

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.

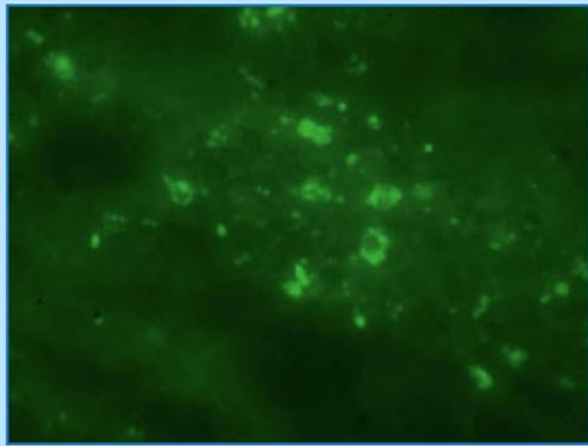
СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

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.

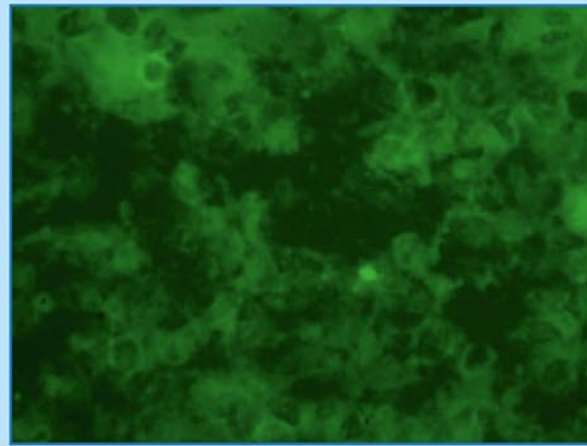
REFERENCES

1. Velichko N.V., Rabochaya D.E., Makeeva A.S., Pinevich A.V. Taksonomicheskoe raznoobrazie cianobakterij v antarkticheskikh pochvennyh soobshchestvah, vyyavlennoe metodom fluorescentnoj *in situ* gibrizacii. 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-krupnokletochnoj 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., Cepenکو 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 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. 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



А



Б

Миндалина свиньи:

А – положительный результат гибридизации *in situ*; Б – отрицательный.

Длина волны флуоресценции – 470 × 630 нм.