Иммуногистохимия и гибридизация insitu в диагностике классической чумы свиней

The immunohistochemistry and in situ hybridization in diagnostics of classical swine fever

Стаффорд В.В.
г. Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-6-4
УДК 619:616-71

Ключевые слова: классическая чума свиней, КЧС, вирус, диагностика, иммуногистохимия, гибридизация insitu, ИГХ, ИФА, ПЦР.

Key words: Immunohistochemistry, classical swine fever, CSF, virus, diagnostic, ISH, PCR, FISH.

Резюме. Обзор посвящен диагностике классической чумы свиней с применением современных лабораторных методов. Классическая чума свиней (КЧС) – высококонтагиозное вирусное заболевание домашней свиньи и дикого кабана. Вирус относится к роду Pestivirus семейства Flaviviridae, имеет генетическое родство с вирусом диареи крупного рогатого скота. Болезнь может иметь острое, подострое, хроническое и латентное течение. При определении тяжести заболевания большое значение имеет степень вирулентности вируса и время заражения. Разнообразие клинических проявлений болезни затрудняет постановку диагноза, если он основан только на клинических и патологоанатомических признаках. Поэтому необходимо проведение комплексной лабораторной диагностики, позволяющей обнаружить и идентифицировать вирус, его нуклеиновую кислоту или антиген.

Summary. This review describes diagnostics of classical swine fever using modern laboratory methods. Classical swine fever is a highly contagious viral disease of domestic swine and wild boar. The virus belongs to the family Flaviviridae, genus Pestivirus and is closely related to bovine diarrhea virus. The variety of clinical manifestations make it difficult to finalize a diagnosis based only on clinical and pathological signs. Therefore, it is necessary to conduct complex laboratory diagnostics, which would allow to detect and identify viral nucleic acid or antigens.

Введение

Вирус, вызывающий КЧС, является представителем семейства Flaviviridae, рода Pestivirus, генетически родственен вирусу диареи крупного рогатого скота [1,2,10]. Клинические признаки и патологоанатомические изменения, наблюдаемые при посмертном обследовании свиней,

пораженных КЧС, имеют широкую вариабельность. Заболевание влияет на иммунную систему, вызывая в организме животного генерализованную лейкопению, обнаружить которую возможно до наступления лихорадочного состояния. Иммунодепрессия способствует развитию смешанной инфекции, маскируя клиническую картину первоначального заболевания. Вирус КЧС вызывает изменения респираторной, лимфатической, нервной и пищеварительной систем (кишечник). Патологические поражения при КЧС не являются патогномоничными, кроме инфарктов в органах. Важно учитывать, что клиническая и патологоанатомическая картины имеют сходство с другими заболеваниями, особенно с африканской чумой свиней. Соответственно, проведение лабораторной диагностики необходимо для окончательной постановки диагноза и выбора стратегии искоренения заболевания [11, 12, 15].

Лабораторная диагностика

В лабораторной диагностике КЧС используются методы, общие для всех вирусных инфекций. Биопроба, выделение вируса, гистологические, серологические и молекулярные исследования.

Выделение вируса в клеточных культурах является наиболее чувствительным, но при этом одним из самых трудоемких методов. Поэтому предпочтение чаще отдают более быстрым лабораторным анализам, таким как иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР).

В России проведены исследования по экспрессии гена гликопротеина оболочки E2 из вакцинного и вирулентных штаммов ВКЧС. Создан набор на основе ИФА для определения вирус-специфических антител (АТ) к ВКЧС, в качестве компонентов набора использованы очищенные рекомбинантные продукты, полученные методом аффинной хроматографии с моноклональными АТ к E2 ВКЧС [4, 6, 9].

Согласно последним исследованиям гликопротеины оболочки штамма КС могут служить координатами для анализа антигенных маркеров в серологической диагностике. Поверхностный белок E2 ВКЧС способен индуцировать образование вирус-нейтрализующих АТ. Данное свойство может найти применение в диагностических тестах для оценки напряженности поствакцинального иммунитета. Существует возможность использования моноклональных АТ, полученных к эпитопам натурального гликопротеина E2 ВКЧС, для обнаружения антигенов (АГ) вируса методом ИФА [3, 14].

В России разработана высокочувствительная система выявления нуклеиновой кислоты вируса классической чумы свиней (ВКЧС) на основе ПЦР, позволяющая дифференцировать РНК ВКЧС от других вирусов данного рода и других патогенов различного генеза. Данная система детекции позволяет выявить полевые и вакцинные штаммы ВКЧС.

На основе ПЦР и рестрикционного анализа нуклеиновой кислоты ВКЧС был разработан тест, идентифицирующий вакцинный штамм КС и ЛК ВНИИВВиМ, в основу разработки вошли результаты филогенетического анализа российских полевых изолятов ВКЧС и их сравнение с первичной структурой генов штамма КС [5, 13].

В современной лабораторной диагностике существуют более информативные методы, направленные на выявление локализации вируса или его нуклеиновой кислоты, такие как иммуногистохимическое исследование (ИГХИ) и гибридизация insitu.

Авторы / Authors

В.В. Стаффорд, старший научный сотрудник, stafford.v.v@gmail.com

Я.Б. Стрельцова, аспирант

ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН им.К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко, сектор патоморфологии, г.Москва, Stafford V.V., Streltsova Ya.B.

Иммуногистохимический анализ

Одно из первых мест в современной патоморфологической диагностике занимает иммуногистохимический метод (ИГХ), разработанный в 1941 году Альбертом Кунсом. Данное исследование позволяет обнаружить локализацию АГ вируса в органах и тканях с использованием моноклональных или поликлональных АТ. Существует две формы проведения ИГХИ – прямой и непрямой методы.

При проведении ИГХ прямым методом в реакции применяют специфичные меченые антитела к АГ ВКЧС. Маркером может служить пероксидаза хрена, авидин-биотин-овый комплекс, иммунофлуоресцентная метка, например флуоресцеин-изотиоцианат.

Суть непрямого ИГХ заключается в использовании двух видов антител. Первичное АТ не имеет метки, но обладает специфичностью к АГ ВКЧС, вторичное маркированное АТ воспринимает первичное как АГ. Такой метод более трудоемкий в сравнении с прямой ИГХ, но обладает высокой специфичностью, что является одним из основных критериев в проведении успешной лабораторной диагностики.

Метод ИГХ не просто позволяет обнаружить АГ ВКЧС в пораженных тканях, но и определить степень влияния вируса на развитие патологических изменений. Исследованием можно установить тип клеток, к которым ВКЧС проявляет тропизм, изучить динамику распространения вируса в органах и тканях [8].

Гибридизация *insitu*

За рубежом для диагностики КЧС все чаще используют гибридизацию *insitu*. Метод был разработан Дж. Голлом и М.Л. Пардью в 1969 году, позволяет точно выснить местонахождение специфических последовательностей ДНК или РНК внутри клетки без дополнительного выделения нуклеиновых кислот. Комплекс современных методик включает разнообразные вариации, самой используемой из которых является флуоресцентная гибридизация *insitu* (FISH).

Основной принцип исследования заключается в обнаружении нуклеотидной последовательности ВКЧС гибридизацией с комплементарной цепью нуклеотидного зонда. Зонд представляет собой фрагменты нуклеиновых кислот с репортерными молекулами. Мечение осуществляется включением предшественников нуклеиновых кислот, конъюгированных с флуорохромами (прямое) или гаптенами (непрямое). Для обнаружения РНК ВКЧС можно использовать как ДНК, так и РНК зонды, целью которых являются гены гликопротеинов оболочки вируса, чаще Е2 ВКЧС. Нуклеиновую кислоту ВКЧС находят в срезах тканей лимфатических узлов, селезенки инфицированных свиней. При проведении FISH-диагностики зараженные макрофаги и ретикулоэндотелиальные клетки, к которым ВКЧС проявляет тропизм, демонстрируют яркую цитоплазматическую флуоресценцию.

Данный молекулярный метод обладает высокой диагностической ценностью, так как позволяет выявить точную локализацию нуклеиновых кислот, исследовать вирусный патогенез и провести дифференциацию от других патогенных агентов [7, 16].

Заключение

Методы, используемые в диагностике КЧС разнообразны, они позволяют обнаружить сам вирус, его АГ или нуклеиновую кислоту. На современном этапе развития технологий прослеживается тенденция упрощения процессов проведения лабораторных исследований, автоматизация оборудования в целях ускорения времени получения результатов и максимального увеличения их точности. Самыми популярными методами диагностики остаются ИФА и ПЦР.

Однако, несмотря на высокую чувствительность методик, не исключены погрешности и ошибки. В диагностике

КЧС особенно необходимо одновременное использование нескольких разных методов диагностики, взаимоподтверждающих результаты друг друга, для исключения ошибочных данных. Такими методами являются ИГХ и гибридизация *insitu*, которые обеспечивают визуализацию локализации вируса в инфицированных тканях. Оба метода способны дифференцировать патогены разной природы, обладают высокой точностью и эффективностью, что крайне важно в современной лабораторной диагностике КЧС.

Литература

1. Готов А.Г. Выделение на территории Российской Федерации нецитопатогенного изолята 2-го генотипа вируса диареи - болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота / А.Г. Готов, Т.И. Глотова, А.Г. Южаков, А.Д. Забережный, Т.И. Алипер // Вопросы вирусологии. - 2009. - Т. 54. - № 5. - С. 43-47.
2. Забережный А.Д. Современная таксономия вирусов/ А.Д. Забережный, Л.В. Костина, А.Г. Южаков, И.А. Гулюкина, Т.В. Степанова, В.В. Стаффорд, И.В. Полякова, Е.И. Дроздова // Ветеринария и кормление. - 2017. - № 1. - С. 4.
3. Костина Л.В. Получение и характеристика моноклональных антител к белку Е2 (gp55) вируса классической чумы свиней / Л.В. Костина, Е.А. Непоклонов, А.Д. Забережный, А.Ф. Валихов, А.Ю. Козлов // Вопросы вирусологии. - 2008. - Т. 53. - № 5. - С. 36-40.
4. Кривонос А.В. Синтез и иммунохимические свойства рекомбинантного главного поверхностного гликопротеина Е2 вируса классической чумы свиней / А.В. Кривонос, А.Д. Забережный, Т.В. Гребенникова, М.И. Мусиенко, Р.А. Гибадулин, В.В. Цибезов, В.С. Богданова, С.Л. Кальнов, Т.И. Алипер, Е.А. Непоклонов // Вопросы вирусологии, №2, 2000. - С. 29-36.
5. Куриннов В.В. Клиническая и лабораторная диагностика классической чумы свиней / В.В. Куриннов, А.Д. Забережный, Т.В. Гребенникова, С.Ж. Цыбанов, А.А. Коломыцев, А.А. Стрижаков и др. // Ветеринария. - 2004. - №5. - С. 18-22.
6. Раев С.А. Использование бакуловирусной системы экспрессии генов при разработке вакцин против вирусных болезней свиней / С.А. Раев, Т.И. Алипер, К.П. Алексеев, А.Д. Забережный, Е.В. Шемельков, М.М. Мусиенко, Б.Г. Орлянкин, О.А. Верховский // Сборник тезисов 7 Московского меконгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития". Сборник тезисов 7 Московского международного конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития". - 2013. - С. 42-45.
7. Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. // Учебно-методическое пособие. - СПб.: "СОЛО", - 2008. - С. 72.
8. Стаффорд В.В. Применение иммуногистохимического метода в диагностике // RJOAS. - 2016. - 8(56). - С. 18-21.
9. Цибезов В.В. Применение рекомбинантного белка Е2 вируса классической чумы свиней для иммунизации животных / В.В. Цибезов, В.С. Богданова, А.Д. Забережный, Т.В. Гребенникова, А.В. Кривонос, Л.А. Дудников, С.Л. Кальнов, Т.И. Алипер, Е.А. Непоклонов // Вопросы вирусологии, №2, 2000. - С. 36-41.
10. Южаков А.Г. Филогенетический анализ нецитопатогенных изолятов вируса диареи крупного рогатого скота/ А.Г. Южаков, Г.И. Устинова, А.Г. Готов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, О.В. Кунгурцева, А.Д. Забережный, Т.И. Алипер // Ветеринария. - 2009. - № 6. - С. 29-32.
11. Blome S. Classical Swine Fever-An Updated Review / Sandra Blome, Christoph Staubach, Julia Henke, Jolene Carlson, Martin Beer // Viruses. -2017. -9(4). - P. 86.
12. Vlasova A. Molecular epidemiology of classical swine fever in the Russian Federation / A. Vlasova, T. Grebennikova, A. Zaberezhny, T. Aliper, E. Nepoklonov, I. Greiser-Wilke, G. Floegel-Niesmann, V. Kurinnov // Journal of Veterinary Medicine, Series B. - 2003. - Т. 50. - № 8. - С. 363-367.
13. Zaberezhny A.D. Differentiation between vaccine strain and field isolates of classical swine fever virus using polymerase chain reaction and restriction test / A.D. Zaberezhny, T.V. Grebennikova, T.I. Aliper, E.A. Nepoklonov, V.V. Kurinnov, S.G. Tsybanov, I.F. Vishnyakov, S.F. Bikitov // DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift. - 1999. - Т. 106. - № 9. - С. 394-397.
14. Kozlov A. "Epitope mapping of the E2 glycoprotein of Classical Swine Fever Virus" / A. Kozlov, L. Kostina, A. Zaberezhny, T. Aliper, E. Nepoklonov // 91 Annual Conference of Research workers in Animal Diseases (CRWAD). - Chicago. -2010. -P. 111.
15. Lowings J.P. Classical swine fever virus diversity and evolution / Lowings J.P., Ibata G., Needham J., Paton D.J. // J. Gen. Virol.-1996.- Vol.77.-P. 1311-1321.
16. Nagarajan K. Fluorescent in-situ hybridization technique for the detection and localization of classical swine fever virus in infected tissues / Kumaresan Nagarajan, Guttula Saikumar // Veterinarski Arhiv. - 2012. - 82(5). - P. 495-504.