

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

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**

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Забережный Алексей Дмитриевич

Москва – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Содержание	2
Введение	6
Глава 1. Литературный обзор	13
1.1 Роль репродуктивного и респираторного синдрома свиней в инфекционной патологии свиней	13
1.2 Характеристика возбудителя репродуктивного и респираторного синдрома свиней	18
1.2.1. История открытия возбудителя репродуктивного и респираторного синдрома свиней	18
1.2.2. Строение вириона вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней	21
1.2.3. Схема репликации вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней	22
1.3 Патогенез репродуктивного и респираторного синдрома свиней	24
1.4. Клинические признаки репродуктивного и респираторного синдрома свиней	27
1.5. Патологоанатомические признаки при репродуктивном и респираторном синдроме свиней	29
1.6. Иммунный ответ организма при репродуктивном и респираторном синдроме свиней	31
1.7. Диагностические методы при заболевании репродуктивным и респираторным синдромом свиней	33
1.7.1. Дифференциальная диагностика репродуктивного и респираторного синдрома свиней	37
1.8. Меры профилактики репродуктивного и респираторного синдрома свиней	37
1.8.1. Методы иммунопрофилактики вирусного репродуктивного и респираторного синдрома свиней	38

1.8.2. Ветеринарно-санитарные мероприятия при репродуктивном и респираторном синдроме свиней	39
1.9. Заключение	42
Глава 2. Собственные исследования	45
2.1. Материалы и методы	45
2.1.2. Исследование патологического материала методом ИФА и ПЦР	48
2.1.3. Проведение парафиновой заливки фиксированных образцов	49
2.1.4. Проведение криотомной обработки нефиксированных образцов	52
2.1.5. Окрашивание полученных срезов и принципы программирования оборудования	53
2.1.6. Протокол получения моноклональных антител к rN белку вируса РРСС	53
2.1.7. Образцы патологического материала	55
2.1.8. Экспериментальное заражение животных вирусом репродуктивного и респираторного синдрома свиней	55
2.1.9. Клиническое наблюдение за животными экспериментальных групп	56
2.1.10. Убой животных экспериментальных и контрольных групп	56
2.1.11. Вскрытие и отбор патологического материала при экспериментальном заражении репродуктивным и респираторным синдромом свиней	57
2.1.12. Отбор патологического материала при естественном инфицировании свиней вирусом репродуктивного и респираторного синдрома	58
2.1.13. Гистологическое исследование патологического материала	58
2.1.14. Методы окрашивания гистологических срезов из исследуемых образцов	58
2.1.15. Иммуногистохимическое исследование патологического материала	59
2.1.16. Схемы подбора оптимальной концентрации моноклональных	

антител	59
2.1.17. Проведение иммуногистохимического исследования	60
Глава 3. Результаты собственных исследований	61
3.1. Экспериментальное заражение свиней вирусом репродуктивного и респираторного синдрома свиней	61
3.2. Анализ клинических признаков инфекционной патологии при экспериментальном заражении свиней	62
3.3. Клинические признаки репродуктивного и респираторного синдрома свиней при естественном инфицировании свиней	63
3.4. Результаты лабораторно-диагностических исследований образцов из экспериментального материала зараженных животных	64
3.5. Результаты патологоанатомических и патоморфологических исследований	65
3.5.1. Патологоанатомические признаки репродуктивного и респираторного синдрома свиней при экспериментальном заражении	65
3.5.2. Патоморфологическое исследование образцов органов и тканей при экспериментальном заражении	68
3.5.3 Патоморфологическое исследование образцов органов и тканей полученных от естественно инфицированных свиней	74
3.6. Результаты иммуногистохимического исследования	75
3.6.1. Иммуногистохимическое исследование гистологических препаратов органов с докраской ядер гематоксилином Майера	79
3.6.2 Иммуногистохимическое исследование гистологических препаратов органов без докраски ядер гематоксилином Майера	81
Обсуждение	85
Заключение	92
Выводы	94
Практические рекомендации	96
Список сокращений	97
Список литературы	98

Приложения	119
Приложение А	119
Приложение Б	120

Введение

Актуальность проблемы

Репродуктивный и респираторный синдром свиней наносит ощутимый экономический ущерб свиноводству, который складывается из гибели молодняка, затрат на лечебные мероприятия и недополучения мясной продукции от более возрастных групп животных. По данным исследователей, в неблагополучных хозяйствах, из числа свиней с клиническими признаками респираторной патологии гибель на 80% обусловлена действием вирулентного вируса РРСС [149]. Данный вирус распространен повсеместно, отнесен к двум генетическим типам – американскому с 9 подтипами и европейскому с 3 подтипами [153].

Поскольку вызываемое вирусом РРСС заболевание относится к группе респираторных патологий, то и клинические признаки будут сходные с симптомами заболеваний, имеющих иное этиологическое начало. Из анализа научных работ, возбудителями таких заболеваний могут быть как бактерии и вирусы, так и микоплазмы [127]. Многими авторами отмечено совместное действие вирусов РРСС и ЦВС-2. В отличие от других инфекций, РРСС у взрослого поголовья животных, протекает бессимптомно, что оказывает существенное влияние на эпизоотическую ситуацию [84; 117; 159].

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

Актуальными остаются вопросы о характере патологического влияния вируса репродуктивного и респираторного синдрома на органы животного, распространении его в организме и взаимосвязь с происходящими гистоморфологическими изменениями в органах [121]. Данные проблемы осложняются наличием разнообразных патогенов, оказывающих целый комплекс патологического влияния и осложняющих диагностику основного заболевания [83]. При диагностических мероприятиях, применяемых на

сегодняшний день, необходимо учитывать следующие особенности: при проведении реакции нейтрализации, выявление вируснейтрализующих антител к вирусу РРСС возможно только на 45 день [101]; 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 РРСС при респираторной патологии остается актуальной задачей [6].

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 [6; 12; 22; 26]. На фоне хорошо изученных вопросов о структуре возбудителя заболевания не до конца изученными остается цитопатологическое действие вируса *in vivo*, принципы его взаимодействия с иммунокомпетентными 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 вспышках заболевания в свиноводческих хозяйствах.

Для реализации цели исследования необходимо решение ряда конкретных задач:

1. Выполнить экспериментальное заражение поросят референтным штаммом «Lelystad» и вирулентным штаммом «Западносибирский 13» 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 репродуктивного и 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 вспышек заболевания 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 легких, бронхиальных лимфатических узлов и других паренхиматозных органов при экспериментальном заражении и естественном инфицировании. Прослежена динамика диссеминации возбудителя в организме свиней.

Разработан метод иммуногистохимической диагностики РРСС, на основе отечественных моноклональных антител 4h7h9, специфичных к капсидному белку вируса РРСС, который позволяет выявлять антиген вируса в органах и тканях свиней при заражении европейским и североамериканским типами вируса. Иммуногистохимическая диагностика может быть применена в

качестве подтверждения данных патолого-морфологических исследований и использоваться как дополнительный метод диагностики РРСС, что подтверждено патентом на изобретение «Способ диагностики репродуктивного респираторного синдрома свиней непрямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител» № 2645114.

Теоретическая и практическая значимость работы. 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 указания по иммуногистохимической диагностике РРСС свиней, которые утверждены на Секции зоотехния и ветеринария отделения сельскохозяйственных наук РАН от 01.12.16. 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 иммуногистохимического анализа на основе МАТ к гN белку вируса РРСС. Применены методы научного познания:

экспериментальное заражение животных, наблюдение, выявление антигена вируса, интерпретация, обобщение и результаты.

Положения, выносимые на защиту.

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

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

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

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 макрофагах альвеол и бронхиальных лимфатических узлов, а изменения, выявленные в других паренхиматозных органах, не связаны с накоплением в них вируса.

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. Комплексной диагностикой с применением методов 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 антигена вируса в органах и тканях инфицированных свиней и определения клеток-мишеней использовали непрямой метод ИГХ анализа.

Апробация результатов.

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 опубликовано 13 работ, в том числе 1 методическое указание, из них 5 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, выдан патент № 2645114 от 15.02.2018 «Способ диагностики репродуктивного респираторного синдрома свиней непрямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител».

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 159 источников, из которых 37 – отечественные, 122 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; гистологическое и иммуногистохимическое исследование, анализ и интерпретация полученных данных. Экспериментальное заражение и убой свиней, отбор проб в свиноводческих хозяйствах выполнены автором лично и совместно с сотрудниками лаборатории болезней свиней ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Работа является частью государственного задания, в котором автор работы является ответственным исполнителем.

Благодарность. Автор выражает благодарность 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.в.н., доценту Илиешу В.Д., к.с/х.н., доценту, Дробину Ю.Д.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Роль репродуктивного и респираторного синдрома свиней в инфекционной патологии свиней

В условиях интенсивного ведения свиноводства увеличивается риск возникновения как моно-, так и смешанных инфекций среди свиней различных возрастных групп [73]. Углубленное изучение их этиологических признаков вскрыло многообразие смешанных инфекций, протекающих тяжелее и длительнее, чем моноинфекция. Диагностика таких заболеваний осложняется из-за смешанных клинических признаков при наличии нескольких возбудителей болезни в одном организме [5; 10]. Наиболее опасная ситуация возникает, когда на фоне бессимптомного вирусоносительства возникает вспышка респираторной болезни, вызванной появлением нового инфекционного начала.

Анализ случаев заболеваемости свиней по регионам Российской Федерации и в целом по стране показывает, что наиболее распространенными болезнями среди поголовья свиней являются заболевания с нарушениями функций органов пищеварения и дыхания [19]. При детальном изучении хозяйств можно выявить, что патология респираторных органов свиней выявляется у 30 - 50% из общего числа болеющих животных [29]. Причем из числа заболевших РРСС ежегодно, в среднем по стране, по данным одних исследователей погибает до 30% поросят [24; 11], а по другим данным гибель составляет до 60% [4; 36].

Наиболее подвержены заболеванию поросята до 90 дневного возраста. [25; 33]. Поросята, находящиеся в подсосном периоде и после отъема, относятся к группе риска. Период отъема особенно важен, в такой ситуации организм находится в состоянии технологического стресса, что способствует

ослаблению его защитных свойств, и приводит к возникновению различных инфекций осложняющихся, впоследствии, вторичной микрофлорой [16; 138].

При изучении научной литературы установлено, что в число выделенных у свиней вирулентных возбудителей при клинической картине респираторной и репродуктивной патологии, входят патогены вирусной этиологии: вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней, цироковир, вирус гриппа, вирус болезни Ауески. Зарубежными исследователями проведен ряд экспериментальных работ по двойному заражению поросят возбудителями вирусной и бактериальной этиологии. Таким образом, были получены чистые данные, описывающие совместное действие вируса РРСС с другими патогенами в организме животных. Эти данные отражены в таблицах 1 и 2. При сочетанной инфекции вируса РРСС и ЦВС-2 происходит усиление репликации вируса ЦВС-2, такое быстрое количественное увеличение вируса способствует развитию тяжелых клинических признаков и быстрой гибели животного [39; 74; 83; 84; 117; 121]. При ассоциации вируса РРСС с вирусом болезни Ауески происходит усиление клинических признаков респираторной патологии, значительные патологические изменения выражаются в повреждении легочной ткани, особенно добавочных долей легкого [126]. Подобные изменения выявляются и при ассоциации с респираторным коронавирусом [145]. По данным этого же автора отмечен эффект синергии 2 возбудителей в организме свиней, такими патогенами являются вирус гриппа свиней и вирус РРСС [146].

По данным многих исследователей [3; 72; 87], в ассоциированном действии с вирусами активно проявляет себя бактериальная инфекция. Согласно исследованиям в РФ, РРСС чаще наблюдают в сочетании с микоплазмой (до 50-60% поголовья положительно реагирующих в ПЦР и ИФА на вирус РРСС), которая является «ключником», открывающим ворота инфекции, поражая слизистую оболочку респираторного тракта.

Таблица 1 – Примеры сочетанной инфекции вирусом РРСС и вирусными патогенами.

Возбудитель	Влияние вируса РРСС
Цирковирол свиней 2 типа	усиление репродукции ЦВС, влияние на тяжесть течения болезни
Вирус гриппа свиней	эффект синергии для вторичной инфекции
Респираторный коронавирус свиней	значительное усиление тяжести течения болезни
Вирус болезни Ауески	двойная инфекция усиливает клинические проявления болезни, в особенности поражение лёгких

К наиболее распространенным ассоциированным заболеваниям бактериальной этиологии относят: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* и *Streptococcus suis*, процент встречаемости составляет от 20 до 50% [37; 73]. Как и в случае с вирусным этиологическим началом, совместное действие бактериальной инфекции с вирусом РРСС имеет ряд особенностей. Как видно из таблицы 2, *Mycoplasma hyopneumoniae*, повреждая слизистую оболочку дыхательных путей, создает благоприятную среду для инфицирования организма вирусом РРСС [137]. А наиболее сильное патологическое влияние оказывает *Streptococcus suis*, при котором повышается вероятность септицемии у животных [62; 65]. Кроме ухудшения состояния у свиней вьетнамскими учеными отмечена социальная значимость данного бактериального патогена, который вызывает инфекционный менингит у людей, работающих на свиноводческих фермах в периоды вспышек РРСС [78]. *Bordetella bronchiseptica* усиливает респираторную патологию и увеличивает тяжесть клинического проявления бронхиально-легочной патологии [47]. *Salmonella sp.* оказывает эффект синергии в случае с совместным действием с вирусом РРСС [151]. *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis* не показали существенного влияния на организм

животного при ассоциированной инфекции с вирусом РРСС, однако риск заражения пастереллёзом значительно увеличивается [48; 119; 124].

Таблица 2 – Примеры сочетанной инфекции вируса РРСС с бактериальными патогенами.

Возбудитель	Влияние вируса РРСС
<i>Streptococcus suis</i>	повышена вероятность септицемии, вызванной <i>S.suis</i> . Высокая степень развития инфекционного менингита у работников свиноводческого комплекса.
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	повышена вероятность бронхопневмонии, вызванной <i>B.bronchiseptica</i>
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	открывает «ворота» для вторичной инфекции
<i>Salmonella choleraesuis</i>	эффект синергии для вторичной инфекции
<i>Pasteurella multocida</i>	нет влияния/ повышена вероятность пастереллёза
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	нет влияния в лабораторных опытах
<i>Haemophilus parasuis</i>	нет влияния в лабораторных опытах

Одними из основных факторов распространения вируса внутри стада является, возможно, его бессимптомная циркуляция в организме взрослого поголовья и горизонтальный и вертикальный пути передачи вируса [44; 111]. Такая «маскировка» вируса способствует его беспрепятственному распределению внутри стада, особенно при большой скученности животных в условиях свинокомплексов.

Другой немаловажной проблемой является то, что инфекционный процесс активизирует иммунизация поросят, особенно живыми вакцинами, на что обращают внимание многие исследователи [58; 93; 96]. Как известно, применение живых вакцин в значительной мере зависит от иммунного статуса животных. В отличие от инактивированных вакцин, в изготовлении аттенуированных вакцинных препаратов используют инфекционно активный, ослабленный патоген, что подразумевает его размножение в организме животного и выработке стойкого иммунитета у здорового животного за счет

включения естественных механизмов иммунного ответа. В случае с вакцинацией от РРСС ситуация усугубляется тем, что вирус специфичен к моноклеарным клеткам, т.е. непосредственно направлен на иммунную систему. Когда в организме находится вирус, даже в латентном состоянии, а вакцинация вызывает усиленную реакцию клеточного иммунитета, это может являться благоприятным условием для развития инфекции, особенно у больных животных и у свиней со слабым иммунитетом [89].

В настоящее время в нашей стране применяется ряд вакцин против РРСС, которые способствуют улучшению эпизоотической обстановки внутри стада и увеличивают показатели воспроизводства стада на 60% [25]. Но проблема перезаражения животных вирусом до сих пор не решена и, по мнению многих авторитетных исследователей [6; 23; 76; 100], применение живых вакцин в хозяйствах, где регистрировались случаи РРСС, нежелательно.

В последнее десятилетие появились новые штаммы, которые вызывают высокий падеж среди молодняка и ремонтного поголовья свиней, а также осложнение клинических признаков у взрослого поголовья. Это связывают с появлением высоковирулентных штаммов вируса РРСС и ЦВС-3 [93]. Появление новых высокопатогенных штаммов ведет к ухудшению эпизоотической обстановки по РРСС при вакцинации живыми вакцинами прошлого поколения на основе аттенуированных штаммов.

Говоря о роли вируса РРСС в патологии свиней можно отметить ряд основных пунктов: Вирус РРСС оказывает свое патологическое действие на организм всех возрастных групп свиней особенно на поросят в подсосном периоде, и при смешанной инфекции с вирулентными штаммами других возбудителей болезней у поросят на дорастивании и у взрослого поголовья. Наиболее опасной вирусной ассоциацией РРСС является его сочетание с цирковирусом, вирусом болезни Ауески и респираторным коронавирусом. В список наиболее опасных бактериальных патогенов в плане ассоциации с вирусом РРСС входят *Streptococcus suis* и *Bordetella bronchiseptica*, которые

значительно ухудшают течение болезни и усложняют выявление этиологического начала. Применение аттенуированных вакцин должно осуществляться с учетом особенностей биологии вирусной инфекции, особенно в хозяйствах где регистрируются случаи респираторной патологии.

1.2 Характеристика возбудителя репродуктивного и респираторного синдрома свиней

1.2.1. История открытия возбудителя репродуктивного и респираторного синдрома свиней

Первоначальные попытки по выявлению этиологической причины, ответственной за новый синдром, были неудачными. Таким образом, в Северной Америке с 1986 года данное состояние называли «таинственной болезнью» свиней (ТБС). В Европе в 1991 году удалось выполнить постулаты Коха и получить положительные результаты с ранее неизвестным РНК вирусом при ТБС, и вирусный изолят называли Лелистад [15; 136; 150]. До сегодняшнего дня это основной референтный штамм вируса РРСС 1 типа.

Вирус РРСС относится к порядку *Nidovirales*, семейству *Arteriviridae*, роду *Arterivirus* [13; 86]. Совместно с представителями семейства *Coronaviridae* [51] он является одним из наиболее патологически значимых возбудителей болезней свиней, в том числе и экономически значимым для благополучия свиноводческой отрасли [136].

Аббревиатура ВРРСС была введена в 1992 году и охватывает ВРРСС -1 (генотип впервые выделен в Европе), и ВРРСС -2 (генотип впервые выделен в Америке) [40; 112]. На сегодняшний день оба эти генотипа распространены по всему миру, европейский тип (ВРРСС-1) преимущественно в Европе, включая Россию, и североамериканский (ВРРСС-2) в основном в Северной Америке, Азии и Южной Америке [159]. Одновременно с выделением вируса

проводились масштабные исследования по изучению возбудителя и его свойств.

Вирус РРСС имеет однонитевой РНК-содержащий геном, очень изменчив, имеет оболочку, его диаметр составляет 45-65 нм. На основе филогенетического анализа ВРРСС считается одним из самых быстро мутирующих РНК - вирусов, со значительной генетической изменчивостью обоих генотипов, ВРРСС -1 и ВРРСС -2 [12; 46; 109]. В таблице 3 представлены данные об изменчивости вируса между подтипами внутри одного генотипа. Из приведенных данных видно, что наибольший процент различий между 9 подтипами 2 генотипа вируса РРСС составляет 18,0%, что показывает его высокую изменчивость [80; 125].

Таблица 3 – Различия между генетическими подгруппами ВРРСС-2 (североамериканского типа вируса) в гене ORF5 (%).

Подтипы	1	2	3	4	5	6	7	8
2	14,4							
3	15,6	17,4						
4	12,7	14,6	14,1					
5	14,9	14,8	15,2	11,8				
6	16,6	16,8	18,0	15,1	13,2			
7	13,6	13,5	14,2	10,1	10,2	13,0		
8	14,8	14,2	16,0	13,1	12,1	14,0	11,0	
9	15,5	15,4	16,3	13,2	12,9	13,5	10,4	11,3

Таким образом, при филогенетическом анализе первичной структуры генов разных изолятов вируса РРСС и генетических свойств возбудителя была выявлена вариабельность вируса, которая позволила установить, что у данного возбудителя болезни кроме двух известных типов, имеются и подтипы у каждого из них. У европейского типа обнаружено три подтипа, а у североамериканского их девять. На основании полученных данных была построена дендрограмма, представленная на рисунке 1 [66; 99; 109; 130; 154], отражающая схему разделения вируса РРСС на типы и подтипы.

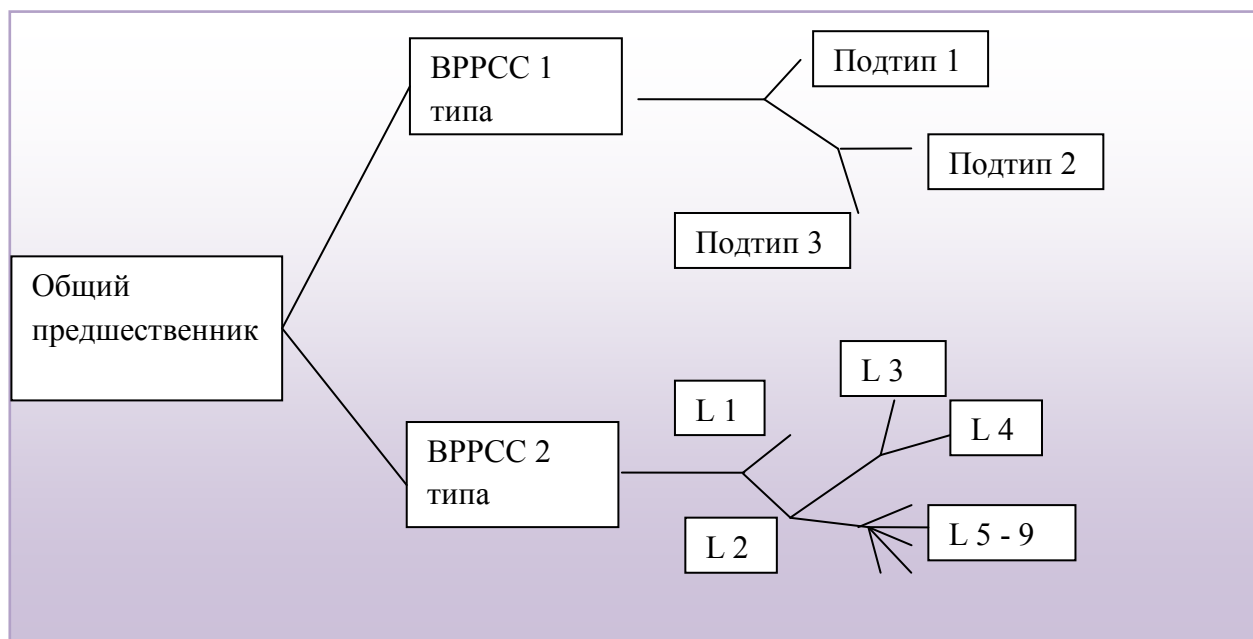


Рисунок 1 – Дендрограмма 1 и 2 типов вируса РРСС с его подтипами.

Благодаря полученным данным появилась возможность проанализировать неопределенные ранее случаи заболевания свиней, а масштабные исследования патологического материала, в том числе и архивного, позволили с уверенностью сказать, что проблема РРСС приобрела повсеместное распространение. Таким образом были определены новые неблагополучные пункты по данному заболеванию и началась работа по генетическому типированию новых штаммов вируса.

Обширные исследования в данном направлении показали, что на территории Российской Федерации заболевание впервые было отмечено в 1991 году в Курской области [20], т.е. через 5 лет после выявления его в Европе. Еще через 3 года, в 1994 году, вирус выделен в Корее [55; 85; 88; 95; 110]. В ходе дальнейших исследований было выяснено, что в процессе эволюции патоген приобретает высокую вирулентность. В 2006 году в Китае и Вьетнаме была вспышка заболевания, обусловленная высокопатогенным вирусом РРСС, относящимся к североамериканскому типу, и нанесящая огромные потери свиноводческой отрасли [113; 141; 148]. А уже в 2007 году впервые был зарегистрирован случай вспышки атипичного РРСС, но уже в России, в Иркутской области в Усть-Кутумском районе, в частных подворьях и в свиноводческом хозяйстве, детальное изучение возбудителя болезни показало

высокую вирулентность вируса РРСС, относящегося к североамериканскому генотипу [15].

Так же как и в Китае, в США в Миннесоте в 2015г. был снова зарегистрирован высоковирулентный североамериканский тип вируса. А в 2015-2016гг в Западной Сибири РФ, был выделен и охарактеризован новый изолят «Siberian» (Европейского типа 2 подтипа), который, возможно также приобрел высокую вирулентность [154].

За последнее годы отмечаются вспышки заболевания, этиологическим фактором которых является высоковирулентный штамм вируса РРСС. Подобная ситуация происходит на разных континентах планеты, независимо друг от друга. Таким образом, подтвердились опасения ученых, предрекавших эволюцию вируса РРСС к высоковирулентному типу, что и происходит независимо в разных географических зонах [131].

В настоящее время продолжают исследования в области молекулярной биологии вируса, которые позволяют определить филогенетические отношения полученных изолятов. Ведутся исследования по изучению распространенности РРСС, экологии возбудителя, его биологических свойств. Не менее пристальное внимание ученых привлекают проблемы патогенеза болезни, тропизма возбудителя, а также разработка и усовершенствование методов, позволяющих решать данные научные задачи [64].

1.2.2. Строение вириона вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней

Вирусный несегментированный РНК-геном ВРРСС заключен в нуклеокапсид, (в его состав входит нуклеокапсидный белок N), который имеет икосаэдральную форму, хорошо заметную на микрофотографии вирусных частиц (рисунок 2) [129]. Нуклеокапсид окружен двойным липидным слоем, в котором находится 4 дополнительных структурных белка: негликозилированный мембранный белок М и гликопротеин GP5 [40; 60]. Оба

этих белка являются главными компонентами вирусной оболочки. Кроме белков GP5 и M, в состав липидного слоя входят 2 минорных компонента: GP2 и GP4 [61; 97; 98; 103; 104], и белок GP3, являющийся дополнительным гликопротеином вириона [139; 157], схематическое строение вируса РРСС показано на рисунке 3 [129].

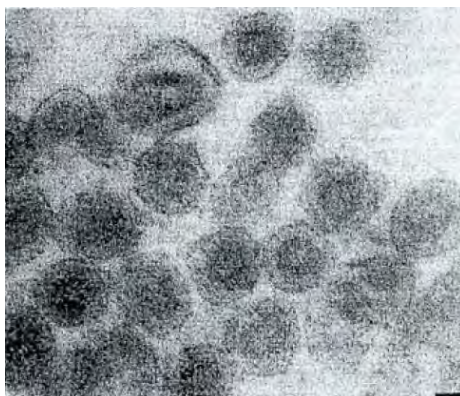


Рисунок 2 – Электронная микрофотография вирусных частиц РРСС.

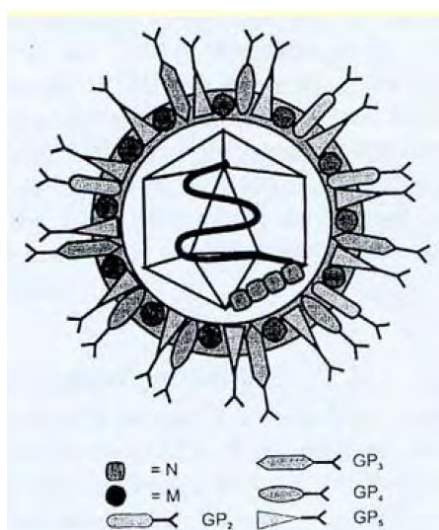


Рисунок 3 – Схематическое строение вириона РРСС с расположением генома и белками.

1.2.3. Схема репликации вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней

Для репликации внутри организма естественного хозяина вирусу необходимо наличие комплекса гемоглобин-гаптоглобин и дифференцировочный антиген CD163, который является главным рецептором

для капсидного белка вируса РРСС [67; 120; 152]. Линейный геном вируса РРСС состоит из одной кэпированной и полиаденилированной молекулы (+)РНК с 15300 нуклеотидами [105; 140]. Наличие кэп-структуры имеющей в своем составе трифосфат на 5'-конце геномной РНК необходимо для репликации вируса [105].

Для репликации в лабораторных условиях кроме первичной культуры альвеолярных макрофагов, используют два субклона клеток линии MARK-145 и CL2621 (производные от перевиваемой культуры клеток почек обезьян МА-104). В результате инокуляции вируса в культуру клеток происходит разрушение клеточного монослоя, проявляющееся цитопатическим действием как на культуре альвеолярных макрофагов (рисунок 4) [129], так и на перевиваемых клеточных линиях. Вирусные частицы отпочковываются в гладком эндоплазматическом ретикулуме аппарата Гольджи, накапливаются там и высвобождаются при экзоцитозе.

Таким образом, данный вирус направлен на макрофаги, являющиеся общими членами системы мононуклеарных фагоцитов, которые играют разнообразную, и важную роль во многих аспектах ремоделирования тканей, развития, иммунитете и иммунопатологии [77].

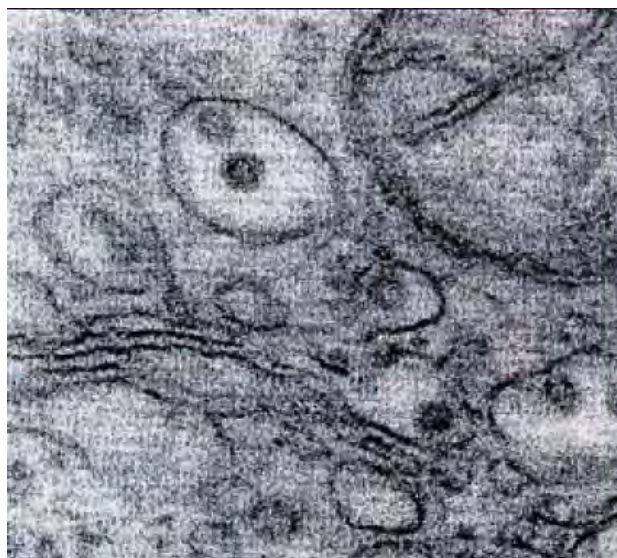


Рисунок 4 – Электронная микрофотография вирусных частиц. Культура альвеолярных макрофагов, зараженная вирусом РРСС.

1.3 Патогенез репродуктивного и респираторного синдрома свиней

Этиологическим фактором РРСС является вирус, который специфичен для клеток моноцитарного происхождения, что создает благоприятную среду для развития вторичных инфекций. Многими исследователями отмечено, что в большинстве исследованного материала присутствовали вторичные возбудители, представляющие бактериальную микрофлору. Кроме вирус - бактериальных ассоциаций, отмечено смешанное действие возбудителя РРСС с другими вирусами, что усложняет дифференциальную диагностику и определяет разноплановость клинических признаков. Патогенез таких мультифакторных заболеваний трудно изучать, это связано с тем, что затруднительно выявить причинно-следственную связь между клиническими признаками болезни и выявляемыми возбудителями.

На сегодняшний день, патогенез данного заболевания недостаточно изучен, как и вопросы иммунитета. Основываясь на полученных экспериментальных данных, можно сделать выводы о том, что патогенез заболевания зависит от ворот инфекции, биологических свойств вируса, в частности от его тропизма к определенным клеткам и от насаивания вторичной микрофлоры [95].

В диссеминации вируса в пределах одного организма существенную роль играют клеточные рецепторы, определяющие границы распространения вируса. При половом пути заражения вирус РРСС передаётся хряками – производителями и легко преодолевает плацентарный барьер с помощью макрофагов маточной стенки за счет того, что поверхностные белки вируса обладают афинностью к рецепторам CD-169 этих макрофагов и, таким образом, проникают в тимус плода [114]. В случае высокой вирулентности вируса, он, проникая в лимфоидную ткань зародыша, вызывает внутриутробную гибель, а также может вызвать внутриматочное воспаление, что приводит к отслоению плаценты и абортam. При относительно невысокой патогенности вирус

нарушает процесс развития иммунитета у зародыша, что приводит к рождению слабого поголовья поросят, зачастую заканчивающееся летальным исходом [115].

Известно, что кроме аффинности к CD-169 вирус обладает комплементарностью к рецепторам макрофагов CD 163, которые относятся к альвеолярным мононуклеарам. Основываясь на этом знании, можно предположить, что вирус попадет в легочную ткань гематогенным, и при аспирации вируса, воздушно-капельным путем. Попадая на слизистую оболочку альвеол, проникает в альвеолярные макрофаги где и происходит репродукция возбудителя. При цитологическом исследовании зараженных клеток (макрофагов) было показано, что макрофаг разрушается уже через 48 часов после внедрения в него вируса РРСС (рисунок 7), по сравнению с «чистым контролем» (рисунок 5), а уже через 24 часа после заражения выявляются поверхностные изменения оболочки макрофага (рисунок 6) [107].

Фотографии альвеолярных макрофагов представленных на рисунках 5-7 любезно предоставлены нам профессором Drew Trevor, заведующим отделом ветеринарной вирусологии центральной ветеринарной лаборатории в Вейбридже, Великобритания.

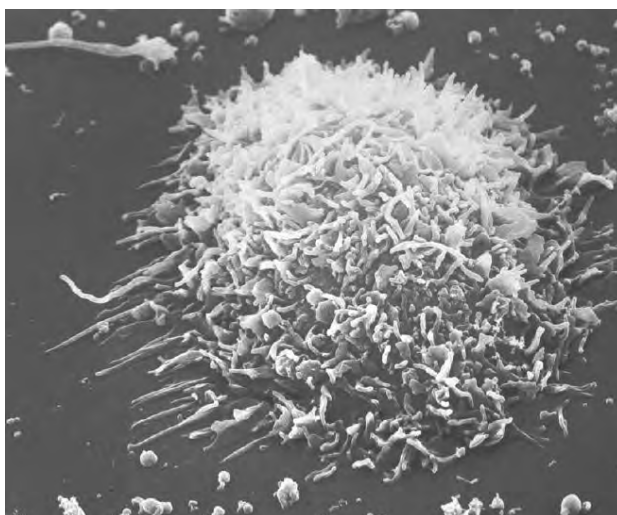


Рисунок 5 – Альвеолярный макрофаг 42 дневного поросенка

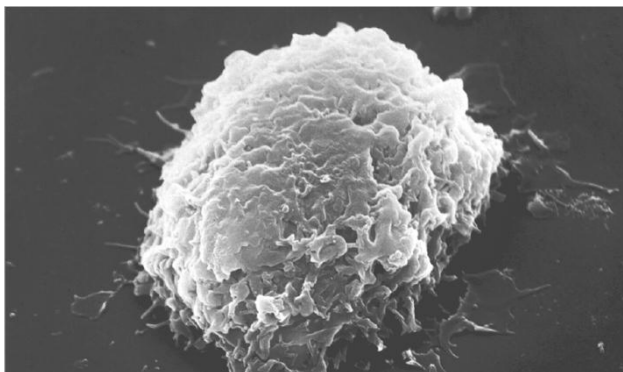


Рисунок 6 – Альвеолярный макрофаг. 24 часа после заражения вирусом РРСС.

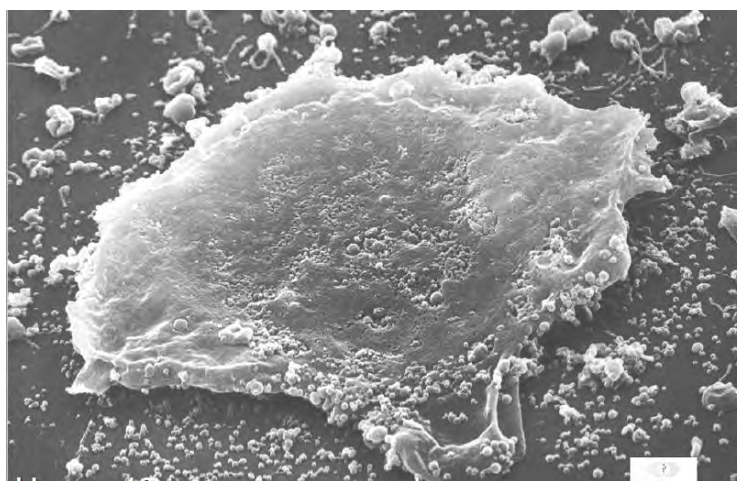


Рисунок 7 – Альвеолярный макрофаг. 48 часов после заражения вирусом РРСС.

Можно предположить, что затем, по дренажному пути вирус РРСС попадает в висцеральный лимфатический узел, где в процессе фильтрации лимфоидной жидкости, задерживается и продолжает свое развитие в клетках со специфическими рецепторами, перемещаясь от клетки к клетке по межклеточным мостикам [50]. Такое накопление вируса в органах приводит к развитию патологических процессов за счет разрушения клеток в процессе репликации вируса и за счет токсического действия продуктов распада клеток. Зарубежными учеными были проведены исследования методом потоочной цитометрии, которые показали изменения связанные с дифференцировкой макрофагов в костном мозге. Так, у серопозитивных свиней была выявлена «заместительная» выработка макрофагов с измененными рецепторами, которые не были афинны к поверхностным белкам вируса, что значительно тормозило

его развитие. Таким образом был обоснован механизм бессимптомности заболевания у свиней старше 6 месяцев [143].

Вырабатываемые в небольшом количестве макрофаги с рецепторами CD-163 не обеспечивали условий для развития инфекции в полной мере, но и не избавляли организм от вируса полностью. Об этом свидетельствуют вспышки заболевания с тяжелыми клиническими проявлениями при инфицировании животных другими патогенами [108].

Таким образом, можно выделить следующие особенности: Происходит выработка иммунной системой хозяина вирусспецифичных антител в момент циркуляции вируса в кровяном или лимфатическом русле. А выработка вируснейтрализующих антител происходит примерно на 45ый день. Интрацеллюлярное нахождение вируса внутри моноцитарных клеток как бы «маскирует» его от гуморальной иммунной системы организма. Возможно увеличение уровня репродукции вируса при активации иммунной системы или попадании в организм патогенов различной этиологии.

1.4 Клинические признаки репродуктивного и респираторного синдрома свиней

Клиническая картина заболевания зависит от множества факторов, таких как свойства возбудителя, пути передачи, наличие и вид секундарной микрофлоры, а в случае с РРСС значение имеет возраст животного. Вирус РРСС передается алиментарным, контактным и половым путем [149].

Наиболее тяжелые клинические признаки наблюдаются у поросят в возрасте до 70 – 90 дней. Зачастую новорожденные поросята появляются на свет нежизнеспособными, отсутствует сосательный рефлекс [52]. В некоторых источниках отмечено, что вирус, проникая в плод в период вынашивания, губительно влияет на формирование иммунной системы плода, вызывая тем самым необратимые патологические изменения в период донашивания [56;

158]. У таких поросят могут наблюдаться следующие патологические признаки: недоразвитие глазных яблок, нарушение формирования костей черепа, конечностей [7].

В дальнейшем на оставшихся в живых поросят влияет наличие вторичных инфекций и технологические процессы, связанные, в том числе, с перегруппировкой животных. Клинические признаки у поросят в период отъема проявляются дермальными изменениями, характеризующиеся цианозом на отдельных участках кожи, чаще на ушных раковинах и дистальных участках конечностей. В дальнейшем возможна некротизация поврежденной кожи [53]. Как правило, кроме патологии кожи, в клинической картине РРСС, ярко выражены симптомы поражения респираторного тракта, характеризующиеся кашлем и одышкой. Многие ветеринарные специалисты замечают прогрессирующую слабость у животных, отказ от корма, шаткость походки и периоды долгого заживания поросят. Как правило, такое прогрессирующее состояние приводит к гибели животных [54; 57]. У поросят старшего возраста болезнь протекает более доброкачественно, сопровождается теми же, но менее выраженными симптомами (слабость, снижение аппетита, исхудание) и, по мере увеличения возраста, снижением летальности.

У более взрослого поголовья болезнь протекает в хронической форме, практически без симптомов [4; 23]. В периоды вспышек данного синдрома среди ремонтного поголовья свиноматок и хряков – производителей может проявляться только кратковременным повышением температуры. Наиболее выраженная симптоматика развивается у супоросных свиноматок и может характеризоваться дермальными патологиями, абортами на поздних сроках супоросности, рождением мертвого поголовья, в ходе родового процесса может отмечаться прогрессирующее ослабление схваток и потуг. Несмотря на довольно тяжелые клинические симптомы, болезнь у большинства свиноматок протекает доброкачественно и к 5-7 дню заканчивалась выздоровлением [135].

При хроническом вирусоносительстве у хряков–производителей развивается бесплодие, а у свиноматок увеличивается число прохолостов. Может наблюдаться кратковременное повышение температуры. Клиническая картина в большинстве случаев неоднозначная и во многом зависит от наличия и характера вторичной микрофлоры, иммунного статуса животного, и вирулентности вируса РРСС [57; 159].

1.5 Патологоанатомические признаки при репродуктивном и респираторном синдроме свиней

Анализируя литературные данные, можно отметить, что кроме смешанных патологоанатомических признаков, есть ряд характерных для РРСС признаков заболевания у свиней.

При репродуктивном и респираторном синдроме свиней авторы обращают внимание на следующие патологоанатомические изменения внутренних органов, у новорожденных поросят характеризуются перикардальным выпотом экссудата, наличием участков некроза на селезенке, что может свидетельствовать о внутриутробном заражении плода [136]. У поросят-сосунов и поросят-отъемышей при вскрытии трупов выявляют отеки подкожной клетчатки, наиболее яркие изменения происходят в диафрагмальных долях легких, которые характеризуются наличием обширных участков кровоизлияния под легочной плеврой и тестообразностью структуры тканей [3; 9]. В большинстве исследованных трупов поросят выявляется наличие экссудата в плевральной полости [27]. Такая же патология выявляется в перикардальном пространстве, с нарушением структуры перикардальной сумки. При пальпации средних и краниальных долей констатируют крепитацию тканей, что характерно для эмфизематозного процесса [49].

Патологические изменения лимфоидной ткани у поросят двух – четырех месячного возраста характеризуются отеками лимфатических узлов, чаще бронхиальных, увеличением объема селезенки, на поверхности которой

выявляются участки неправильной формы серого цвета, располагающиеся ниже уровня капсулы органа [56].

У ремонтного и маточного поголовья свиней степень патологических изменений в органах зависит от вирулентности вируса РРСС и вида вторичной микрофлоры [101]. Наиболее чаще встречающиеся патологии характеризуются изменениями в легочной ткани в виде кровоизлияний и отеков, в лимфоидной ткани – отеками лимфатических узлов, в тканях респираторного тракта – кровоизлияниями в слизистой оболочке трахеи, в паренхиме легкого с явлениями карнификации. У свиноматок выявляются патологии стенки матки, характеризующиеся нарушением структуры клеток мышечного и слизистого слоев [62].

На гистологическом уровне выявляется обтурация бронхов большим количеством густой слизи с заключенными в ней макрофагами и клетками десквамированного эпителия [136]. В межальвеолярном пространстве и в полости альвеол обнаруживают небольшое количество лимфоцитов. В зависимости от возраста животных и длительности инфекционного процесса, в начале, выявляют истончение стенок отдельных альвеол, приводящее к ателектазу, затем наблюдаются обширные полости, свидетельствующие о разрушении альвеолярной ткани, приводящее к эмфиземе легкого [42]. В строме органа выявляют большое количество лимфоидных клеток, периваскулярные и перибронхиальные отеки. В слизистой оболочке бронхов при инфекции РРСС, также диагностируют отеки, гиперсекрецию бокаловидных клеток с последующей десквамацией слизистого эпителия до базальной мембраны. В полости бронхов характерно наличие густой слизи с заключенными в ней эпителиальными клетками и макрофагами. Предположительно, в качестве фактора местной защиты перибронхиально формируются обширные лимфоидные фолликулы. Данные процессы характерны для катаральной бронхопневмонии и катарального плеврита [68]. В кровеносных сосудах легкого нередко выявляют тромбоз, определяющий застойные явления в строме легкого.

При гистологическом исследовании в бронхиальных и средостенных лимфатических узлах у поросят и свиней может наблюдаться разрастание соединительной ткани, что характерно для хронического течения болезни. Некоторыми исследователями выявлена жировая метаплазия мягкотных тяжей [27]. В паховых лимфатических узлах могут наблюдаться отежные процессы. У поросят группы откорма (120 – 180 дней), выявляют подобные патологоанатомические и патолого-морфологические признаки, регистрируемые у младших возрастных групп, характер которых зависит от иммунного статуса животного и тяжести патологического процесса [81; 121].

1.6 Иммунный ответ организма при репродуктивном и респираторном синдроме свиней

Генетическая изменчивость вируса не дает возможности для развития полноценного защитного иммунного ответа при использовании гетерологичных вакцин.

При инфицировании свиней вирусом РРСС, у них формируется гуморальная реакция с образованием специфических иммуноглобулинов и выработкой клеточного иммунного ответа. Колостральный иммунитет длится до 70 дневного возраста и не может полностью предохранить поросят от инфицирования вирусом РРСС. Иммунитет, полученный после переболевания или вакцинации поголовья, непродолжителен, и при повторном заражении через 150 дней у свиней вновь могут возникнуть симптомы поражения респираторной и репродуктивной системы.

Известно что макрофаги поглощают антигены и взаимодействуют с цитотоксическими Т-клетками и В-лимфоцитами, тем самым иницируя адаптивный иммунный ответ против конкретного антигена [43]. Учитывая, что вирус РРСС способен инфицировать и разрушать макрофаги, а также поддерживать свою жизнеспособность в дендритных клетках, можно сказать,

что у него есть потенциал для модулирования иммунного ответа в благоприятную сторону для своей собственной репликации и «выживания» [50; 67].

Зарубежные ученые, изучая белки вируса РРСС, выяснили, что несколько из них (nsp1, nsp2, nsp4, nsp5, nsp11 и белок нуклеокапсида), обладают интерферон-блокирующей способностью. Кроме того, многими учеными было показано *in vivo*, что выработка интерферона тормозится на начальных этапах инфекции, создавая тем самым благоприятную среду для проникновения вируса в макрофаги [38; 49; 108; 145]. Исследования, проведенные *in vitro*, показали, что вирус имеет способность передаваться от клетки к клетке через межклеточные нанотрубки, что дает ему дополнительную защиту [50; 69].

Изучая свойства вируса РРСС, ученые отмечают его способность к подавлению иммунной системы организма. И сравнивают такое «поведение» вируса РРСС со свойствами возбудителей таких болезней как ВИЧ, болезнь Гамборо. Стоит выделить тот факт, что данные заболевания губительно действуют на иммунную систему, приводя к тяжелым лимфоидным истощениям в организме, что, в свою очередь, приводит к выключению адаптивного иммунитета. В случае с вирусом РРСС гибели всей популяции лимфоидных клеток не происходит, что доказывается лейкоцитарной вспышкой в лимфоидных тканях при инфицировании организма вирусом РРСС [147]. Многими учеными показано, что адаптивный иммунитет при РРСС не уничтожается, а лишь ослабевает [68; 94; 128; 156]. И в такой ситуации его сравнивают с толерантностью иммунной системы хозяина к бактериям – комменсалам, к собственным белкам, за что отвечают действия цитотоксических Т-клеток, у которых тормозится выработка цитокинов [81].

Несмотря на многочисленные работы в области иммунитета свиней при их инфицировании вирусом РРСС, практически все ученые сходятся к одному мнению, что иммунитет при данном синдроме недостаточно изучен.

1.7 Диагностические методы при заболевании репродуктивным и респираторным синдромом свиней

Для принятия решения о проведении тех или иных диагностических мероприятий необходимо обращать внимание на «Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов репродуктивно-респираторного синдрома свиней», утвержденные приказом МСХ РФ, № 25 от 24.01.2018г. Учитывая данные исследователей необходимо помнить, что заболевание протекает со смешанной клинической картиной [26; 122]. Требуется точная оценка характерных клинических признаков, эпизоотического состояния внутри стада и возрастных особенностей. Сложность дифференциальной диагностики данной инфекции диктует необходимость комплексного подхода к идентификации возбудителя.

В настоящее время для дифференциальной диагностики РРСС, и выявления вируса используют классические вирусологические, молекулярно-биологические и иммунохимические методики [8; 17; 116]. Данные методы включают в себя флюоресцентный антителный тест, иммуногистохимический тест, ПЦР в реальном времени, гибридизация *in-situ*, выделение вируса [57; 70; 71; 75; 91; 127; 155]. В России в основном используют ПЦР, ИФА и иммуноцитохимический метод в культуре клеток [6; 22]. Зарубежные коллеги, в качестве дифференциальной диагностики, применяют более широкий спектр исследований, включающий в себя использование патоморфологических методов, которые позволяют более детально изучить особенность респираторной патологии, степень повреждения органов и тканей, в зависимости от типа и вирулентности штаммов. Для определения тропизма инфекционного агента используют метод иммуногистохимической диагностики [42; 54; 79; 106].

Метод ИГХ был разработан Альбертом Кунсом путем получения антител, меченных флюоресцеином [59]. Данный метод направлен на выявление точной локализации того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена) благодаря связыванию его с мечеными антителами [63]. Данный метод занимает на сегодняшний день одно из главных мест в патоморфологических исследованиях. Он широко используется как в научных разработках, так и в повседневной практической деятельности специалистов-морфологов. При этом наибольший удельный вес принадлежит онкоморфологии, в диагностике заболеваний человека [28]. В практической и научной ветеринарной деятельности ИГХ исследования крайне необходимы, а иногда и обязательны, при широком спектре болезней животных и их дифференциальной диагностике. Они позволяют определить тропизм патологического агента к клеткам, распределение антигена в тканях и патогенез болезни.

Основным реагентом, используемым во всех иммуногистохимических методах, являются вирусспецифические антитела. Появление новых антисывороток, их фракций, иммуноглобулинов и моноклональных антител, специфичных к возрастающему числу тканевых антигенов, полезных в клинической диагностике, значительно увеличило количество и качество иммуногистологических методов [79; 82].

Проведение иммуногистохимического исследования не требует дополнительного дорогостоящего оборудования. Применение ИГХ исследования возможно в стандартной парафиновой проводке, которая широко распространена в гистологических лабораториях. Также возможно применение замораживающего криотома, которое значительно ускоряет процесс диагностики заболевания за счет исследования нативного материала, т.е. сразу после вскрытия. При изготовлении срезов для ИГХИ рекомендуется подготовка срезов для патоморфологического исследования, что параллельно позволит увидеть патологическую картину процесса.

На сегодняшний день применяются два метода иммуногистохимического исследования:

- прямой, с применением меченых антител, специфичных к антигену.
- непрямой, подразумевающий использование двух видов антител.

Первичные антитела специфичны к антигену, а вторичные, меченые, антитела специфичны к первичным.

Прямой метод более прост в исполнении, однако иногда приводит к множеству артефактов и ложно-положительным результатам. Непрямой метод трудоёмок, однако обладает более высокой точностью за счет применения двух видов антител.

Иммуногистохимия является ценным исследовательским методом для получения информации, дополняющей стандартные морфологические окраски [153]. Использование иммуногистохимии для изучения клеточных маркеров, определяющих специфический фенотип, предоставляет важную диагностическую и прогностическую информацию о статусе болезни и ее биологии. Использование антител в молекулярных исследованиях патологии ткани потребовало адаптации и уточнения иммуногистохимических методик, в частности при использовании фиксированных формалином тканей [142]. В отличие от жидкостных (solution-based) иммунологических методик, которые позволяют выявить белки, присутствующие в ткани в высоких концентрациях, на фиксированной ткани сохранность антигена вариабельна и непредсказуема [118]. Таким образом, история иммуногистохимии представляет собой попытки повысить чувствительность антител к малым количествам антигенов с целью интегрировать тканевой анализ с результатами молекулярно-биологических и иммунохимических тестов.

В условиях хорошего оснащения лаборатории можно осуществить две основные цели исследования: быстрая диагностика и собственно научное исследование.

Для ИГХ диагностики РРСС целесообразно исследовать ткани, иссеченные из краниальных и добавочной долей легкого свиней [106]. Дополнительно можно исследовать и другие паренхиматозные органы.

При ИГХИ органов свиней зарубежные авторы опираются на разработанный в 1994 году метод, который описал Patrick G. Halbur с соавторами. Суть их метода заключается в следующем: При вскрытии трупов поросят отбирают образцы легких и помещают их в 10% забуференный нейтральный формалин, жидкость Буэна или раствор содержащий 4% формальдегида и 1% глутарового альдегида. Затем ткань фиксируют в течение 24 часов. После фиксации ткани в жидкости Буэна, ее выдерживают в 5 сменах 70%-го этилового спирта. После этого формируют парафиновые блоки и нарезают на микротоме толщиной 3 микрона. Полученные срезы приклеивают на предметные стекла с поли-L-лизиновым покрытием, депарафинируют в 2 порциях ксилола и далее проводят по спиртам в возрастающей концентрации. Для удаления эндогенной пероксидазы срезы выдерживают в 3% растворе перекиси водорода 3 раза по 10 минут. Далее срезы промывают в 0,05M TRIS буфере (pH 6,7) – 5 минут. В качестве блокирующего раствора используют 5% нормальную сыворотку крови козы. В качестве первичных антител используют моноклональные антитела SDOW-17, разведенные в смеси 1 часть TRIS буфера и 9 частей фосфатного буфера (PBS pH 7,2) в соотношении 1:1500. Далее срезы с антителами инкубируют при 4⁰C 16 часов во влажной камере. После инкубации срезы ополаскивают TRIS буфером 5 минут, и еще 5 минут выдерживают в 1% растворе сыворотки козы на TRIS буфере. Затем срезы помещают в биотинилированную козью антимышиную антисыворотку на 30 минут. Затем ополаскивают в 3 порциях TRIS буфера. После этого срезы выдерживают в пероксидазном конъюгате в разведении 1:200 (в TRIS/PBS буфере), 40 минут. Отмывают в течение 5 минут в TRIS буфере. Далее срезы инкубируют в свежеприготовленном растворе 3,3'-диаминобензидин тетрахлориде от 8 до 10 минут при комнатной температуре. Затем, реакцию останавливают промыванием в дистиллированной воде в течение 5 минут. После этого окрашивают гематоксилином, промывают в растворе (10г MgS₄ и 2г NaHCO₃ в 1 литре ультрачистой воды). Полоскают в дистиллированной воде, дегидрируют, покрывают покровным стеклом при помощи монтирующей

среды [118]. Данная схема используется в зарубежной практике при выполнении реакции на срезах органов поросят при диагностике РРСС зарубежом.

1.7.1. Дифференциальная диагностика репродуктивного и респираторного синдрома свиней

Диагностику болезни проводят путем комплексного исследования с учетом эпизоотической обстановки, клинических признаков болезни и патоморфологических изменений с обязательным лабораторным исследованием для подтверждения окончательного диагноза [9].

Для лабораторных исследований используют пробы крови, легких, экссудат из грудной и брюшной полостей, средостенные лимфатические узлы от 2 до 5 свежих абортированных плодов или вынужденно убитых нежизнеспособных 1 – 3-суточных поросят. Для выявления антител к возбудителю РРСС исследуют пробы сывороток крови от нескольких свиноматок по 2-5 мл от каждой через 4-8 недель после неблагополучного опороса или аборта. Сыворотку крови исследуют также от поросят до приема молозива, отъемышей, ремонтного молодняка из 2-3 гнезд или станков, не раньше, чем через 2 недели после начала заболевания.

Дифференцируют РРСС от: бруцеллеза, лептоспироза, хламидиоза, классической чумы, болезни Ауески, листериоза, туляремии, энтеровирусной инфекции, японского энцефаломиелита, рожи свиней и незаразных болезней (алиментарных, травматических) [1].

1.8 Меры профилактики репродуктивного и респираторного синдрома свиней

На основании нормативной документации в области ветеринарии и сельского хозяйства профилактические мероприятия при попадании в

свиноводческое хозяйство вируса РРСС включают в себя общие, ветеринарно-санитарные и специальные мероприятия [123]. В РФ основным документом является приказ МСХ РФ №25 от 24.01.2018г.

Общие меры основаны на предупреждении заноса возбудителя РРСС в хозяйство, а именно: животных комплектовать из благополучных хозяйств после двукратного исследования сыворотки крови с интервалом 2 недели; в ранее неблагополучные хозяйства завозить только иммунизированных свиней; улучшать кормление с включением в рацион макро- и микроэлементов, в виде премиксов витаминов.

Специальные мероприятия включают в себя ряд пунктов: 1. В угрожаемых по РРСС хозяйствах проводят поголовную вакцинацию поросят инактивированной вакциной согласно наставлению. 2. Свиноматок, хряков-производителей и свинок прививают инактивированной вакциной за 3 недели до осеменения двукратно, а в последующем ранее привитых — однократно за 2-3 нед. до следующего осеменения. Хряков — 1 раз в 6 мес. 3. При подозрении на заболевание проводят лабораторные исследования патологического материала. 4. Запрещается осеменение свиноматок с признаками метрита, мастита, агалактии, с нежизнеспособным приплодом [14].

1.8.1. Методы иммунопрофилактики вирусного репродуктивного и респираторного синдрома свиней

В качестве средств специфической профилактики РРСС разработаны живые (сухая культуральная вирус-вакцина из аттенуированного штамма БД) и инактивированные вакцины: эмульсионная моновакцина для репродуктивного поголовья; поливалентные вакцины против РРСС и парвовирусной инфекции; и против болезни Ауески, РРСС, парвовирусной инфекции и лептоспироза.

Однако, как уже было описано выше, применение живой вакцины рекомендовано только в хозяйствах, неблагополучных по РРСС; вакцинировать животных в хозяйствах благополучных по РРСС, не рекомендуется [1].

1.8.2. Ветеринарно-санитарные мероприятия при репродуктивном и респираторном синдроме свиней

Ветеринарно-санитарные мероприятия также направлены на предупреждение заноса патогена в хозяйство, и предписывают: строгое соблюдение ветеринарно-санитарных правил содержания животных и обработку пищевых и боенских отходов. Согласно данным мероприятиям, животным можно скармливать отходы только после их термической обработки [14]. В литературе встречаются данные по использованию аэрозольного метода дезинфекции помещений в присутствии животных, который сокращает количество вспышек заболеваний бактериальной и вирусной этиологии у свиней [18].

Вирус РРСС чувствителен к эфиру, хлороформу и любому растворителю липидов. Неионные детергенты разрушают структуру оболочки, что приводит к высвобождению нуклеокапсида в окружающую его среду [102]. Во внешней среде (на различных поверхностях, спецодежде, инвентаре и в испражнениях) вирус сохраняет свою активность в течение 18 часов [105], в жидкой среде до 260 часов. При температуре 4 °С вирус РРСС теряет свою патогенность, а при температуре от -20°С до -70°С хорошо сохраняется достаточно долгое время [45].

В.С. Богданова в своей работе отразила данные, касающиеся водородного показателя среды, в которых говорится о том, что вирус РРСС стабилен при рН 6,0-7,5. При изучении устойчивости вириона из референтного штамма Lelystad было показано, что при рН среды 7,5 и $t=4^{\circ}\text{C}$ его период полураспада составляет 140 часов, а при $t=37^{\circ}\text{C}$ этот интервал составляет 3 часа [2].

К ветеринарно-санитарным правилам относится наложение ограничительных мер на хозяйства, которые регламентируют предупреждение распространения вируса РРСС внутри стада и вынос его за пределы свинокомплексов:

1. Запрещаются: ввоз и вывоз свиней за пределы неблагополучного пункта (за исключением вывоза на мясокомбинат для убоя); убой и перегруппировка свиней внутри хозяйства без разрешения ветеринарных специалистов; вывоз спермы хряков; реализация мяса в сыром виде. 2. Мясо и продукты убоя свиней перерабатывают на вареные сорта колбас или консервы; при невозможности переработки мяса его проваривают в течение 3 часов. 3. Туши, имеющие изменения, перерабатывают на мясокостную муку или проваривают в течение 3 часов. 4. Ограничения снимают через 60 дней после прекращения выделения больных животных и проведения всех ветеринарно-санитарных мероприятий предусмотренных инструкцией. После снятия ограничений не рекомендуется ввозить свиней в течение 6 мес. В мелких хозяйствах — убой всех свиней.

Кроме этого, для оздоровления хозяйства от РРСС разработана система мероприятий, в которой предусматривается поддержание температуры и микроклимата в свинарниках, организация кормления доброкачественными кормами с высокой энергетической ценностью, обогащенными витаминными добавками с включением витаминов Е, D и селена.

Ветеринарно-санитарные правила, регламентируют обеззараживание шкур и щетины 2,5%-ным раствором формалина, сжигание абортированных плодов и плацент после таких опоросов. Нежизнеспособный приплод подвергают вынужденному убоя с последующим сжиганием трупов. Для предупреждения распространения инфекции за пределы хозяйства необходимо очищать и дезинфицировать транспорт 2,5-5%-ным раствором формалина. Необходимо проводить ежедневную дезинфекцию помещений после их освобождения 3%-ным горячим раствором гидроксида натрия или 5%-ным раствором формалина. Навоз обеззараживают биотермическим способом.

Проводят дератизацию в помещениях независимо от наличия свиней. Согласно данной инструкции временно прекращают ветеринарные манипуляции: введение препаратов железа до двух недельного возраста; кастрацию; обрезание хвостов и скалывание клыков до недельного возраста. Поросятам в возрасте от трех до восемнадцати недель проводят вакцинацию инактивированной вакциной для предотвращения развития респираторного синдрома. Первый раз — в возрасте 2 - 3 мес., второй раз — в возрасте 5 - 7 мес., третий раз уже группе ремонта — за 2 - 3 недели до случки. Для основных свиноматок и хряков-производителей схема вакцинации остается без изменений. Проводят симптоматическое лечение для предотвращения развития тяжелых признаков заболевания [14].

При подтверждении диагноза на РРСС администрация района (города) по представлению главного ветеринарного инспектора района (города) выносит решение об объявлении хозяйства или фермы, или населенного пункта, неблагополучным по РРСС и вводит ограничения [1].

1.9 Заключение

Проблема РРСС известна на протяжении 30 лет. На сегодняшний день получены данные о детальном изучении всех биологических свойств вируса, отражена его высокая патогенность и способность к быстрым мутациям. Анализируя данные научных статей отечественных и зарубежных исследователей можно сделать вывод о независимом развитии разных подтипов вируса, о его высокой генетической вариабельности внутри одного типа, что, по всей видимости, объясняет возникшую в последние десятилетия в ходе эволюции высокую вирулентность циркулирующих штаммов.

Вирус РРСС распространен повсеместно во всём мире. Выделить вирус РРСС удалось лишь после того, как были выявлены вспышки нового синдрома у свиней и проведен ряд исследований, направленных на выделение, экспериментальное заражение и повторное выделение возбудителя. По всей видимости, вирус существовал задолго до 1986 года, но не имел высокой патогенности и широкого географического распространения.

Бессимптомное течение синдрома РРСС у взрослого поголовья в значительной мере осложняло и осложняет своевременную диагностику, и принятие необходимых мер направленных на недопущение развития инфекции.

Несмотря на глубокое изучение этиологического фактора РРСС, вопросы иммунитета при данном синдроме требуют дальнейшего изучения и вызывают множество споров. Разработан ряд живых и инактивированных вакцин. Однако известно, что применение аттенуированных вакцин влечет за собой реверсию вакцинного штамма к дикому типу и развитие синдрома РРСС, с яркой клинической картиной у свиней в тех хозяйствах, где ранее не регистрировалось данное заболевание. Поэтому применение живых вакцин в благополучных хозяйствах недопустимо.

В настоящее время, в России и за рубежом, разработано множество диагностических наборов и тест-систем, позволяющих дать оценку о наличии возбудителя в организме или антител к нему. За рубежом применяется

комплексная диагностика, определяющая окончательный диагноз на основании непосредственного выявления генома или антигенов вируса в тканях свиней, это гибридизация *in-situ* и ИГХ исследование. В современной отечественной литературе, до появления наших публикаций, отсутствовали данные по ИГХ исследованию, ряд ученых проводили патоморфологические исследования патологического материала от свиней с подозрением на РРСС. Поскольку такие исследования проводились на естественно больных животных, гистологическая картина усугублялась наличием в организме возбудителей других болезней. В настоящее время в Российской Федерации для диагностики РРСС применяется ИФА метод, который выявляет АТ к вирусу и ПЦР, который выявляет геном вируса. Данные методы, безусловно, хороши с диагностической точки зрения, но они не способны продемонстрировать тропизм вируса к клеткам и не доказывают связь вирусной инфекции с наблюдаемыми очагами поражения в органах и тканях животного. Кроме того, выявление вируснейтрализующих АТ к вирусу РРСС возможно лишь на 45 день после заражения, что может повлечь за собой ложно отрицательный диагноз. К вопросам диагностики РРСС необходимо подходить комплексно, доказывать непосредственную вовлечённость вируса в развитие патологических процессов в организме.

Рассматривая клинические и патологоморфологические признаки РРСС, можно сказать, что они зачастую носят смешанный характер, и постановка окончательного диагноза требует детальной дифференциальной диагностики. Это связано и с тем, что вирус РРСС, находясь в организме животного, ослабляет его иммунный статус и открывает тем самым ворота для вторичной инфекции, в которую входят как вирусные, так и бактериальные патогены. Отмечено влияние микоплазменной инфекции, которая оказывает свое патологическое действие на респираторный тракт животных, что в свою очередь является благоприятным условием для развития вирусной инфекции в организме. Пути передачи вируса включают в себя и алиментарный, воздушно-капельный и половой пути.

Патогенез при данном заболевании во многом зависит от вирулентности вируса и наличия вторичной инфекции. Для его детального изучения необходимо провести заражение поросят в экспериментальных условиях и разработать применение комплексной диагностики включающей в себя молекулярно-биологические, патоморфологические и иммуногистохимические исследования в ходе которых можно будет выявить и проанализировать такие характеристики репродуктивного и респираторного синдрома свиней в условиях эксперимента, а в дальнейшем отработать методику при вспышках заболевания в свиноводческих хозяйствах. Учитывая особенности распространения вируса среди поголовья свиней в пределах одного хозяйства, решение данной цели позволило бы выполнять все диагностические мероприятия с наименьшими затратами. Исходя из этого, нами была определена цель работы, направленная на изучение патоморфологических и иммуногистохимических характеристик РРСС. Для реализации поставленной цели необходимо решить ряд взаимосвязанных задач, которые состоят из анализа патологоанатомических изменений у экспериментально зараженных и инфицированных свиней в хозяйствах, изучить гистоморфологические изменения в патологическом материале от свиней с теми же условиями заражения. На основании полученных данных, разработать тест-систему для иммуногистохимического выявления антигена нуклеокапсидного белка вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней на основе моноклональных антител отечественного производства. С помощью данного метода определить распределение вируса в органах и тканях организма у экспериментально зараженных свиней вирусом репродуктивного и респираторного синдрома для получения «чистого результата» и проверить чувствительность и специфичность метода в период эпизоотий в свиноводческих хозяйствах, определить диагностическую ценность метода для возможности внедрения его лабораторную практику.

Глава 2. Собственные исследования

Работа выполнялась в соответствии с государственным заданием ФГБНУ ВИЭВ № 0578-2015-0001 «Разработать методические пособия по применению непрямого иммуногистохимического исследования в органах и тканях свиней для диагностики репродуктивного респираторного синдрома свиней и цирковирусной инфекции свиней 2 типа». Животных экспериментальных групп содержали в инфекционных блоках на опытной базе Вышневолоцкого отдела ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, остров Лисий. Там же производили заражение и вскрытие павших животных. Оценивали патологоанатомическую картину и отбирали необходимый материал для последующего исследования. Патоморфологическое и иммуногистохимическое исследование выполняли в секторе патоморфологии ФГБНУ ВИЭВ. Исследование сыворотки крови в ИФА и ПЦР выполняли в подразделении ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, институт вирусологии им.Д.И. Ивановского.

2.1 Материалы и методы

В данной работе было использовано 40 поросят, из которых 30 были взяты в 21 дневном возрасте для проведения эксперимента и 10 из свиноводческих хозяйств Ростовской, Свердловской и Белгородской областей. Для анализа работы было исследовано более 200 образцов патологического материала и более 800 гистологических препаратов. Для этого мы использовали лабораторное оборудование и материалы, необходимые для выполнения поставленных задач. В таблице 4 представлено дополнительное оборудование и расходные материалы, а также химические реактивы необходимые для выполнения ИГХ реакции и окраски гистологических срезов.

Таблица 4 – Перечень дополнительного лабораторного оборудования.

Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 16317-87
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или других видов	ТУ-16-535-84
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ Р 53228-2008
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239-93
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240-89
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241-89
Препаровальные иглы	
Крючки стеклянные и металлические	
Гистологические кассеты	
Заливочные кольца	
Заливочные формы	
Кисточки волосяные	
Перманентный маркер	
Микроскоп биологический	
Автоматические пипетки	
Наконечники	

Лабораторная посуда и материалы.

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Марля медицинская	ГОСТ 9412-93
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556-81
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 1770-74
Цилиндры вместимостью 1000 см ³	ГОСТ 1770-74
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336-82
Стекля предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672-75
Стекля покровные	
Широкогорлые банки с притертыми крышками вместимостью от 50 до 200 мл	
Химические стаканчики	
Пробирки вакуумные с наполнителем для сыворотки Vacuette Premium	РУ ФСЗ 2011/09572

Реактивы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Масло иммерсионное для микроскопии	ГОСТ 13739-78
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962-2013
Эфир для изготовления раствора для обезжиривания стекол	
Изопропиловый спирт	ГОСТ 9805-84
О-Ксилол, ЧДА	ТУ 2631-088-4449317

Парафин с температурой плавления 56 ⁰ С	ТУ 9369-003-89079081
10% забуференный формалин	РУ № РЗН 2013/775
Квасцовый гематоксилин Майера	ТУ 9398-001-89079081
Эозин водный	ТУ 9398-001-89079081
Криосреда Neg-50	
МАТ к гN белку вируса РРСС	
Антивидовые поликлональные антитела	
Фосфатносолевой буфер рН 7.7	
Твин-50	
Na-фосфатный буфер рН 5,0	
Диметилформамид	
3-амино-9-этилкарбазол	
Сухое обезжиренное молоко	
3% раствор перекиси водорода	
Глицириновый альбумин по Малори	
Монтирующая среда для гистологических препаратов	

Для получения сыворотки крови использовали вакуумные пробирки с наполнителем для сыворотки Vacuette Premium и одноразовые шприцы. Для транспортировки сыворотки крови использовали замороженные холодоэлементы и термос. Для выполнения термометрии использовали электронные термометры, фиксацию животных выполняли на процедурном столике.

Убой животных производили в технологическом помещении инфекционного блока, для утилизации биологических отходов использовали трупосжигательную печь.

Вскрытие трупов животных осуществляли в секционном зале инфекционного блока. Для этого использовали хирургический инструмент, поддоны. Для исследования образцов органов иссекали необходимое количество объектов патологического материала и упаковывали его в пластиковые химически стойкие емкости. Материал, предназначенный для гистологического исследования парафиновым методом, фиксировали 10% раствором формалина забуференного фосфатами натрия. А для материала, предназначенного для криотомной методики, использовали замороженные холодоэлементы и портативный холодильник.

Для получения гистологических образцов использовали оборудование производства Германия, фирмы Microm: установка карусельного типа, установка для заливки блоков парафином с криоконсолью, криостат. Для массовой окраски гистологических срезов стандартной методикой использовали установку линейного типа.

При подготовке патологического материала к парафиновой заливке использовали 10% забуференный формалин, изопропиловый спирт различной концентрации, орто-ксилол с добавлением к объёму 5% парафина Histomix. Для криотомии полученных образцов использовали замораживающий гель Neg-50 производства США и предметные криостатные столики.

При исследовании материала на гистологическую патологию применяли сложные гистохимические методы окраски, направленные на выявление биохимических и структурных изменений в тканях.

При выполнении ИГХ исследования использовали вытяжной шкаф, термостат фирмы Sanyo. Для выполнения лабораторных диагностических методик использовали соответствующие наборы и химические реагенты, а также, солевые буферные растворы.

Более подробные описания используемых в работе материалов представлены в соответствующих главах.

2.1.2. Исследование патологического материала методом ИФА и ПЦР

Для исследования проб сыворотки крови иммуноферментным анализом на выявление антител класса G к ЦВС-2 использовали тест-систему «Цирко – Серотест» («Ветбиохим», Россия), а для выявления IgG-антител к вирусу РРСС в сыворотке крови использовали набор «РРСС – Серотест плюс» («Ветбиохим», Россия).

Полимеразную цепную реакцию выполняли для выявления геномного материала ЦВС-2 и ВРРСС для этого применяли «тест-систему для обнаружения ЦВС-2 методом ПЦР» и «тест-систему для обнаружения ВРРСС

методом ПЦР («Ветбиохим»). Постановку реакции, учет и интерпретацию полученных результатов проводили согласно инструкции по применению, рекомендованной фирмой-производителем.

При положительном результате ПЦР проводили определение инфекционной активности вируса в культуре клеток альвеолярных макрофагов свиней (АМС). Для этого клетки АМС засевали в 96-луночные культуральные планшеты (Costar, США) в концентрации 1×10^5 клеток/лунка. Далее готовили десятикратные (от 10^{-1} до 10^{-6}) разведения 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 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

2.1.3. Проведение парафиновой заливки фиксированных образцов

Для парафиновой заливки, органы и образцы тканей отбирали сразу после вскрытия животных и помещали в химически стойкие пластиковые емкости с 10% раствором формалина. Фиксацию материала выполняли в течение 24-72 часов, размер объектов при фиксации был $1 \times 1 \times 0,5 \text{ см}$. Этот же фиксатор использовали для транспортировки и хранения материала, а также в чаше С-01 установки карусельного типа для временного хранения материала перед стартом программы.

Емкости с патологическим материалом хранили при комнатной температуре. Для обработки патологического материала и подготовки его к заливке в парафин использовали установку карусельного типа STP 120, (рисунок 8). В ее комплектацию входит 12 чашей, 1 емкость с 10% раствором забуференного формалина, 9 – для необходимых растворов пропитывающих фрагменты органов, и 2 с парафином, разогретым до 57°C . В качестве проводки материала перед пропитыванием парафином использовали «Изопреп» (Россия)

различной концентрации, в состав которого входит изопропиловый спирт и неионогенные ПАВ (чаши с С-02 по С-09). Для приготовления 50% (С-02 по С-04) и 70% (С-05 по С-07) концентрации «Изопрепа», использовали дистиллированную воду. В чашах карусели С-08 и С-09 использовали 100% раствор «Изопрепа». В С-10 использовали орто-ксилол (Роосия) с добавлением 5% парафина «Histomix» (Россия). В С-11 и С-12 – парафин с температурой плавления 57⁰С.



Рисунок 8 – Установка карусельного типа, фирмы Thermo Scientific.

После пропитывания образцов ткани, материал заливали горячим парафином, заливку органов осуществляли в полуавтоматическом режиме, при помощи оборудования ЕС 350-1 с криоконсолью ЕС 350-2 (поверхностная температура консоли -10⁰С), для формирования парафиновых блоков использовали многоразовые металлические формы соответствующих размеров и заливочные кольца (рисунок 9).

Для приготовления парафиновых срезов использовали санный микротом Microm HM 450 (рисунок 10), и одноразовые микротомные лезвия Microm SEC 35e, Patho cutter- r ERMA microtom blades. Толщина срезов 4 – 6 микрон. Для расправления гистосрезов использовали водяную баню Microm SB 80 (с температурой воды 47⁰С) и нагревательный столик фирмы Medax для сушки предметных стекол (рисунок 11). Для необходимой фиксации парафинового

среза на предметное стекло наносили глицериновый альбумин по Маллоури, что придавало оптимальную адгезию и минимизировало возможные артефакты. Высушивание приклеенных парафиновых срезов выполняли в вертикальном положении в держателе для предметных стекол, при температуре 60⁰С в течение 2 часов.



Рисунок 9 – Заливка и формирование образцов в парафиновые блоки.



Рисунок 10 – Электронный микротом санного типа



Рисунок 11 – Экспозиция срезов на предметном стекле.

Для обработки гистологических срезов во время проведения иммуногистохимического исследования использовали термостат с регулируемой температурой Sanyo Incubator MIR 262 (Япония). Для просушки стекол использовали ламинар с реверсной подачей воздуха ВЛ-12 (Россия).

Для технической обработки гистосрезов при проведении ИГХИ использовали ацетон, этиловый спирт, дистиллированную воду, фосфатный буфер и фосфатный буфер с Твином для промывки и обработки срезов. Для блокирования эндогенной пероксидазы применяли 3% раствор перекиси водорода. Для предотвращения неспецифического окрашивания применяли 5% раствор сухого обезжиренного молока или 10% нормализованную сыворотку крови лошади. Для проявления комплексов применяли ДМФ и АЭК.

2.1.4 Проведение криотомной обработки нефиксированных образцов

Для транспортировки экспериментальных проб патологического материала для криотомии использовали замороженные хладо-элементы и портативный холодильник. Материал из свиноводческих хозяйств доставляли в замороженном виде.

Для нарезки нефиксированного материала использовали замораживающий микротом Microm HM 525 (Германия) (рисунок 12), одноразовые микротомные лезвия Microm SEC 35 (Германия) и биполярные предметные стекла Thermo scientific Superfrost ultra plus или X-tra Adhesive (Германия), которые способствовали плотной фиксации среза на стекле, и таким образом не требовалось дополнительной сушки материала.



Рисунок 12 – Рабочая камера криостата для нарезки нативных срезов и фиксированных в 10% растворе формалина.

2.1.5. Окрашивание полученных срезов и принципы программирования оборудования

Для окраски полученных срезов использовали автоматическую установку линейного типа Microm HMS 70 (Германия). Данную установку использовали для рутинной окраски гистологических срезов гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое и специфическое окрашивание (на фибрин) выполняли ручным способом в вытяжном шкафу.

При составлении программы для автоматической окраски полученных гистологических срезов учитывали время необходимое для оптимального прокрашивания структурных элементов клеток, а также качество отмывки гистопрепаратов от избытка используемых растворов.

Время экспозиции гистосрезов при окрашивании подбирали эмпирически. После завершения программы срезы монтировали под покровное стекло при помощи монтирующей среды Sub-X, фирмы Leica (Германия).

2.1.6. Протокол получения моноклональных антител к rN белку вируса РРСС

Получение моноклональных антител, к белку rN вируса РРСС было выполнено Костной Л.В. и Козловым А.Ю. в ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Для иммунизации использовали самок мышей линии BALB/c. Мышей иммунизировали 3-4-кратно с интервалом 2 недели. В качестве антигена использовали рекомбинантный белок N вируса РРСС, полученный в прокариотической системе экспрессии в E.coli [2]. Для слияния была использована перевиваемая клеточная линия мышинной миеломы Sp2/0, дефектная по гену HGPТ, не продуцирующая собственные иммуноглобулины. В качестве ростовой среды для культивирования миеломных и гибридомных клеток использовали среду RPMI-1640 (США), содержащую 20%

эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 4,5 г/л глюкозы, 3 мМ глутамина, 0,2 ед/мл инсулина, 60 мкг/мл гентамицина.

После введения бустерной дозы антигена получали суспензию клеток селезенки мыши стандартным методом в охлажденной ростовой среде без сыворотки.

Для слияния использовали PEG/DMSO Solution (США). Гибридизацию проводили по методу Kohler G., Milstain C. Суспензию клеток селезенки и миеломные клетки смешивали в соотношении 3:1 (5:1 – 2-е слияние rN), соответственно. После слияния клетки ресуспендировали в селективной среде НАТ, вносили в 96-луночные панели в концентрации $1,5 \times 10^5$ клеток в лунку в объеме 0,1 мл. Панели с клетками инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. первичный просмотр панелей проводили через 5 дней после слияния.

“Подкармливание” гибридных клонов проводили каждые 2-3 дня, используя в течение 9-10 дней после слияния среду с НАТ. Культуральные жидкости тестировали на наличие противовирусной активности в реакции ИФА, когда клоны гибридных клеток занимали не менее 50% площади лунки. Клоны, обнаружившие специфическую активность, реклонировали путем лимитирующих разведений в 96-луночных панелях с фидерным слоем из перитонеальных макрофагов мышей. Супернатанты из лунок, содержащих реклонированные гибридомы, снова тестировали на наличие антител и их специфичность. Позитивные реклонированные гибридомы наращивали в культуральных флаконах увеличивающихся размеров.

После получения МАТ их исследовали в перекрестной реакции непрямым методом с применением иммунофлюоресценции. Из таблицы 5 видно, что антитела № 2 показали одинаковый результат при их титровании на тест-препаратах с европейским и североамериканским типами вируса РРСС. Активность моноклональных антител № 1 на тест-препаратах европейского вируса РРСС была выше, чем на тест-препаратах североамериканского типа того же вируса.

Таблица 5 – Исследование МАТ к rN-белку вируса РРСС шт. Lelystad в перекрестной реакции непрямо́й иммунофлуоресценции.

N п/п	Разведения МАТ	Результаты РНИФ						
		тест-препарат	1: 10 ¹	1: 10 ²	1: 10 ³	1: 10 ⁴	1: 10 ⁵	1: 10 ⁶
1	3d10c6f3	Е	+	+	+			
		СА	+	+				
2	4h7h9	Е	+	+	+			
		СА	+	+	+			

Примечание: Е – Европейский тип вируса; СА – Североамериканский тип вируса

Исходя из представленных в таблице 7 данных, нами были выбраны МАТ, для тестирования их в ИГХ реакции. В качестве первичных антител брали мышинные моноклональные антитела клонов 4h7h9, 3d10c6f3 к r-N белку вируса РРСС и меченые пероксидазой хрена поликлональные козы антивидовые АТ, в качестве вторичных.

2.1.7. Образцы патологического материала

В качестве исследуемого материала использовали пробы патологического материала: сыворотка крови животных и паренхиматозные органы: почка; печень; селезенка; паховый, бронхиальный и предлопаточный лимфатические узлы; легкие; трахея; миокард. Отбор патологического материала производили в соответствии с «правилами взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования».

2.1.8. Экспериментальное заражение животных вирусом репродуктивного и респираторного синдрома свиней

Для эксперимента использовали 30 поросят породы крупная белая, из свиноводческих хозяйств РФ, благополучных по РРСС, в возрасте от 21 дня. Перед постановкой животных в опыт исследовали сыворотку крови от них на наличие возбудителей РРСС и ЦВС-2. Для этого использовали одноразовые

шприцы объемом 5 см³ и пробирки с наполнителем для сыворотки Vacuette Premium. Далее проводили исследование сыворотки крови методами ИФА и ПЦР. Для взятия крови из краниальной поллой вены, и во время заражения вирусом РРСС поросят фиксировали в спинальном положении на процедурном столике.

Для заражения поросят использовали вирулентный штамм «Западносибирский 13» вируса РРСС в титре 4,66 lg ТЦД₅₀/мл и референтный штамм «Lelystad» вируса РРСС, с инфекционной активностью 5,0 lg ТЦД₅₀/мл.

Вирусосодержащий материал вводили в дозе 2 см³ внутримышечно и 3 см³ интраназально; животным контрольной группы вводили неинфицированную культуру клеток MARK-145 таким же методом и в соответствующей дозе.

2.1.9. Клиническое наблюдение за животными экспериментальных групп

В ходе выполнения экспериментов по заражению животных вирусом РРСС, за поросятами вели ежедневное наблюдение, в ходе которого выполняли ежедневную термометрию ректальным способом. 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 (т.е., если клиническое состояние животного резко ухудшалось, то кровь отбирали в этот же день).

Термометрию и отбор крови у контрольных групп животных выполняли 1 раз в 5 суток.

2.1.10. Убой животных экспериментальных и контрольных групп

Убой животных выполняли в соответствии с «положениями комитета по биоэтике РФ» и «правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными Министерством сельского хозяйства.

Убой животных экспериментальных групп выполняли с диагностической целью при получении положительных результатов на РРСС методами ИФА и ПЦР, для определения наличия вируса в органах. Убой животных контрольных групп производили с целью получения отрицательного контроля срезов органов при выполнении патоморфологических и иммуногистохимических исследований.

2.1.11. Вскрытие и отбор патологического материала при экспериментальном заражении репродуктивным и респираторным синдромом свиней

Органы от трупов экспериментально зараженных животных, и животных из контрольной группы получали в результате их падежа в ходе опыта или убоя с диагностической целью. Вскрытие трупов животных выполняли в секционном зале инфекционного блока, по срединной линии с рассечением брюшной и грудной стенок. Сразу после вскрытия оценивали анатомическое расположение органов на наличие патологических изменений.

От каждого животного из каждого исследуемого органа брали по 4 образца патологического материала для ПЦР и ИФА диагностики, парафиновой заливки и для криотомии. Для иссечения объектов необходимых размеров использовали одноразовые микротомные ножи. Затем полученные образцы органов помещали в гистологические кассеты, подписанные черно-графитным карандашом для маркировки материала. После этого кассеты помещали в пластиковые контейнеры с фиксирующей жидкостью (для гистохимического и ИГХ исследования), в емкости для охлаждения (для криотомии) и для заморозки материала (для ПЦР).

После вскрытия неиспользованный патологический материал, трупы животных и перчатки сжигали в трупосжигательной печи. Используемый инструментарий и поддоны дезинфицировали в 5% растворе хлорамина.

2.1.12. Отбор патологического материала при естественном инфицировании свиней вирусом репродуктивного и респираторного синдрома

Отбор патологического материала от свиней из свиноводческих комплексов РФ осуществлялся во время осмотра туш после технологического убоя или при летальном исходе, ветеринарными специалистами хозяйств. После этого органы были помещены в пластиковые емкости, заморожены и затем доставлены в сектор патоморфологии в замороженном виде, с нарочным. Материал исследовали от свиней с подозрением на репродуктивный и респираторный синдром, с целью апробации разработанной ИГХ тест-системы. После получения положительных результатов тестов, разработанную нами методику применяли для дифференциальной диагностики на циркулирующую инфекцию второго типа.

2.1.13. Гистологическое исследование патологического материала

После проведения гистохимического и иммуногистохимического окрашивания срезов исследуемых образцов выполняли их оценку при помощи микроскопа ZEISS Axio Scope A.1 (Германия) с окулярами x10 и объективами x10, x20, x40, x63, x100. Для проведения фотосъемки использовали фотоаппарат фирмы AxioCam ERc5s. Полученные фотографии обрабатывались при помощи программы Axio Vision Release 4.8.2 (06-2010).

2.1.14. Методы окрашивания гистологических срезов из исследуемых образцов

Для оценки гистопатологических изменений во внутренних органах свиней экспериментальных групп и подозреваемых на РРСС из хозяйств, использовали сложные гистохимические методы окраски, включающие в себя стандартную окраску гематоксилином и эозином, а также использование набора

реагентов и красителей для определения возраста фибрина в тканях компании BioVitrum (Россия).

2.1.15. Иммуногистохимическое исследование патологического материала

Для проведения ИГХИ использовали парафиновые и криотомные срезы исследуемых органов. В своей работе мы применяли непрямой метод ИГХ исследования, который основан на двухэтапном нанесении специфичных и антивидовых антител. В качестве первичных антител применяли мышинные антитела к рекомбинантному белку вируса РРСС. В качестве вторичных антител использовали меченные пероксидазой хрена козы анти тела к мышинным иммуноглобулинам.

2.1.16. Схемы подбора оптимальной концентрации моноклональных антител

На начальном этапе работы мы подбирали оптимальную концентрацию первичных антител на положительном контроле, полученном в ходе выполнения экспериментов по заражению поросят вирулентными штаммами вируса РРСС, и отработывали условия для проведения ИГХИ.

Для определения оптимальной концентрации первичных АТ специфичных к капсидному белку вируса РРСС, из одного блока нарезали необходимое количество идентичных срезов и использовали различную концентрацию АТ. 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 с рН 7.7. Вторичные антивидовые АТ (меченные пероксидазой хрена) использовали в разведении 1:200 с тем же ФСБ.

2.1.17. Проведение иммуногистохимического исследования

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

Параллельно проводили ИГХ исследование на замороженных, нативных и фиксированных в 10% растворе формалина образцах тканей.

Глава 3. Результаты собственных исследований

3.1. Экспериментальное заражение свиней вирусом репродуктивного и респираторного синдрома свиней

Перед постановкой животных в эксперимент ($n=30$) и в ходе опытов по заражению отбирали кровь из краниальной поллой вены для получения сыворотки крови.

С целью изучения патологического влияния вируса на паренхиматозные органы свиней и для разработки иммуногистохимического способа диагностики РРСС мы проводили экспериментальное заражение поросят, предварительно получив отрицательные результаты на РРСС и ЦВС-2 после исследования сывороток крови в ИФА и ПЦР.

После этого формировали экспериментальные группы и группу контрольных неинфицированных животных в отдельных боксах инфекционного блока.

Заражение вирусосодержащим материалом выполняли двумя способами внутримышечно по 2см^3 и интраназально по 3см^3 . Внутримышечное введение вируса выполняли в бедренную группу мышц, для интраназального введения использовали одноразовые шприцы без иглы, введение компонента осуществляли в момент инспирации. Поросят экспериментальных групп инфицировали вирусом РРСС:

- ✓ Референтный штамм «Lelystad» с инфекционной активностью $\lg 5,0 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$,
- ✓ Вирулентный штамм «Западносибирский 13» с инфекционной активностью $\lg 4,66 \text{ ТЦД}_{50}/\text{мл}$

Поросятам группы чистого контроля вводили неинфицированную культуру клеток MARK-145 таким же способом и в соответствующей дозе, как и животным экспериментальных групп.

В ходе опыта вели клиническое наблюдение за животными и оценивали патологическое состояние каждого животного методом визуального наблюдения и термометрии, а в случае падежа - вскрытия павших особей.

В результате проведенных экспериментов по заражению было исследовано 30 поросят, 238 образцов патологической ткани и органов и более 750 гистологических объектов.

3.2 Анализ клинических признаков инфекционной патологии при экспериментальном заражении свиней

В ходе опытов по заражению штаммом «Lelystad» вируса РРСС с инфекционной активностью $\lg 5,0$ ТЦД₅₀/см³ было установлено, что заражение этим штаммом привело к развитию незначительной клинической симптоматики: у инфицированных животных наблюдали снижение аппетита и вялость в течение 6 – 8 суток после заражения. Акт дефекации не был нарушен. Несмотря на снижение аппетита, поросята съедали суточную норму корма, а вялость характеризовалась заторможенной реакцией на внешние раздражители. По истечении 8 суток после заражения, общее состояние поросят начало улучшаться.

В результате заражения поросят вирулентным штаммом «Западносибирский 13» с инфекционной активностью $\lg 4,66$ ТЦД₅₀/см³, была выявлена гипертермия до 42⁰С, прогрессирующая апатия у животных через 24 часа после заражения. В первые сутки после заражения поросят погибло 50% из числа экспериментальной группы с признаками асфиксии. В дальнейшем у выживших животных клинические проявления были значительно ярче и проявлялись отказом от корма, тремором соматической мускулатуры, шаткостью походки, залеживанием, развитием дермальных патологий. Гибель остальных 50% данной группы наблюдали на протяжении 5 – 6 суток после заражения.

3.3 Клинические признаки репродуктивного и респираторного синдрома свиней при естественном инфицировании свиней

Выраженность клинических признаков при инфицировании свиней вирусом РРСС зависела от иммунного статуса животных и их возраста. Анализируя полученные данные из свиноводческих хозяйств, основными признаками РРСС являлись высокая смертность поросят раннего возраста, аборт у свиноматок во второй половине супоросности или рождением слабых, нежизнеспособных поросят. Кроме абортов, у репродуктивных свиноматок выявлялись прохолосты. Несмотря на наиболее характерные клинические признаки для репродуктивной патологии, в клинике животных отмечались и другие признаки заболевания, относящиеся к патологии респираторной и желудочно-кишечной систем.

У поросят в возрасте 60 суток РРСС проявлялся респираторной патологией, синюшностью ушных раковин, диареей, прогрессирующей слабостью, залёживанием завершающимся гибелью животных. У остальных поросят была смешанная симптоматика, которая крайне затрудняла определение окончательного диагноза.

У более старших возрастных групп (хряки производители, свиноматки и свиньи на откорме), не наблюдали каких либо характерных для РРСС признаков. А при контрольных убоях выявляли различные патологоанатомические признаки, требующие дополнительных методов исследования с целью определения окончательного диагноза [82].

В результате исследования патологического материала от поросят и свиней из свиноводческих хозяйств было исследовано 10 голов, от которых для гистологического исследования было взято 70 образцов органов и исследовано 210 гистологических объектов.

3.4. Результаты лабораторно-диагностических исследований образцов из экспериментального материала зараженных животных

В ходе каждого опыта за животными вели ежедневное наблюдение, в результате которого фиксировали проявления клинических признаков болезни, выполняли термометрию, регулярно отбирали пробы крови для анализа методами ИФА и ПЦР, и патологического материала для гистологического, ИГХ исследования и ПЦР.

Кровь отбирали из краниальной полый вены одноразовыми шприцами в объёме 5см^3 , затем кровь переносили в пробирки с активатором сыворотки. Полученную сыворотку крови исследовали на наличие геномов вируса РРСС и ЦВС-2 иммуноферментным и био-молекулярным способами.

Методом ПЦР в исследуемых сыворотках крови поросят вирус РРСС был выявлен на 2-е сутки после экспериментального заражения, а вирус-специфические IgG-антитела в ИФА – на 9-е. Максимальный титр накопления вируса в крови зафиксирован на 8-е сутки после заражения ($10^{2,5}$ ТЦД₅₀/см³), после чего оставался таким без достоверных изменений до окончания периода наблюдения (рисунок – 13). Титр накопления вируса РРСС в легких и лимфатических узлах животных составил $10^{2,0-2,5}$ ТЦД₅₀/см³.

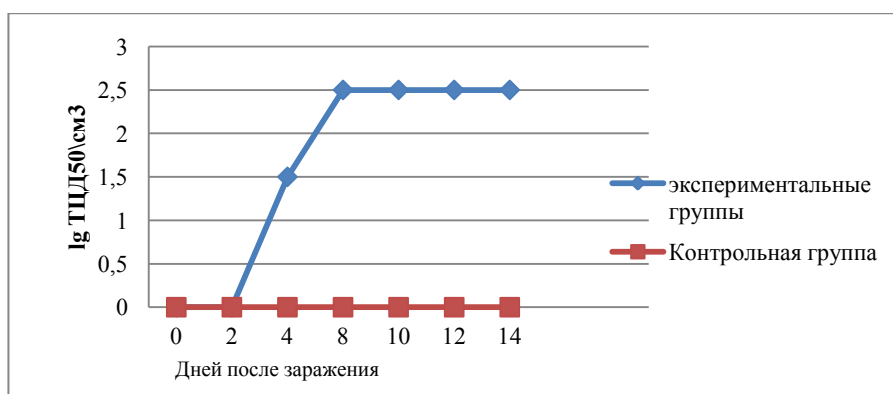


Рисунок 13 – Динамика содержания вируса РРСС в сыворотке крови поросят. Приведены среднегеометрические значения величин для животных каждой группы.

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.

3.5. Результаты патологоанатомических и патоморфологических исследований

3.5.1 Патологоанатомические признаки репродуктивного и респираторного синдрома свиней при экспериментальном заражении

Наиболее яркие патологоанатомические изменения характерные для РРСС отмечали в случае летального исхода после экспериментального заражения. При наружном осмотре трупов отмечали следующие изменения покровного эпителия:

На коже, в районе лицевого отдела черепа отмечали темно-фиолетовый цвет мягких тканей, пяточка, посинение кожи верхней и нижней челюсти (рисунок 14). Подобные изменения цвета кожи распространялись по вентральной поверхности шеи, затрагивая латеральные участки угла нижней челюсти (рисунок 15).



Рисунок 14 – Дермальная патология в области лицевого отдела черепа.



Рисунок 15 – Дермальная патология вентральной области шеи и латеральных и медиальных поверхностей грудных конечностей

Далее покраснение распространялось на латеральную и медиальную поверхность свободных конечностей (рисунки 15 и 16) и имело разлитой характер, от проксимального до дистального участков (рисунок 17).



Рисунок 16 – Дермальная патология в паховой области и на латеральных и медиальных поверхностях тазовых конечностей



Рисунок 17 – Обширные и точечные кровоизлияния на коже.

Нами было выявлено, 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. Подобные изменения наблюдали на коже с вентральной поверхности в районе грудины (рисунок 18), начиная от области рукоятки грудины, и заканчивая в лонной области.



Рисунок 18 – Петехии на эпидермисе в области грудины

Вскрытие трупов животных проводили по правилам патологоанатомического вскрытия, по срединной линии. Проводили визуальный осмотр органокомплекса, правильность анатомической топографии органов грудной и брюшной полостей. У животных контрольных групп не наблюдали патологий в топографии органов. У животных экспериментальных групп были выявлены изменения макрокартины органов, приводящие к нарушению топографических границ органов в различной степени.

Макроскопически, паренхима органов выглядела слегка отёчной, а в легочной ткани (рисунок 19), в дополнение ко всему, были выявлены участки кровоизлияний пропитывающие ткань в глубь органа, на срезе отмечали обильное отделяемое темно красного цвета. Лимфатические узлы, в основном, имели упругую консистенцию, но стоит отметить, что в предлопаточном узле (рисунок 20) пульпа выглядела отёчной и выступала над поверхностью среза, а

у бронхиального узла была рыхлая консистенция, отмечали подкапсульные петехии (рисунок 21).



Рисунок 19 – Лёгкое с диффузными участками кровоизлияний



Рисунок 20 – Предлопаточный лимфатический узел



Рисунок 21 – Бронхиальный лимфатический узел рыхлой консистенции.

После оценки макроскопических изменений паренхиматозных органов проводили отбор патологического материала для дальнейшего исследования патоморфологических изменений внутренних органов.

3.5.2 Патоморфологическое исследование образцов органов и тканей при экспериментальном заражении

В результате выполнения работы на автоматическом оборудовании были подобраны условия для оптимальной обработки патологического материала, а именно: концентрация изопропилового спирта и время полного пропитывания образцов необходимыми растворами. С этой целью использовали контрольные образцы различных тканей, с размером объектов необходимых нам для исследований. Контрольные образцы тканей подвергали различным схемам

автоматической обработки, отличие было во времени выдержки в каждой порции, концентрации растворов и в схеме составления последовательности растворов. В итоге, оптимальной схемой оказалась программа P04 представленная в таблице 6. Возрастающая концентрация изопропилового спирта меньше «сушила» ткань, а добавление орто-ксилола с 5% парафина способствовало лучшему пропитыванию образцов последующими порциями парафина.

Таблица 6 – Программа пропитывания материала необходимыми растворами.

Номер ёмкости	Раствор и его концентрация	Количество перемешиваний	Время выдержки
C01	Забуференный 10% раствор формалина	нет	В зависимости от автоматизации процесса.
C02	Изопропиловый спирт 50%	2	10 мин
C03	Изопропиловый спирт 50%	2	30 мин
C04	Изопропиловый спирт 50%	2	40 мин
C05	Изопропиловый спирт 70%	2	40 мин
C06	Изопропиловый спирт 70%	2	40 мин
C07	Изопропиловый спирт 70%	2	60 мин
C08	Изопропиловый спирт 100%	2	60 мин
C09	Изопропиловый спирт 100%	2	60 мин
C10	Орто-ксилол и парафин	2	240 мин
C11	I Парафин	2	150 мин
C12	II Парафин	2	210 мин

Органы и образцы тканей, предназначенные для криотомии, отбирали так же как описано в п.2.1 и помещали в химически стойкие пластиковые емкости, затем переносили в холодильную камеру. Для нарезки нативных препаратов патологический материал доставляли в сектор патоморфологии при температуре +4°C.

Из полученного материала нарезали объекты необходимого размера (0,5*0,5*1,0см) и при помощи криогеля Neg-50 (США) примораживали их к предметным столикам криостата. Для формирования криотомного блока, на охлажденный предметный столик наносили небольшое количество криогеля и сразу же располагали исследуемый материал. Затем давали застыть криогелю и наносили необходимое количество геля так, чтобы замораживающая среда

покрывала весь объект, это способствовало прочному закреплению исследуемого образца на предметном столике и его равномерному охлаждению. Заморозка образцов выполнялась в камере криотома при температуре -35°C , до полного промерзания патологического материала, что составляло 40 – 60 мин.

После окончательной заморозки исследуемых объектов предметный столик закрепляли в держателе, выполняли грубую подгонку до получения среза нужной плоскости при толщине среза 50 микрон. Далее, работу продолжали при толщине среза 5 – 7 микрон. Наиболее качественные срезы помещали на предметные стекла со статическим зарядом, маркировали их, часть гистосрезов окрашивали рутинным методом (гематоксилин – эозин), а часть стекол была направлена на иммуногистохимическое исследование.

Рутинное окрашивание гистосрезов выполняли после эмпирического подбора алгоритмов программы. В результате, использовали программу №20, регламентирующую полный цикл работ, описанный в таблице 7 включающий в себя депарафинизацию, отмывку депарафинизирующей жидкости, отмывку в дистиллированной воде, окрасу гематоксилином, эозином, и обработку срезов для заключения их под покровное стекло.

Таблица 7 – Программа автоматической окраски гистологических срезов.

№ п/п	Химический реактив	Время экспозиции
1	Орто-ксилол I	15 мин
2	Орто-ксилол II	15 мин
3	Орто-ксилол III	5 мин
4	Этиловый спирт I	15 мин
5	Этиловый спирт II	15 мин
6	Вода дистиллированная	15 мин
7	Вода дистиллированная	15 мин
8	Гематоксилин Майера	15 мин
9	Проточная вода	15 мин
10	Водный раствор эозина	10 мин
11	Этиловый спирт I	10 мин
12	Этиловый спирт II	5 мин
13	Этиловый спирт III	5 мин
14	Орто-ксилол I	10 мин
15	Орто-ксилол II	10 мин
16	Орто-ксилол III	5 мин

В результате выполнения работы был исследован патологический материал от поросят, использованных в эксперименте и от заболевших в условиях свиноферм, что составило 40 голов и более 800 гистологических срезов.

Стандартное гистологическое исследование выполняли при помощи изготовления парафиновых срезов, в результате этого были получены следующие данные.

В легочной ткани наблюдали обширные участки кровоизлияний в легочную паренхиму и диффузное расположение эозинофилов в ней. В строме органа выявляли скопление клеток лимфоидного ряда, отек ткани, кровоизлияния (рисунок 22). Гистоархитектоника среза ткани легкого выглядела неоднородно из-за наличия в ней участков ателектаза альвеол с кровоизлияниями, и обширных участков с утолщенной стромой и эмфиземой (рисунок 23). Утолщение стенок альвеол характеризовалось пролиферацией стромальной ткани лимфоидными клетками и обширным кровоизлиянием. В просвете бронха выявляли экссудативный пролиферат и наличие некротических элементов в нем. Стенка бронха также была обильно пропитана лимфоидными клетками (рисунок 24).

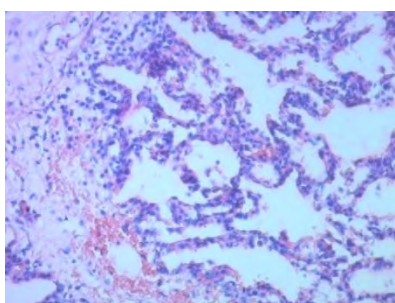


Рисунок 22 – Строма и паренхима легкого. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув.100

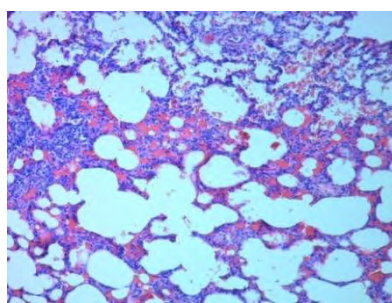


Рисунок 23 – Лёгкое. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 100.

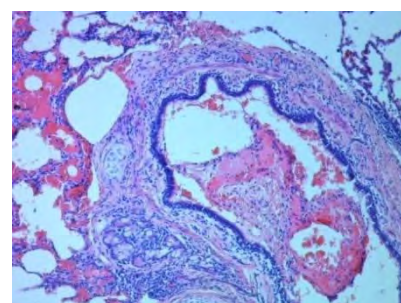


Рисунок 24- Просвет бронха. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 100.

В контрольной группе животных гистоархитектоника печени была сохранена (рисунок 25).

В гистологических срезах печени животных экспериментальной группы были выявлены следующие изменения: Строма органа в состоянии отека, внутри долек печени выявлены как диффузные, кольцевидные скопления клеток лимфоидного ряда, так и с более чёткими границами, но с участками кровоизлияний, десквамация интимы междолковых венозных и артериальных сосудов (рисунок 26). Так же отмечено скопление лимфоидных клеток в районе триады печени, отек стенки печеночного протока, десквамация его эпителия в просвет. Выявляли диффузное кровоизлияние в паренхиме органа, с преобладанием смазанности рисунка, наблюдали кариопикноз и лизис гепатоцитов, кариомегалия Купферовых клеток (рисунок 27).

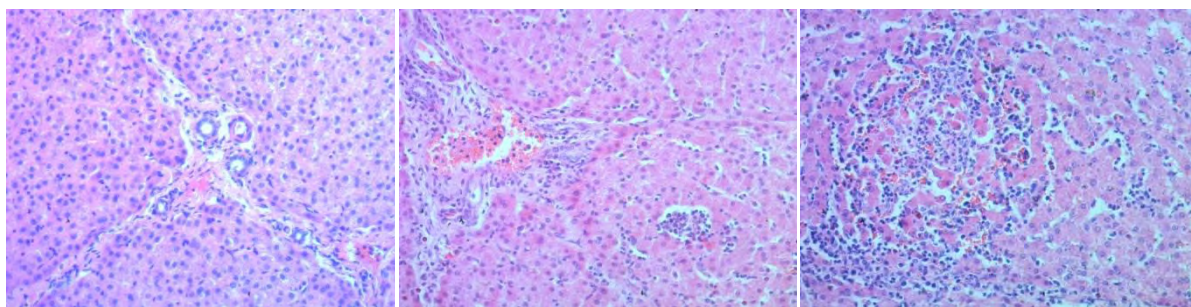


Рисунок 25 – Печень.
Контрольная группа.
Гематоксилин и
эозин. Ув. 200

Рисунок 26 – Печень.
Опыт. Гематоксилин и
эозин. Ув. 200.

Рисунок 27 – Печень.
Опыт. Гематоксилин и
эозин. Ув. 200.

После экспериментального заражения поросят вирулентным штаммом и при наступившей смерти гистоархитектоника в срезах селезенки характеризовалась дискмплексацией клеток белой пульпы, нарушением границ узелковых зон, вплоть до их слияния. Также, выявляли диффузные скопления гемосидерина в селезенке, наличие которого говорит об усиленном разрушении клеток эритроцитарного ряда (рисунок 28).

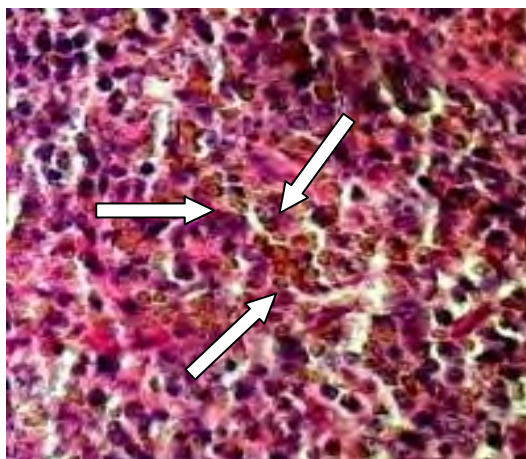


Рисунок 28 – Скопление гемосидерина в селезенке. Экспериментальное заражение. Гематоксилин и эозин. Ув. 400

При микроскопии гистологических срезов почек наблюдали смазанность рисунка канальцев, вследствие разрушения структурных элементов призматического и кубического эпителия (кариолизис, кариопикноз, цитолиз, десквамация эпителия в просвет) канальцев мозгового вещества почки. А также, выявляли локализованные участки кровоизлияний; обширное пропитывание ткани органа зернистыми эозинофилами, отёк сосудистых клубочков, кровоизлияния (рисунок 29).

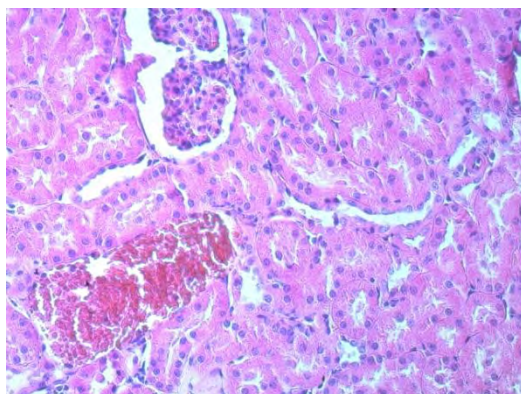


Рисунок 29 – Почка. Опыт.
Гематоксилин и эозин. Ув. 200.

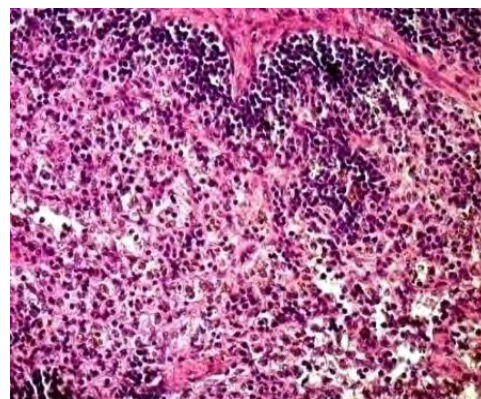


Рисунок 30 – Бронхиальный
лимфатический узел. Опыт.
Гематоксилин и эозин. Ув.200.

В срезах лимфатических узлов экспериментальных групп (рисунок 30) наблюдали дискompлексацию клеток коркового слоя. Лимфатические фолликулы были без четких границ, герминативная зона не выражена, маргинальная и мантийная зоны отсутствовали. Вследствие развития

заболевания, выявляли отек стенки трофических сосудов, набухание капсулы и трабекул. В трабекулах лимфатического узла отмечали большое количество зернистых эозинофилов.

3.5.3. Патоморфологическое исследование образцов органов и тканей полученных от естественно инфицированных свиней

Полученные нами данные по патологоанатомическим и патоморфологическим изменениям были схожи с экспериментальными данными и в основном отражали хроническое течение болезни. В результате этого мы применили специфические гистохимические методы окрашивания

При окраске на выявление фибрина были получены следующие результаты:

- в бронхиальных лимфатических узлах отмечали наличие гемосидерина в паренхиме органа и периваскулярное и внутрисосудистое отложение фибрина, который заполнял практически весь просвет сосуда (рисунок 31).

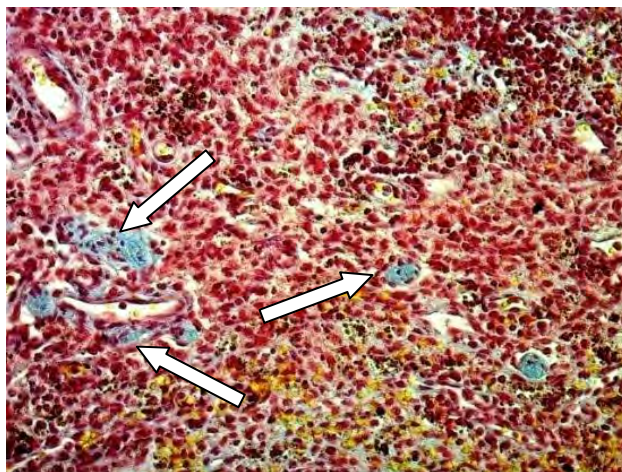


Рисунок 31 – Бронхиальный лимфоузел. Окраска на фибрин. Ув. 100.

- в просвете крупных бронхов выявляли обширные участки некроза слизистого и подслизистого слоя с наличием большого количества фибрина и глубокую альтерацию слизистого слоя бронхов (рисунок 32).

Отмечали, ателектаз альвеол, в межалвеолярных перегородках выявляли лимфоцитарную инфильтрацию с небольшим количеством фибрина на слизистой оболочке альвеол (рисунок 33).

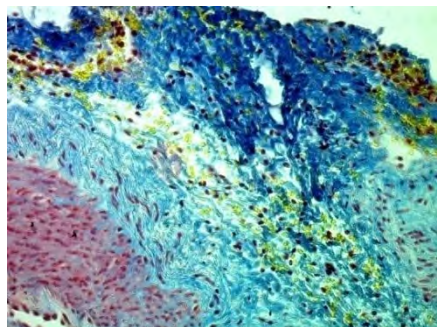


Рисунок 32 – Просвет крупного бронха. Окраска на фибрин. Ув. 100.

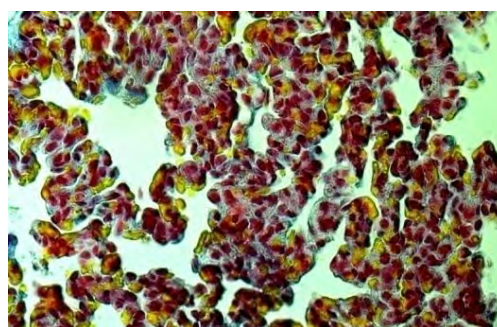


Рисунок 33 – Альвеолы легкого. Окраска на фибрин. Ув. 100.

3.6. Результаты иммуногистохимического исследования

После подготовки гистологических срезов, описанной в пункте 2.1.3, отработывали схему выполнения ИГХ реакции. Для парафиновых срезов применяли следующие схемы для подбора оптимальных условий выполнения ИГХ реакции:

Схема 1 – Выполнение ИГХ реакции.

1. Парафиновые срезы депарафинировали в орто-ксилоле (2 порции) по 10 минут в каждой.
2. Отмывали в этиловом спирте возрастающей концентрации (50%, 75%, абсолютный), по 5 минут в каждой порции.
3. Трижды отмывали в ФСБ pH 7,7 и при комнатной температуре, по 5 минут.
4. Эндогенную пероксидазу в срезах блокировали 3%ым раствором перекиси водорода в ФСБ pH 7,7 в течение 40 минут при комнатной температуре.
5. Отмывали в трех порциях ФСБ pH 7,7.

6. Для первого этапа непрямой ИГХ реакции брали первичные антитела к рекомбинантному белку N вируса, разбавленные в 5% растворе сухого обезжиренного молока в ФСБ pH 7,7. Помещали на ночь во влажную камеру при +4⁰C.

7. На следующий день отмывали в ФСБ как описано в пункте 3.

8. Для второго этапа непрямой ИГХ реакции, на срезы наносили вторичные АТ меченные пероксидазой хрена в разведении 1:200. Инкубацию выполняли при 37⁰C, 30 минут.

9. Отмывали в ФСБ с твином pH 7,7.

10. Для специфического окрашивания пероксидазной метки, перед использованием готовили рабочий раствор субстрата на Na-фосфатном буфере. Рабочий раствор готовили непосредственно перед работой, годен 12 час. Маточный раствор хранится при +4⁰C:

- Маточный раствор: 0,02г АЭК растворяли в 3мл ДМФ. Работу выполняли в перчатках и в вытяжном шкафу. Так как данный раствор обладает канцерогенными свойствами.

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

11. Для проявления конъюгированной пероксидазы хрена, на срезы наносили хромоген в количестве 200мкл. Инкубацию выполняли в термостате при температуре 37⁰C, 30 минут.

12. Для остановки реакции стекла отмывали в дистиллированной воде.

13. Для окрашивания ядер клеток применяли гематоксилин Майера с экспозицией 10 минут.

14. Промывали в ФСБ pH 7,7 5 минут

15. Дегидрировали в этиловом спирте 96⁰ аккуратно

16. Покрывали монтирующей средой под покровное стекло

Схема 2 – Выполнение ИГХ реакции.

1. Парафиновые срезы депарафинировали в орто-ксилоле (2 порции) по 10 минут в каждой.
2. Отмывали в этиловом спирте возрастающей концентрации (50%, 75%, абсолютный) по 3 минуты в каждой.
3. Отмывали ФСБ pH 7,7 3 раза по 5 минут при комнатной температуре.
4. Наносили на срез 3% раствор перекиси водорода в ФСБ pH 7,7 выдерживали в термостате при 37⁰C 15 минут.
5. Отмывали в ФСБ pH 7,7 3 раза по 5 минут
6. Наносили раствор 10% сыворотки крови лошади на ФСБ pH 7,7 и выдерживали в термостате при 37⁰C 60 минут.
7. Первичные антитела, разбавленные до концентрации 1:1500 в ФСБ pH 7,7 помещали в термостат при температуре 37⁰C на 80 минут.
8. Отмывали в ФСБ pH 7,7 три раза по 5 минут
9. Наносили вторичные АТ меченные пероксидазой хрена в концентрации 1:200, инкубировали в термостате при 37⁰C 40 минут.
10. Отмывали в ФСБ pH 7,7 3 раза по 5 мин.
11. Наносили рабочий раствор хромогена и инкубировали в термостате при 37⁰C 20 минут. Приготовление данного раствора описано в п.10, схема №1.
12. Промывали в дистиллированной воде
13. Наносили гематоксилин Майера на 10 минут
14. Промывали в ФСБ pH 7,7 5 минут
15. Дегидрировали в этиловом спирте 96⁰ аккуратно
16. Покрывали монтирующей средой под покровное стекло.

Гистологические срезы выполненные криотомной методикой исследовали в ИГХ реакции по следующей схеме:

Схема 3 – Выполнение ИГХ реакции.

1. Стекла со срезами органов помещали в холодный раствор, состоящий из 30мл этилового спирта 96⁰ и 70мл ФСБ pH7.7, в холодильную камеру при +4⁰C на 60мин.

2. Затем ополаскивали в ФСБ pH7.7 3 раза по 10мин при комнатной температуре.
3. На срезы наносили 3% раствор перекиси водорода на ФСБ pH7.7 при 37⁰С на 40мин.
4. Ополаскивали в ФСБ 3 раза по 10мин при комнатной температуре.
5. Готовили блокирующий 5% раствор обезжиренного сухого молока в ФСБ pH 7,7 и инкубировали при 37⁰С, 40 минут.
6. Ополаскивали в ФСБ pH7.7, 3 раза по 10мин при комнатной температуре.
7. Пока выполнялся процесс ополаскивания, готовили раствор рабочей концентрации первичных антител, специфичных к капсидному белку вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней. Рабочий раствор АТ готовили на ФСБ pH 7,7.
8. Затем на стекла наносили первичные АТ и помещали в термостат во влажную камеру при 37⁰С на 80мин.
9. Промывали в ФСБ pH7.7 3 раза по 10мин при комнатной температуре.
10. Пока идет процесс ополаскивания готовили рабочий раствор вторичных АТ с меткой пероксидазы хрена. Раствор АТ готовили на 5% растворе сухого обезжиренного молока на ФСБ pH 7,7. Как правило, разведение АТ составляет 1:200.
11. Затем наносили вторичные АТ и помещали в термостат во влажную камеру при 37⁰С на 40мин.
12. Промывали в ФСБ pH7.7 с 0,05% твина-50 3 раза по 10мин при комнатной температуре.
13. Во время выполнения пункта 12., для специфического окрашивания пероксидазной метки, перед использованием готовили рабочий раствор субстрата на ацетатном буфере pH 5,0. Рабочий раствор готовится непосредственно перед нанесением, годен 12 час. Маточный раствор хранится при +4⁰С. Приготовление данных растворов описано в п.10, схема №1.

14. Рабочий раствор наносили на срезы в количестве 200мкл, стекла помещали во влажную камеру в термостат при 37⁰С на 30 мин.

15. Для прекращения реакции срезы аккуратно промывали в дистиллированной воде.

16. Окрашивали ядра клеток гематоксилином Майера.

17. Проявляли в воде и наносили желатиновую среду под покровное стекло.

В результате, для выполнения ИГХ реакции на нативных срезах использовали схему №3, а для парафиновых срезов использовали схему №2.

В ходе выполнения ИГХ исследования, ядра клеток можно не окрашивать гематоксилином. В данном случае после п.15 схемы №3 мы наносили на срез желатиновую среду. Однако это усложняет дифференцировку клеток.

Иммуногистохимическое исследование в хозяйствах на выявление антигена вируса РРСС выполняли с целью отработки ИГХ тест-системы.

3.6.1. Иммуногистохимическое исследование гистологических препаратов органов с докраской ядер гематоксилином Майера

Для дифференциальной окраски и лучшей визуализации клеточных элементов, после прекращения ИГХ реакции и отмывки срезов в воде, на них наносили гематоксин Майера на 5-10минут. Затем срезы помещали в дистиллированную воду для проявления гематоксилина. Аккуратно дегидрировали в 3 порциях 96⁰С спирта, наносили монтирующую среду и закрывали покровным стеклом. При использовании замороженных срезов после окрашивания ядер на срез наносили желатиновую среду и покрывали под покровное стекло. Положительная ИГХ реакция определялась специфическим окрашиванием пероксидазного хромогена в кирпичный цвет.

На рисунке 34 представлены препараты легкого с положительной ИГХ реакцией на антиген вируса РРСС (А) и отрицательный контроль (Б). Положительная реакция характеризовалась тем, что в стенках альвеол на

макрофагах выявлено специфическое окрашивание пероксидазной метки вторичных антител в красно-кирпичный цвет. На рисунке 34 (Б) представлен срез легкого от животного контрольной группы, в результате проведенного ИГХ исследования, в строме органа на макрофагах не выявлено окрашивание хромогеном пероксидазной метки, что говорит об отсутствии АГ к вирусу РРСС.

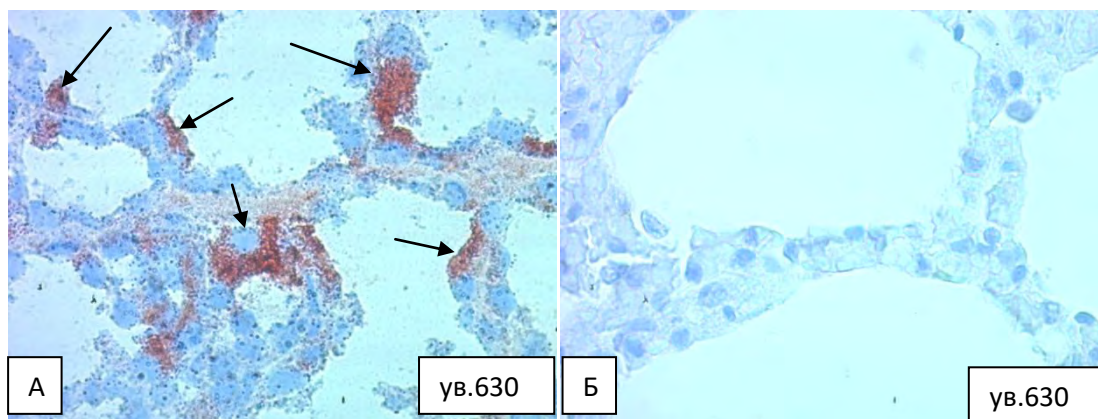


Рисунок 34 – Препарат легкого с докраской ядер. А. Положительная ИГХ реакция. Б. Отрицательная ИГХ реакция.

В случае с лимфатическим узлом, представленном на рисунке 35, выявлена идентичная положительная ИГХ реакция (А) как и в случае с легким, характеризующаяся скоплением макрофагов и специфическим окрашиванием, в отличие от контрольного среза (Б).

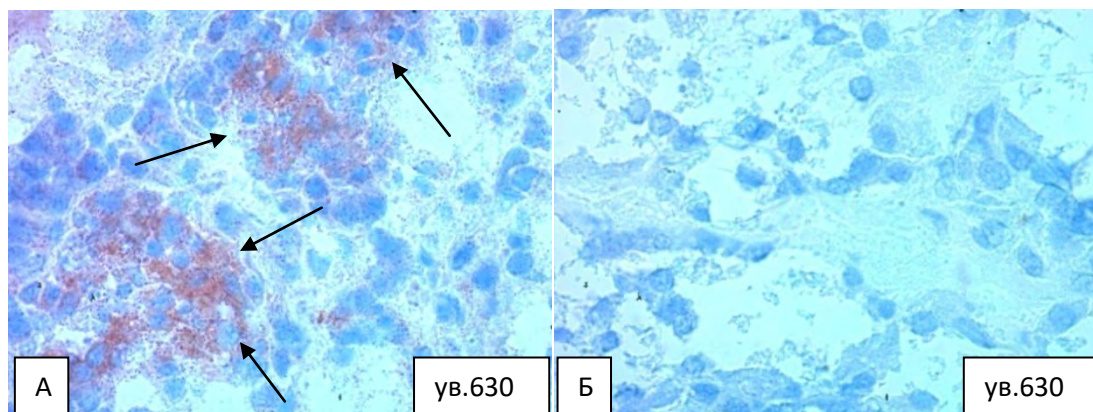


Рисунок 35 – Препарат лимфатического узла с докраской ядер. А. Положительная ИГХ реакция. Б. Отрицательная ИГХ реакция.

3.6.2. Иммуногистохимическое исследование гистологических препаратов органов без докраски ядер гематоксилином Майера

После инкубации гистосрезов с хромогеном, для остановки реакции, срезы помещали в дистиллированную воду, ополаскивали, затем наносили желатиновую среду и монтировали под покровное стекло.

В результате выполненной работы на препаратах без докраски ядер гематоксилином Майера были видны только положительно реагирующие участки окрашенные хромогеном в коричнево-красный цвет. Окрашивание АГ вируса РРСС на препаратах легкого и бронхиального лимфатического узла, представленных на рисунке 36 (А) и рисунке 37 (А), идентично гистологическим срезам представленным на рисунке 34 (А) и рисунке 35 (А).

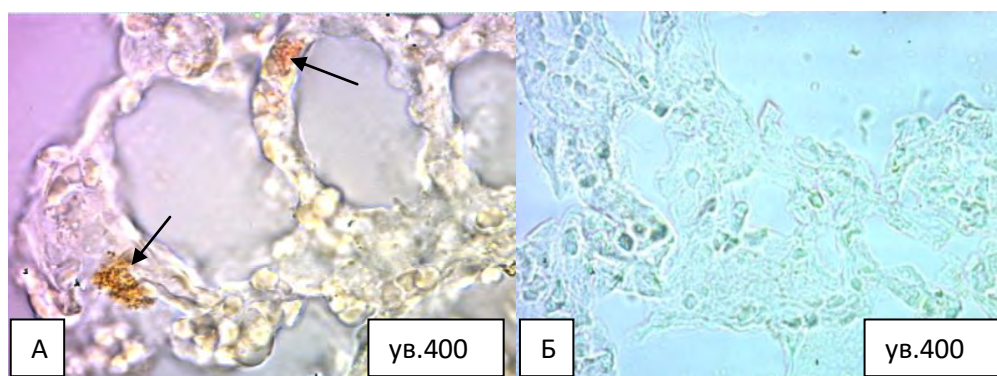


Рисунок 36 – Препарат легкого. А. Положительная ИГХ реакция. Б. Отрицательный контроль

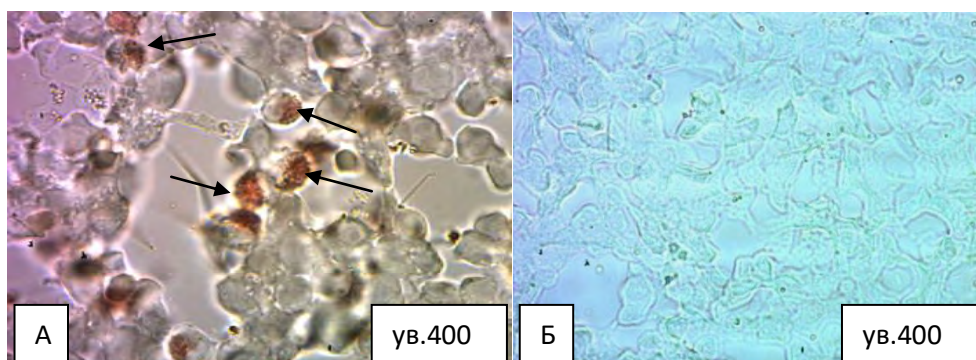


Рисунок 37 – Препарат бронхиального лимфатического узла. А. Положительная ИГХ реакция. Б. Отрицательный контроль

На контрольных срезах легкого и бронхиального лимфатического узла (Рисунок 36 (Б) и Рисунок 37 (Б)) видны только очертания клеток, без каких-

либо включений, что говорит об отрицательной ИГХ реакции и об отсутствии АГ к вирусу РРСС в данных тканях.

После исследования патологического материала методами ИГХ, ИФА, и ПЦР мы получили обобщенные данные из числа исследованных образцов патологического материала к числу положительно реагирующих проб. Из таблицы 8 видно, что результат диагностических исследований на наличие АГ к РРСС в иммуно-ферментном анализе экспериментально зараженных животных схож с данными ПЦР. Исследование патологического материала методом ПЦР показало положительный результат в экспериментальных пробах сыворотки крови, легких и бронхиальных лимфатических узлов. В результате проведенной работы положительная ИГХ реакция отмечена в патологическом материале от 6 поросят из свиноводческих хозяйств, и при исследовании образцов органов от 20 экспериментально зараженных животных: 10 из которых заражали вирулентным штаммом «Западносибирский 13» в титре 4,66 lg ТЦД₅₀/мл, и 10 поросят референтным штаммом «Lelystad» в титре 5,0 lg ТЦД₅₀/мл.

Таблица 8 – Количество положительных проб по отношению к общему числу патологического материала.

Метод Материал	ИФА	ПЦР	ИГХ
Сыворотка крови (э. з.)	20/20	20/20	н/и
Легкое (э. з.)	н/и	20/20	20/20
Лимфатический узел (э. з.)	н/и	18/18	20/20
Сыворотка крови (контроль)	0/10	0/10	н/и
Легкое (контроль)	н/и	0/10	0/10
Лимфатический узел (контроль)	н/и	0/10	0/10
Легкое (е. и.)	н/и	н/и	6/10
Лимфатический узел (е. и.)	н/и	н/и	6/10

Примечание: н/и – не исследовали; э.з – экспериментальное заражение; е.и. – естественная инфекция; числитель – положительные пробы; знаменатель – общее число исследованных проб.

В результате полученных положительных проб в ИГХ была проведена статистическая оценка общего количества вирусных бляшек в исследованном материале. Расчеты вычисляли по формулам:

$$K_{\text{ср}} = \frac{\sum_{i=1}^n Ki}{n}$$

$$\Delta k = \frac{\sum_{i=1}^n |K_{\text{ср}} - Ki|}{n}$$

Где:

$K_{\text{ср}}$ – среднее число вирусных бляшек в гистосрезе

Δk – среднеарифметическое отклонение

n – количество исследованных гистосрезов

i – порядковый номер гистосреза

В нашем исследовании при анализе ИГХ-положительных бронхиальных лимфатических узлов, величины были следующие: $n=18$ при исследовании патологического материала от естественно инфицированных животных, и $n=60$ при исследовании экспериментального материала. При анализе патологического материала из легких с положительной ИГХ реакцией $n=12$ (при естественной инфекции) и $n=40$ (при экспериментальном заражении).

В таблице 9 приведено среднее значение количества вирусных бляшек в одном гистологическом срезе. Из таблицы видно, что разница среднего количества вирусных бляшек между срезами органов от естественно и экспериментально инфицированных животных составляет: в срезе легкого на 2,43 вирусные бляшки; в срезе лимфатического узла на 4,44 вирусные бляшки в сторону уменьшения у естественно инфицированных животных.

Таблица 9 – Среднее количество вирусных бляшек выявленных на одном гистологическом срезе.

Метод Материал	ИГХ		
	Естественно инфицированные животные	Экспериментально зараженные животные	Контрольная группа
Легкое	4,42±0,92	6,85±0,99	0
Лимфатический узел	2,56±0,78	7,00±1,37	0
Печень	н/и	0	0
Почки	н/и	0	0
Селезенка	н/и	0	0
Трахея	н/и	0	0

Основываясь на полученных данных, мы можем предположить, что в организме больных животных из хозяйств происходит процесс адаптации к вирусу и количество инфицированных мононуклеаров уменьшается за счет их депонирования в организме.

Обсуждение

Заражение животных вирусом РРСС приносит огромные экономические потери во всем мире. В США ежегодные потери от РРСС в свиноводстве превышают потери от любых других болезней и составляют от 600 миллионов долларов.

Считается что одной из проблем, способствующих быстрому распространению болезни среди поголовья на крупных предприятиях свиноводческой отрасли, является массовость поголовья и высокая скученность животных на замкнутой территории, однако вирус РРСС опасен также и в частных подворьях, где в среднем содержится по несколько голов свиней.

Особенность данного вируса заключается в его способности быстро эволюционировать и независимо развиваться, демонстрируя одну из самых высоких в царстве вирусов степень изменчивости [12; 46]. Проводимые молекулярно-генетические исследования позволили определить 2 генотипа вируса и их подтипы. Вирус относится к высоковариабельным и различие в одном генотипе составляет до 18%. Вирус РРСС имеет генетическое сходство с вирусом артериита лошадей и вирусом повышения уровня лактат-дегидрогеназы у мышей, но в отличие от них, вирус РРСС менее стабилен. Он передается всеми возможными путями, на всех этапах жизнедеятельности свиней. Пути передачи вируса включают в себя и алиментарный, и воздушно-капельный и половой.

Несмотря на вариабельность и нестабильность вируса РРСС, он вызывает заболевание с характерными клиническими признаками, затрагивающими респираторную и репродуктивную систему [41]. Признаки респираторной патологии характерны в основном для молодых свиней и проявляются затрудненным дыханием, интерстициальной пневмонией и обтурацией структурных единиц респираторного тракта с тромбозом трофических сосудов

легких [109]. В старшем возрасте доминирует репродуктивная патология, которая проявляется абортами на позднем сроке супоросности, смертностью новорожденных поросят, цианозом кожных покровов с последующим некрозом ткани.

Одним из основных опасных свойств данного вируса, является его умение маскироваться от иммунной системы взрослого поголовья, переводя болезнь в латентное состояние, это называют процессом «адаптации» [42]. Этот феномен в Европе используется в хозяйствах в качестве превентивной меры для снижения потерь, для чего ремонтное стадо выдерживают в карантине перед осеменением, позволяя вирусу адаптироваться к животным. Изменчивость данного вируса и возможность его бессимптомного нахождения в организме взрослых животных затрудняет диагностику заболевания, особенно при наличии вторичной микрофлоры [43].

Вирус РРСС у всех производственных категорий свиней, включая ремонтное поголовье, у свиноматок и хряков-производителей участвует в развитии смешанных инфекций бактериальной и вирусной природы [21; 144]. Анализ литературы показал, что сочетанная инфекция вируса РРСС с бактериальными патогенами на примере *Streptococcus suis* повышает вероятность септицемии у свиней, а у работающего персонала во время вспышки РРСС на предприятии повышается риск развития гнойного менингита, обусловленного стрептококковой инфекцией [78]. Совместное инфицирование с *Bordetella spp.* увеличивает риск бронхопневмонии. Подобным образом усиливается патологическое влияние при сочетанной инфекции с вирусными патогенами, особенно с постоянно циркулирующими в хозяйствах – примером может быть цирковирс свиней 2 типа, в присутствии которого усиливается репродукция вируса РРСС, а совместная инфекция с коронавирусом значительно увеличивает тяжесть заболевания. Показано, что наиболее тяжелые респираторные патологии встречаются при взаимодействии вируса РРСС и ЦВС-2, которые вызывают расстройства, характеризующиеся абортами у супоросных свиноматок и бесплодием у хряков-производителей.

Происходит долговременная циркуляция вируса РРСС, а возникающие болезни респираторного тракта и нарушения функции воспроизводства трудно привязать к патогенному действию именно вируса РРСС без доказательства окончательной локализации вируса в очагах поражения [134].

Сложности в клинической диагностике данного синдрома заключаются в том, что он может проявляться только незначительным повышением температуры тела у взрослого поголовья, а в реакции нейтрализации антитела к вирусу РРСС можно выявить только на 45 день, в отличие от стандартного 21 дневного периода. Данный факт затрудняет серологическую диагностику. Исследования патологического материала методом ИФА и ПЦР показывают наличие вируса в организме, но не дают понимания о клеточном тропизме и особенностях диссеминации вируса в органах и тканях. Таким образом, необходимость подтверждения этиологической природы заставляет использовать дополнительные способы диагностики. Так как вирус накапливается в определенных органах, необходимо определить его специфику локализации и тропность к клеткам, что позволит с уверенностью сказать о присутствии вируса в поражённых органах и тканях животного, а также об эпизоотическом процессе внутри хозяйства и оптимизировать выбор материала для исследования.

Одним из методов, позволяющих выявить антиген вируса *in vivo* практически сразу же после заражения, является ИГХ исследование, которое широко применяется за рубежом при диагностике болезней свиней. Благодаря этому методу, зарубежные коллеги имеют возможность не только диагностировать заболевание, но и выявлять его динамику и эволюционные этапы вируса. Так, например, с конца 80х годов, антиген вируса РРСС выявляли только на альвеолярных макрофагах с рецепторами CD-163Si⁺. В дальнейшем коллеги сообщили о наличии АГ РРСС уже на макрофагах CD-163Si^{+/−} [67]. Более современные данные, в зарубежной литературе, отражают сообщения о выявлении АГ вируса РРСС уже на пристеночных макрофагах матки с рецепторами CD-169 [114]. В нашей стране ИГХ исследование пока не

получило широкого применения из-за отсутствия отечественных специфических реагентов, в частности антител к вирусу РРСС.

Однако, нашим коллегам, при исследовании данного синдрома у свиней на территории РФ, удалось не только выделить патогенный вирус РРСС, но и, применив методы современной клеточной и генетической инженерии, получить моноклональные АТ к г-N белку вируса РРСС. Данная работа способствовала развитию иммуноцитохимической диагностики синдрома РРРС на монослое культур клеток, что позволило расширить методы диагностики данного синдрома. Для усовершенствования комплексной диагностики синдрома РРС необходимо было наличие тест-системы позволяющей выявить антиген непосредственно в органах больных животных [34; 132; 133].

Исходя из данной ситуации, мы поставили перед собой задачу разработать надёжный, специфичный и высокотехнологичный метод выявления вируса РРСС в органах, что помогло бы определить его тропизм и роль в возникшем заболевании.

Для выполнения поставленной задачи и для разработки ИГХ метода нам необходимо было выполнить экспериментальное заражение свиней, изучить патоморфологическую [30; 31; 32; 33] и иммуногистохимическую характеристики при инфицировании животных вирусом РРСС [34; 35]. При разработке такого метода диагностики нужно было выполнить исследования патологического материала от свиней при экспериментальном заражении и при инфицировании животных в свиноводческих хозяйствах. Для достижения данной цели мы выполнили патологоанатомическое вскрытие трупов экспериментальных животных для определения анатомических патологий вызванных «чистой» инфекцией в эксперименте, и естественно больных поросят для сравнения полученных данных при заболевании в условиях хозяйства. Затем нам необходимо было исследовать полученный патологический материал на наличие морфологических изменений в органах и тканях, проанализировать полученные результаты и разработать ИГХ тест-

систему, которая позволила бы выявить антиген вируса РРСС непосредственно в органах и тканях. С помощью полученных результатов, при исследовании патматериала ИГХ методом, появилась возможность сопоставить патологические процессы в органах с локализацией вируса и определить его патологическое влияние на клеточном уровне и поставить окончательный диагноз.

Поскольку патогенными являются оба известных на сегодня типа вируса РРСС, для разработки ИГХ диагностики необходимы были антитела, способные взаимодействовать с антигенами двух типов вируса. Для более точных результатов ИГХ диагностики, нами было принято решение разработать непрямую ИГХ реакцию для антигена вируса РРСС, основанную на применении первичных АТ (к АГ вируса) и вторичных АТ (поликлональные АТ к первичным АТ). В результате этого, нами были выбраны мышинные моноклональные АТ к рекомбинантному белку N вируса РРСС (3d10c6f3 и 4h7h9) и поликлональные козы АТ к иммуноглобулинам мыши.

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

Выполняя гистотехнические методики на патологическом материале, одним из этапов исследования было определить патологические изменения в органах, вызываемые действием вируса при экспериментальном заражении животных и сравнить их с патологией у больных животных из свиноводческих хозяйств. А также необходимым условием было определить связь патологии в органах с наличием вируса.

При экспериментальном заражении поросят вирулентным штаммом «Западносибирский 13» вируса РРСС мы наблюдали 50% летальный исход у зараженных поросят в течение первых суток эксперимента, а использование референтного штамма «Lelystad» вируса РРСС в таких же условиях не дало характерных клинических признаков.

При проведении патологоанатомического вскрытия и последующего патоморфологического исследования мы выявили, что у поросят, павших в первые сутки после заражения вирулентным штаммом «Западносибирский 13» вируса РРСС, наблюдались обширные участки кровоизлияний в лёгких, ателектаз альвеол и эмфизема, обтурация просвета бронхиол клеточным конгломератом, отек паренхимы селезенки с венозным застоем и кровоизлияниями. У животных, павших через трое суток, выявляли более выраженные гистологические изменения в легочной ткани и бронхиальном лимфатическом узле, кроме этого наблюдали фокусные скопления лимфоидных клеток в паренхиме печени и геморрагический гломерулонефрит в почках. Перед контрольным убоем поросят, экспериментально зараженных референтным штаммом «Lelystad», наблюдали лишь снижение аппетита и вялость у животных. При патоморфологическом исследовании была установлена инфильтрация лимфоидными клетками в строме легкого и бронхиальных лимфатических узлах, в других органах не было выявлено патологий на клеточном уровне.

Исследование естественно инфицированных поросят выполняли по той же схеме. В результате, нами были получены данные о схожести патологических признаков с таковыми у экспериментальных животных при заражении вирулентным штаммом «Западносибирский 13» вируса РРСС, и характеризовались лимфоцитарной инфильтрацией в строме альвеол, отложением фибрина на их слизистой оболочке; некрозом слизистой оболочки бронхов; фибринозным выпотом в просвет бронха; дискомплексацией клеток коркового слоя и отложением гемосидерина в мозговом веществе, а также выявлены участки кровоизлияний в лимфатических узлах.

В результате проведенных патоморфологических, молекулярно-биологических и иммунохимических исследований, мы выявили положительные результаты при диагностике РРСС, но не определили взаимосвязь патологических процессов во внутренних органах с наличием вируса. Имея корреляцию результатов всех проводимых исследований и наличие экспериментального материала и патологического материала из хозяйств, мы применили ИГХ методику, для выявления антигена вируса в тканях больных свиней. В результате этого мы выяснили, что антиген к вирусу РРСС у экспериментально зараженных поросят выявляется на альвеолярных макрофагах легких и на макрофагах в бронхиальных лимфатических узлах. Исследования других паренхиматозных органов и образца трахеи не выявили присутствия АГ вируса РРСС. После отработки ИГХ методики на экспериментальном материале, мы провели свои исследования на патологическом материале от больных поросят в свиноводческих хозяйствах и получили идентичные результаты.

Таким образом, в результате полученных данных после проведения патоморфологического и иммуногистохимического исследования, можно сделать вывод о том, что основные патологические изменения сопровождаются накоплением вируса в легких и бронхиальных лимфатических узлах, а изменения, выявленные в других паренхиматозных органах, не связаны с накоплением вирусного АГ. Полученные нами данные подтверждаются данными зарубежных коллег, применяющих патоморфологические и иммуногистохимические исследования.

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

специфичности примененных нами антител ко всем типам вируса можно утверждать, что разработанная нами тест-система иммуногистохимического выявления вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней может быть использована при проведении ИГХ диагностики при европейском и североамериканском типе вируса РРСС в комплексе лабораторной диагностики.

В результате выполненной работы нам удалось создать ИГХ тест-систему, которая предназначена для выявления АГ двух типов вируса РРСС, что способствует более широкому ее применению. Опираясь на анализ данных об исследовании вируса, можно сделать вывод что применение такой тест-системы на крупных предприятиях свиноводческой отрасли для диагностики данного синдрома у свиней возможно без дополнительных затрат, так как материал можно отбирать во время технологического убоя. Учитывая особенности течения инфекционного процесса при РРСС, при проведении диагностических исследований с использованием не прямой иммуногистохимической реакции на патологическом материале от подозреваемых свиней можно сделать вывод об эпизоотическом состоянии хозяйства, исследовав всего несколько голов. Такой подход, по нашему мнению, облегчит проведение мониторинга синдрома, внесет весомый вклад в изучение патогенеза заболевания и иммунных, адаптивных процессов в организме.

Заключение

В результате выполнения диссертационной работы было установлено, что метод иммуногистохимического выявления вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней в органах даёт возможность повысить достоверность диагностики заболевания и подтвердить тропность вируса к клеткам и тканям органов свиней. Применение отечественных моноклональных антител в иммуногистохимическом анализе дает положительные результаты с обоими типами вируса РРСС. Полученные результаты в ИГХ реакции совпадают с данными, полученными в ПЦР и ИФА, при исследовании патологического материала. Основываясь на результатах

иммуногистохимического исследования, при экспериментальном заражении свиней вирусом РРСС можно определить, что антиген вируса локализуется в легких и бронхиальных лимфатических узлах. Поскольку предложенный непрямой метод иммуногистохимической диагностики репродуктивного и респираторного синдрома свиней позволяет выявить взаимосвязь между патологическими изменениями в органах свиней и диссеминацией вируса в тканях, данную тест-систему можно использовать в качестве дополнения к дифференциальной и комплексной диагностике.

Впервые в России был применен иммуногистохимический метод при исследовании патологического материала от свиней с РРСС, что позволило расширить и уточнить данные патоморфологических исследований органов свиней при естественной и экспериментальной инфекции РРСС, дало возможность сопоставить гистоморфологические изменения в паренхиме и строме легкого, бронхиальных лимфатических узлах и других паренхиматозных органах при экспериментальном заражении и естественном инфицировании. На основании полученных данных был разработан метод иммуногистохимической диагностики РРСС, с применением 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 североамериканским типами вируса. Иммуногистохимическое исследование может служить в качестве подтверждения данных патолого-морфологических исследований и использоваться как дополнительный метод диагностики РРСС. Полученные знания позволяют определить дальнейшее развитие в решении такой актуальной проблемы как РРСС. Разработанная нами непрямая ИГХ тест-система отличается от зарубежной укороченным сроком постановки реакции и сниженной трудоемкостью процесса.

Основываясь на результатах собственных исследований, можно сделать следующие выводы.

Выводы

1. Экспериментальное заражение поросят патогенным штаммом «Западносибирский 13» вируса РРСС с инфекционной активностью $4,66 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, показало 50% смертность зараженных поросят в течение первых 24 часов, с признаками одышки и угнетения общего состояния. При вскрытии были выявлены диффузные кровоизлияния в легочной ткани и спленомегалия. Наиболее характерные для РРСС патологоанатомические изменения установлены у поросят павших через 72 часа от начала эксперимента и более, что было сопоставимо с патологоанатомическими изменения в органах от спонтанно инфицированных животных.

2. При изучении патологического материала от поросят, павших в первые 24 часа после заражения патогенным штаммом «Западносибирский 13» вируса РРСС при помощи патоморфологического анализа гистологических срезов были выявлены обширные участки кровоизлияний в лёгких; ателектаз альвеол; эмфизема; обтурация бронхиол клеточным конгломератом; отек паренхимы селезенки, венозный застой, кровоизлияния. У животных, павших позднее 72 часов, выявлены более выраженные гистологические изменения в легочной ткани, лимфатических узлах (дискомплексация клеток в бронхиальном лимфатическом узле), кроме этого наблюдали фокусные скопления лимфоидных клеток в паренхиме печени. В почках - геморрагический гломерулонефрит.

3. При экспериментальном заражении поросят, референтным штаммом «Lelystad» вируса РРСС с инфекционной активностью $5,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, не удалось воспроизвести характерные патогномоничные признаки, наблюдали лишь снижение аппетита и вялость. При патологоморфологическом исследовании была установлена инфильтрация клетками лимфоидного ряда

стромы легкого и бронхиальных лимфатических узлов, в других органах не было выявлено нарушений гистоархитектоники.

4. При естественном инфицировании у поросят были выявлены патологоанатомические и патоморфологические изменения схожие с данными при экспериментальном заражении патогенным штаммом «Западносибирский 13» вируса РРСС. Они характеризовались лимфоцитарной инфильтрацией межальвеолярных перегородок, с выпотом небольшого количества фибрина на слизистой оболочке альвеол, некрозом слизистой оболочки бронхов. В бронхиальных лимфатических узлах выявлены участки кровоизлияний, структурная дискомплексации клеток коркового слоя, отложение гемосидерина в мозговом слое.

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

6. Разработанная тест-система на основе иммуногистохимического анализа для выявления вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней может быть использована для диагностики РРСС всех типов вируса РРСС в комплексе методов лабораторной диагностики.

Достижение благополучия по РРСС требует комплексного подхода и не может быть достигнуто при помощи одной лишь вакцинопрофилактики.

Появление новых данных о ключевой роли рецепторной специфичности в патогенезе данного заболевания вызывает необходимость определения тканевого тропизма новых естественно возникающих и модифицированных штаммов вируса РРСС. Таким образом, разработанный подход к комплексной диагностике РРСС с использованием ИГХИ будет использован в будущем в фундаментальных и прикладных исследованиях, направленных на искоренение РРСС.

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 указания 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*.

Список сокращений

АГ – антиген

АТ – антитело

АМС – альвеолярные макрофаги свиней

АЭК – 3-амино-9-этилкарбазол

ВРРСС – вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней

ДМФ – диметилформамид

ИГХ – иммуногистохимия

ИГХИ – иммуногистохимическое исследование

ИФА – иммуноферментный анализ

МАТ – моноклональное антитело

МЭБ – международное эпизоотическое бюро

ПАВ – поверхностно активные вещества

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РРСС – репродуктивно респираторный синдром свиней

ТБС – таинственная болезнь свиней

ФСБ – фосфатносолевой буфер

ЦВС-2 – цирковирус свиней второго типа

ЦВС-3 – цирковирус свиней третьего типа

pH – водородный показатель

Список литературы

1. Бессарабов Б.Ф. Инфекционные болезни животных: учебник для студентов высших учебных заведений / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вишутин, Е.С. Воронин и др. ; под общ. ред. А.А. Сидорчука. - М. : КолосС, 2007. – 671с.
2. Богданова В.С. Технология синтеза и очистки рекомбинантных антигенов вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней и цирковируса свиней второго типа и их применение в иммуноферментном анализе: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Богданова Валентина Саттаровна. – Щелково, 2007. – 139с.
3. Бочев И. Комплекс респираторных болезней свиней: обзор. 1. Этиология, эпизоотология, клинические формы и патологоанатомические черты / И. Бочев // Российский ветеринарный журнал. - 2008. - № 1. - С. 16–20.
4. Бригадиров, Ю.Н. Комплексная система мероприятий по профилактике и борьбе с респираторными и желудочно-кишечными болезнями свиней в современных условиях производства / Ю.Н. Бригадиров, О.В. Казимиров, С.В. Борисенко, С.В. Борисенко, М.Л. Бердников, Е.В. Михайлов, А.Н. Модин, Н.А. Борисенко, О.А. Манжурина, В.В. Довыдова // Ветеринарная патология. – 2011. - № 4. - С. 40-44.
5. Гаффаров, Х.З. Инфекционные болезни свиней и современные средства борьбы с ними / Х.З. Гаффаров, Е.А. Романов. - Казань: РИЦ «Школа», ООО «Шестой элемент», 2003. - 199 с.
6. Гребенникова, Т.В. Средства лабораторной диагностики репродуктивного и респираторного синдрома свиней / Т.В. Гребенникова, А.Д. Забережный, Е.А. Непоклонов, О.А. Верховский, Б.Г. Орлянкин, Т.И. Алипер // Ветеринария. – 2005. - №10. - С.24-26.
7. Голубцов, А.В. Клинико-эпизоотологическая характеристика и профилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней: автореф. Дисс. ...канд. вет. наук: 16.00.03 / А.В. Голубцов. – Воронеж., 2000. – 21 с.

8. Дрю Т. Синдром мультисистемного послеотъемного истощения, дерматит и синдром нефропатии / Т. Дрю // Мат-лы XIV международного ветеринарного конгресса. – М: - 2006. - С. 21-24.
9. Демкин, Г.П. К вопросу о ранней патоморфологической диагностике репродуктивно-респираторного синдрома свиней / Г.П. Демкин, И.В. Бородавкин // Ветеринария и зоотехния: Сб. научн. работ посв. 150-летию Сар. ИВМиБ. – Саратов: Сар. ИВМиБ, 2000. - С. 28-30.
10. Евглевский, Ал.А. Проблемы инфекционной патологии свиней в современных условиях / Ал.А. Евглевский, Е.И.Будкин, О.Б. Ситникова и др., // Вестник Курской Государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - №2. - С. 58 – 59
11. Жуков, И.Ю. Выявление клинико-анатомических, гистологических изменений при АЧС и локализации вируса в органах инфицированных животных / И.Ю. Жуков, И.В. Шевченко, А.С. Иголкин, и др. // Российский ветеринарный журнал, серия «Сельскохозяйственные животные». - 2015. - №3. - С.36-39.
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. 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.
14. Кузьмин, Г.Я. Репродуктивно-респираторный синдром свиней / Г.Я. Кузьмин, Т.Е. Соловьева // Инфекционные болезни животных. - М.: КолосС, 2007. – С. 390-395.
15. Кукушкин, С.А. Атипичный (высокопатогенный) репродуктивно-респираторный синдром свиней (обзор литературы) / С.А. Кукушкин, Т.З. Байбилов, А.Е. Фомин // Ветеринарная патология. - 2008. - №4. - С. 38-41.

16. Кукушкин С. А. Болезни репродуктивной системы свиней / С.А. Кукушкин, В. Ковалишин // Главный зоотехник. – 2010. - №1. – С. 34-36.
17. Крысенко, Ю.Г. Использование ИФА и ПЦР в диагностике цирковирусной инфекции и репродуктивно-респираторного синдрома свиней / Ю.Г. Крысенко, А.Ю. Попова, Н.В. Максимова // Научный потенциал современному АПК: Мат. Всерос. науч.-практ. конф. – Ижевск, 2009.- С. 92-95.
18. Меньшиков, А.В., Изучение эффективности препарата Вироцида при респираторных болезнях поросят смешанной этиологии / А.В. Меньшикова, Ю.Г. Крысенко, Н.А. Баранова // Ученые записки Казанской Государственной Академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2010. - Т: 203. – С. 166-170
19. Оганесан, А. С., Комплекс респираторных болезней свиней: факторный анализ и первичная модель заболевания / А.С. Оганесан, С. А. Дудников, О. П. Бъядовская, Л. Б. Прохватилова // Ветеринарная патология. - 2009. - № 4. - С. 28–38.
20. Орлянкин, Б. Г. Диагностика и специфическая профилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней / Б.Г. Орлянкин, Е.А. Непоклонов, Т. И. Алипер и др. // Ветеринария. - 2000. - №10. - С. 16-19.
21. Орлянкин, Б.Г. Цирковирусная инфекция свиней / Б.Г. Орлянкин, Т.И. Алипер, Е.А. Непоклонов // Ветеринария. - 2002. - № 11. - С. 48-51.
22. Орлянкин, Б. Г. Инфекционные респираторные болезни свиней / Б.Г. Орлянкин, Т. И. Алипер, Е. А. Непоклонов // Ветеринария. - 2005. - №11. - С. 3–5.
23. Орлянкин, Б.Г. Диагностика и специфическая профилактика РРСС / Б.Г. Орлянкин, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер, А.Д. Забережный, М.И. Мусиенко // Ветеринария сельскохозяйственных животных. - 2006. - №12. – С. 14.
24. Орлянкин, Б.Г. Инфекционные респираторные болезни свиней: этиология, диагностика и профилактика / Б.Г. Орлянкин, Т.И. Алипер, А.М. Мишин // Ветеринария. – 2010. - №4. – С. 67-69.

25. Орлянкин, Б.Г. Инфекционные респираторные болезни свиней: этиология, диагностика и профилактика / Б.Г. Орлянкин, А.М. Мишин, Т.И. Алипер // Ветеринария Кубани. – 2010. - №3. – С. 5 – 7.
26. Орлянкин, Б. Г. Специфическая профилактика репродуктивно - респираторного синдрома свиней / Б.Г. Орлянкин, Т. В. Гребенникова, Т. И. Алипер, А. М. Мишин // Свиноводство. - 2010. - №3. - С. 67–69.
27. Попова, Н. Ю. Морфологические изменения в респираторной системе при репродуктивно - респираторном синдроме свиней / Н.Ю. Попова, Л. А. Рабовская // Аграрный вестник Урала. - №11-2 (106). - 2012. - С. 23-24.
28. Семченко, В.В., Гистологическая техника / В.В. Семченко, С.А. Барашкова, В.Н. Артемьев. - Омск – Орел.: Омская областная типография, 2006. - С. 38 – 43.
29. Сидорчук, А. А. Причины респираторной патологии свиней в ряде промышленных комплексов России / А. А. Сидорчук, Е. А. Зеленуха // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2014. - №1. – С. 17 – 24.
30. 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.
31. 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.
32. Стаффорд В.В. Гистологическая диагностика респираторного синдрома свиней / В.В. Стаффорд // Труды ВИЭВ. - Т. 79. – 2016. - С. 283 – 288.
33. 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.
34. 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.

35. 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.

36. Тамбиев, Т.С. Ассоциативные желудочно-кишечные инфекции молодняка свиней в Ростовской области / Т.С. Тамбиев, Л.А. Малышева // Ветеринарная патология. – 2010. - №4. – С.88-92.

37. Шахов, А.Г. Специфическая профилактика респираторных болезней свиней бактериальной этиологии / А.Г. Шахов, Л.Ю. Сашнина, М.И. Лебедев, А.И. Никулин // Ветеринарная Практика. - 2008. - № 3(42). – С. 52-55.

38. Albina, E. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus / E. Albina, C. Carrat, B. Charley // Journal of Interferon and Cytokine Research. – 1998. – V.18(7). - P 439 -450.

39. Allan, G.M. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication / G.M. Allan, F. McNeilly, J. Ellis, S. Krakowka, B.Meehan, I. McNair, I. Walker, S. Kennedy // Archives of Virology. - 2000; V. -145(11). – P. 2421.

40. Allende, R. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions / R. Allende, T.L. Lewis , Z. Lu , D.L. Rock , G.F. Kutish , A. Ali , A.R. Doster , F.A. Osorio // Journal of General Virology. – 1999. – V. 80. – P. 307-315.

41. Allende, R. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection / R. Allende, W.W. Laegreid, G.F. Kutish, J.A. Galeota, R.W. Wills, F.A. Osorio // Journal of Virology. - 2000. – V.74(22). – P.10834-10837.

42. Barranco, I. Immunohistochemical expression of IL-12, IL-10, IFN- α and IFN- γ in lymphoid organs of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected

- pigs / J. Gómez-Laguna, I.M. Rodríguez-Gómez, J.J. Quereda, F.J. Salguero, F.J. Pallarés, L. Carrasco // *Veterinary immunology and immunopathology*. – 2012. – V. 149. – P.262–271.
43. Batista, F.D. The who, how and where of antigen presentation to B cells / F.D. Batista, N.E. Harwood // *Nat. Rev. Immunol.* - 2009. - №9. - P.15–27.
44. Benfield, D. Transmission of PRRSV by artificial insemination using extended semen seeded with different concentrations of PRRSV / D. Benfield, C. M. Nelson, R.R. Steffen // *In Proceedings of the 31st Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners, Indianapolis*. - 2000. - P. 405–408.
45. Bloemraad, M. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs / M. Bloemraad, E.P. de Kluijver, A. Petersen, G.E. Burkhardt, G. Wensvoort // *Veterinary Microbiology*. – 1994. – V.42(4). – P. 361-371.
46. Brar, M.S., Evolutionary diversification of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus / M.S. Brar, M. Shi, M.P. Murtaugh, F.C. Leung // *Journal of General Virology*. – 2015. – V.96(7). – P.1570-1580.
47. Brockmeier, S.L. Effects of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Bordetella bronchiseptica*, or a combination of both organisms in pigs / S.L. Brockmeier, M.V. Palmer, S.R. Bolin // *American journal of veterinary research*. – 2000. – V.61(8). – P.892-899.
48. Brockmeier S.L., Palmer M.V., Bolin S.R., Rimler R.B. Effects of intranasal inoculation with *Bordetella bronchiseptica*, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, or a combination of both organisms on subsequent infection with *Pasteurella multocida* in pigs. // *American journal of veterinary research*. – 2001. – V.62(4). – P. 521-525.
49. Buddaert, W. In vivo and in vitro interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) / W. Buddaert, K. Van Reeth, M. Pensaert // *Advances in experimental medicine and biology*. – 1998. – V.440. – P.461-467.

50. Cafruny, W.A. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection spreads by cell-to-cell transfer in cultured MARC-145 cells, is dependent on an intact cytoskeleton, and is suppressed by drug-targeting of cell permissiveness to virus infection / W.A. Cafruny, R.G. Duman, G.H. Wong, S. Said, P. Ward-Demo, R.R. Rowland, E.A. Nelson // *Virology Journal*. – 2006. – V. 3. – P.90.
51. Cavanagh, D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae / D. Cavanagh // *Archives of Virology*. - 1997. – V.142. – P.629–633.
52. Cheon, D. S. Detection of nucleic acids of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of naturally infected piglets as determined by in situ hybridization / D. S. Cheon, C. Chae, Y.S. Lee // *Journal of comparative pathology*. - 1997. – V.117. P.157–163.
53. Cheon, D. S. Distribution of a Korean strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected pigs, as demonstrated immunohistochemically and by in-situ hybridization / D. S. Cheon, C. Chae// *Journal of comparative pathology*. - 1999. – V.120. P.79–88.
54. Cheon, D. S. Comparison of virus isolation, reverse transcription-polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from naturally aborted fetuses and stillborn piglets / D. S. Cheon, C. Chae // *Journal of veterinary diagnostic investigation*. - 2000. – V.12. - P.582–587.
55. Cheon, D. S. Antigenic variation and genotype of isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Korea / D. S. Cheon, C. Chae // *Veterinary Research*. - 2000. – V.147. – P.215–218.
56. Cheon, D. S. Distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in stillborn and liveborn piglets from experimentally infected sows / D. S. Cheon, C. Chae // *Journal of comparative pathology*. - 2001. – V.124. – P.231–237.
57. Christopher-Hennings, J. Detection of PRRSV in boar semen using the polymerase chain reaction / J. Christopher-Hennings, E.A. Nelson, J.K. Nelson, R.J. Hines, S.L. Swenson, H.T. Hill, J.J. Zimmerman. J.B. Katz, M.J. Yaeger, C.C. Chase // *Journal of clinical microbiology*. - 1995. – V.33. – P.1730–1734.

58. Christopher-Hennings, J. Effects of a modified-live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boars / J. Christopher-Hennings, E. Nelson, J. Nelson, D. Benfield // American Journal of Veterinary Research. - 1997. - V.58. – P.40–45.
59. Coons, A.H. Immunological properties of an antibody containing a fluorescence group / A.H. Coons, H.J. Creech, R.N. Jones // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1941. – Vol.47. – P.200-202.
60. Dea, S., Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates / S. Dea, C.A. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh, D. Rogan // Archives of Virology. - 2000. – V.145(4). – P.659-688.
61. den Boon, J.A. Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases / J.A. den Boon, K.S. Faaberg, J.J. Meulenberg, A.L. Wassenaar, P.G. Plagemann, A.E. Gorbalenya, E.J. Snijder // Journal of Virology. - 1995. – V. - 69(7). – P.4500-4505.
62. Feng, W. In utero infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by Streptococcus suis type II / W. Feng, S.M. Laster, M. Tompkins, T. Brown, J.S. Xu, C. Altier, W. Gomez, D. Benfield, M.B. McCaw // Journal of Virology. - 2001. – V.75(10). – P.4889-4895.
63. Fisher, C. Immunohistochemistry in diagnosis of soft tissue tumours / C. Fisher // Histopathology. – 2011. – V.58. –P.1001-1012.
64. Frydas, I.S. Replication characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) European subtype 1 (Lelystad) and subtype 3 (Lena) strains in nasal mucosa and cells of the monocytic lineage: indications for the use of new receptors of PRRSV (Lena) / I.S. Frydas, M. Verbeeck, J. Cao, H.J. Nauwynck // Vet. Res. - 2013. – V.44. – P.13
65. Galina, L. Interaction between Streptococcus suis serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets / L.

- Galina, C. Pijoan, M. Sitjar, W.T. Christianson, K. Rossow, J.E. Collins // *Vet Rec.* - 1994. – V.134(3). – P.60-64.
66. Gilbert, S. A. Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR assay / S. A. Gilbert, R. Larochelle, R. Magar, H. J. Cho, D. Deregt // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – V.35. P.264–267.
67. Gao, L. MicroRNA 181 suppresses porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection by targeting PRRSV receptor CD163 / L. Gao, X.K. Guo, L. Wang, Q. Zhang, N. Li, X.X. Chen, Y. Wang, W.H. Feng // *J Virol.* – 2013. – V.87(15). – P.8808-8812.
68. Gómez-Laguna, J. Immunopathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome in the respiratory tract of pigs / J. Gómez-Laguna, F.J. Salguero, F.J. Pallarés, L. Carrasco // *Veterinary Journal.* - 2013. – V. 195(2). – P.148-155.
69. Guo, L. Modulation of CD163 Expression by Metalloprotease ADAM17 Regulates Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Entry / L. Guo, J. Niu, H. Yu, W. Gu, R. Li, X. Luo, M. Huang, Z. Tian, L. Feng, Y. Wang // *Journal of Virology.* – 2016. – V.90(11). – P.5532.
70. Halbur, P.G. Development of a streptavidin–biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung / P.G. Halbur, J.J. Andrews, E.L. Huffman, P.S. Paul, X.J. Meng, Y. Niyo // *J Vet Diagn Invest.* - 1994. – V.6. – P. 254–257.
71. Halbur, P.G. Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old, colostrum deprived pigs / P.G. Halbur, L.D. Miller, P.S. Paul, X.J. Meng, E.L. Huffman, J.J. Andrews // *Veterinary Pathology.* - 1995. – V.32. – P.200–204.
72. Halbur, P.G. Porcine viral respiratory disease / P.G. Halbur // *Proc. 15 Int. Pig Vet. Soc. Congr.* – Birmingham. - 1998. - P. 1–9.
73. Haimi-Hakala, M. Etiology of acute respiratory disease in fattening pigs in Finland / M. Haimi-Hakala, O. Hälli, T. Laurila, M. Raunio-Saarnisto, T. Nokireki, T.

- Laine, S. Nykäsenoja, K. Pelkola, J. Segales, M. Sibila, C. Oliviero, O. Peltoniemi, S. Pelkonen, M. Heinonen // *Porcine Health Manag.* – 2017. – V.23. – V.3. – P.19.
74. Harms, P.A. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus / P.A. Harms, S.D. Sorden, P.G. Halbur, S.R. Bolin, K.M. Lager, I. Morozov, P.S. Paul // *Vet Pathol.* – 2001. – V.38(5). – P.528-539.
75. Haynes, J.S. Temporal and morphologic characterization of the distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by in situ hybridization in pigs infected with isolates of PRRSV that differ in virulence / J.S. Haynes, P.G. Halbur, T. Sirinarumitr, P.S. Paul, X.J. Meng, E.L. Huffman // *Vet Pathol.* – 1997. – V.34. – P.39–43.
76. Hermann, J.R. Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose / J.R. Hermann, C.A. Munoz-Zanzi, M.B. Roof, K. Burkhardt, J.J. Zimmerman // *Vet. Microbiol.* - 2005. – V.110. – P. 7–16.
77. Hume D.A. Macrophages as APC and the dendritic cell myth / D.A. Hume // *Journal of Immunology.* - 2008. – V.181(9). – P. 5829-5835.
78. Huong, V.T.L. Temporal and spatial association of *Streptococcus suis* infection in humans and porcine reproductive and respiratory syndrome outbreaks in pigs in northern Vietnam / V.T.L. Huong, L.V. Thanh, V.D. Phu, D.T. Trinh, K. Inui, N. Tung, N.T.K. Oanh, N.V. Trung, N.T. Hoa, J.E. Bryant, P.W. Horby, N.V. Kinh, H.F.L. Wertheim // *Epidemiol. Infect.* - 2016. – V.144. – P.35–44.
79. Benson, J.E. A comparison of virus isolation, immunohistochemistry, fetal serology, and reverse-transcription polymerase chain reaction assay for the identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transplacental infection in the fetus / J.E. Benson, M.J. Yaeger, J. Christopher-Hennings, K. Lager, K.J. Yoon // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* . – 2002. – V.14. – P.8-14.
80. Johnson, C.R. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses / C.R

- Johnson, T.F. Griggs, J. Gnanandarajah, M.P. Murtaugh // *Journal of General Virology*. – 2011. – V.92(5). – P. 1107-1116.
81. Jamieson, A.M. Role of tissue protection in lethal respiratory viral-bacterial coinfection / A.M. Jamieson, L. Pasman, S. Yu, P. Gamradt, R.J. Homer, T. Decker, R. Medzhitov // *Science*. – 2013. – V.340. – P. 1230-1234.
82. Kim, J. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embadded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nesyed PCR with in situ hybridization / J. Kim., C. Chae // *J.Virol. Methods*. - 2001. – V. 92. - №2. - P. 105-111.
83. Kim, J. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms / J. Kim, H.K. Chung, T. Jung, W.S. Cho, C. Choi, C. Chae // *J. Vet. Med. Sci.* - 2002. – V. 64. – P. 57– 62.
84. Kim, J. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex / J. Kim, H.K. Chung, C. Chae // *Veterinary Journal*. - 2003. – V.166. – P. 251–256.
85. Kim, S. H. A molecular analysis of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in South Korea / S. H. Kim, I.S. Roh, E.J. Choi, C. Lee, C.H. Lee, K.H. Lee, K.K. Lee, Y.K. Song, O.S. Lee, C.K. Park // *Veterinary Microbiology*. - 2010. – V.143. – P. 394–400.
86. Kiwon Han. Effect of the Modified Live Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Vaccine on European and North American PRRSV Shedding in Semen from Infected Boars / K. Han, H.W. Seo, J.H. Shin, Y. Oh, I. Kang, C. Park, C. Chae. // *Clinical and vaccine immunology*. - 2011. - V. 18. - №. 10. - P. 1600–1607.
87. Kohne, K. Mixed respiratory infections associated with the porcine respiratory disease complex detected with multiplex-PCR / K. Kohne, P. Huebert // *Proceeding of the 19th Int. Congress on Pigs Veterinary Society*. - 2006. - P. 313.

88. Kweon, C. H. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Korea / C. H. Kweon // Korean Journal of Veterinary Research. - 1994. – V. 34. – P. 77–83.
89. Labarque, G. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy / G. Labarque, K.V. Reeth, H. Nauwynck, C. Drexler, S.V. Gucht, M. Pensaert // Vaccine. - 2004. – V. 22. – P. 4183–4190.
90. Lager, K. M. Limited crossprotection between two strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant swine / K.M. Lager, W. L. Mengeling, S.L. Brockmeier // Abstr. Second Int. Symp. Porcine Reprod. Respir. Syndr., Copenhagen, Denmark. - 1995. - P. 10.
91. Larochelle, R. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in paraffin-embedded tissues: comparison of immunohistochemistry and in situ hybridization / R. Larochelle, R. Magar // J Virol Methods. - 1997. – V. 63. – P. 227–235.
92. Lee, C. Prevalence and phylogenetic analysis of the isolated type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2007 to 2008 in Korea / C. Lee, H. Kim, B. Kang, M. Yeom, S. Han, H. Moon, S. Park, H. Kim, D. Song, B. Park // Virus Genes. - 2010. – V. 40. – P. 225–230.
93. Leng, C. ORF1a of highly pathogenic PRRS attenuated vaccine virus plays a key role in neutralizing antibody induction in piglets and virus neutralization in vitro / C. Leng, W. Zhang, H. Zhang, Y. Kan, L. Yao, H. Zhai, M. Li, Z. Li, C. Liu, T. An, et al. // Virology Journal. – 2017. – V. 22. – P. 2-15.
94. Li, Y. Identification of a single nucleotide promoter polymorphism regulating the transcription of ubiquitin specific protease 18 gene related to the resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection / Y. Li, Y. Sun, F. Xing, L. Kang, P. Wang, L. Wang, H. Liu, Y. Li, Y. Jiang // Vet Immunol Immunopathol. – 2014. – V. 15. – P. 65-71.

95. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. - 2001. – V. 25. - P. 402–408.
96. Liu, J.K. Emergence of a novel highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China / J.K. Liu, X. Zhou, J.Q. Zhai, B. Li, C.H. Wei, A.L. Dai, X.Y. Yang, M.L. Luo // *Transbound Emerg Dis*. - 2017. – V.64(6). – P. 2059-2074.
97. Mardassi, H. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / H. Mardassi, B. Massie, S. Dea // *Virology*. - 1996. – V. 221(1). - P.98-112.
98. Mardassi, H. A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form / H. Mardassi, P. Gonin, C.A. Gagnon, B. Massie, S. Dea // *J Virol*. – 1998. – V. 72(8). - P. 298-306.
99. Meng, X. J. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe / X. J. Meng, P. S. Paul, P. G. Halbur, M. A. Lum // *Arch. Virol*. - 1995. – V.140. - P.745–775.
100. Meng X. J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implication for current vaccine efficacy and future vaccine development / X. J. Meng // *Vet. Microbiol*. - 2000. – V. 74. - P.309–329.
101. Meulenbergh, J.J. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV / J.J. Meulenbergh, M.M. Hulst, E.J. de Meijer, P.L. Moonen, A. den Besten, E.P. de Kluyver, G. Wensvoort, R.J. Moormann // *Virology*. - 1993. – V. 192. - P.62–72.
102. Meulenbergh, J.J. Nucleocapsid protein N of Lelystad virus: expression by recombinant baculovirus, immunological properties, and suitability for detection of serum antibodies / J.J. Meulenbergh, R.J. Bende, J.M. Pol, G. Wensvoort, R.J. Moormann // *Clin Diagn Lab Immunol*. - 1995. – V. 2(6). - P. 2-6.

103. Meulenberg, J.J. Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 is incorporated in virus particles / J.J. Meulenberg, A. Petersen-den Besten // *Virology*. - 1996. – V. 225(1). - P.44-51.
104. Meulenberg, J.J. Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus / J.J. Meulenberg, A.P. van Nieuwstadt, A. van Essen-Zandbergen, J.P. Langeveld // *J Virol*. - 1997. – V.71(8). – P. 1-7.
105. Meulenberg, J. J. Infectious Transcripts from Cloned Genome-Length cDNA of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus / J.J. Meulenberg, J.N.A. Bos-de Ruijter, R. van de Graaf, G. Wensvoort, R.J. Moormann // *J. Virol*. - 1998. – V. 72(1). – P. 380–387.
106. Michael J. Yaeger The diagnostic sensitivity of immunohistochemistry for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lung of vaccinated and unvaccinated swine / M.J. Yaeger // *J Vet Diagn Invest*. - 2002. – V. 14. - P.15–19.
107. Morgan, S.B. Pathology and Virus Distribution in the Lung and Lymphoid Tissues of Pigs Experimentally Inoculated with Three Distinct Type 1 PRRS Virus Isolates of Varying Pathogenicity / S.B. Morgan, J.P. Frossard, F.J. Pallares, J. Gough, T. Stadejek, S.P. Graham, F. Steinbach, T.W. Drew, F.J. Salguero // *Transbound Emerg. Dis*. - 2016. – V.63(3). - P.85-95.
108. Mulupuri, P. Antigen-specific B-cell responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection / P. Mulupuri, J.J Zimmerman, J. Hermann, C.R. Johnson, J.P. Cano, W. Yu, S.A. Dee, M.P. Murtaugh // *J Virol*. - 2008. – V.82(1). – P. 358-70.
109. Murtaugh, M.P. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / M.P. Murtaugh, T. Stadejek, J.E. Abrahante, T.T. Lam, F.C. Leung // *Virus Res*. - 2010. – V.154(1-2). - P.18-30.

110. Nam, E. Complete genomic characterization of a European type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate in Korea / E. Nam, C.K. Park, S.H. Kim, Y.S. Joo, S.G. Yeo, C. Lee // *Arch. Virol.* - 2009. – V.154. - P.629–638.
111. Nielsen, T.L. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus / T.L. Nielsen, J. Nielsen, P. Have, P. Baekbo, R. Hoff-Jørgensen, A. Bøtner // *Vet. Microbiol.* - 1997. – V. 54. – P.101–112.
112. Nelsen, C.J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents / C.J. Nelsen, M.P. Murtaugh, K.S. Faaberg // *J Virol.* – 1999. – V. 73(1). - P.270-80.
113. Normile, D. Vietnam grapple with ‘rapidly evolving’ pig virus / D. Normile // *Science.* - 2007. – V.317. – P.1017.
114. Novakovic, P. Relationships of CD163 and CD169 positive cell numbers in the endometrium and fetal placenta with type 2 PRRSV RNA concentration in fetal thymus / P. Novakovic, J.C. Harding, A. Ladinig, A.N. Al-Dissi, D.J. MacPhee, S.E. Detmer // *Vet Res.* - 2016. – V.47(1). – P.76.
115. Obdulio García-Nicolás. Comparative analysis of cytokine transcript profiles within mediastinal lymph node compartments of pigs after infection with porcine reproductive and respiratory syndrome genotype 1 strains differing in pathogenicity / Obdulio García-Nicolás, Rubén S Rosales, F.J Pallarés, D. Risco, J.J Quereda, S.P. Graham, J.P. Frossard, S.B. Morgan, F. Steinbach, T.W. Drew, et al. // *Veterinary Research.* - 2015. – V.46. - P.34.
116. Oleksiewicz M. B., Botner A., Madsen K. G., and Storgaard T. Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes // *Vet. Microbiol.* 1998.64.p.7–22.
117. Pallarés, F.J. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) / F.J. Pallarés, P.G. Halbur, T. Opriessnig, S.D. Sorden, D. Villar, B.H. Janke, M.J. Yaeger, D.J. Larson,

- K.J. Schwartz, K.J. Yoon, L.J. Hoffman // J. Vet. Diagn. Invest. - 2002. – V. 14. – P.515–519.
118. Patrick G. Halbur. Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung / P.G. Halbur, J.J. Andrews, E.L. Huffman, P.S. Paul, X.J. Meng, Y. Niyo // J Vet Diagn Invest. - 1994. – V.6. - P.254-257.
119. Pol, J.M. Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/Actinobacillus pleuropneumoniae in the respiratory tract / J.M. Pol, L.A. van Leengoed, N. Stockhofe, G. Kok, G. Wensvoort // Vet Microbiol. - 1997. – V.55(1-4). – P.259-264.
120. Prather, R.S. Knockout of maternal CD163 protects fetuses from infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) / R.S. Prather, K.D. Wells, K.M. Whitworth, M.A. Kerrigan, M.S. Samuel, A. Mileham, L.N. Popescu, R.R. Rowland // Sci. Rep. - 2017. – V.17. – P. 13371.
121. Rovira, A. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 / A. Rovira, M. Balasch, J. Segalés, L. García, J. Plana-Durán, C. Rosell, H. Ellerbrok, A. Mankertz, M. Domingo // J Virol. – 2002. – V. 76(7). – P. 3232-3239.
122. Rossow, K.D. Chronologic immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs / K.D. Rossow, D.A. Benfield, S.M. Goyal, et al. // Vet Pathol. - 1996. – V. 33. - P.551–556.
123. Scheidt, A. Control of viral respiratory diseases / A. Scheidt // Proc. 15th IPVS Congress. - 1998. - P. 27–31.
124. Segalés, J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Haemophilus parasuis antigen distribution in dually infected pigs / J. Segalés, M. Domingo, G.I. Solano, C. Pijoan // Vet Microbiol. – 1999. – V.12. – P.287-97.
125. Shi, M. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective / M Shi, T.T. Lam, C.C. Hon, R.K. Hui, K.S. Faaberg, T. Wennblom, M.P. Murtaugh, T. Stadejek, F.C. Leung // Virus Res. – 2010. – V. 154(1-2). – P. 7-17.
126. Shibata, I. Experimental dual infection of specific pathogen-free pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies virus / I.

- Shibata, S. Yazawa, M. Ono, Y. Okuda // J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. – 2003. – V. 50(1). – P. 14-19.
127. Sibila, M. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection / M. Sibila, M. Pieters, T. Molitor, D. Maes, F. Haesebrouck, J. Segales // Vet. J. - 2009. – V. 181. - P. 221-231.
128. Sinkora, M. The comparative profile of lymphoid cells and the T and B cell spectratype of germ-free piglets infected with viruses SIV, PRRSV or PCV2 / M. Sinkora, J.E. Butler, K.M. Lager, H. Potockova, J. Sinkorova // Vet Res. – 2014. – V. 4. – P. 91.
129. Snijder E. J. The molecular biology of arteriviruses / E. J. Snijder, J. J. M. Meulenbergh // Journal of General Virology. – 1998. – 79. – P. 961–979.
130. Stadejek, T. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe / T. Stadejek, M.B. Oleksiewicz, A.V. Scherbakov, A.M. Timina, J.S. Krabbe, K. Chabros, D. Potapchuk // Arch Virol. – 2008. – V. 153(8). – P. 1479-1488.
131. Stadejek, T. Molecular evolution of PRRSV in Europe: Current state of play / T. Stadejek, A. Stankevicius, M.P. Murtaugh, M.B. Oleksiewicz // Vet. Microbiol. - 2013. – V. 165. – P. 21-28.
132. Stafford V.V. Application of immunohistochemistry in diagnostics/ V.V. Stafford // Russian journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2016. - T. 56. - №8. – P. 18-21.
133. 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.
134. Stafford V.V. Second type of pigs' circovirus infection / V.V. Stafford // Russian journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. - T.65. - №5. – P. 306-309.

135. Sur, J. H. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis / J.H. Sur, A.R. Doster, J.S. Christian, J.A. Galeota, R.W. Wills, J.J. Zimmerman, F.A. Osorio // *J. Virol.* - 1997. – V.71. – P. 9170–9179.
136. Terpstra, C. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled / C. Terpstra, G. Wensvoort, J.M. Pol // *Veterinary Quarterly.* - 1991. – V. 13. – P. 131-136.
137. Thacker, E.L. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia / E.L. Thacker, P.G. Halbur, R.F. Ross, R. Thanawongnuwech, B.J. Thacker // *J Clin Microbiol.* – 1999. – V. 37(3). – P. 620-627.
138. Thacker, E.L. Immunology of the porcine respiratory disease complex / E.L. Thacker // *Vet. Clin. North America: Food anim. Pract.* - 2001. – V. 17. – P. 551-565.
139. Therrien, D. Preliminary characterization of protein binding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells / D. Therrien, Y. St-Pierre, S. Dea // *Arch Virol.* – 2000. – V. 145(6). – P. 1099-1116.
140. Thiel, H.J. Molecular characterization of positive-strand RNA viruses: pestiviruses and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) / H.J. Thiel, G. Meyers, R. Stark, N. Tautz, T. Rümenapf, G. Unger, K.K. Conzelmann // *Arch Virol Suppl.* – 1993. – V. 7. - P.41-52.
141. To, L.T. PRRS and research on PRRS in Vietnam / L.T. To, V.L. Nguyen, V.N. Hoang, Q.A. Bui // *Proc. International PRRS Symposium. Chicago, Illinois.* – 2007. – P.74.
142. Trang, N.T. Enhanced detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in fixed tissues by in situ hybridization following tyramide signal amplification / N.T. Trang, T. Hirai, P.H. Ngan, N.T. Lan, N. Fuke, K. Toyama, T. Yamamoto, R. Yamaguchi // *J. Vet. Diagn. Invest.* - 2015. – V. 27(3). – P.326-31.

143. Vanderheijden, N. Involvement of sialoahesivn in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages / N. Vanderheijden, P.L. Delputte, H.W. Favoreel, J. Vandekerckhove, J. Van Damme, P.A. van Woensel, H.J. Nauwynck // *Journal Virology*. – 2003. – V. 77(15). – P. 8207-8215.
144. Van Gucht, S. The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratorydisease in pigs / Van Gucht S., G. Labarque, Van Reeth K. // *Ve.t Immunol. Immunopathol.* - 2004. – V. 102(3). – P. 165-178.
145. Van Reeth, K. Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection / K. Van Reeth // *Vet. Microbiol.* – 1997. – V. 55(1-4). – P. 223-230.
146. Van Reeth, K. Clinical effects of experimental dual infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by swine influenza virus in conventional and colostrum-deprived pigs / K. Van Reeth, H. Nauwynck, M. Pensaert // *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* – 2001. – V. 48(4). – P. 283-292.
147. . van Woensel, P.A.M. Effect on viraemia of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus / P.A.M. van Woensel, K. Liefkens, S. Denmmaret // *Vet. Rec.* - 1998. – V. 142. – P. 510–512.
148. Wang, X. Distribution of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP -PRRSV) in different stages of gestation sows: HP-PRRSV distribution in gestation sows / X. Wang, H. Qiu, M. Zhang, X. Cai, Y. Qu, D. Hu, X. Zhao, E. Zhou, S. Liu, Y. Xiao // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2015. – V. 166(3-4). – P. 88-94.
149. Wasilk, A. Detection of U.S., Lelystad, and European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and relative quantitation in boar semen and serum samples by real-time PCR / A. Wasilk, J.D. Callahan, J. Christopher-Hennings, T.A. Gay, Y. Fang, M. Dammen, M.E. Reos, M. Torremorell,

D. Polson, M. Mellencamp. et al. // J. Clin. Microbiol. - 2004. – V. 42. – P. 4453–4461.

150. Wensvoort, G. Lelystad agent' - the cause of abortus blauw (mystery swine disease) / G. Wensvoort, C. Terpstra, J.M. Pol // Tijdschrift voor diergeneeskunde. – 1991. – V. 16(13). – P. 675-676.

151. Wills, R.W. Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and Salmonella choleraesuis in swine / R.W. Wills, J.T. Gray, P.J. Fedorka-Cray, K.J. Yoon, S. Ladely, J.J. Zimmerman // Vet. Microbiol. – 2000. – V. 71(3-4). – P. 177-192.

152. Wells, K.D. Replacement of Porcine CD163 Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 with a CD163-Like Homolog Confers Resistance of Pigs to Genotype 1 but Not Genotype 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus / K.D. Wells, R. Bardot, K.M. Whitworth, B.R. Tribble, Y. Fang, A. Mileham, M.A. Kerrigan, M.S. Samuel, R.S. Prather, R.R. Rowland // J. Virol. – 2017. – V. 91(2). – P. 1521.

153. Yaeger, M. The diagnostic sensitivity of immunohistochemistry for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lung of vaccinated and unvaccinated swine / M. Yaeger // J. Vet. Diagn. Invest. – 2002. – V. 14. – P. 15–19.

154. Yuzhakov, A. Genetic and pathogenic characterization of a Russian subtype 2 PRRSV-1 isolate / S. Raev, A. Mishin, T. Grebennikova, O. Verkhovsky, A. Zaberezhniy, I. Trus, H. Nauwynck, T. Aliper // Veterinary Microbiology. – 2017. – V. 211. – P. 22-28.

155. Zeman, D. Laboratory investigation of PRRS virus infection in three swine herds / D. Zeman, R. Neiger, M. Yaeger, E. Nelson, D. Benfield, P. Leslie-Steen, J. Thomson, D. Miskimins, R. Daly, M. Minehart // J. Vet. Diagn. Invest. – 1993. – V. 5. – P. 522–528.

156. Zhang, L. Developing a Triple Transgenic Cell Line for High-Efficiency Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection / L. Zhang, Z. Cui,

- L. Zhou, Y. Kang, L. Li, J. Li, Y. Dai, S. Yu, N. Li // PLoS One. – 2016. – V. – 16. – 11(5). – P. 1542.
157. Zhi S., The Cysteine Protease Domain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nonstructural Protein 2 Possesses Deubiquitinating and Interferon Antagonism Functions / S. Zhi, C. Zhenhai, S.R. Lawson, Y. Fang // J. Virol. – 2010. – V. 84(15). – P. 7832–7846.
158. Zimmerman, J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus) // Diseases of swine, 9th ed. / edited by D. J. Taylor. – Iowa. : Blackwell Publishing, Ames. - 2006. – P. 1607.
159. Zimmerman JJ, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus) // Diseases of swine, 10th ed. / edited by G.W. Stevenson. – West Sussex, United Kingdom. : Wiley-Blackwell. - 2012. – P 461–486.

Приложения

Приложение А.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФГБНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
имени Я.Р. КОВАЛЕНКО

«У Т В Е Р Ж Д А Ю»

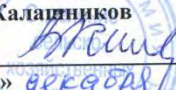
Руководитель Секции

зоотехния и ветеринария

отделения сельскохозяйственных наук РАН

академик РАН

В.В. Калашников

« 01 »  2016 год

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РЕПРОДУКТИВНО –
РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

Москва 2016

Приложение Б.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2645114

**СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ РЕПРОДУКТИВНОГО
РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ НЕПРЯМЫМ
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ НА
ОСНОВАНИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение Всероссийский научно-
исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени Я.Р. Коваленко (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2016121833

Приоритет изобретения 02 июня 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 15 февраля 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 02 июня 2036 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

