

## СОЗДАНИЕ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО ЗОНДА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ *FISH*\*

Алина Константиновна Комина, младший научный сотрудник  
 Виктория Васильевна Стаффорд, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник  
 Алексей Михайлович Гулюкин, член-корреспондент РАН  
 ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский исследовательский институт  
 экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»,  
 г. Москва, Россия  
 E-mail: stafford.v.v@gmail.com

**Аннотация.** В статье представлены данные по созданию ДНК-зонда для применения во флуоресцентной гибридизации *in situ* на криотомных гистологических срезах образцов внутренних органов свиней. Данный метод диагностики актуален при инapparатном течении инфекции, которая способствует поддержанию вирусной нагрузки внутри стада, не проявляясь выраженными клиническими признаками. Кроме этого, метод способствует выявлению вируса в патологическом материале в период поствиремии. В нашей работе отражены этапы создания ДНК зонда размером 173 п.о. соответствующего участку гена гликопротеина E2 вируса классической чумы свиней. Зонд проверяли на миндалинах от инфицированных вирусом свиней, в качестве отрицательного контроля использовали миндалины от здоровых, не привитых от КЧС свиней. Получены хорошие результаты применения зонда, отражающие его высокую специфичность и избирательность в образцах положительного контроля. Экспериментальные данные легли в основу наших дальнейших исследований в области инфекционной патологии сельскохозяйственных животных.

**Ключевые слова:** флуоресцентная гибридизация *in situ*, гибридизационный зонд, классическая чума свиней

## CREATION OF A HYBRIDIZATION PROBE FOR THE DIAGNOSIS OF CLASSICAL SWINE FEVER BY THE *FISH* METHOD

A.K. Komina, Junior Researcher  
 V.V. Stafford, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher  
 A.M. Gulyukin, Corresponding Member of the RAS  
 Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Centre VIEV», Moscow, Russia  
 E-mail: stafford.v.v@gmail.com

**Abstract.** The article presents data creation of the DNA probe labeled with fluorescein-12-dUTP for its subsequent use in *in-situ* hybridization in cryotomic histological sections from samples of internal organs of pigs. This diagnostic method is especially relevant for the inapparate course of infection, which contributes to maintaining the viral load inside the herd without showing pronounced clinical signs. In addition, the method helps to identify the viral genetic material in the pathological samples during the post-viremia period. In this article the stages of creating a probe consisting of 173 pairs of nucleotide bases corresponding to the site of the glycoprotein E2 gene of the classical swine fever virus are shown. The final DNA probe was tested on tonsils from pigs infected with the CSF virus as a positive control for the DNA probe and as a negative control for the DNA probe is tonsils from healthy pigs not vaccinated against CSF were used. Finally, we obtained positive results of using the DNA probe, reflecting its high specificity and selectivity in the studied samples of positive control. The data obtained by us formed the basis for our further research in the field of infectious pathology of farm animals.

**Keywords:** hybridization probe, nucleotide pair, DNA, RNA, fluorescent mark, classical swine fever

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (*fluorescence in situ hybridization – FISH*) – цитогенетический метод, при котором применяют меченные флуорохромами ДНК-зонды для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК или РНК в гистологических, цитологических и хромосомных препаратах. В современной медицине гибридизация *in situ* – стандарт диагностики многих инфекционных, иммунных и функциональных расстройств в макроорганизме. В России широко используют данный метод

при диагностике онкологических состояний у человека, на его основе создают медицинские базы данных. [2, 3] Бактериологи изучают почвенные бактерии и их эволюцию. [1] В РФ нет данных по использованию метода при диагностике болезней животных. Гибридизация *in situ* позволяет выявить генетический материал возбудителя в тканях органов, определить его тропность и раскрыть вопросы патогенеза и иммунного ответа, особенно при инapparатном течении болезни. [4–8, 10] Одно из таких заболеваний – классическая чума сви-

\* Статья выполнена в рамках государственного задания и плана НИР ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН на 2021–2024 годы / The article was carried out within the framework of the state task and the research plan of the Federal State Budgetary Institution of the Federal Research Center RES RAS for 2021–2024.

ней (КЧС), которой характерно острое, подострое и бессимптомное течение.

Иностранные специалисты для гибридизации *in situ* в органах и тканях от свиней, зараженных КЧС, применяют протокол, опубликованный в сборнике Всемирной организации здоровья животных (МЭБ) «Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals» (Глава 3.9.3). [9]

Учитывая современные геополитические вопросы, нам необходим отечественный доступный метод выявления генетического материала любого патогена в тканях животных.

Цель работы – создание гибридизационного зонда для диагностики КЧС методом гибридизации *in situ*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения специфического фрагмента размером 173 п.н., соответствующего участку гена гликопротеина E2, проводили гнездовую ПЦР. Выделение РНК вакцинного штамма «КС» вируса КЧС осуществляли при помощи коммерческого набора «РИБО-преп» («ИнтерЛабСервис», Россия) по методике производителя. На первом этапе ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) использовали прямой праймер F1 5'-АТАТАТГСТСААГГГСГАТ-3' и обратный R1 5'-АСАГСАТГАТССАТТСТТТА-3' (10 пМ). При этом реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 5 мкл образца, 5 мкл буфера (5x) для ОТ-ПЦР (Диам, Россия), 0,5 мкл смеси dNTP (Диам, Россия), 12,1 мкл воды без нуклеаз, 0,25 мкл Taq-полимеразы (Диам, Россия), 0,125 MMLV-ревертазы. Термический цикл: 50°C – 30 мин., 94°C – 5 мин. Затем 25 циклов: 95°C – 30 с, 60,5°C – 30 с и 72°C – 90 с, в конце 72°C – 5 мин. На втором этапе проводили ПЦР с прямым праймером F2 5'-СТГТГГСТААТАГТГАСТАС-3' и обратным R2 5'-САТТСТТТАТГГГСГАТС-3' (по 10 пМ). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 5 мкл образца, 2,5 мкл буфера (10x) для ПЦР (Диам, Россия), 0,5 мкл смеси dNTP (Диам, Россия), 14,6 мкл воды без нуклеаз, 0,25 мкл Taq-полимеразы (Диам, Россия). Термический цикл: 94°C – 5 мин. Затем 25 циклов: 94°C – 30 с, 55°C – 30 с и 72°C – 90 с, в конце 72°C – 5 мин. После амплификации выполняли электрофорез в 1%-м агарозном геле, приготовленном на трис-ацетатном буферном растворе (рН = 8,0) с добавлением 40 мкл бромистого этидия на литр буфера. ПЦР-фрагмент, соответствующий по электрофоретической подвижности размеру 173 п.н., вырезали и выделяли из геля при помощи набора «LumiPure» (Lumiprobe, Россия) согласно инструкции производителя.

Для мечения ДНК-зонда использовали ПЦР. Реакционная смесь состояла из 4,0 мкл смеси флуоресцеина-12-dUTP 1/3, 2,5 мкл Taq-буфера (x10), по 1 мкл праймеров F2 и R2 до конечной концентрации каждого праймера 0,1...1,0 мкМ, 0,25 мкл Taq-полимеразы, 5 мкл матричной ДНК (0,02...0,15 мкг/25 мкл смеси), деионизированной воды до 25 мкл. Программа амплификации состояла из 40 циклов: 94°C – 10 с, 55°C – 10 с, 72°C – 30 с, затем инкубирование при 72°C – 3 мин.

Дополнительно нуклеотидную последовательность зонда определяли по методу Сэнгера с использованием набора «BigDye 3.1» (Applied Biosystems, США).

В дальнейшем, для применения готового гибридизационного зонда (ГБ) в качестве компонента гибридизации *in situ*, готовили гибридизационную смесь (ГС), начиная с гибридизационного буфера (рН = 7,2), состоящего из 15 мл формамида, 3 мл 50% раствора декстрана сульфата натрия на дистиллированной воде, 3 мл 0,1М ФСБ, 3 мл 20xЦСБ. К данному объему добавили необходимое количество ГБ для получения ГС, которую использовали в гибридизации *in situ* в гистологических срезах.

В качестве патологического материала для испытания ГБ брали криотомные, нефиксированные гистологические срезы миндалин от инфицированных свиней (положительный контроль) и интактных, не вакцинированных (отрицательный контроль).

Для детекции флуоресцентной метки зонда использовали микроскоп *Axio Scope A1.0* (Zeiss) и осветитель *HBO 50* с соответствующим светофильтром при ок.x10, об.x63. Фото съемку вели при помощи фотоаппарата и программы *Axio Vision*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Секвенированием по методу Сэнгера получили нуклеотидную последовательность ДНК-зонда: СТГТГГСТААТАГТГАСТАСАТАГ ТТСТААКАГААААААСССГСССГТГГТТТАС АГСТГГГССАГГГТГАГГТАГТГТТААТ АГГГААСТТААТТАСССАСАСАГАСАТТГА ГГТТГТАГТАТТТСТТАСТГССТАТТТ ГГТКАТГАГАГАТГАГССАТАААГАААТГ. После вшивания флуоресцеина-12-dUTP в ДНК-зонд методом ПЦР получили флуоресцентный ГБ, который использовали в реакции гибридизации *in situ* для определения расположения вируса классической чумы свиней в криотомных гистологических срезах.

Получены положительные результаты гибридизации зонда в криотомных срезах миндалин от инфицированной вирусом КЧС свиньи (см. рисунок А, 2-я стр. обл.) по сравнению с гистологическим образцом от интактного животного (см. рисунок Б, 2-я стр. обл.).

При положительной гибридизации зонда в гистологических срезах мы наблюдаем характерное изумрудно-зеленое свечение (А), по характеру которого можно определить расположение генетического материала вируса (ГБ в тканях расположен избирательно, в виде отдельно лежащих глыбок и их скоплений). Хорошо выражены цитоплазма клеток и ядро, что свидетельствует о целостности структуры клетки, отдельно лежащие частицы свидетельствуют о внеклеточном расположении вируса.

Таким образом, мы получили чувствительный гибридизационный ДНК-зонд, который может быть использован в качестве компонента для такого диагностического теста как гибридизация *in situ*. Дальнейшие исследования в этой области позволят нам расширить методы диагностики инфекционной патологии животных.

**СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Величко Н.В., Рабочая Д.Е., Макеева А.С., Пиневи́ч А.В. Таксономическое разнообразие цианобактерий в антарктических почвенных сообществах, выявленное методом флуоресцентной *in situ* гибридизации. В сб.: Микроорганизмы и плодородие почвы. Мат. I Всеросс. науч.-практ. конф. с межд. уч., посвящ. 90-летию со дня рождения профессора Е.М. Панкратовой. 2022. С. 27–30.
2. Каракулов Р.К., Кайдарова Д.Р., Душимова З.Д. и др. Дифференцированный подход к терапии диффузной В-крупноклеточной лимфомы с учетом статуса *c-MYC* и *BCL2*. Онкогематология. 2022. Т. 17. № 1. С. 37–42. DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-1-37-42.
3. Шкаврова Т.Г., Михайлова Г.Ф., Цепенко В.В., Голуб Е.В. База данных частоты стабильных aberrаций хромосом у детей, проживающих на радиоактивно-загрязненных территориях после чернобыльской аварии. Свидетельство о регистрации базы данных 2022620536, 15.03.2022. Заявка № 2022620389 от 09.03.2022.
4. Choi C., Chae C. Localization of classical swine fever virus in male gonads during subclinical infection. J Gen Virol. 2002 Nov; 83 (Pt 11): 2717–2721. DOI: 10.1099/0022-1317-83-11-2717.
5. Choi C., Chae C. Detection of classical swine fever virus in the ovaries of experimentally infected sows. J Comp Pathol. 2003 Jan; 128 (1): 60–6. DOI: 10.1053/jcpa.2002.0607.
6. Fan Y-H, Lin Y-L, Hwang Y-C. et al. T-cell factor-4 and MHC upregulation in pigs receiving a live attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine strain with interferon-gamma adjuvant. Vet J. 216. P. 148–56. DOI: 10.1016/j.tvjl.2016.07.009.
7. Ha S.-K., Choi C., Chae C. Development of an optimized protocol for the detection of classical swine fever virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by seminested reverse transcription-polymerase chain reaction and comparison with *in situ* hybridization. Research in Veterinary Science. 2004. 77. P. 163–169.
8. Nagarajan K., Saikumar G. Fluorescent *in-situ* hybridization technique for the detection and localization of classical swine fever virus in infected tissues. Veterinarski Arhiv. 82 (5). 2012. P. 495–504.
9. URL: <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>
10. Zhang Q., Xu Lu, Zhang Y. et al. A novel ViewRNA *in situ* hybridization method for the detection of the dynamic distribution of Classical Swine Fever Virus RNA in PK15 cells. Virology Journal. 2017. 14 (1): 81. DOI: 10.1186/s12985-017-0734-4.

**REFERENCES**

1. Velichko N.V., Rabochaya D.E., Makeeva A.S., Pinevich A.V. Taksonomicheskoe raznoobrazie cianobakterij v antarkticheskikh pochvennyh soobshchestvah, vyavlennoe metodom fluorescentnoj *in situ* gibridizacii. V sb.: Mikroorganizmy i plodorodie pochvy. Mat. I Vseross. nauch.-prakt. konf. s mezhd. uch., posvyashch. 90-letiyu so dnya rozhdeniya professora E.M. Pankratovoj. 2022. S. 27–30.
2. Karakulov R.K., Kajdarova D.R., Dushimova Z.D. i dr. Differencirovannyj podhod k terapii diffuznoj V-kрупnokletochnoj limfomy s uchetom statusa s-MYC i BCL2. Onkogematologiya. 2022. T. 17. № 1. S. 37–42. DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-1-37-42.
3. Shkavrova T.G., Mihajlova G.F., Cepenkov V.V., Golub E.V. Baza dannyh chastoty stabil'nyh aberracij hromosom u detej, prozhivayushchih na radioaktivno-zagryaznennyh territoriyah posle chernobyl'skoj avarii. Svidetel'stvo o registracii bazy dannyh 2022620536, 15.03.2022. Zayavka № 2022620389 ot 09.03.2022.
4. Choi C., Chae C. Localization of classical swine fever virus in male gonads during subclinical infection. J Gen Virol. 2002 Nov; 83 (Pt 11): 2717–2721. DOI: 10.1099/0022-1317-83-11-2717.
5. Choi C., Chae C. Detection of classical swine fever virus in the ovaries of experimentally infected sows. J Comp Pathol. 2003 Jan; 128 (1): 60-6. DOI: 10.1053/jcpa.2002.0607.
6. Fan Y-H, Lin Y-L, Hwang Y-C. et al. T-cell factor-4 and MHC upregulation in pigs receiving a live attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine strain with interferon-gamma adjuvant. Vet J. 216. R. 148-56. DOI: 10.1016/j.tvjl.2016.07.009.
7. Ha S.-K., Choi C., Chae C. Development of an optimized protocol for the detection of classical swine fever virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by seminested reverse transcription-polymerase chain reaction and comparison with *in situ* hybridization. Research in Veterinary Science. 2004. 77. R. 163–169.
8. Nagarajan K., Saikumar G. Fluorescent *in-situ* hybridization technique for the detection and localization of classical swine fever virus in infected tissues. Veterinarski Arhiv. 82 (5). 2012. P. 495–504.
9. URL: <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>
10. Zhang Q., Xu Lu, Zhang Y. et al. A novel ViewRNA *in situ* hybridization method for the detection of the dynamic distribution of Classical Swine Fever Virus RNA in PK15 cells. Virology Journal. 2017. 14 (1): 81. DOI: 10.1186/s12985-017-0734-4.

*Поступила в редакцию 17.02.2023  
Принята к публикации 03.03.2023*