие отрицательных лунок объясняется возможностью сорти-

ровки в них неинфицированных клеток либо клеток с вирусом, потерявшим свою инфекционность. Также следует учитывать, что в момент сортировки клеток происходит приложение к ним механических сил, что повышает риск повреждения клетки [16].

Кроме того, создание аэрозолей в момент сортировки потенциально может приводить к попаданию вируса АЧС в нецелевые лунки. Однако в нашем эксперименте вирус в контрольных интактных частях планшета (16 лунок) не обнаруживали.

Полученные в результате сортировки клоны вируса были наработаны на перевиваемых и первичных культурах клеток, что позволило подтвердить присутствие неинaktivированного вируса АЧС в отобранных клетках. После наработки достаточного объема вируса из единичных сортированных клеток его использовали при проведении биологической пробы с заражением естественно восприимчивых животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, метод сортировки клеток с использованием проточной цитометрии по физическим параметрам (их размер и гранулярность) позволяет получать гомогенные обогащенные суспензии клеток. В случае сортировки инфицированных клеток в 96-луночный планшет метод позволяет проводить клонирование вируса с высокой скоростью и эффективностью. Однако максимальной эффективности можно будет добиться при использовании меченых флуорохромами антител к вирусу АЧС для сортировки непосредственно его внеклеточных вирионов, что является целью дальнейшей работы специалистов референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ремыга С. Г., Першин А. С., Шевченко И. В., Иголкин А. С., Шевцов А. А. Клинические и патологоанатомические изменения у диких европейских кабанов и домашних свиней при заражении вирусом африканской чумы свиней. *Ветеринария сегодня*. 2016; (3): 46–51.

2. Шевченко И. В., Ремыга С. Г., Першин А. С. и др. Клинико-анатомическое проявление африканской чумы свиней при заражении разными методами вирусом, выделенным от дикого кабана. *Современные проблемы патологической анатомии, патогенеза и диагностики болезней животных: материалы 18-й Международной научно-методической конференции по патологической анатомии животных (20–25 октября 2014 г.)*. М.: МГАВМиБ; 2014; 82–84.

3. Schoder M. E., Tignon M., Linden A., Vervaeke M., Cay A. B. Evaluation of seven commercial African swine fever virus detection kits and three Taq polymerases on 300 well-characterized field samples. *J. Virol. Methods*. 2020; 280:113874. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.113874.

4. European Food Safety Authority (EFSA), Desmecht D., Gerbier G., Gortázar Schmidt C., Grigaliuniene V., Helyes G., et al. Epidemiological analysis of African swine fever in the European Union (September 2019 to August 2020). *EFSA J*. 2021; 19 (5):e06572. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6572.

5. Zhu J. J., Ramanathan P., Bishop E. A., O'Donnell V., Gladue D. P., Borca M. V. Mechanisms of African swine fever virus pathogenesis and immune evasion inferred from gene expression changes in infected swine macrophages. *PLoS One*. 2019; 14 (11):e0223955. DOI: 10.1371/journal.pone.0223955.

6. Teklue T., Sun Y., Abid M., Luo Y., Qiu H. J. Current status and evolving approaches to African swine fever vaccine development. *Transbound. Emerg. Dis*. 2020; 67 (2): 529–542. DOI: 10.1111/tbed.13364.

7. Pikalo J., Zani L., Hühr J., Beer M., Blome S. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar – Lessons learned from recent animal trials. *Virus Res*. 2019; 271:197614. DOI: 10.1016/j.virusres.2019.04.001.

8. Borca M. V., Carrillo C., Zsak L., Laegreid W. W., Kutish G. F., Neilan J. G., et al. Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *J. Virol*. 1998; 72 (4): 2881–2889. DOI: 10.1128/JVI.72.4.2881-2889.1998.

9. Shields C. W. IV, Reyes C. D., López G. P. Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. *Lab Chip*. 2015; 15 (5): 1230–1249. DOI: 10.1039/c4lc01246a.

10. Lacasta A., Monteagudo P. L., Jiménez-Marín Á., Accensi F., Ballster M., Argilaguet J., et al. Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Vet. Res*. 2015; 46:135. DOI: 10.1186/s13567-015-0275-z.

11. Pershin A., Shevchenko I., Igolkin A., Zhukov I., Mazloum A., Aronova E., et al. Long-term study of the biological properties of ASF virus isolates originating from various regions of the Russian Federation in 2013–2018. *Vet. Sci*. 2019; 6 (4):99. DOI: 10.3390/vetsci6040099.

12. Boinas F. S., Hutchings G. H., Dixon L. K., Wilkinson P. J. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J. Gen. Virol*. 2004; 85 (Pt 8): 2177–2187. DOI: 10.1099/vir.0.80058-0.

13. Oļševskis E., Schulz K., Staubach C., Seržants M., Lamberga K., Pūle D., et al. African swine fever in Latvian wild boar – A step closer to elimination. *Transbound. Emerg. Dis*. 2020; 67 (6): 2615–2629. DOI: 10.1111/tbed.13611.

14. Orfao A., Ruiz-Arguelles A. General concepts about cell sorting techniques. *Clin. Biochem*. 1996; 29 (1): 5–9. DOI: 10.1016/0009-9120(95)02017-9.

15. Liou Y. R., Wang Y. H., Lee C. Y., Li P. C. Buoyancy-activated cell sorting using targeted biotinylated albumin microbubbles. *PLoS One*. 2015; 10 (5):e0125036. DOI: 10.1371/journal.pone.0125036.

16. Pereira H., Schulze P. S., Schüler L. M., Santos T. F., Barreira L., Varela J. Fluorescence activated cell-sorting principles and applications in microalgal biotechnology. *Algal Research*. 2018; 30: 113–120. DOI: 10.1016/j.algal.2017.12.013.

17. Sasagawa Y., Nikaido I., Hayashi T., Danno H., Uno K. D., Imai T., Ueda H. R. Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol*. 2013; 14 (4):R31. DOI: 10.1186/gb-2013-14-4-r31.

18. Liao X., Makris M., Luo X. M. Fluorescence-activated cell sorting for purification of plasmacytoid dendritic cells from the mouse bone marrow. *J. Vis. Exp*. 2016; 117:e54641. DOI: 10.3791/54641.

19. Ender F., Zamzow P., Bubnoff N. V., Gieseler F. Detection and quantification of extracellular vesicles via FACS: Membrane labeling matters! *Int. J. Mol. Sci*. 2019; 21 (1):291. DOI: 10.3390/ijms21010291.

20. Schierer S., Ostalecki C., Zinser E., Lamprecht R., Plosnita B., Stich L., et al. Extracellular vesicles from mature dendritic cells (DC) differentiate monocytes into immature DCs. *Life Sci. Alliance*. 2018; 1 (6):e20180093. DOI: 10.26508/lsa.20180093.

21. Lippé R. Flow virometry: a powerful tool to functionally characterize viruses. *J. Virol*. 2018; 92 (3):e01765-17. DOI: 10.1128/JVI.01765-17.

22. Shehadul Islam M., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P. R. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*. 2017; 8 (3):83. DOI: 10.3390/mi8030083.

23. Galindo I., Alonso C. African swine fever virus: A review. *Viruses*. 2017; 9 (5):103. DOI: 10.3390/v9050103.

24. Власова Н. Н., Жуков И. Ю., Мазлум Али, Шарыпова Д. В., Першин А. С., Иголкин А. С. Штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/СВ-1» вируса африканской чумы свиней, со сниженной вирулентностью для свиней, для вирусологических, диагностических, молекулярно-генетических и мониторинговых исследований. Патент 2675535 Российская Федерация, МПК C12N 7/00 (2006.01). ФГБУ «ВНИИЗЖ». № 2018117990. Заявл. 15.05.2018. Опубликовано. 19.12.2018. Бюл. № 35. Режим доступа: <https://patentimages.storage.googleapis.com/9b/54/86/bad913ad3ea42a/RU2675535C1.pdf>.

25. Мазлум Али, Шарыпова Д. В., Гаврилова В. Л., Пузанкова О. С., Жуков И. Ю., Аронова Е. В. и др. Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезенки свиней: утв. 15.03.2019 № 09-19. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2019. 24 с.

REFERENCES

1. Remyga S. G., Pershin A. S., Shevchenko I. V., Igolkin A. S., Shevtsov A. A. Clinical and post-mortem signs in European wild boars and domestic pigs infected with African swine fever virus. *Veterinary Science Today*. 2016; (3): 46–51. (in Russ.)

2. Shevchenko I. V., Remyga S. G., Pershin A. S., et al. Kliniko-anatomicheskoe proyavlenie afrikanской chумы svinei pri zarazhenii raznymi metodami virusom, vydelennym ot dikogo kabana = Clinical and anatomical manifestations of African swine fever as a result of using various methods of infection with the virus isolated from a wild boar. *Sovremennye problemy patologicheskoy anatomii, patogeneza i diagnostiki boleznei zhivotnykh: materialy 18-j Mezhdunarodnoy nauchno-metodicheskoy konferentsii po patologicheskoy anatomii zhivotnykh (20–25 oktyabrya 2014 g.) = Current issues of anatomical pathology, pathogenesis and diagnosis of animal diseases: proceedings of the 18th International Scientific and Methodical Conference on Animal Anatomical Pathology (20–25 October 2014)*. Moscow: SAVMB, 2014; 82–84. (in Russ.)

3. Schoder M. E., Tignon M., Linden A., Vervaeke M., Cay A. B. Evaluation of seven commercial African swine fever virus detection kits and three Taq polymerases on 300 well-characterized field samples. *J. Virol. Methods*. 2020; 280:113874. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.113874.

4. European Food Safety Authority (EFSA), Desmecht D., Gerbier G., Gortázar Schmidt C., Grigaliuniene V., Helyes G., et al. Epidemiological analysis of African swine fever in the European Union (September 2019 to August 2020). *EFSA J*. 2021; 19 (5):e06572. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6572.

5. Zhu J. J., Ramanathan P., Bishop E. A., O'Donnell V., Gladue D. P., Borca M. V. Mechanisms of African swine fever virus pathogenesis and immune evasion inferred from gene expression changes in infected swine macrophages. *PLoS One*. 2019; 14 (11):e0223955. DOI: 10.1371/journal.pone.0223955.

6. Teklue T., Sun Y., Abid M., Luo Y., Qiu H. J. Current status and evolving approaches to African swine fever vaccine development. *Transbound. Emerg. Dis*. 2020; 67 (2): 529–542. DOI: 10.1111/tbed.13364.

7. Pikalo J., Zani L., Hühr J., Beer M., Blome S. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar – Lessons learned from recent animal trials. *Virus Res*. 2019; 271:197614. DOI: 10.1016/j.virusres.2019.04.001.

8. Borca M. V., Carrillo C., Zsak L., Laegreid W. W., Kutish G. F., Neilan J. G., et al. Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *J. Virol*. 1998; 72 (4): 2881–2889. DOI: 10.1128/JVI.72.4.2881-2889.1998.

9. Shields C. W. IV, Reyes C. D., López G. P. Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. *Lab Chip*. 2015; 15 (5): 1230–1249. DOI: 10.1039/c4lc01246a.

10. Lacasta A., Monteagudo P. L., Jiménez-Marín Á., Accensi F., Ballster M., Argilaguet J., et al. Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Vet. Res*. 2015; 46:135. DOI: 10.1186/s13567-015-0275-z.

11. Pershin A., Shevchenko I., Igolkin A., Zhukov I., Mazloum A., Aronova E., et al. Long-term study of the biological properties of ASF virus isolates originating from various regions of the Russian Federation in 2013–2018. *Vet. Sci*. 2019; 6 (4):99. DOI: 10.3390/vetsci6040099.

12. Boinas F. S., Hutchings G. H., Dixon L. K., Wilkinson P. J. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J. Gen. Virol*. 2004; 85 (Pt 8): 2177–2187. DOI: 10.1099/vir.0.80058-0.

13. Oļševskis E., Schulz K., Staubach C., Seržants M., Lamberga K., Pūle D., et al. African swine fever in Latvian wild boar – A step closer to elimination. *Transbound. Emerg. Dis*. 2020; 67 (6): 2615–2629. DOI: 10.1111/tbed.13611.

14. Orfao A., Ruiz-Arguelles A. General concepts about cell sorting techniques. *Clin. Biochem*. 1996; 29 (1): 5–9. DOI: 10.1016/0009-9120(95)02017-9.

15. Liou Y. R., Wang Y. H., Lee C. Y., Li P. C. Buoyancy-activated cell sorting using targeted biotinylated albumin microbubbles. *PLoS One*. 2015; 10 (5):e0125036. DOI: 10.1371/journal.pone.0125036.
16. Pereira H., Schulze P. S., Schüler L. M., Santos T. F., Barreira L., Varela J. Fluorescence activated cell-sorting principles and applications in microalgal biotechnology. *Algal Research*. 2018; 30: 113–120. DOI: 10.1016/j.algal.2017.12.013.
17. Sasagawa Y., Nikaido I., Hayashi T., Danno H., Uno K. D., Imai T., Ueda H. R. Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol*. 2013; 14 (4):R31. DOI: 10.1186/gb-2013-14-4-r31.
18. Liao X., Makris M., Luo X. M. Fluorescence-activated cell sorting for purification of plasmacytoid dendritic cells from the mouse bone marrow. *J. Vis. Exp*. 2016; 117:e54641. DOI: 10.3791/54641.
19. Ender F., Zamzow P., Bubnoff N. V., Gieseler F. Detection and quantification of extracellular vesicles via FACS: Membrane labeling matters! *Int. J. Mol. Sci*. 2019; 21 (1):291. DOI: 10.3390/ijms21010291.
20. Schierer S., Ostalecki C., Zinser E., Lamprecht R., Plosnita B., Stich L., et al. Extracellular vesicles from mature dendritic cells (DC) differentiate monocytes into immature DC. *Life Sci. Alliance*. 2018; 1 (6):e201800093. DOI: 10.26508/lsa.201800093.
21. Lippé R. Flow virometry: a powerful tool to functionally characterize viruses. *J. Virol*. 2018; 92 (3):e01765-17. DOI: 10.1128/JVI.01765-17.
22. Shehadul Islam M., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P. R. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines*. 2017; 8 (3):83. DOI: 10.3390/mi8030083.
23. Galindo I., Alonso C. African swine fever virus: A review. *Viruses*. 2017; 9 (5):103. DOI: 10.3390/v9050103.
24. Vlasova N. N., Zhukov I. Yu., Mazlum Ali, Sharypova D. V., Pershin A. S., Igolkin A. S. ACHS/VNIIZH/CV-1 strain of African swine fever, with decreased virulence for pigs, for virologic, diagnostic, molecular-genetic and surveillance studies. Patent No. 2675535 Russian Federation, Int. Cl. C12N 7/00 (2006.01). FGBl "ARRIAH". Application: 2018117990. Application published: 15.05.2018. Date of publication: 19.12.2018. Bull. No. 35. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/9b/54/86/ba-d913ad3ea42a/RU2675535C1.pdf>. (in Russ.)
25. Mazlum Ali, Sharypova D. V., Gavrilova V. L., Puzankova O. S., Zhukov I. Yu., Aronova E. V., et al. Metodicheskie rekomendatsii po vydeleniyu i titrovaniyu virusa afrikanskoj chumy svinej v kul'ture kletok selezhenki svinej = Methodical guidelines for the isolation and titration of African swine fever virus in porcine spleen cell culture: approved on 15.03.2019 No. 09-19. Vladimir: FGBl "ARRIAH"; 2019. 24 p. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 21.10.2021

Поступила после рецензирования / Revised 16.11.2021

Принята к публикации / Accepted 11.01.2022

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Першин Андрей Сергеевич, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шевченко Иван Вячеславович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Комова Татьяна Николаевна, аспирант, сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Мазлум Али, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Власова Наталья Никифоровна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Морозова Елизавета Олеговна, аспирант, сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Иголкин Алексей Сергеевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий референтной лабораторией по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Груздев Константин Николаевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Andrey S. Pershin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Ivan V. Shevchenko, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Tatiana N. Komova, Post-Graduate Student, Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Ali Mazloun, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Natalia N. Vlasova, Doctor of Science (Biology), Chief Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Elizaveta O. Morozova, Post-Graduate Student, Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexey S. Igolkin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Konstantin N. Gruzdev, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, Information and Analysis Centre, FGBl "ARRIAH", Vladimir, Russia.