

На правах рукописи

СТАФФОРД
Виктория Васильевна

**ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОГО
РЕПРОДУКТИВНОГО И РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2018

Работа выполнена в ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор, **Забережный Алексей Дмитриевич.**

Официальные оппоненты:

Власова Наталья Никифоровна - доктор биологических наук, главный научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Малоголовкин Александр Сергеевич - кандидат биологических наук, заместитель директора по научно-исследовательской работе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии».

Ведущая организация: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности».

Защита состоится « ___ » _____ 2018 года в 13.00 на заседании диссертационного совета Д 006.033.02, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской Академии Наук» по адресу: 109428, г.Москва, ул. Рязанский проспект, д.24, к.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН <http://www.viev.ru>.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2018 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

И.Ю. Ездакова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Репродуктивный и респираторный синдром свиней (PPCC) наносит ощутимый экономический ущерб свиноводству, который складывается из гибели молодняка, затрат на лечебные мероприятия и недополучение мясной продукции от более возрастных групп животных. По данным исследователей, в неблагоприятных хозяйствах, из числа свиней с клиническими признаками респираторной патологии гибель на 80% обусловлена действием вирулентного вируса PPCC (Wasilk A., 2015). Данный вирус распространен повсеместно, отнесен к двум генетическим типам – американскому с 9 подтипами и европейскому с 3 подтипами (Yaeger M., 2002).

Поскольку вызываемое вирусом PPCC заболевание относится к группе респираторных патологий, то и клинические признаки будут сходные с заболеваниями, имеющими иное этиологическое начало. Из анализа научных работ, возбудителями таких заболеваний могут быть как бактерии и вирусы, так и микоплазмы (Sibila M., 2009). Многими авторами отмечено совместное действие вирусов PPCC и ЦВС-2. В отличие от других инфекций, PPCC у взрослого поголовья животных, протекает бессимптомно, что оказывает существенное влияние на эпизоотическую ситуацию (Pallarés, F.J., 2002; Kim J., 2003; Zimmerman J.J., 2012).

На сегодняшний день проводимые мероприятия по вакцинации позволяют повысить показатели воспроизводства животных, но не решают вопрос с циркулирующей вирусом полностью.

Актуальными остаются вопросы о степени патологического влияния репродуктивного и респираторного синдрома на органы животного, распространении вируса в организме и его взаимосвязь с происходящими гистоморфологическими изменениями в органах (Rovira A., 2002). Данные проблемы осложняются наличием разнообразных патогенов, оказывающих целый комплекс патологического влияния и осложняющих диагностику основного заболевания (Kim J., 2002). При диагностических мероприятиях, применяемых на сегодняшний день, необходимо учитывать следующие особенности: при проведении реакции нейтрализации, выявление вируснейтрализующих антител к вирусу PPCC возможно только на 45 день (Meulenberg J.J., 1993); применяемый метод ПЦР позволяет выявить присутствие вируса, но не дает прямого подтверждения о роли данного вируса в наблюдаемых пораженных органах и тканях. Таким образом, подтверждение этиологической роли вируса PPCC при респираторной патологии остается актуальной задачей (Гребенникова Т.В., 2005).

Степень разработанности темы. Заболевание свиней с симптомами РРСС известно чуть более 30 лет, данный синдром привлекает внимание ученых во всем мире. В Российской Федерации известны публикации Орлянкина Б. Г., Алипера Т. И., Гребенниковой Т. В., Забережного А. Д., и др, в которых детально отражены вопросы молекулярной биологии возбудителя, геномных технологий, эпизоотологии РРСС (Гребенникова Т.В., 2005; Орлянкин Б.Г., 2005; Орлянкин Б.Г., 2010; Забережный А.Д., 2017). На фоне хорошо изученных вопросов о структуре возбудителя заболевания, не до конца изученными остается цитопатологическое действие вируса *in vivo*, принципы его взаимодействия с иммунными клетками животного, закономерности его распределения в органах и тканях. Таким образом, с учетом эпизоотологии РРСС, его этиологическая роль в респираторной патологии, где он участвует в сочетании с другими патогенами, каждый раз требует подтверждения, так как окончательный диагноз можно поставить, только доказав репликацию вируса *in vivo*.

Цель исследования – Изучить патоморфологические и иммуногистохимические характеристики репродуктивного и респираторного синдрома свиней в условиях эксперимента и при эпизоотическом процессе в свиноводческих хозяйствах.

Для реализации цели исследования необходимо решение ряда конкретных задач:

1. Выполнить экспериментальное заражение поросят референтным штаммом Lelystad и полевым патогенным изолятом вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней
2. Изучить патологоанатомические изменения в органах поросят при экспериментальном заражении и у инфицированных свиней в естественных условиях.
3. Изучить гистологические изменения в органах и тканях при экспериментальном заражении и у естественно инфицированных свиней.
4. Разработать тест-систему для иммуногистохимического выявления антигена нуклеокапсидного белка вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней на основе моноклональных антител отечественного производства.
5. Определить распределение вируса в органах и тканях организма свиней с помощью иммуногистохимического метода у экспериментально зараженных свиней вирусом репродуктивного и респираторного синдрома и у животных в период эпизоотий в свиноводческих хозяйствах.

Научная новизна

Применение иммуногистохимического метода позволило расширить и уточнить данные патоморфологических исследований органов свиней при естественной и экспериментальной инфекции РРСС. Определены гистоморфологические изменения в паренхиме и строме легкого, бронхиальных лимфатических узлов и других паренхиматозных органах при экспериментальном заражении и естественном инфицировании. Прослежена динамика диссеминации возбудителя в организме свиней.

Разработан метод иммуногистохимической диагностики РРСС, на основе отечественных моноклональных антител 4h7h9. Данные моноклональные антитела к капсидному белку вируса РРСС позволяют выявить возбудителя болезни в органах и тканях свиней при заражении европейским и американским типами вируса. Иммуногистохимическое исследование может служить в качестве подтверждения данных патоморфологических исследований и использоваться как альтернативный метод диагностики РРСС.

Теоретическая и практическая значимость

Регламент проведения иммуногистохимической диагностики РРСС апробирован при проведении диагностических исследований в хозяйствах, неблагополучных по респираторным и репродуктивным заболеваниям свиней. На основе анализа экспериментального материала и образцов, полученных из свиноводческих хозяйств, неблагополучных по респираторным патологиям и имеющих проблемы воспроизводства, разработана методика выявления вируса РРСС в органах и тканях больных и экспериментально зараженных свиней с использованием отечественных моноклональных антител. Разработаны методические рекомендации по иммуногистохимической диагностике РРСС свиней, которые утверждены на Секции зоотехния и ветеринария отделения сельскохозяйственных наук РАН от 01.12.16. Выдан патент на изобретение «Способ диагностики репродуктивного респираторного синдрома свиней непрямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител» № 2645114. Метод является важным звеном комплексной диагностики, позволяющей определить этиологическую роль вируса РРСС, что дает основание для выбора стратегии иммуноспецифической профилактики.

Методология и методы исследования. При выполнении работы были применены методы направленные на комплексную диагностику репродуктивного и респираторного синдрома свиней, и включали в себя применение полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализа и гистологические методы. Кроме этого, были применены

патологоанатомические и патоморфологические исследования. Оригинальным исследованием является получение данных о диссеминации антигена вируса в органах и тканях свиней с помощью иммуногистохимической реакции. Применены методы научного познания: экспериментальное заражение животных, наблюдение, выявление вируса, интерпретация и обобщение.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработан метод иммуногистохимического выявления вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней в органах, который даёт возможность повысить достоверность диагностики заболевания и подтвердить тропность вируса к клеткам и тканям органов свиней.

2. Иммуногистохимический анализ, выполненный с применением отечественных моноклональных антител, является универсальным для американского и европейского типов вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней.

3. Результаты иммуногистохимического теста репродуктивного и респираторного синдрома свиней коррелируют с данными, полученными молекулярно-биологическим (ПЦР) и иммуноферментным методами (ИФА) при исследовании патологического процесса.

4. Результаты иммуногистохимического исследования, при экспериментальном заражении свиней вирусом РРСС свидетельствуют о том, что основные патологические изменения локализуются в легких и бронхиальных лимфатических узлах, и сопровождаются накоплением вируса в альвеолярных и свободных макрофагах, а изменения, выявленные в других паренхиматозных органах, носят второстепенный характер.

5. Применение предложенного непрямого метода иммуногистохимической диагностики репродуктивного и респираторного синдрома свиней позволяет выявить взаимосвязь между патогистологическими изменениями в органах свиней и диссеминацией вируса.

Степень достоверности результатов исследований.

Достоверность полученных результатов обусловлена большим объемом исследованного материала, работой по экспериментальному заражению животных в сравнении с исследованиями патологического материала поросят инфицированных в естественных условиях. Корреляцией полученных результатов исследования с методами ПЦР и ИФА. Для определения специфичности моноклональных антител (МАТ) исследовали их на матрице референтных штаммов вируса РРСС. Для морфологического исследования использовали гистотехнические методики. Для выявления

вируса в органах и тканях свиней и определения клеток-мешений использовали не прямое ИГХ исследование.

Апробация работы.

Работа выполнялась в рамках государственного задания №0578-2015-0001 «Разработать метод применения непрямого иммуногистохимического исследования в органах и тканях свиней для диагностики репродуктивного респираторного синдрома свиней и цирковирусной инфекции свиней 2 типа». Полученные в ходе работы данные представлены на ежегодных отчетах Ученого Совета ФГБНУ ВИЭВ и апробированы на IV международной конференции «Инновационные разработки молодых ученых - развитию агропромышленного комплекса», ВНИИОиК, Ставрополь 2016; VII International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2016" Босния и Герцеговина, Ягорина 2016; 97th Annual Conference of Research Workers in Animal Diseases, США Чикаго (Иллинойс) 2016; VII Международном ветеринарном конгрессе, Уфа 2017.

Публикации результатов по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 1 методическое наставление, из них 5 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, выдан патент № 2645114.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах компьютерного набора и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, материалов и методов проводимых исследований; содержит экспериментальную часть, заключение и выводы. В заключительной части диссертации представлен библиографический список используемой литературы, состоящий из 158 источников, из которых 37 – отечественные, 121 зарубежные. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 37 рисунками.

Личный вклад автора. Основные этапы диссертационной работы выполнены автором самостоятельно и включают в себя: анализ отечественной и зарубежной литературы; планирование исследований; отбор патологического материала; исследование, анализ и интерпретация полученных данных; экспериментальная часть выполнена автором лично и совместно с сотрудниками лаборатории болезней свиней ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Работа выполнялась согласно государственному заданию № 0578-001-2015.

Благодарность. Автор выражает благодарность д.б.н., профессору Алиперу Т.И., д.б.н., профессору Верховскому О.А., член-корреспонденту РАН, д.б.н., профессору Гребенниковой Т.В., к.в.н. Раеву С.А., к.б.н. Алексееву К.П., к.б.н. Южакову А.Г., к.б.н. Корицкой М.А., к.б.н. Цибезову В.В., к.б.н. Козлову А.Ю, к.б.н. Костиной Л.В., к.в.н., доценту Илиешу В. Д.,

к.с/х.н., доценту, Дробину Ю. Д. за оказанное содействие в проведении исследований и всестороннюю помощь.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Работа выполнена в секторе патоморфологии и на опытной базе Вышневолоцкого отдела ВИЭВ на острове Лисий в период с 2014 по 2017 гг.

Для исследования была использована сыворотка крови и паренхиматозные органы поросят в возрасте от 21 до 240 дней, экспериментально зараженных на опытной базе ВИЭВ и естественно больных из свиноводческих хозяйств Московской, Смоленской, Ростовской и Тюменской областей. Было использовано 40 поросят, 210 образцов патологического материала и более 800 гистологических препаратов.

Схема эксперимента. Для заражения поросят использовали патогенный полевой изолят вируса РРСС в титре $4,66 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и референтный штамм Lelystad вируса РРСС, с инфекционной активностью $5,0 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Вирусосодержащий материал вводили в дозе 2 см^3 внутримышечно и 3 см^3 интраназально; животным контрольной группы вводили неинфицированную культуру клеток MARK-145 таким же методом и соответствующей дозе.

В ходе каждого эксперимента за животными велось ежедневное наблюдение, термометрия.

Первый отбор крови, из краниальной поллой вены, для получения сыворотки выполняли через 24 часа после заражения, затем каждые 48 часов или в зависимости от габитуса животного. Внутренние органы для последующего патоморфологического исследования, включая ИГХ, отбирали постмортально или после проведения диагностических убоев.

Сыворотку крови экспериментально зараженных животных исследовали на наличие генома вируса РРСС с помощью тест-системы на основе ПЦР согласно рекомендациям производителя («Ветбиохим», Россия). При положительном результате ПЦР проводили определение инфекционной активности вируса в культуре клеток альвеолярных макрофагов свиней (АМС). Для этого клетки АМС засеивали в 96-луночные культуральные планшеты (Costar, США) в концентрации 1×10^5 клеток/лунку. Далее готовили десятикратное (от 10^{-1} до 10^{-6}) разведение вируса, вносили каждое из них в 4 лунки планшета в объеме 100 мкл и инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 37°C в течение 4-5 суток. В контроле клеток объем вируса заменяли ростовой средой. Накопление вируса РРСС оценивали методом микроскопии по его цитопатическому действию (ЦПД), инфекционный титр вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в $\text{Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Выявление IgG-антител к вирусу

РРСС в сыворотке крови проводили в ИФА с помощью набора «РРСС-Серотест плюс» («Ветбиохим», Россия).

Для ИГХ метода использовали моноклональные антитела 3h9, 4h7h9, специфичные к капсидному белку вируса РРСС. Данные антитела получены в ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МинЗдрав РФ, Костиной Л.В. и Козловым А.Ю. Материалом для исследований служили почки, печень, селезенка, миокард, лимфатические узлы (бронхиальные, паховые, предлопаточные), трахея и легкие.

Полученные образцы органов помещали в 10% раствор забуференного нейтрального формалина. Для криотомной методики использовали нативные образцы доставленные в лабораторию на льду не позднее 36 часов после отбора.

Для патоморфологического исследования полученного материала применяли парафиновую и криотомную методики для стандартного, специфического и ИГХ окрашивания.

Для экспериментального заражения было использовано 30 поросят. От каждого поросенка, для исследования, отбирали органы: лимфатические узлы (бронхиальный, предлопаточный, паховый), почки, селезенка, печень, миокард, трахея и кровь, для получения сыворотки.

Для исследования патологического материала при естественном заражении, отбирали пробы от 10 поросят из свиноводческих хозяйств Московской, Смоленской, Ростовской и Тюменской областей.

В общей сложности, было исследовано 210 образцов органов от 40 поросят и более 800 гистологических срезов. Количество исследованных сывороток крови составило: 30.

2.1.1. Парафиновая проводка.

Отобранный материал фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, в течение 72 часов, размер объектов 1*1*0,5см.

Далее, органы пропитывали в автоматической установке карусельного типа, фирмы Thermo Scientific (Германия). Схема и принципы программирования подробно описаны в диссертации.

После пропитывания материал заливали горячим парафином в металлические формы и при помощи гистологических колец формировали блоки на криоконсоле при поверхностной температуре -10⁰С, Thermo Scientific (Германия). Готовые парафиновые блоки нарезали на санном микротоме фирмы Thermo Scientific (Германия), толщина срезов составляла 3-5мкм. После микротомы срезы переносили в водяную баню Microm SB-80 на дистиллированную воду, подогретую до температуры 47⁰С. Для необходимой

фиксации парафинового среза на предметное стекло наносили глицериновый альбумин по Маллоури, что придавало оптимальную адгезию и минимизировало возможные артефакты.

После просушивания гистосрезов на нагревательном столике фирмы Medax (Германия), проводили гистотехнические мероприятия, направленные на освобождение срезов от парафина и стандартную окраску материала направленную на выявление возможных патологий (гематоксилин – эозиновая окраска). Для этой цели использовали автоматическое оборудование фирмы Thermo Scientific (Германия), схема и принцип программирования описаны в диссертации. Специфическую окраску выполняли ручным методом, в вытяжном шкафу. Часть парафиновых срезов была исследована гистохимически, а другая часть предназначалась для иммуногистохимического исследования.

2.1.2. Криотомия.

Для изготовления нативных гистологических препаратов, камеру криотома фирмы Thermo Scientific (Германия) с необходимым инвентарем (предметные столики, микротомные ножи, кисточки) предварительно охлаждали до температуры -35°C .

Для формирования криотомного блока, на охлажденный предметный столик наносили небольшое количество криогеля «Neg-59» (США) и сразу же располагали исследуемый материал. Затем, давали застыть криогелю и после наносили необходимое количество геля так, чтобы замораживающая среда покрывала весь объект, это способствовало прочному закреплению фрагмента органа на предметном столике и его равномерному охлаждению. Время полной заморозки объекта – 40 – 60 мин. После окончательной заморозки исследуемых объектов, предметный столик закрепляли в держателе, выполняли грубую подгонку толщиной 50 микрон до получения нужной плоскости. Далее, работу продолжали при толщине среза 5 микрон. Наиболее качественные срезы помещали на предметные стекла Thermo scientific Superfrost ultra plus или X-tra Adhesive (Германия), маркировали их, часть срезов окрашивали рутинным методом (Гематоксилин – Эозин), а часть для иммуногистохимического исследования.

2.1.3. Определение оптимальной концентрации антител.

Отработка метода заключалась в следующем:

Из одного блока делали необходимое количество идентичных срезов: для стандартной окраски на патологическую морфологию, и остальные для отработки необходимой концентрации специфичных к капсидному белку вируса РРСС моноклональных антител. Для этого брали антитела в рабочем разведении: 1:500, 1:800, 1:1000 и 1:1500. Разбавление МАТ выполняли с

помощью ресуспендирования концентрата АТ в ФСБ рН 7.7. Вторичные антивидовые АТ (меченные пероксидазой хрена) использовали в разведении 1:200 с тем же ФСБ.

Кроме отработки необходимой концентрации антител, нами были использованы несколько схем выполнения непрямого ИГХИ, которые отличались по составляющим компонентам и по времени выполнения самого исследования.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе опытов по заражению референтным штаммом Lelystad вируса РРСС с инфекционной активностью $5,0 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ привело к развитию незначительной клинической симптоматики: у инфицированных животных наблюдалось снижение аппетита и вялость в течение 6 – 8 суток после заражения. В сыворотке крови вирус РРСС был обнаружен на 2-е сутки после заражения методом ПЦР, а вирус-специфические IgG-антитела в ИФА – на 9-е. Максимальный титр накопления вируса в сыворотке крови зафиксирован на 8-е сутки после заражения ($10^{2,5} \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$), после чего оставался таким без достоверных изменений до окончания периода наблюдения.

В эксперименте с вирулентным штаммом вируса РРСС, в титре $4,66 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, 50% поросят пало в первые 24 часа от начала эксперимента с признаками асфиксии и гипертермии до 42°C . У поросят павших на 5-6 сутки, клинические проявления были значительно характернее и выражались в развитии апатии, отказом от корма, тремором, развитием патологий кожного покрова. Титр накопления вируса РРСС в легких и лимфатических узлах составил $10^{2,0-2,5} \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

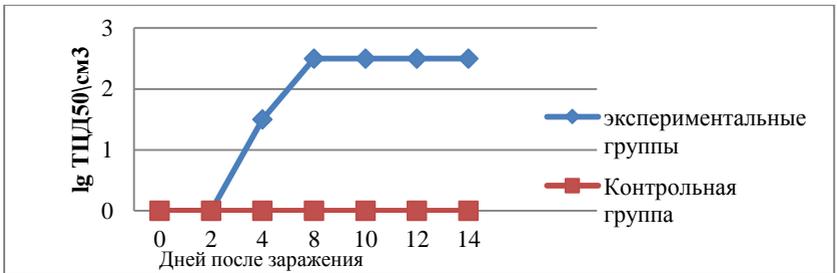


Рисунок – 1 Динамика содержания вируса РРСС в сыворотке крови поросят. Приведены среднегеометрические значения величин для животных каждой группы.

Клиническое состояние поросят контрольных групп на протяжении всех экспериментов оставалось неизменным, у животных не наблюдалось сероконверсии, результаты ПЦР показали отсутствие генома вируса РРСС в

сыворотке крови, легких и лимфатических узлах. При ИГХ исследовании контрольных образцов был получен отрицательный результат.

В таблице 1 представлены данные исследования патологического материала методом ИФА и ПЦР. Показано соотношение положительно и отрицательно реагирующих проб к общему числу материала.

Таблица 1 – Корреляция результатов исследования материала.

Метод \ Материал	ИФА	ПЦР
Сыворотка крови (экспериментальное заражение)	20/20	20/20
Легкое (экспериментальное заражение)	20/20	20/20
Бронхиальный лимфатический узел (экспериментальное заражение)	18/18	18/18
Сыворотка крови (контроль)	10/0	10/0
Легкое (контроль)	10/0	10/0
Лимфатический узел (контроль)	10/0	10/0

Основными критериями при исследовании патологического материала из свиноводческих хозяйств являлось наличие характерных клинических признаков заболевания у супоросных свиноматок и поросят в первые месяцы жизни животных, а также оценка эпизоотической ситуации внутри хозяйства и характер проводимых ветеринарных мероприятий. Необходимость проводимых исследований определялась затрудненной дифференциальной диагностикой инфекционного процесса и установлением окончательного диагноза. При вспышках заболевания с характерной клинической картиной у поросят в возрасте до 4 месяцев и супоросных свиноматок. Клинико-морфологические изменения у поросят наблюдались в подсосном периоде и при отъеме. Репродуктивная патология у супоросных свиноматок характеризовалась абортами во второй половине супоросности и рождением слабых или нежизнеспособных поросят. У выживших поросят, в возрасте 2-4 мес, наблюдали гипертермию, цианоз кожи ушных раковин и пяточка, учащенное дыхание, диарею. В последующие периоды выращивания регистрировали случаи смертельных исходов с признаками асфиксии, цианоза и некроза участков кожи.

3.1. Патологоанатомические данные

Развитие наиболее выраженных клинических признаков болезни наблюдалось в случае летального исхода (через 24 часа и более) после экспериментального заражения вирулентным штаммом вируса РРСС в титре $4,66 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и при исследовании патологического материала из

свиноводческих хозяйств. При наружном осмотре трупов отмечали следующие изменения покровного эпителия:

На коже, в районе лицевого отдела черепа наблюдали темно-фиолетовый цвет мягких тканей пяточка, посинение кожи верхней и нижней челюсти (Рис. 2). Подобные изменения цвета кожи распространялись по вентральной поверхности шеи, затрагивая латеральные участки угла нижней челюсти (Рис. 3.).

Далее синюшность распространялась на латеральную и медиальную поверхность свободных конечностей (Рис. 3 и Рис. 4) и имело разлитой характер, от проксимальных до дистальных участков конечностей.



Рисунок 2 – Дермальная патология в области лицевого отдела черепа.



Рисунок 3 – Дермальная патология в вентральной области шеи и латеральных и медиальных поверхностях грудных конечностей

Нами было отмечено, что, несмотря на разлитой характер, участки с измененным цветом кожи имели и четкие границы, располагались в виде точечных покраснений разного размера, местами сливаясь в одно большое пятно, приобретая синий оттенок. Подобные изменения наблюдались на коже с вентральной поверхности в районе грудины (Рис. 5), начинаясь от области рукоятки грудины, и заканчиваясь в лонной области.



Рисунок 4 – Дермальная патология в паховой области и на латеральных и медиальных поверхностях тазовых конечностей



Рисунок 5 – Обширные и точечные кровозлияния на коже.

Вскрытие трупов животных проводили по правилам патологоанатомического вскрытия, по белой линии. Проводили визуальный

осмотр органокомплекса, правильность анатомической топографии органов грудной и брюшной полостей.

У животных контрольных групп не наблюдалось патологий в топографии органов. У животных экспериментальных групп были выявлены те или иные изменения макрокартины органов, приводящие к нарушению топографических границ органов в различной степени.

Макроскопически, паренхима органов выглядела отёчной, а в легочной ткани (Рис. 6), в дополнение ко всему, отмечали участки кровоизлияний пропитывающие ткань вглубь органа, на срезе отмечали обильное отделяемое темно красного цвета. Лимфатические узлы, в основной массе, имели упругую консистенцию, но стоит отметить, что в предлопаточном узле (Рис. 7) пульпа выглядела отёчной и выступала над поверхностью среза, у бронхиального узла была рыхлая консистенция, отмечали подкапсульные петехии (Рис. 8).



Рисунок 6 – Лёгкое с диффузными участками кровоизлияний



Рисунок 7 – Предлопаточный лимфатический узел



Рисунок 8 – Бронхиальный лимфатический узел рыхлой консистенции.

После оценки макроскопических изменений паренхиматозных органов выполняли отбор патологического материала для дальнейшего исследования.

3.2. Микроскопия.

В срезах легких наблюдали обширные участки кровоизлияний в просвет бронха, в паренхиму и диффузное расположение эозинофилов в ней. Кроме того, в бронхиальной ткани отмечали отёк подслизистого слоя, десквамацию реснитчатого эпителия в просвет бронха (Рис. 10), в самых тяжелых случаях выявлена полная обтурация просвета бронха экссудативным пролифератом и наличие некротических элементов (Рис.11). В бронхах контрольной группы (Рис. 9) гистоархитектоника тканей сохранена, структурные элементы просматриваются хорошо.

В контрольной группе животных гистоархитектоника печени была сохранена (Рис. 12).

Экспериментальная группа животных: Строма органа в состоянии отека, внутри долек печени выявлены как диффузные, кольцевидные скопления клеток лимфоидного типа, так и с более чёткими границами, но с

участками кровоизлияний, отек стромы органа. Десквамация интимы портальной вены и собственной артерии (Рис. 13).

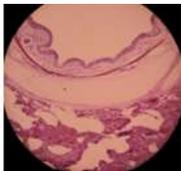


Рисунок 9 – Стенка крупного бронха. Контроль. Гематоксилин и эозин. Ув.200

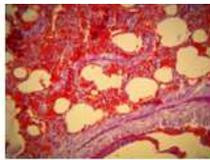


Рисунок 10 – Альвеолярный и бронхиальный фрагменты легкого. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.



Рисунок 11- Просвет бронха. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 200.

Так же выявлено скопление лимфоидных клеток в районе триады печени, отек стенки собственной артерии десквамация её эпителия и интимы портальной вены. Отмечали диффузное кровоизлияние в паренхиме органа с преобладанием смазанности рисунка, наблюдали кариопикноз и лизис гепатоцитов, кариомегалию Купферовых клеток (Рис. 14).



Рисунок 12 – Печень. Контрольная группа. Гематоксилин и эозин. Ув. 100



Рисунок 13 – Печень. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 200.



Рисунок 14 – Печень. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

После экспериментального заражения поросят вирулентным полевым изолятом вируса РРСС и при наступившей смерти в течение первых нескольких суток, гистоархитектоника селезенки характеризовалась дисконкомплексацией клеток белой пульпы, которая выражалась в нарушении границ узелковых зон, вплоть до их слияния. Также, выявляли диффузные скопления гемосидерина, наличие которого говорит об усиленном разрушении клеток эритроцитарного ряда (Рис. 15).

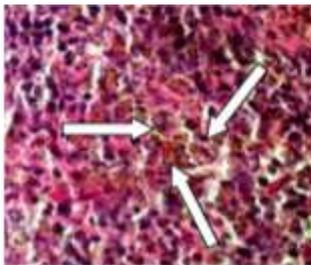


Рисунок 15 – Скопление гемосидерина в селезенке. Опыт. Ув. 400.

В почках, на микроуровне, вследствие разрушения клеток наблюдали смазанность рисунка дистальных и проксимальных канальцев. Выявлены локализованные участки кровоизлияний, обширное пропитывание ткани органа зернистыми эозинофилами. В канальцах почек наблюдали десквамацию эпителия в просвет, отёк клубочков и кровоизлияния (Рис. 16).

В срезах бронхиальных лимфатических узлов экспериментальных групп животных (Рис. 17) наблюдали дисконфракцию клеток паренхимы белой пульпы. Лимфатические фолликулы без четких границ, герминативная зона не была выражена, маргинальная и мантийная зоны отсутствовали. Вследствие развития заболевания, заметен отек стенки фолликулярной артерии, набухание капсулы и трабекул. В трабекулярной части узла выявляли большое количество зернистых эозинофилов.



Рисунок 16 – Почка.
Гематоксилин и эозин. Ув. 200.



Рисунок 17 – Бронхиальный
лимфатический узел
Гематоксилин и эозин. Опыт.
Ув.200.

При окраске на выявление фибрина были получены следующие результаты:

- в бронхиальном лимфатическом узле отмечали наличие гемосидерина в паренхиме органа и фибрина в просвете вен, который заполнял практически весь просвет сосуда, а также выявлено периваскулярное отложение фибрина (Рис. 18).

- в просвете крупных бронхов отмечали обширные участки некроза слизистого и подслизистого слоя с наличием большого количества фибрина с глубокой альтерацией слизистого слоя бронхов (Рис. 19).

Отмечали, ателектаз альвеол. В межальвеолярных перегородках выявляли лимфогистеоцитарную инфильтрацию с небольшим количеством фибрина на слизистой оболочке (Рис. 20).

Полученные нами данные по патологоанатомическим и патоморфологическим изменениям были схожи с экспериментальными данными и в основном отражали хроническое течение болезни. Гистопатологическая картина в легких и бронхиальных лимфатических узлах поросят из свиноводческих хозяйств характеризовались идентичными патоморфологическими изменениями.



Рисунок 18 – Бронхиальный лимфоузел. Ув. 100. Окраска на фибрин.

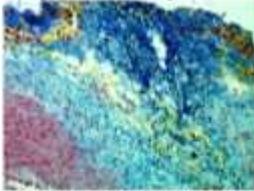


Рисунок 19 – Просвет крупного бронха. Окраска на фибрин. Ув. 100.

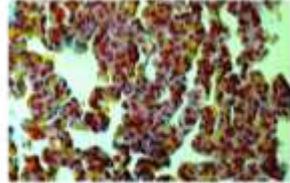


Рисунок 20 – Альвеолы легкого. Окраска на фибрин. Ув. 100.

3.2.1. Иммуногистохимическое исследование.

Иммуногистохимическое исследование выполняли на поросятах 21 дневного возраста (экспериментальный материал) и 1-3 месячных поросятах (свиноводческие хозяйства). ИГХ исследование материала полученного из свиноводческих хозяйств выполняли после отработки методики на экспериментальных образцах.

Иммуногистохимическое исследование парафиновых срезов без докраски гематоксилином Майера.

Парафиновые срезы, предназначенные для ИГХ исследования, депарфинировали, отмывали в спирте восходящей концентрации и доводили до воды. Затем их промывали в дистиллированной воде. После отмывки срезов их (не высушивая) выдерживали в смеси этилового спирта 96⁰С 30мл и ФСБ 70мл, при +4⁰С – 60мин, а после этого высушивали в потоке воздуха. Далее на срезы наносят 3% раствор перекиси водорода на ФСБ pH 7,7 при 37⁰С на 40мин. После удаления эндогенной пероксидазы, срезы отмывают в ФСБ 3 раза по 10мин при комнатной температуре. Во время отмывки стекол, готовят

блокирующий 5% раствор обезжиренного сухого молока в ФСБ pH 7,7 и затем инкубируют при 37°C, 40 минут. Ополаскивают в ФСБ 3 раза по 10мин при комнатной температуре. Пока идет процесс ополаскивания, готовят раствор рабочей концентрации первичных антител, специфичных к капсидному белку вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней. Рабочий раствор АТ готовят на ФСБ pH 7,7. Данный раствор подбирается опытным путем в соответствии с чувствительностью антител. Для данной цели необходимо иметь положительный контроль. Обычно разведение АТ составляет от 1:800 до 1:1500. На стекла наносят первичные АТ и помещают в термостат во влажную камеру при 37°C на 80мин. После инкубации, промывают при комнатной температуре в ФСБ 3 раза по 10мин. Пока идет процесс ополаскивания готовят рабочий раствор вторичных АТ с меткой пероксидазы хрена для проведения непрямого метода ИГХИ. Раствор АТ готовят на 5% растворе сухого обезжиренного молока на ФСБ pH 7,7. Как правило, разведение АТ составляет 1:200. На стекла наносят вторичные АТ и помещают в термостат во влажную камеру при 37°C на 40мин. Промывают в ФСБ с Твином-50 3 раза по 10мин при комнатной температуре. Для специфического окрашивания пероксидазной метки, перед использованием готовят рабочий раствор субстрата на Na-фосфатном буфере. Рабочий раствор готовится непосредственно перед работой, годен 12 час. Маточный раствор хранится при +4°C:

Маточный раствор: 0,02г АЭК растворяют в 3мл ДМФ. Работу необходимо выполнять в перчатках и в вытяжном шкафу. Необходимо помнить, что данный раствор обладает канцерогенными свойствами.

Рабочий раствор готовят на 0,02 М Na-фосфатном буфере, pH 5,0 – 5мл, с добавлением 300мкл маточного раствора и 1 мкл 3% раствора перекиси водорода.

Рабочий раствор наносят на срезы в количестве 200мкл, стекла помещают во влажную камеру в термостат при 37°C на 30 мин. Для прекращения реакции срезы аккуратно промывают в дистиллированной воде. Дегидрируют аккуратно в 3 порциях этилового 96°C спирта. Наносят монтирующую среду и закрывают покровным стеклом.

Иммуногистохимическое исследование срезов с докраской гематоксилином Майера.

Для дифференциальной окраски и лучшей визуализации клеточных элементов, после прекращения ИГХ реакции и отмытки срезов в воде, на них наносят гематоксин Майера на 5-10минут. Срезы помещают в дистиллированную воду для проявления гематоксилина. Аккуратно

дегидрируют в 3 порциях 96⁰С спирта. Наносят монтирующую среду и закрывают покровным стеклом.

Иммуногистохимическое исследование криотомных срезов.

Методика выполнения иммуногистохимической реакции на срезах полученных на криотоме исключает выполнение первичных этапов депарафинизации и дегидротации. В дальнейшем, ИГХ исследование выполняется также как и на парафиновых срезах с докраской и без докраски ядер.

Результат иммуногистохимической реакции.

В результате проведенной работы положительная ИГХ реакция отмечена в легочной ткани и паренхиме лимфатического узла от поросят из свиноводческих хозяйств и при исследовании материала от поросят экспериментально зараженных патогенным полевым изолятом в титре Ig 4,66 ТЦД₅₀/см³ и референтным штаммом Lelystad в титре Ig 5,0 ТЦД₅₀/см³.

Положительная ИГХ реакция определялась специфическим окрашиванием пероксидазного хромогена в кирпичный цвет. На рисунках 21 и 22 представлены препараты легкого и бронхиального лимфатического узла с положительной реакцией на ИГХ (Б, В) в сравнении с контрольным гистосрезом (А). На данных рисунках хорошо заметны положительно реагирующие участки ткани, дополнительная окраска ядер клеток гематоксилином Майера позволяет определить первичную дифференцировку клеток.

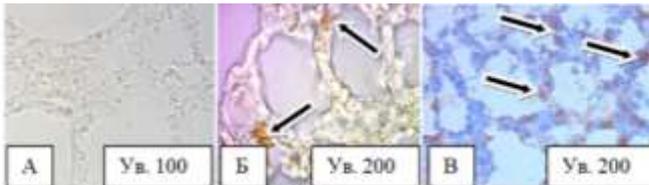


Рисунок 21 – Препарат легкого: А. Отрицательный контроль, без докраски ядер; Б. Положительная ИГХ реакция на препарате без докраски ядер гематоксилином Майера; В. Положительная ИГХ реакция на препарате с докраской ядер гематоксилином Майера.

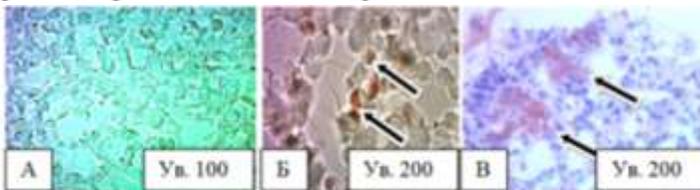


Рисунок 22 – Препарат бронхиального лимфатического узла: А. Отрицательный контроль, без докраски ядер; Б. Положительная ИГХ реакция на препарате без докраски ядер гематоксилином Майера; В. Положительная ИГХ реакция на препарате с докраской ядер гематоксилином Майера.

В таблице 2 показаны обобщенные данные общего числа исследованных образцов к числу положительных образцов в ИГХ реакции. Из данной таблицы видно, что антиген вируса РРСС выявляется в бронхиальном лимфатическом узле и в стромальной ткани легких. Исследования других паренхиматозных органов и тканей трахеи показали отрицательный результат.

Таблица 2 – Результаты выявления антигена вируса РРСС в ИГХ исследовании органов поросят

Метод Материал	ИГХ		
	Экспериментальное заражение	Контрольная группа	Естественно инфицированные
Легкое	20/20	0/10	10/10
Лимфатический узел	20/20	0/10	10/10
Печень	0/20	0/10	0/10
Почки	0/20	0/10	0/10
Селезенка	0/20	0/10	0/10
Трахея	0/20	0/10	0/10

4.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе были испытаны несколько схем иммуногистохимического выявления возбудителя репродуктивного и респираторного синдрома свиней, вследствие чего, были подобраны оптимальные условия для выполнения иммуногистохимического анализа внутренних органов свиней. Полученная тест-система была отработана при экспериментальном заражении поросят и апробирована при исследовании патологического материала из хозяйств.

На основании проведенных исследований выявлены патологические изменения в паренхиматозных органах свиней (печень, селезенка, почки, трахея, лимфатический узел, легкое). В результате анализа имеющихся отечественных моноклональных антител, определены наиболее специфичные к капсидному белку вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней антитела для выполнения непрямого иммуногистохимического исследования.

При анализе полученных данных после проведения патоморфологического и иммуногистохимического исследования, было выявлено, что основные патологические изменения сопровождаются накоплением вируса в легких (альвеолярные макрофаги) и бронхиальных лимфатических узлах (свободные макрофаги), а изменения, выявленные в других паренхиматозных органах, носят второстепенный характер.

Проводимые комплексные диагностические исследования выявили корреляцию разработанного нами метода с данными ИФА и ПЦР. можно сказать, что метод иммуногистохимического выявления вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней в тканях инфицированных свиней дополняет и расширяет возможности лабораторной диагностики болезней свиней и отвечает на вопрос этиологии респираторной патологии свиней.

5.ВЫВОДЫ

1. Экспериментальным заражением поросят патогенным полевым изолятом вируса РРСС с инфекционной активностью $4,66 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, воспроизведено заболевание с 50% смертностью зараженных поросят в течение первых 24 часов, с признаками одышки и угнетения общего состояния. При вскрытии выявлены диффузные кровоизлияния в легочной ткани и спленомегалия. Наиболее специфичные, патологоанатомические признаки установлены у поросят павших в течение 72 – 120 часов, визуальные изменения в органах были сопоставимы с естественно больными животными.

2. При изучении патологического материала от поросят, павших в первые 24 часа после заражения патогенным изолятом вируса РРСС при помощи патоморфологического анализа гистологических срезов были выявлены обширные участки кровоизлияний в лёгких, ателектаз альвеол, обтурация бронхиол клеточным конгломератом, отек паренхимы селезенки, венозный застой, кровоизлияния. У животных, павших позднее 72 часов, выявляли более выраженные гистологические изменения в легочной ткани, лимфатическом узле (дискомплексаию клеток в бронхиальном лимфатическом узле), кроме этого наблюдали фокусные скопления лимфоидных клеток в паренхиме печени и гемморагический гломерулонефрит.

3. При экспериментальном заражении поросят того же возраста, референтным штаммом Lelystad вируса РРСС с инфекционной активностью $5,0 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, не удалось воспроизвести характерных патогномоничных признаков, наблюдалось лишь снижение аппетита и вялость. При патологоморфологическом исследовании была установлена инфильтрация клетками лимфоидного ряда в строме легкого и бронхиальных лимфатических узлах, в других органах не было отмечено нарушений гистоархитектоники.

4. При естественном инфицировании у поросят были выявлены патологоанатомические и патоморфологические изменения схожие с экспериментальными данными при заражении патогенным полевым изолятом вируса РРСС. Они характеризовались лимфогистеоцитарной инфильтрацией в межальвеолярных перегородках, с небольшим количеством фибрина на

слизистой оболочке альвеол, некрозом слизистой оболочки бронхов, фибринозным выпотом в просвет бронха. В лимфатических узлах выявлены участки кровоизлияний, дискомплексации белой пульпы, наличие гемосидерина в красной пульпе.

5. Иммуногистохимическим исследованием выявлено присутствие антигена вируса РРСС в пораженных органах и тканях, что дает прямое подтверждение этиологии патоморфологических изменений.

6. Разработанная тест-система иммуногистохимического выявления вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней может быть использована при проведении иммуногистохимической диагностики РРСС со всеми типами вируса РРСС в комплексе лабораторной диагностики.

6. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные данные позволяют расширить комплексные исследования в диагностике РРСС и применимы как при моно-, так и при смешанных инфекциях.

2. Разработанный регламент выполнения ИГХ на основе отечественных моноклональных антител, позволяет выявлять антиген вируса РРСС непосредственно на клетках-мишенях. Данный метод позволяет более детально сопоставить патологическую морфологию и распределение вируса РРСС в органах больных свиней, имеет диагностическую значимость для лабораторной практики врачей патологов.

3. Разработаны и утверждены на секции инфекционной патологии животных методические наставления по иммуногистохимической диагностике репродуктивного и респираторного синдрома свиней предназначенные для ветеринарных лабораторий и специалистов патоморфологов занимающихся диагностикой болезнью свиней.

4. Материалы диссертации могут быть использованы в научных целях при дальнейшем изучении особенностей тропизма вируса, а также, могут лечь в основу разработки диагностики РРСС с помощью молекулярной гибридизации in-situ.

7. СВЕДЕНИЯ О ПРАКТИЧЕСКОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты работы применяются для диагностики вирусных болезней свиней в ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, используются в учебном процессе студентов ветеринарного факультета ФГБОУ ВО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина по дисциплине «Клиническая анатомия животных», с 2015 года, ежегодно при проведении лабораторно-практических занятий со студентами факультета ветеринарной медицины, в группах по 25 человек. Договор от 28.10.2015г., от 10.09.2016г., от 11.09.2017г.

8. СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

1. **Патент РФ 2645114.** Способ диагностики репродуктивного респираторного синдрома свиней непрямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител / **В.В. Стаффорд**, Л.В. Костина, Т.В. Степанова, А.Ю. Козлов, А.Д. Забережный, А.М. Гулюкин, Т.И. Алипер, М.И. Гулюкин. 2016121833: заяв. 02.06.2016, опублик. 15.02.2018.
2. Стаффорд В.В. Иммуногистохимическая диагностика репродуктивно-респираторного синдрома свиней / В.В. Стаффорд, М.А. Корицкая, С.А. Раев, К.П. Алексеев, В.В. Цибезов, О.А. Верховский, Т.И. Алипер, А.Д. Забережный, М.И. Гулюкин // Утверждена на Секции зоотехнии и ветеринарии отделения сельскохозяйственных наук РАН 01.12.16.
3. **Стаффорд В.В.** Патоморфологические изменения паренхиматозных органов поросят, при экспериментальном зараженных вирусом репродуктивно- респираторного синдрома и цирковирусом свиней типа 2 / В.В. Стаффорд, А.Д. Забережный, М.И. Гулюкин // Ветеринария. – 2016. - №9. – С. 24-27.
4. **Stafford V.V.** Application of immunohistochemistry in diagnostics/ V.V. Stafford // Russian journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2016. - Т. 56. - №8. – Р. 18-21.
5. **Стаффорд В.В.** Иммуногистохимическая диагностика репродуктивного и респираторного синдрома свиней/ В.В. Стаффорд, С.А. Раев, О.А. Верховский, К.П. Алексеев, А.Г. Южаков, Т.И. Алипер, А.Д. Забережный, М.И. Гулюкин // Ветеринария. – 2017. - №2. – С. 26-30.
6. 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 4-13.
7. Stafford V.V. Second type of pigs' circovirus infection / V.V. Stafford // Russian journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. - Т.65. - №5. – Р. 306-309.
8. Стаффорд В.В. Гистологическая диагностика / В.В. Стаффорд // Сборник: Инновационные разработки молодых ученых - развитию агропромышленного комплекса. Материалы IV международной конференции: Сборник научных трудов. - 2015. Ставрополь. - С. 523-526.
9. Стаффорд В.В. Современные гистологические методы диагностики в ветеринарии / В.В. Стаффорд, И.М. Волкова, Г.Н. Борисова // Труды ВИЭВ. – Т. 78. – 2015. – С. 382-388.

10. Стаффорд В.В. Гистологическая диагностика респираторного синдрома свиней / В.В. Стаффорд // Труды ВИЭВ. - Т. 79. – 2016. - С. 283 – 288.

11. Stafford V.V. Histologic Diagnostics Of Respiratory Swine Diseases / V.V. Stafford // VII International Scientific Agriculture Symposium. AgroSym-2016. Jahorina, oktober 06-09. Bosnia and Herzegovina. Book of abstracts. – 2016. - P. 1036.

12. Забережный А.Д. Биологические свойства нового российского изолята вируса РРСС / А.Д. Забережный, С.А. Раев, А.Г. Южаков, А.М. Мишин, А.Н. Шкрылев, **В.В. Стаффорд**, Т.И. Алипер // Материалы VII Ветеринарного конгресса. - Уфа. - 2017. - С. 129-130.

13. Стаффорд В.В. Иммуногистохимический метод диагностики репродуктивного и респираторного синдрома свиней / В.В. Стаффорд, С.А. Раев, Т.И. Алипер, А.Д. Забережный // Материалы VII Ветеринарного конгресса. - Уфа. - 2017. - С. 177.