

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»  
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

*На правах рукописи*

**Стрельцова Яна Борисовна**

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ  
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В ОРГАНАХ СВИНЕЙ ПРИ  
СПОНТАННОМ ИНФИЦИРОВАНИИ ЦИРКОВИРУСОМ ВТОРОГО ТИПА**

4.2.3 — инфекционные болезни и иммунология животных

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
**Стаффорд Виктория Васильевна**

Москва – 2023

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

1 ВВЕДЕНИЕ.....	4
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
2.1 Открытие цирковируса свиней и этапы его изучения.....	11
2.2 Таксономия и характеристика цирковируса.....	12
2.3 Эпизоотологические данные.....	16
2.4 Клинические признаки и патологоанатомические изменения при цирковирусной болезни свиней.....	17
2.4.1 Синдром послеотъемного мультисистемного истощения.....	17
2.4.2 Респираторный синдром.....	19
2.4.3 Синдром дерматита и нефропатии поросят.....	20
2.4.4 Желудочно-кишечный синдром.....	21
2.4.5 Неврологический синдром.....	22
2.4.6 Репродуктивный синдром.....	22
2.5 Особенности смешанных и вторичных инфекций с участием цирковируса свиней второго типа.....	23
2.6 Патогенез цирковирусной болезни свиней.....	25
2.7 Особенности иммунного ответа при цирковирусной болезни свиней...	27
2.7.1 Дендритные клетки.....	27
2.7.2 Моноциты и макрофаги.....	29
2.7.3 Т-лимфоциты.....	29
2.7.4 В-лимфоциты.....	31
2.7.5 Цитокиновый профиль.....	33
2.8 Лабораторная диагностика цирковирусной болезни свиней.....	33
2.9 Иммунопрофилактика цирковирусной болезни свиней.....	36
2.10 Заключение.....	37
3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	40
3.1 Материалы и методы.....	40

3.1.1	Материалы.....	40
3.1.2	Методы.....	43
4	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	57
4.1	Лабораторная диагностика цирковиральной инфекции в исследуемых свиноводческих хозяйствах.....	57
4.2	Патологоанатомические изменения в органах при спонтанной цирковиральной инфекции.....	60
4.3	Гистологические изменения в органах при естественном инфицировании цирковиральной инфекцией свиней второго типа .....	66
4.4	Выявление антигена цирковиральной инфекции свиней второго типа прямым методом иммуногистохимического исследования.....	73
4.5	Идентификация лимфоцитов и макрофагов в органах свиней непрямой метод иммуногистохимического исследования.....	80
5	ОБСУЖДЕНИЕ.....	94
6	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
7	ВЫВОДЫ.....	104
8	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	106
9	ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	107
10	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	108
11	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	110
12	ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	132
	ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	133

## 1 ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Свиноводство - одна из самых развитых отраслей сельскохозяйственного сектора экономики Российской Федерации и многих стран мира [5, 16]. Интенсификация свиноводства зачастую сопровождается негативными последствиями, связанными с распространением инфекционных болезней, что приводит к появлению новых неблагополучных пунктов [13, 18, 30, 47].

Согласно литературным данным, цирковиральная болезнь свиней (ЦВБС) имеет статус одной из самых распространенных среди свиноводческих хозяйств по всему миру [16, 17, 92]. Об этом свидетельствует уровень серопозитивности свиней, составляющий 20-80%, а также высокая заболеваемость до 60% и смертность в пределах 3-10% [47].

Цирковиральной болезни свиней свойственно широкое разнообразие клинических признаков. Наиболее часто болезнь сопровождается синдромом послеотъемного мультисистемного истощения (СПМИ), реже - синдромом дерматита и нефропатии поросят (СДНП). Также у инфицированных вирусом свиней выявляют патологию органов респираторной, репродуктивной, пищеварительной и центральной нервной систем [21, 91, 149, 157].

Анализ литературных данных, связанных с экспериментальным заражением свиней цирковирусом свиней второго типа (ЦВС-2), показал, что воспроизвести клиническую картину болезни в искусственных условиях крайне тяжело [44, 46, 92]. Для этой цели необходимо создание условий сочетанной инфекции, например, с возбудителем репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС). В этом случае развивается только СПМИ. Напротив, в условиях естественного инфицирования свиней такое сочетание вирусов способно вызвать не только СПМИ, но и ряд других синдромов, таких как респираторный или репродуктивный [85, 92, 127, 128, 130, 134].

Кроме трудностей, связанных с экспериментальным воспроизведением клинической картины ЦВБС, существуют проблемы и при диагностике болезни у

животных с субклинической формой инфекции. Для лабораторной диагностики ЦВБС чаще используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР), позволяющую определить фрагменты ДНК вируса в патологическом материале и иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления противовирусных антител (АТ) в сыворотке крови. Для обнаружения антигена (АГ) ЦВС-2 непосредственно в органах животных, зарубежные специалисты применяют иммуногистохимическое исследование (ИГХИ), которое позволяет установить связь локализации АГ вируса с развитием патологии, а также выявить бессимптомных носителей ЦВС-2 [174]. До настоящего времени применение данного метода в РФ было ограничено в связи с отсутствием АТ к ЦВС-2 отечественного производства.

Подобная ситуация существует и в вопросах оценки местного иммунитета. Так ученые сходятся во мнении, что для ЦВБС характерно развитие тяжелой патологии органов лимфатической системы, приводящей к подавлению иммунных реакций в организме [35, 129, 154, 155]. Для более детального изучения нарушений в работе иммунной системы и анализа популяционного состава лимфоцитов, специалисты используют иностранные протоколы ИГХИ, которые позволяют идентифицировать фенотип и определить количество иммунокомпетентных клеток в тканях [1, 137, 139].

Таким образом, в рамках политики импортозамещения, актуальным является разработка как ИГХИ для выявления АГ ЦВС-2 в тканях с применением реактивов отечественного производства, так и ИГХИ для идентификации и подсчета лимфоцитов и макрофагов в органах инфицированных свиней, что позволит изучить особенности патогенеза и иммунного ответа при цирковирусной инфекции.

**Степень разработанности темы.** Отечественные специалисты занимаются изучением ЦВБС более 20 лет [5, 18]. Особое внимание было уделено мониторингу болезни, включая генотипирование ЦВС-2 и филогенетический анализ изолятов вируса [4]. В результате выполненных исследований российскими учеными был получен рекомбинантный капсидный белок С ЦВС-2 и моноклональные антитела (МАТ) к нему [23]. На этой основе разработаны

отечественные диагностические наборы и вакцины: коммерческий набор для выявления АТ к ЦВС-2 методом ИФА, тест-систему для обнаружения ЦВС-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) и рекомбинантную инактивированную вакцину против ЦВБС «ВЕРРЕС-ЦИРКО» [9, 22, 24].

Ранее в отечественной литературе Андреевым Д.А. были опубликованы результаты применения непрямого ИГХ метода по протоколу зарубежных специалистов с использованием АТ иностранного производства (ДАКО, США) для изучения динамики распределения Т- и В-лимфоцитов в тканях лимфатических узлов свиней с признаками СПМИ [1]. Однако, вопрос о том, как ЦВС-2 влияет на количество иммунокомпетентных клеток в органах инфицированных свиней остается открытым. В связи с чем, разработка отечественного метода ИГХИ позволит проводить более глубокие исследования по изучению различных аспектов цирковирусной инфекции и расширит область применения метода в условиях российских ветеринарных диагностических лабораторий.

**Цель диссертационной работы** – выявить связь между наличием патологических изменений, антигена вируса и количеством иммунокомпетентных клеток в органах-мишенях при естественном инфицировании свиней ЦВС-2, используя прямой и непрямой методы иммуногистохимического исследования.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие **задачи**:

1. Выполнить исследование патологического материала от свиней с признаками цирковирусной болезни в условиях естественного инфицирования, используя методы ПЦР-РВ и ИФА.

2. Изучить патологоанатомические и гистологические изменения в органах свиней инфицированных ЦВС-2 в естественных условиях.

3. Разработать прямой иммуногистохимический метод исследования на основе МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2, меченых

пероксидазой хрена для определения локализации АГ вируса и его диссеминации в органах инфицированных свиней.

4. Разработать непрямой иммуногистохимический метод исследования с использованием МАТ мыши к маркерам CD3, CD4 и CD8 - Т-лимфоцитов, CD20 - В-лимфоцитов и CD14 – макрофагов человека для идентификации лимфоцитов и макрофагов в органах свиней.

5. Сравнить количество и распределение макрофагов и основных популяций лимфоцитов в тканях бронхиальных лимфатических узлов и легких интактных и инфицированных ЦВС-2 животных.

#### **Научная новизна работы.**

Впервые в РФ разработан прямой метод ИГХИ на основе отечественных МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2, который позволяет выявлять АГ вируса в органах инфицированных свиней.

Впервые в РФ разработан непрямой метод ИГХИ на основе отечественных МАТ мыши к маркерам CD3, CD4, CD8, CD20, CD14 иммунокомпетентных клеток человека в срезах органов свиней. Выполнен сравнительный подсчет основных популяций лимфоцитов и макрофагов в бронхиальных лимфатических узлах и легких интактных и инфицированных ЦВС-2 поросят-отъемышей.

Установлено, что органами-мишенями для ЦВС-2 являются бронхиальные, паховые лимфатические узлы и легкие инфицированных свиней, так как в макрофагах, Т- и В-лимфоцитах данных органов локализуется АГ вируса.

Определено, что ЦВС-2 оказывает супрессивное действие на исследованные популяции клеток в бронхиальных лимфатических узлах поросят-отъемышей с признаками СПМИ. В легких от этих же поросят супрессии подверглись только макрофаги и В-лимфоциты, при этом численность Т-лимфоцитов была повышена, что указывает на стимуляцию локального Т-клеточного иммунного ответа.

Установлено, что гибель и снижение количества иммунокомпетентных клеток в тканях опосредует развитие лимфоидного истощения, что является основной патогенетической характеристикой ЦВБС.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Получен патент № 2695330 от 23.06.2019 «Способ диагностики цирковиральной инфекции свиней второго типа прямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител» (Приложение 1).

Разработаны методические указания «Иммуногистохимическая диагностика цирковиральной болезни свиней 2 типа», утвержденные секцией зоотехнии и ветеринарии отделения сельскохозяйственных наук РАН от 15.03.2018 (Приложение 2). Работа выполнена 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 цирковиральной инфекции свиней 2 типа».

**Методология и методы исследования.** Методология диссертационной работы выстроена согласно цели и задачам исследования и включала в себя применение патологоанатомического, гистологического и иммуногистохимического методов исследования. Кроме этого, были применены молекулярно-биологический и серологический методы диагностики. Основными направлениями научно-исследовательской работы стали получение данных о диссеминации АГ ЦВС-2, а также распределении и количестве иммунокомпетентных клеток в органах спонтанно инфицированных свиней. Применены эмпирические методы научного познания, среди которых – наблюдение, сравнение, измерение и описание, теоретические - обобщение и интерпретация результатов, а также методы статистического анализа.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Прямой метод иммуногистохимического исследования на основе МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2, меченых пероксидазой хрена, позволяющий выявить АГ вируса в органах инфицированных свиней;
2. Связь локализации АГ ЦВС-2 с развитием патологических изменений в органах-мишенях при естественном инфицировании свиней;
3. Непрямой метод иммуногистохимического исследования на основе МАТ мыши к маркерам CD3, CD4, CD8, CD20, CD14 иммунокомпетентных



клеток человека, позволяющий идентифицировать макрофаги и основные популяции лимфоцитов в тканях бронхиальных лимфатических узлов и легких интактных и спонтанно инфицированных ЦВС-2 свиней;

4. Влияние вируса на количество иммунокомпетентных клеток в органах-мишенях при естественном инфицировании свиней ЦВС-2.

**Степень достоверности и апробации результатов исследования.** В качестве достоверности результатов проведенного исследования, нами отобрано более 600 образцов патологического материала. Применен комплексный подход к выявлению ЦВС-2 с применением современного оборудования и расходных материалов. Полученные результаты подтверждены статистической обработкой данных. Материалы диссертации были доложены и обсуждены на:

- Ежегодных отчетах Ученого совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН;
- Национальной научно-практической конференции «Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения», ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, Москва 2019;
- VII Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — АНО «Инновационный центр Кольцово» — ИПЦ НГУ Новосибирск 2020;
- XVII Международной научно-практической конференции СФНЦА РАН «Пища. Экология. Качество» Новосибирск 2020;
- Международной научной конференции «FarEastCon» Владивосток 2020.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 1 патент № 2695330 от 23.06.2019 «Способ диагностики цирковиральной инфекции свиней второго типа прямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител», 1 методическое указание «Имуногистохимическая диагностика цирковиральной болезни свиней 2 типа», 6 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и 1 в издании индексируемом в Scopus.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, собственные

исследования, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список используемой литературы и приложения. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 32 рисунками. Список используемой литературы представлен 176 источниками, из них отечественными в количестве 43, зарубежными – 133.

**Личный вклад автора.** Автором работы выполнен анализ источников зарубежной и отечественной литературы, отбор и обработка патологического материала, патологоанатомическое, гистологическое, иммуногистохимическое исследование органов и иммуноферментный анализ сывороток крови свиней. Проанализированы результаты работы. Принято участие в разработке методических указаний и патента совместно с сотрудниками сектора патоморфологии и лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики вирусных болезней свиней ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

**Благодарность.** Автор выражает благодарность научному руководителю, ведущему научному сотруднику сектора патоморфологии к.б.н. Стаффорд В.В., к.б.н. Южакову А.Г., д.в.н., профессору РАН Арисову М.В., д.б.н. Капустиной О.В., д.б.н., профессору, члену-корреспонденту РАН Забережному А.Д.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Открытие цирковируса свиней и этапы его изучения

В 1974 году немецкими учеными впервые был обнаружен ЦВС-1, как контаминант клеточной культуры РК-15. Дальнейшие исследования показали, что выделенный из РК-15 изолят вируса не вызывал развитие клинических признаков болезни при экспериментальном заражении свиней, поэтому был признан непатогенным [5, 36].

Позже, в 1991 году канадскими исследователями впервые описаны клинические признаки неизвестного ранее заболевания, которое получило название – синдром послеотъемного мультисистемного истощения [45, 68].

В 1997 году специалистам удалось получить ДНК вируса из образцов, собранных в Европе и Северной Америке, в том числе из Канады от вспышки СПМИ 1991 года [125]. Полученная последовательность была внесена в базу данных «GenBank» как ЦВС-2 [68, 122, 149].

В 2015 году на ферме в Северной Каролине (США) в результате обследования свиноматок с хронической репродуктивной недостаточностью и высокой смертностью плодов с признаками СДНП, был выделен новый, генетически отличающийся от предшественников, цирковирус свиней третьего типа [135, 153]. В результате многочисленных исследований было установлено, что цирковирус свиней третьего типа, как и ЦВС-2 имеет потенциальную связь с развитием СПМИ, СДНП и репродуктивной недостаточности у свиней [102, 135, 153].

В 2019 году была опубликована статья с информацией об обнаружении цирковируса свиней четвертого типа в Китае [172].

В России ЦВС-2 впервые был выделен в 2000 году [5]. В 2018 году отечественные ученые впервые обнаружили цирковирус свиней третьего типа на территории РФ [169].

Таким образом, на данный момент, в России, ЦВБС может быть вызвана вирулентными цирковиррусами второго и третьего типа, из которых ЦВС-2 является наиболее распространенным [39].

## 2.2 Таксономия и характеристика цирковирруса

Согласно последним данным Международного комитета по таксономии вирусов возбудитель цирковиррусной болезни свиней относится к роду *Circovirus* семейства *Circoviridae* [141, 175]. На данный момент род *Circovirus* представлен 49 видами, включая цирковиррус свиней (4 типа), летучих мышей (13 типов), грызунов (7 типов), клещей (2 типа), а также зебр, лосей, собак, медведей, китов, лебедей, скворцов, воронов, голубей, пингвинов, чаек, комаров, человека и многих других [175].

Геном ЦВС-2 представлен одноцепочечной инкапсулированной кольцевой молекулой ДНК [25, 38]. Вирион диаметром от 13 до 25 нм имеет икосаэдрическую симметрию, состоит из 60 субъединиц ( $T=1$ ) капсидных белков, представленных двенадцатью пентамерными морфологическими единицами (рисунок 1) [60, 175].

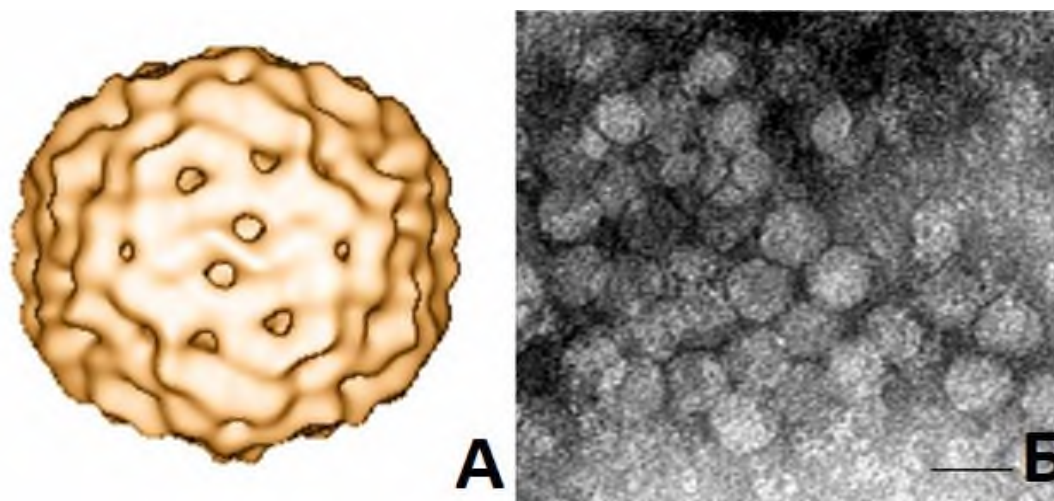


Рисунок 1 – А. Трехмерная реконструкция ЦВС-2 с использованием криоэлектронной микроскопии; Б. Электронная микроскопия ЦВС-2 (негативный контраст, 20 нм) [60, 175]

Геном ЦВС-2 содержит 1766-1769 нуклеотидов и согласно последним данным, имеет четыре открытые рамки считывания (ORF) (таблица 1) [65, 121].

Таблица 1 – Характеристика ORF ЦВС-2

ORF	Белок	Количество аминокислот в белке	Описание
ORF1	Rep Rep'	314 ак 297 ак [84]	Белки, контролирующие процесс репликации вируса [118, 135].
ORF2	Cap	233 - 236 ак [84, 87]	Иммуногенный структурный белок, определяющий антигенность вируса. При взаимодействии рецепторов клеток с данным белком, происходит запуск иммунного ответа в организме хозяина. Является надежным маркером для филогенетического анализа [81, 109].
ORF3	NS	104 - 105 ак [84, 111]	Неструктурный белок, обладающий апоптотической активностью [91, 111]. Белок способен накапливаться в ядре зараженной клетки [82].
ORF4	-	60 ак [86]	Неструктурный белок, обладающий антиапоптотической активностью [76]. Подавляет активность каспазы и экспрессию рецепторов CD4 <sup>+</sup> и CD8 <sup>+</sup> Т-клетками во время инфекции. Белок способен влиять на Т-лимфоцитопоез в тимусе и ухудшать созревание тимоцитов [86].

По предположениям исследователей, геном ЦВС-2 должен содержать восемь ORF, но на данный момент удалось охарактеризовать только первые четыре [76, 86, 111]. Некоторые ученые ставят под сомнение существование ORF3 и ORF4, из-за отсутствия достоверных данных [81, 145, 160].

В отличие от других ДНК содержащих вирусов, ЦВС-2 обладает высокой скоростью эволюции [74]. Причем, белок Cap ЦВС-2 эволюционирует быстрее, чем остальные белки вируса (Rep и Rep'). Исследователи связывают это с ограничением мутаций в регионе ORF1. Тогда как белок Cap, кодируемый ORF2, является основной мишенью иммунной системы хозяина и эволюционирует под ее селективным давлением [59, 92].

В 2008 году была принята конвенция о классификации ЦВС-2 по генотипам, основанная на разнообразии нуклеотидов ORF2 и пороговом расстоянии 0,035 единиц, что стало основанием для определения генотипов вируса [47, 92, 152]. На сегодняшний день идентифицируют восемь генотипов ЦВС-2: ЦВС-2а, ЦВС-2b, ЦВС-2с, ЦВС-2d, ЦВС-2е, ЦВС-2f, ЦВС-2g и ЦВС-2h (рисунок 2) [73].

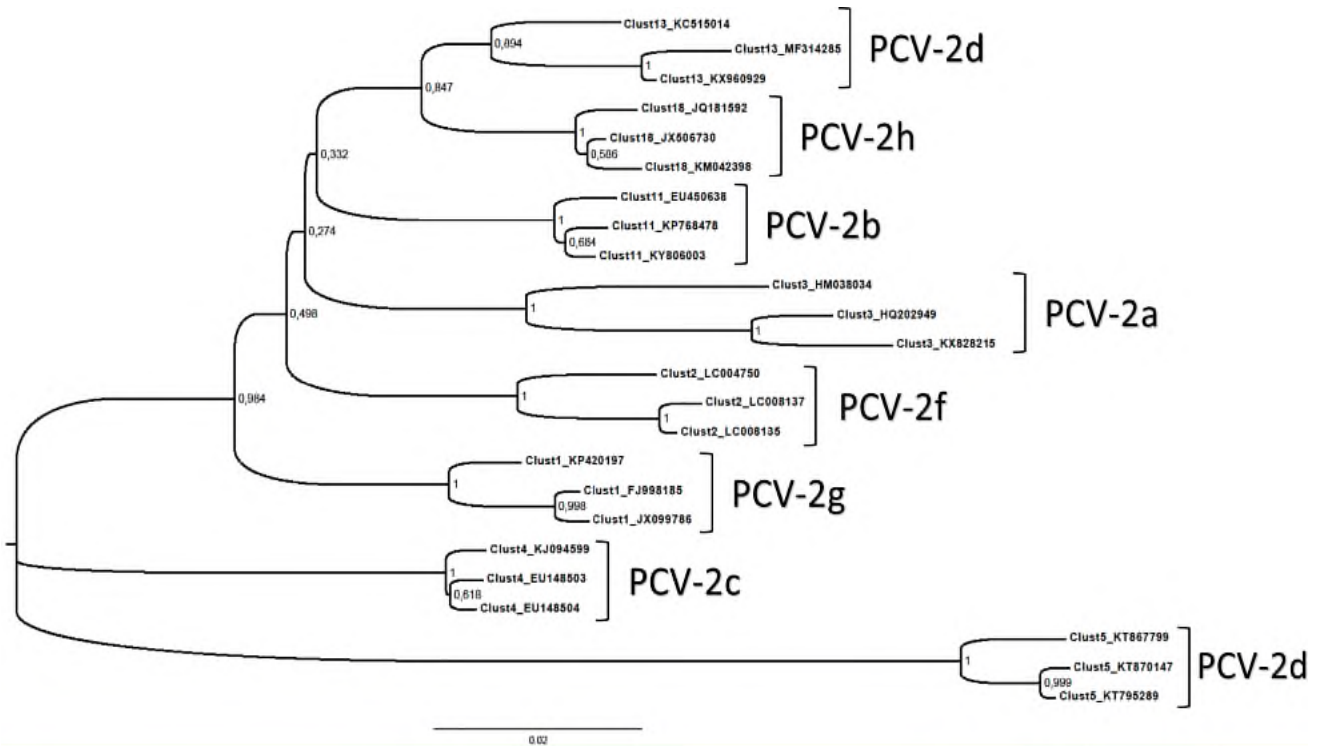


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево генотипов ЦВС-2 на основе попарного порогового расстояния [73]

Ретроспективный анализ сывороток крови свиней показал, что еще в 1960-х годах ЦВС-2 циркулировал в США и Германии, в 1970-х в Северной Ирландии и Швейцарии, а с 1980-х годов в Великобритании и Дании [56, 80, 89, 103, 166]. С момента открытия ЦВС-2 наблюдали два основных изменения в распространении его генотипов, которые описывают как «сдвиги генотипов» [72]. В середине 2000-х годов после широкомасштабного применения вакцин против ЦВБС, преобладающий в то время вирус генотипа ЦВС-2а был замещен более вирулентным вирусом генотипа ЦВС-2б [50, 52, 74, 92].

В последние годы распространенность вируса генотипа ЦВС-2d, ранее считавшимся мутацией ЦВС-2 генотипа ЦВС-2б, растет в районах с активным развитием свиноводства, включая США, Европу, Китай, Корею и Южную Америку [72, 104]. При этом ЦВС-2 генотипа ЦВС-2d принято разделять на два субгенотипа ЦВС-2d-1 и ЦВС-2d-2 [72, 104, 167]. Большинство штаммов вируса субгенотипа ЦВС-2d-1 циркулировали с 1999 по 2011 годы, тогда как штаммы вируса субгенотипа ЦВС-2d-2 только с 2006 года, что указывает на последовательную смену субгенотипов [72]. Ранее циркулирующий на

территории Дании ЦВС-2 генотипа ЦВС-2d и ЦВС-2с был выделен из материала от диких кабанов в Бразилии, указывая на распространение ЦВС-2 из Европы в Южную Америку [71, 92]. Помимо этого, при ретроспективном исследовании образцов из Мексики и США был обнаружен вирус генотипа ЦВС-2е [61]. Позже, в Китае, а также в Хорватии, Индии и Индонезии, идентифицировали ЦВС-2 генотипа ЦВС-2f [49].

Филогенетический анализ изолятов из свиноводческих хозяйств на территории РФ показал, что в России циркулирует ЦВС-2 пяти генотипов: ЦВС-2а, ЦВС-2b, ЦВС-2с, ЦВС-2d и ЦВС-2е (рисунок 3) [138].

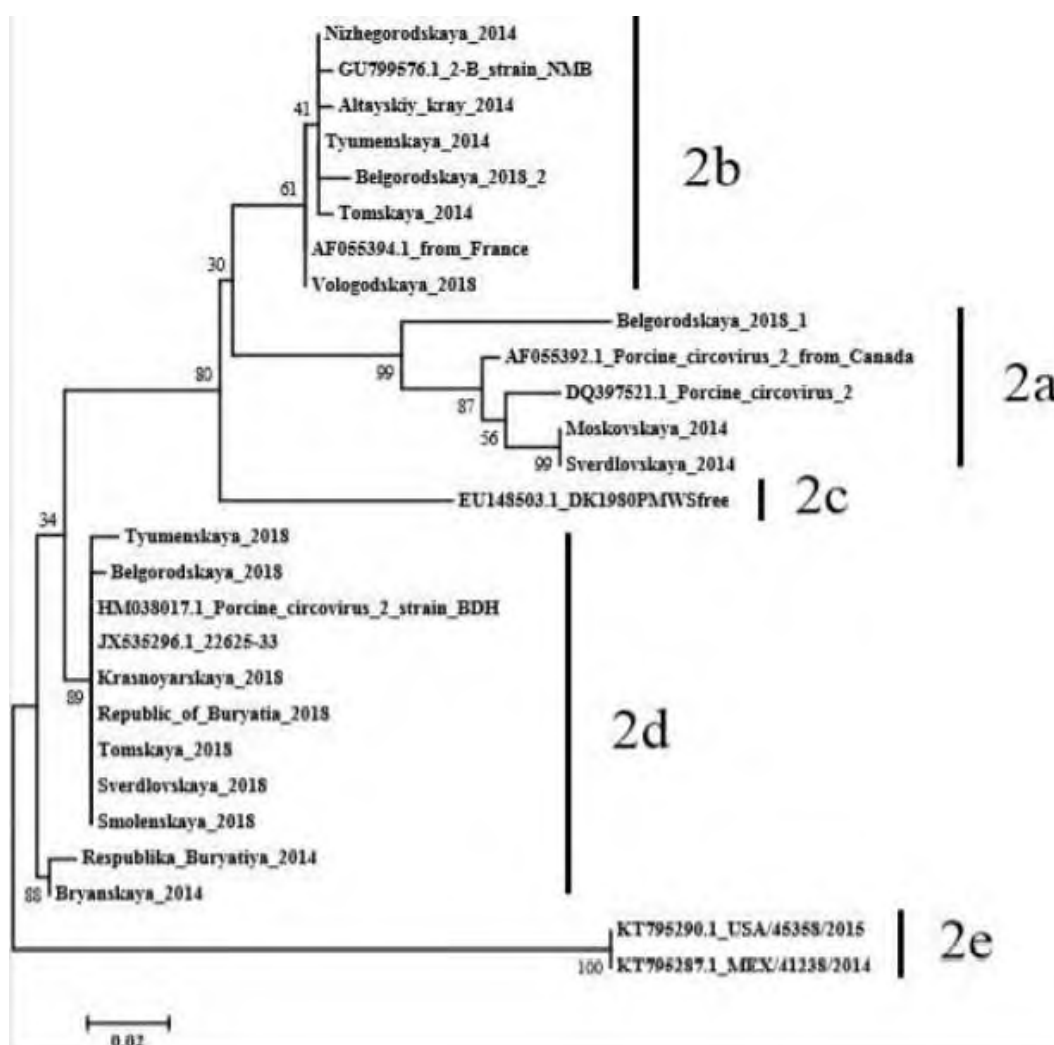


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево изолятов ЦВС-2 в России [138]

Вирус генотипа ЦВС-2а или ЦВС-2b вызывает у свиней клиническую картину ЦВБС различной степени тяжести, тогда как ЦВС-2 генотипа ЦВС-2с не инициирует развитие признаков болезни у носителей [131]. Исследования

показали, что вирусная нагрузка при инфицировании ЦВС-2 генотипа ЦВС-2а или ЦВС-2b, находилась на одном уровне, но у свиней, зараженных вирусом генотипа ЦВС-2b, наблюдали более быстрое развитие клинических признаков и высокий уровень смертности - 100%, в отличие от свиней, зараженных ЦВС-2 генотипа ЦВС-2а, смертность которых составила 25% [88]. Смешанная инфекция, вызванная ЦВС-2 двух разных генотипов ЦВС-2а и ЦВС-2b, является потенцирующим фактором в развитии ЦВБС [47, 105]. Есть предположение, что одновременное инфицирование животного несколькими генотипами ЦВС-2 увеличивает количество рекомбинаций между ними, что способствует развитию более тяжелых клинических признаков у свиней [171].

### **2.3 Эпизоотологические данные**

Международная торговля живыми свиньями, спермой, мясом и мясопродуктами способствовала глобальному распространению генотипов ЦВС-2 [37, 71, 92]. Риск возникновения ЦВБС возрастает при ненадлежащей проверке свиней-вирусоносителей. Исследования в свиноводческих хозяйствах РФ с использованием ПЦР-РВ показали, что ЦВБС чаще проявляется в форме инаппарантной инфекции [42]. Обнаружение вирусной ДНК в тканях свиней на протяжении 125 дней после инфицирования без развития клинических признаков болезни указывает на вирусоносительство, которое поддерживает циркуляцию ЦВС-2 внутри стада [50]. По этим причинам при импорте и экспорте свиней необходимо тщательное проведение комплексных диагностических исследований.

Кроме вирусоносителей, источником инфекции являются больные свиньи, которые выделяют вирус с носовыми и глазными выделениями, слюной, фекалиями, мочой, молозивом, молоком и со спермой [26, 67, 168]. Передача ЦВС-2 происходит при контакте с человеком, грызунами, насекомыми и предметами ухода за животными [67]. Экспериментально было отмечено инфицирование свиней без прямого контакта, что указывает на воздушно-



капельный путь передачи ЦВС-2 [54]. Также были зафиксированы случаи передачи вируса при искусственном осеменении [47, 75, 116, 162]. В доказательство этих данных, АГ ЦВС-2 был обнаружен в пузырьковидной, предстательной и бульбоуретральной железах зараженных хряков [86, 106, 120]. Заражение вирусом возможно как по горизонтальному, так и вертикальному пути передачи [114]. По этой причине вирус был найден у абортированных плодов от свиноматок, инфицированных ЦВС-2 [165]. При исследовании новорожденных поросят была установлена обратная связь смертности и титра специфических АГ свиноматок: чем ниже титр АГ у матери, тем выше вероятность смерти поросят после рождения [51]. К ЦВБС более восприимчивы свиньи старше одного месяца, так как новорожденные поросята защищены АГ матери в течение 30 дней после рождения [55, 118].

## **2.4 Клинические признаки и патологоанатомические изменения при цирковиральной болезни свиней**

Цирковиральная болезнь свиней сопровождается рядом синдромов, каждый из которых выражается разными клиническими признаками и клинико-морфологической характеристикой. Несмотря на то, что патогномичным признаком ЦВБС, является развитие истощения лимфоидной ткани, в клиническом течении и патологоанатомической картине цирковиральной инфекции есть ряд особенностей, которые следует рассматривать отдельно для каждого синдрома.

### **2.4.1 Синдром послеотъемного мультисистемного истощения свиней**

Первая вспышка цирковиральной болезни свиней, сопровождающейся признаками СПМИ была зарегистрирована в 1991 году (Саскачеван, Канада) [57]. До настоящего времени известно, что данный синдром проявляется чаще остальных характерных для ЦВБС синдромов [26, 33]. При развитии СПМИ заболеваемость варьирует от 4 до 25%, а летальность - 90% [145]. Виремия у

инфицированных свиней выявляется на 7 день после заражения и спустя еще 7-14 дней титр ЦВС-2 достигает своего максимума [132, 140, 144].

Синдром чаще обнаруживают у поросят после отъема. Согласно данным Clark E.G. (1997) клиническая картина СПМИ развивалась у поросят в возрасте 5-6 недель [57]. Тогда как Kim J. et al. (2004) наблюдал клинические признаки синдрома у поросят 25-120-дневного возраста [100]. По сообщению Семенцова В.И. и соавторов (2009), клиническая картина СПМИ характерна для поросят в возрасте от 2 до 4 недель. В редких случаях для свиней старше 5 месяцев [26]. Несмотря на эти разобщенные данные, многие ученые сходятся во мнении, что СПМИ чаще встречается у поросят в возрасте от 5 до 12 недель [53, 55].

По мнению многих авторов, при развитии синдрома у свиней наблюдают истощение, кахексию, бледность кожных покровов и слизистых оболочек, увеличение лимфатических узлов, лихорадку, тахипноэ, иногда диарею [47, 57, 78, 124, 149].

При патологоанатомическом исследовании обнаруживают бледные или желтушные кожные покровы, мышцы под ними находятся в состоянии дистрофии различной степени тяжести [148]. Обследованием полостей тела и органокомплекса выявляют увеличение париетальных и висцеральных лимфатических узлов в 3-4 раза больше нормы [20, 129, 150]. На разрезе лимфатические узлы однородно-бледные при малом количестве крови в органе или желто-красные от избыточного кровенаполнения [20, 29, 150]. Легкие увеличены в размере с выраженным отеком, на легочной плевре присутствуют пятна коричневого цвета. Иногда при вскрытии можно обнаружить печень с признаками атрофии, изъязвление стенки желудка с внутренними кровоизлияниями, катаральный энтерит с отеком брыжейки, а также селезенку и почки с белыми очагами на разрезе [26, 129, 150].

При гистологическом исследовании лимфатических узлов и селезенки выявляют признаки некротизирующего лимфаденита, спленита и гранулематозного воспаления. При этом некроз может затрагивать обширные участки паренхимы или локализоваться в зонах лимфоидных фолликулов [129]. В

свою очередь лимфоидные фолликулы находятся в состоянии атрофии или некроза, а в их структурах находят многочисленные гистиоцитарные клетки с цитоплазматическими тельцами-включениями [57, 129]. В тоже время в паракортикальной зоне лимфатических узлов и периартериальной зоне фолликулов селезенки можно обнаружить многоядерные гигантские клетки [57].

Гистологическим исследованием респираторных органов выявляют патологию, характерную для подострой интерстициальной пневмонии и фибринозного бронхита [148, 150]. В утолщенных межальвеолярных перегородках или внутри альвеол находят гистиоциты и многоядерные гигантские клетки. При хроническом течении инфекции часто наблюдают изменения, характерные для облитерирующего бронхита [148, 150, 151].

В печени выявляют лимфогистиоцитарный инфильтрат в портальных зонах, вакуолизацию цитоплазмы и кариомегалию гепатоцитов [151]. При хроническом течении инфекции в печени обнаруживают дезорганизацию печеночных балок с некрозом гепатоцитов и замещением их соединительной тканью [148]. При гистологическом исследовании других органов часто регистрируют лимфогистиоцитарный инфильтрат в тканях почек, поджелудочной железы, кишечника и миокарда [151, 154].

#### **2.4.2 Респираторный синдром**

Респираторный синдром чаще развивается у свиней в возрасте 12-24 недель [85, 148]. Синдром сопровождается отставанием в росте, анорексией, лихорадкой, кашлем и одышкой [100]. Синдром отягощается при развитии смешанной или вторичной инфекции с возбудителями РРСС, гриппа и микоплазмоза свиней [85, 100].

При патологоанатомическом исследовании органов грудной полости обнаруживают спавшиеся легкие плотной консистенции; при проведении легочной плавательной пробы – кусочки легкого тонут в воде [2]. Легочная плевро покрыта пятнами серо-коричневого цвета, на разрезе ткань темно-красного цвета [129, 148]. Медиастинальные и бронхиальные лимфатические узлы уплотненные и увеличенные в размере [148].

При гистологическом исследовании легких в паренхиме и интерстиции выявляют кровоизлияния и лимфогистиоцитарный инфильтрат. При затяжной инфекции можно обнаружить гранулемы с крупными макрофагами и многоядерными гигантскими клетками. Кроме того, в бронхиолах регистрируют десквамацию эпителия, фиброз слизистой оболочки или подслизистого слоя [129]. Осложнение болезни бактериальными патогенами приводит к развитию гнойно-воспалительных процессов в тканях легкого [57, 129, 148].

При установлении диагноза необходимо правильно дифференцировать респираторный синдром от СПМИ, при котором развивается интерстициальная пневмония с фибринозным бронхитом [100].

### **2.4.3 Синдром дерматита и нефропатии попросят**

Первое описание ЦВБС сопровождающейся СДНП было сделано в Чили в 1976 году [125]. Со временем было установлено, что частота встречаемости СДНП, среди других синдромов, которыми проявляется цирковиральная болезнь свиней, не превышает 14% [66]. Было выявлено, что при развитии СДНП уровень заболеваемости составляет всего 1-2%, тогда как летальность – 90-100% [8]. Риск возникновения синдрома в хозяйствах возрастает при нарушениях производственных процессов, а также проведении гипериммунизации от клостридиоза и болезни Глассера [58].

Для СДНП характерно наличие папулезных образований от красного до пурпурного цвета, а также отек живота и конечностей, общая слабость и лихорадка [26, 143, 148, 164]. На коже тазовых конечностей и промежности можно обнаружить кровоизлияния различной степени и некротические очаги, тогда как на коже головы, ушей, живота и медиальной стороне передних конечностей выявляют пурпуру [26]. Зачастую патологические изменения кожи исчезают спустя 2-3 недели после начала клинических признаков [66].

При патологоанатомическом исследовании в коже и подкожной клетчатке наблюдают отеки и обширные кровоизлияния [26]. При вскрытии обнаруживают почки желто-коричневого цвета с белыми очагами и петехиальными кровоизлияниями на поверхности органа, от которой легко отслаивается

фиброзная капсула. Иногда почки могут превышать размер в 5 раз больше нормы [26, 129]. При исследовании суставов конечностей в синовиальных сумках обнаруживают скопление серозно-геморрагического экссудата [148].

Гистологическим исследованием в срезах кожи выявляют фибриноидный некроз стенок сосудов дермы, что характерно для геморрагического склерозирующего васкулита [148].

При гистологическом исследовании почек обнаруживают изменения свойственные развитию острого гломерулонефрита, интерстициального нефрита и васкулита [26, 129]. При этом в корковом веществе почек наблюдают отек стенок сосудов, а также гиалиноз и атрофию почечных канальцев, тогда как в мозговом веществе находят скопления лимфогистиоцитарного инфильтрата [129, 148].

Как в случаях с СПМИ, при СДНП в лимфатических узлах и селезенке можно выявить атрофию и некроз лимфоидных фолликулов [148].

#### **2.4.4 Желудочно-кишечный синдром**

Цирковирусную инфекцию, проявляющуюся нарушением функции желудочно-кишечного тракта, выявляют у свиней в возрасте 8-16 недель. Синдром характеризуется диареей, которая приводит к истощению организма. У свиней наблюдают кахексию, повышение температуры тела, а также бледность кожи и слизистых оболочек [134].

При патологоанатомическом исследовании в брюшной полости обнаруживают увеличенные в размере брыжеечные лимфатические узлы, а также утолщение и отек стенки слепой и толстой кишки, на слизистой оболочке которых выявляют гиперемию и петехиальные кровоизлияния [129, 148]. Кроме того кровоизлияния и изъязвления слизистой оболочки можно выявить при осмотре фундальной части желудка [129]. Селезенка кровенаполнена и увеличена в размере, в то время как печень дряблой консистенции с признаками атрофии [129, 148].

Гистологическим исследованием подвздошной, слепой и толстой кишки регистрируют наличие гранулематозного энтерита с увеличением количества макрофагов и многоядерных гигантских клеток в слизистой оболочке и

подслизистой основе [129]. При хроническом течении болезни выявляют десквамацию эпителия крипт и некроз бокаловидных клеток, что приводит к развитию некротического колита [148]. В редких случаях можно обнаружить признаки панкреатита с ацинарной атрофией [57, 129, 148].

#### **2.4.5 Неврологический синдром**

По данным исследований, антиген ЦВС-2 был обнаружен в тканях головного мозга новорожденных поросят [83, 95]. В связи с этим у поросят иногда наблюдают патологию нервной системы, проявляющуюся тремором головы и конечностей даже у спящего животного [159]. К четырем неделям после рождения тремор обычно прекращается, но в редких случаях может длиться еще несколько месяцев [101, 161]. Тяжесть состояния зависит от частоты сокращений мускулатуры больного поросенка. Активный тремор при хроническом течении болезни приводит к летальному исходу [83, 95].

Гистологический метод исследования является основой для классификации различных форм конгенитального тремора при ЦВБС, так течение болезни с гистологическими изменениями в центральной нервной системе классифицируют как врожденное и относят к форме типа А, тогда как без изменений в центральной нервной системе, классифицируют как форму типа В [159]. При форме типа А у поросят наблюдают лимфогистиоцитарный инфильтрат в периваскулярном пространстве свойственный менингиту. Кроме того, вследствие развития некротического васкулита выявляют кровоизлияния и отек тканей мозжечка и ствола головного мозга. Среди прочего в спинном и головном мозге можно обнаружить дефицит миелина и олигодендроциты в состоянии отека [129].

Необходимо учитывать, что патология нервной системы, связанная с ЦВС-2, встречается редко по причине отсутствия макро- и микроскопического исследования головного мозга при ЦВБС [128].

#### **2.4.6 Репродуктивный синдром**

Цирковиральная инфекция, сопровождающаяся нарушением функции репродуктивной системы, является редкой патологией и может проявляться

абортами, мертворождением или мумификацией плода, а также смертностью поросят перед отъемом [26, 131, 136, 146].

При патологоанатомическом исследовании грудной полости у мертворожденных и новорожденных поросят обнаруживают гидроторакс, гипертрофию сердца и дилатацию желудочков, а также негнойный некротический или фибринозный миокардит [26, 146]. В брюшной полости регистрируют асцит и гепатомегалию. При гистологическом исследовании у плодов в срезах миокарда наблюдают лимфогистиоцитарную инфильтрацию, обширные участки некроза и фиброз стенок сосудов. Кроме этого, в срезах лимфатических узлов выявляют некроз герминативных центров лимфоидных фолликулов [146].

Также было установлено, что у плодов при экспериментальном внутриутробном инфицировании ЦВС-2, репликация вируса происходит в кардиомиоцитах [26, 136].

## **2.5 Особенности смешанных и вторичных инфекций с участием цирковируса свиней второго типа**

Цирковирусная болезнь зачастую развивается как смешанная инфекция, либо на ее фоне возникает вторичная инфекция, что объясняет такое разнообразие клинических признаков и патологических изменений [3, 11, 13, 36, 41, 47].

Риск развития смешанной инфекции, индуцируемой ЦВС-2 и вирусом РРСС, составляет от 42 до 85,4% [113]. Уровень летальности при развитии такой инфекции не превышает 26%. Клиническая картина характеризуется тяжелой одышкой, летаргией и иктеричностью кожных покровов. При гистологическом исследовании выявляют изменения, соответствующие интерстициальной пневмонии [129, 134, 148]. У свиней, изначально зараженных вирусом РРСС и вторично инфицированных ЦВС-2, развиваются более тяжелые клинические признаки и патологические изменения, чем у свиней, первично зараженных вирусом ЦВС-2 и вторично инфицированных вирусом РРСС [113, 134]. Было установлено, что вирус РРСС способен повышать сроки виремии ЦВС-2 (*in vivo*),

тогда как ЦВС-2 влияет на увеличение частоты аминокислотных мутаций вируса РРСС при серийном пассировании в культуре клеток [134].

Смешанную инфекцию, вызываемую ЦВС-2 и парвовирусом свиней, наблюдают как у домашних свиней, так и диких кабанов. Развитие такой инфекции приводит к появлению мумифицированных и мертворожденных плодов у свиноматок. Полученные от больных свиноматок жизнеспособные поросята не обладают противовирусными материнскими АТ [94]. При патологоанатомическом вскрытии у поросят обнаруживают увеличенные в размере печень и почки. При гистологическом исследовании печени, почек, легких и поджелудочной железы поросят, выявляют лимфогистиоцитарную инфильтрацию и изменения, свойственные гранулематозному воспалению [134]. В тканях лимфатических узлов обнаруживают клетки, заполненные многочисленными амфобильными внутриядерными и цитоплазматическими тельцами-включениями [94].

При исследовании образцов тонкого отдела кишечника от поросят, инфицированных вирусом эпидемической диареи свиней (ВЭДС) в 29,9% проб, было выявлено наличие ЦВС-2 [90, 134]. Совместное инфицирование животного ЦВС-2 и ВЭДС приводит к развитию более тяжелого поражения желудочно-кишечного тракта по сравнению с моноинфекцией [90, 134].

Некоторые данные свидетельствуют об обнаружении смешанной инфекции, вызываемой ЦВС-2 и вирусом гриппа свиней [123, 134]. Было установлено, что вирус гриппа свиней присутствовал в 53,8% образцов, полученных от поросят-отъемышей, и 10,6% образцов от свиноматок, инфицированных ЦВС-2 [134]. Исследование показало, что при развитии такой инфекции вирус гриппа свиней не влияет на репликацию ЦВС-2 [123]. Однако у свиней, зараженных вирусом гриппа, при вторичном инфицировании ЦВС-2, клиническая и патологическая картина болезни значительно усугубляется [134].

Редко регистрируют вторичную инфекцию, инициируемую ЦВС-2 и вирусом псевдобешенства свиней [70]. Было обнаружено, что иммуносупрессивные свойства ЦВС-2 способны подавлять иммунный ответ хозяина при инфицировании вирусом псевдобешенства, что приводит к развитию



тяжелой вторичной инфекции или безуспешной вакцинации против болезни Ауески [70, 134].

Установлено развитие смешанной инфекции, вызываемой ЦВС-2 и *Mycoplasma Hyopneumoniae*. Такая инфекция проявляется общей слабостью, одышкой и снижением массы тела поросят. При гистологическом исследовании выявляют различные патологические изменения в лимфоидных тканях и развитие гранулематозного воспаления в органах, особенно в легких. Показано, что экспериментальная иммунизация поросят, инфицированных ЦВС-2, вакциной против энзоотической пневмонии свиней приводила к запуску клинической картины СПМИ. Кроме этого, вакцинация свиней, зараженных ЦВС-2, против энзоотической пневмонии свиней и инфекции, вызванной *Actinobacillus Pleuropneumoniae* может привести к удлинению виремии и увеличению числа вирусных копий ЦВС-2 по сравнению с не привитыми свиньями [14, 134].

## 2.6 Патогенез цирковирусной болезни свиней

Сложность патогенеза при ЦВБС заключается в многофакторности путей передачи ЦВС-2, большом количестве его ассоциаций с другими патогенами вирусной и бактериальной этиологии, а также в высокой эволюционной способности белка Сар вируса, что в свою очередь влияет на вирулентность возбудителя, широту патологического действия в различных системах организма. Соответственно, при изучении заболевания, вызываемого вирусом с быстро мутирующим геномом, у ученых до сих пор возникает масса вопросов.

Среди всех синдромов, характерных для ЦВБС, наиболее детально изучен патогенез развития СПМИ. Установлено, что ЦВС-2 попадает в организм животного через носоглотку, где внедряется в клетки слизистой оболочки небных миндалин, служащих воротами инфекции. При этом механизмы проникновения ЦВС-2 в эпителиальные и дендритные клетки (ДК), а также макрофаги слизистой оболочки ротовой полости и носоглотки остаются не изученными в полной мере [170]. Существует предположение, что ЦВС-2 через ротовую полость попадает в

пищеварительный тракт, где фагоцитируется М-клетками фолликуло-ассоциированного эпителия кишечника, которые с помощью трансцитоза передают вирус иммунокомпетентным клеткам солитарных фолликулов и Пейеровых бляшек, где ЦВС-2 инфицирует клетки-мишени - лимфоциты, макрофаги и ДК путем клатрин-опосредованного эндоцитоза [125, 170]. Зараженные вирусом клетки с током лимфы распространяются по лимфатическим сосудам, попадают в лимфатические узлы, стволы, а также в правый лимфатический и грудной протоки. Далее через краниальную полую вену лимфа с зараженными клетками попадает в кровь и по малому и большому кругу кровообращения расходится по тканям различных органов [170].

На данный момент процесс проникновения вируса описан только через лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистой оболочкой кишечника, тогда как через другие лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистыми оболочками, включая слизистую оболочку бронхиального и назо-фарингеального тракта, остается не изученным [170].

Особая роль в патогенезе болезни и множество научных споров отведена истощению лимфоидных тканей при ЦВБС [91, 111, 139]. Известно, что при развитии СПМИ, репликация вируса и увеличение вирусной нагрузки вызывает гибель лимфоцитов [129, 139]. В процессе детального изучения патогенеза были получены данные *in vitro*, свидетельствующие о том, что белок, кодируемый ORF3 ЦВС-2, активирует каспазу 3 и 8, тем самым увеличивая степень апоптоза и уменьшая пролиферацию клеток в культуре РК-15 [91, 111]. Однако в исследовании Resendes, A.R. (2004) *in vivo* было установлено, что увеличение вирусной нагрузки, наоборот, снижает скорость апоптоза. Исследование также показало, что у свиней с признаками СПМИ, несмотря на низкий показатель апоптоза, пролиферация лимфоцитов в лимфоидных тканях также была снижена [139].

В лимфоидных тканях здоровых свиней апоптоз и пролиферация неразрывно связаны, благодаря чему популяция лимфоцитов в таких тканях

находится на постоянном уровне. Эта особенность позволяет рассматривать апоптоз в качестве оценки пролиферативной активности [139].

Анализируя литературные данные, можно сказать, что сложность в изучении патогенеза болезни заключается в противоречивости результатов исследований в области взаимодействия вируса с клетками иммунной системы, что требует дальнейшего, более детального изучения.

## **2.7 Особенности иммунного ответа при цирковирусной болезни свиней**

Учитывая сложности в исследованиях патогенеза ЦВБС главной задачей, является понимание принципов формирования основных этапов иммунного ответа на проникновение патогена в макроорганизм. Так, известно, что за это ответственен главный комплекс гистосовместимости (МНС). Выделяют 2 класса МНС – I – экспрессируется на всех клетках организма (непрофессиональные антигенпрезентирующие клетки), благодаря чему происходит презентация АГ для цитотоксических Т-клеток (лимфоциты с маркером CD8+), тогда как клетки экспрессирующие МНС II класса – профессиональные антигенпрезентирующие клетки (ДК, макрофаги, В-клетки) предоставляют АГ Т-хелперам (лимфоциты с маркером CD4+). Известно, что наиболее эффективными клетками в формировании врожденного и приобретенного иммунитета являются ДК [28].

### **2.7.1 Дендритные клетки**

С помощью Toll-подобных рецепторов ДК распознают АГ, с последующим созреванием и миграцией из тканей в другие органы и в лимфатические узлы. Зрелые ДК синтезируют цитокины, хемокины и адгезины, необходимые для антигенпрезентирования. Одна ДК способна активировать от 100 до 3000 Т-клеток. Попав в лимфатический узел, ДК становятся частью стромы органа и приобретают особое название – интердигитальные ДК [28, 154]. Кроме этого, ДК подразделяются на миелоидные, экспрессирующие рецепторы TLR2 и TLR4 для определения бактерий и плазмитоидные, экспрессирующие рецепторы TLR7 и TLR9 для распознавания нуклеиновых кислот вирусов и бактерий.

Плазмоцитоидные ДК при взаимодействии рецептора TRL9 с CpG-олигонуклеотидами генома патогена, начинают синтезировать ИФН- $\alpha$  и ФНО- $\alpha$  для активации противовирусного иммунитета [154].

Было установлено, что ДНК ЦВС-2 препятствует связи плазмоцитоидных ДК с CpG-олигонуклеотидами, подавляя выработку ИФН- $\alpha$  и ФНО- $\alpha$ , тем самым тормозя противовирусный иммунный ответ. К тому же под влиянием ДНК ЦВС-2 плазмоцитоидные ДК не могут образовать связь рецептора TRL7 с другими вирусными патогенами, например, с вирусом РРСС или вирусом гриппа свиней, что открывает ворота для вторичной инфекции [154].

Согласно данным, 90% ДК способны распознать АГ ЦВС-2. Известно, что ЦВС-2 может сохраняться в ДК до 5 дней без репликации или дезорганизации. Совместное культивирование моноцитарных ДК, нагруженных ЦВС-2, с сингенными Т-клетками *in vitro* не индуцировало передачу вируса Т-лимфоцитам и нарушение их жизнеспособности, что доказало отсутствие связи инфицированных ДК с истощением лимфоидных тканей [154]. Интернализация ЦВС-2 в ДК не стимулирует и не ингибирует дифференцировку клеток, а также не нарушает процессы обработки и презентации АГ. Данные исследований показали, что ДК, после интернализации ЦВС-2 сохраняют свою жизнедеятельность и укрывают в себе вирус от иммунных атак. Таким образом, ДК, обладая миграционной способностью, беспрепятственно распространяют ЦВС-2 по организму хозяина [154, 163]. Более того, белки ЦВС-2 снижают экспрессию маркеров CD40, CD86 и CD137 дендритными клетками, нарушая процесс активации Т-клеток [163]. При совместном культивировании моноцитарных ДК, нагруженных ЦВС-2, с мононуклеарными клетками периферической крови *in vitro*, происходила стимуляция регуляторных Т-клеток, опосредующих иммунологическую толерантность в организме. По этой причине иммунная система хозяина воспринимает чужеродный АГ как свой и не отвечает на него [154].

### 2.7.2 Моноциты и макрофаги

Аналогично ДК, моноциты и макрофаги являются важной частью клеточного компонента врожденного иммунитета, и у них также выявлен ряд особенностей при взаимодействии с вирусом.

Моноциты и макрофаги обладают фагоцитарной функцией и несут ответственность за процессинг и представление антигенов, элиминацию патогенов, секрецию противовоспалительных цитокинов и активацию адаптивного иммунного ответа [154]. В макрофагах свиней, инфицированных ЦВС-2, можно обнаружить присутствие АГ или генома вируса, а также вирусные тельца-включения в цитоплазме [142, 154]. Исследование *in vitro* показало, что, несмотря на наличие АГ ЦВС-2 в цитоплазме моноцитов и макрофагов, репликация вируса не происходила [79, 154]. При этом увеличивалась продукция провоспалительных цитокинов альвеолярными макрофагами, в частности ФНО- $\alpha$  и ИЛ-8, что объясняет системное воспаление при СПМИ [154]. Тогда как исследование *in vivo* выявило репликацию ЦВС-2 в моноцитах и макрофагах, а также Т- и В-лимфоцитах зараженных свиней. У свиней с признаками СПМИ, альвеолярные макрофаги являются основными клетками-мишенями для ЦВС-2 [99, 154]. У свиней с признаками СПМИ под действием ЦВС-2 происходит подавление МНС II класса на поверхности макрофагов в лимфоидных тканях, что приводит к нарушению их антигенпрезентирующей функции [115].

### 2.7.3 Т-лимфоциты

Тимус является центральным органом для созревания Т-клеток, которые берут свое начало от гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Кроме этого, у свиней в нем обнаружено присутствие IgM<sup>+</sup> В-клеток, составляющих 1% от всех тимоцитов [155, 176].

Исследования показали, что у свиней в раннем онтогенезе происходит колонизация тимуса тимоцитами, принадлежащими к линии TCR- $\gamma\delta$  и экспрессирующими маркер CD3 $\epsilon$ . В процессе созревания появляются зрелые тимоциты линии TCR- $\alpha\beta$ , которые аналогично ранним клеткам экспрессируют маркер CD3 $\epsilon$  [155, 156].

Необходимо учитывать, что TCR является молекулярным комплексом, содержащим гетеродимер альфа-бета ( $\alpha\beta$ ) или гамма-дельта ( $\gamma\delta$ ), причем оба гетеродимера не могут присутствовать на поверхности клеток одновременно. В комплекс также входит поверхностный рецептор CD3, который отвечает за передачу сигналов от TCR в цитоплазму клетки. Рецептор CD3 по своей структуре представлен пятью полипептидными цепями -  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ ,  $\xi$ , которые в определенной комбинации нужны для правильной сборки и экспрессии комплекса на поверхности клетки [28]. Популяция  $\alpha\beta$ T-клеток способна распознавать чужеродные пептиды, представленные молекулами МНС. Популяция  $\gamma\delta$ T-клеток распознает непротессированные и непептидные антигены независимо от МНС [155].

У свиней  $\alpha\beta$ T-клетки принято делить на три субпопуляции по экспрессии рецепторов CD4 и CD8:  $CD8\alpha\beta^+CD4^-$  цитотоксические T-клетки и T-хелперы, экспрессирующие рецепторы  $CD8^-CD4^+$  или  $CD8\alpha\alpha^+CD4^+$ . Субпопуляция  $CD8\alpha\alpha^+CD4^+$  T-хелперов развивается в тимусе и рассматривается как эффекторные клетки памяти. Субпопуляцию  $CD8^-CD4^+$  T-хелперов дополнительно разделяют на две группы в зависимости от вырабатываемых цитокинов: T-хелперы 1 типа – продуцируют интерферон-гамма (ИФН- $\gamma$ ), активируя работу макрофагов, и T-хелперы 2 типа - секретирующие ИЛ-4, стимулирующий B-клетки [77]. Наивные  $CD8\alpha$  T-клетки находятся в лимфатических узлах и экспрессируют маркер CD27. Тогда как  $CD8\alpha\alpha^+CD4^+$  T-хелперы могут как экспрессировать маркер CD27, так и не экспрессировать его. Такие клетки локализуются в селезенке, печени и крови, продуцируя ИФН- $\gamma$  [77, 155].

Популяция  $\gamma\delta$ T-клеток представлена тремя субпопуляциями в соответствии с экспрессией рецепторов CD2 и CD8, и особенностями локализации:  $CD2^-CD8^-$  T-клетки находятся в кровотоке, тогда как T-клетки экспрессирующие рецепторы  $CD2^+CD8^+$  или  $CD2^+CD8^-$  накапливаются в других тканях организма [155].

Детальное исследование тимоцитов у разных позвоночных показало, что тимоциты свиней демонстрируют сходную с клетками человека экспрессию

дифференцировочных антигенов CD4 и CD8 [156]. Среди особенностей иммунной системы свиней выделяют более высокий уровень  $\gamma\delta$ T-клеток, чем у людей или мышей, а также одновременную экспрессию рецепторов CD2, CD3 и CD5 на поверхности T-хелперов [155].

Было установлено, что циркулирующие в периферической крови T-лимфоциты могут поддерживать репликацию ЦВС-2 [109, 112]. При этом у свиней с развитием тяжелой клинической картины СПМИ, наблюдается общее снижение T-лимфоцитов, особенно  $CD3^+CD4^+CD8^+$  T-клеток памяти, а в патологически измененных участках лимфоидных тканей в первую очередь дезорганизации подвергаются  $CD4^+$  T-хелперы и позже  $CD8^+$  цитотоксические T-клетки [126, 147]. Тогда как у свиней с развитием субклинической формы инфекции было увеличено количество  $CD3^+CD8^+$  цитотоксических T-клеток и  $CD3^+CD4^-CD8^-$   $\gamma\delta$ T-клеток по сравнению с результатами отрицательного контроля, что указывает на активный иммунный ответ [156].

#### 2.7.4 В-лимфоциты

У свиней В-клеточный лимфогенез происходит в костном мозге и продолжается в течение всей жизни. Зрелые В-клетки свиней представлены четырьмя субпопуляциями, основанными на экспрессии рецепторов CD2 и CD21. В частности,  $CD2^+CD21^+$  В-клетки в основном состоят из наивных В-лимфоцитов,  $CD2^-CD21^+$  В-клетки являются активированными В-лимфоцитами, а В-клетки с рецепторами  $CD2^+CD21^-$  и  $CD2^-CD21^-$  представляют плазмоциты, продуцирующие АТ [155]. Отсюда следует, что созревание В-клеток начинается с наивных В-лимфоцитов, продолжается через активированные В-лимфоциты, которые в свою очередь переходят в плазмоциты. На данный момент нет точных данных о том, на какой стадии развития В-лимфоциты становятся В-клетками памяти в организме свиней [156]. Существует предположение, что В-клетки памяти обладают фенотипом  $CD2^+CD21^-$  аналогично эффекторным антителообразующим клеткам, тогда как  $CD2^-CD21^-$  В-клетки, вероятно, состоят из покоящихся антителообразующих клеток и плазмоцитов [155, 156].

Аналогично Т-лимфоцитам, у В-клеток существует антигенраспознающий комплекс В-клеточного рецептора, состоящий из молекул тяжелой и легкой цепей мономера IgM (мембранная форма АТ) и гетеродимеров CD79 $\alpha$  и CD79 $\beta$ . Установлено, что CD79 $\alpha$  В-клетки находятся в селезенке и брыжеечных лимфатических узлах, реже в тонком кишечнике, легких и тимусе [155]. Маркеры CD19, CD20 и CD21 представляют собой корецепторы, обладающие сигнальной функцией и способствующие повышению аффинности антигенраспознающего комплекса В-клеточного рецептора, тогда как маркер CD79 участвует в передаче сигнала о связывании антигена [28]. Исследованием была установлена возможность межвидовой перекрестной реактивности АТ к рецепторам CD19, CD20, CD21, CD79 и CD86 В-лимфоцитов человека и свиней [64, 69].

Было установлено, что В-клетки тимуса представлены тремя субпопуляциями, среди которых выделяют зрелые В-лимфоциты, экспрессирующие рецептор IgM на поверхности, покоящиеся В-лимфоциты, экспрессирующие рецепторы других классов иммуноглобулинов на поверхности и плазматические клетки, экспрессирующие иммуноглобулины только внутриклеточно [155, 176].

Было выявлено, что циркулирующие в периферической крови IgM<sup>+</sup> В-лимфоциты поддерживают репликацию ЦВС-2 [109, 112]. При развитии цирковиральной инфекции значительно снижается доля CD2<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> наивных В-клеток, тогда как количество CD2<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup> плазмочитов и CD2<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup> активированных В-лимфоцитов не изменяется [156]. У свиней с наличием тяжелой клинической картины СПМИ было обнаружено общее снижение содержания CD21<sup>+</sup> В-лимфоцитов [126].

Исследования показали, что в отличие от вируса РРСС, под воздействием которого происходит гиперпродукция В-клетками иммуноглобулинов, ЦВС-2, наоборот, угнетает их выработку [156]. Вместе с тем ЦВС-2 может сохраняться в клетках даже в присутствии высоких титров АТ [103, 107, 119]. Эти данные указывают, что наличие в организме АТ к ЦВС-2 не гарантирует полную элиминацию вируса [156].



Также установлено, что у свиней, инфицированных ЦВС-2, происходит антиген-специфическая селекция плазмоцитов в нижних дыхательных путях. При этом стимулированные В-клетки, синтезирующие IgA, из одного участка слизистой оболочки дыхательных путей могут перемещаться через кровь в другие участки, что объясняет высокие уровни этого иммуноглобулина в сыворотках крови больных поросят. Существует предположение, что IgA играет важную роль в контроле тяжести развития СПМИ [156].

### **2.7.5 Цитокиновый профиль**

Установлено, что ЦВС-2 способен влиять на изменение цитокинового профиля, что играет решающую роль в патогенезе ЦВБС. Белок Cap ORF2 ЦВС-2 воздействует на матричную рибонуклеиновую кислоту цитокинов ИЛ-2, ИЛ-12p40, ИЛ-4 и ИФН- $\beta$  на уровне транскрипции, снижая показатели ее экспрессии. Данный процесс связан с выраженной атрофией и инволюцией тимуса у больных свиней и, возможно, является механизмом угнетения функции цитотоксических Т-клеток [63]. Кроме того, ЦВС-2 оказывает стимулирующее действие на выработку врожденными (макрофаги, ДК) и адаптивными клетками (В-клетки и Т-клетки с рецепторами CD4 и CD8) противовоспалительного цитокина ИЛ-10 [97, 103]. Данный цитокин способен ингибировать активность макрофагов, Т-хелперов и НК-клеток, которые участвуют в уничтожении патогенов и зараженных клеток организма [62]. Ученые предполагают, что под действием ЦВС-2 избыточная продукция клетками ИЛ-10 приводит к нарушениям воспалительных реакций в организме [93, 98].

## **2.8 Лабораторная диагностика цирковиральной болезни свиней**

Обязательной частью диагностики ЦВБС являются лабораторные исследования, включающие серологические, молекулярно-биологические, вирусологические, гистологические и гистохимические методы [174].

Среди серологических методов наиболее часто применяют непрямой или конкурентный блокирующий ИФА [92, 131]. В основе метода лежит реакция АГ-

АТ, которую выявляют с использованием ферментных меток, меняющих окраску хромогенного субстрата. При обработке результатов ИФА необходимо учитывать возможность получения ложноположительного результата реакции на поствакцинальные АТ у клинически здоровых животных [92, 173].

Для определения репродукции ЦВС-2 в культуре клеток используют метод иммунопепероксидазного монослойного анализа. Принцип метода заключается в образовании иммунного комплекса АГ-АТ в цитоплазме инфицированных вирусом клеток, который выявляют нанесением антивидового пероксидазного конъюгата с последующим окрашиванием хромогенным субстратом. Репродукцию ЦВС-2, данным методом, обнаруживают по красно-коричневому окрашиванию цитоплазмы клеток [7].

Среди вирусологических методов для идентификации и выделения вирусов широко используют культуры клеток. Изоляцию ЦВС-2 из патологического материала выполняют в культуре клеток РК-15 [48].

Выявление фрагментов генома возбудителя ЦВБС осуществляют методом ПЦР. В этом направлении наиболее востребован метод количественной ПЦР, который позволяет определить нуклеотидную последовательность ЦВС-2 и количество ее копий для оценки вирусной нагрузки в жидкостях и тканях организма [174]. Для одновременной идентификации разных генотипов ЦВС-2 или геномов других патогенов в пробе применяют метод ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, который осуществляет амплификацию и детекцию нескольких ДНК-мишеней в одной реакции [92].

Кроме вышперечисленных методов используют гистологическое исследование тканей и органов, которое позволяет обнаружить патологические изменения, свойственные ЦВБС [31, 33, 39, 129, 148]. Для определения локализации АГ ЦВС-2 в тканях применяют иммуногистохимическое исследование, являющееся золотым стандартом для диагностики ЦВБС [92, 131, 158].

Метод иммуногистохимического исследования был предложен А. Coons с соавторами в 1941 году. Основой данного метода является реакция АГ с АТ.

Существует два варианта проведения исследования - прямой и непрямой [29, 32, 34]. Если исследование осуществляется прямым методом, в реакции используют специфичные к искомому АГ меченые АТ. В качестве метки используют как ферменты, например пероксидазу хрена или биотин, так и флуоресцентные красители [29, 31, 32, 34]. При выполнении непрямого метода ИГХИ используют два и более вида АТ. Первичные немеченые АТ связываются с определенным АГ, после чего они вступают в реакцию со вторичными мечеными АТ. Стоит учитывать, что данный метод является более долгим по времени выполнения, но более чувствительным по сравнению с прямым вариантом исследования [29, 30, 32].

На данный момент в России отсутствуют отечественные методы для постановки иммуногистохимического исследования с целью обнаружения АГ ЦВС-2 в тканях органов свиней, что открывает возможности для их разработки [32, 35].

Для идентификации и подсчета иммунокомпетентных клеток используют метод иммунофенотипирования, который выполняют с помощью проточных цитофлуориметров, анализируя образцы крови, пунктата костного мозга, ликвора и экссудатов или трансудатов [10, 27, 43]. В основе метода лежит использование МАТ к поверхностным антигенным маркерам иммунокомпетентных клеток, что позволяет произвести подсчет исследуемых клеток, а также судить об их функциональном состоянии и стадии развития [10, 27, 35, 40, 43]. Разработка отечественного метода ИГХИ для идентификации лимфоцитов и макрофагов в тканях и органах позволит использовать данный метод для иммунофенотипирования лимфоцитов в гистологических срезах, а также расширит возможности применения иммунофенотипирования в области гистологических исследований [35].

## 2.9 Иммунопрофилактика цирковирусной болезни свиней

Для успешного искоренения ЦВБС существует комплекс мер направленный на предотвращение заболевания, среди которого выделяют противоэпизоотический контроль, проведение регулярных диагностических исследований и профилактических вакцинаций [6, 19, 37].

В настоящее время вакцинация считается наиболее надежным способом защиты свиней от цирковирусной инфекции. Однако существуют данные, что ЦВБС распространена и среди вакцинированных животных [92].

Современные вакцины против ЦВБС представлены инактивированными цельновирионными (содержат инактивированный вирус) или субъединичными вакцинами (содержат белок Сар ORF2 ЦВС-2), которые эффективны в индукции гуморального и клеточного иммунного ответа [15, 92]. Применение живых аттенуированных вакцин против ЦВБС ограничено, так как существует вероятность реверсии вакцинного штамма к дикому типу [12]. Использование инактивированных вакцин не ограничивает распространение ЦВС-2, а активная иммунизация такими вакцинами стимулирует мутации вируса [92, 96].

Для решения проблемы, связанной с вакцинацией свиней против ЦВБС живыми аттенуированными вакцинами, предложено использование биопрепаратов, основанных на вирусах-химерах [22, 47]. Для экспериментальной вакцины был получен химерный вирус, в основе которого состоял непатогенный ЦВС-1 со встроенной конструкцией из нуклеотидных последовательностей белка Сар ORF2 пяти дивергентных штаммов ЦВС-2. Экспериментальная вакцина вызвала гетерологичный иммунный ответ и защиту от заражения разными генотипами ЦВС-2. В связи с этим разработка биопрепаратов с использованием химерных вирусов в будущем, возможно, станет основой для вакцин нового поколения против ЦВБС [117].

## 2.10 Заключение

Данные ретроспективных исследований, указывают, что ЦВС-2 присутствовал в популяциях диких и домашних свиней до момента открытия вируса в латентном состоянии, не вызывая никаких патологий. С развитием инфраструктуры и экономических связей, произошло мировое распространение ЦВС-2, которому способствовала массовая перевозка свиней, мяса и генетического материала для осеменения. Помимо активного распространения ЦВС-2, повышалась его вирулентность, а клиническая и патологическая картины отягчались при постоянном пассировании вируса среди поголовья. Ученые отмечают, что с течением времени геном ЦВС-2 приобрел способность к быстрой мутации, что благоприятно влияет на его эволюцию и появление новых, более «сильных» генотипов вируса, а также определяет клиническую морфологию синдромов ЦВБС.

Наиболее детально, на сегодняшний день, изучен СПМИ, который, в основном, развивается у поросят-отъемышей. Реже у молодых свиней наблюдают СДНП, при котором нарушается работа органов мочевыделения и определяется патология кожных покровов или неврологический синдром, проявляющийся расстройствами ЦНС. Более взрослое поголовье подвержено респираторному синдрому, когда патология выражена в органах дыхания и желудочно-кишечному синдрому, связанному с нарушениями в пищеварительной системе. У свиноматок выявляют репродуктивный синдром, при котором наблюдают внутриутробную гибель плодов. Несмотря на разнообразие клинических проявлений при ЦВБС существует патогномичный признак, характерный для всех синдромов, а именно, истощение лимфоидных тканей, опосредованное патологическим действием ЦВС-2 на клетки иммунной системы хозяина.

Несмотря на наличие множества исследований, ориентированных на изучение ЦВБС, особенности патогенеза и иммунного ответа, к данному моменту, не изучены полностью. Так, много споров вызывает внедрение вируса и диссеминация его в организме, а также регуляция апоптоза клеток иммунной

системы вирусными белками и многое другое. Хотя и известно, что макрофаги и ДК после интернализации ЦВС-2, могут сохранять его в себе без репликации и дезорганизации, способствуя его доставке в органы животного, остается неясным, какой механизм помогает вирусу скрываться в данных клетках от иммунных атак организма.

Из сказанного ранее следует, что для каждого синдрома характерны определенные клинико-морфологические признаки, которые зачастую отягощаются при развитии вторичной инфекции. Параллельно возникает множество вопросов при изучении иммунного ответа, что добавляет сложности в диагностике и планировании профилактических мероприятий. В данной ситуации необходим комплексный подход при выборе диагностических методов исследования, поскольку такой вектор позволит не только выполнять рутинную диагностику, но и расширит знания о патогенезе ЦВБС.

Зарубежными учеными отмечено, что иммуногистохимическое исследование, является золотым стандартом для подтверждения ЦВБС [131, 158]. Применение данного метода способствует решению проблем, связанных с дифференциальной диагностикой, а также определением связи ЦВС-2 с патологическими изменениями в организме инфицированных свиней [32].

Кроме этого, для изучения вопросов иммунитета при ЦВБС и других инфекционных болезнях, в США, Европе и Азии активно развивается разработка и создание высокоспецифичных МАТ к антигенным маркерам иммунокомпетентных клеток свиней, что позволяет повышать уровень иммунологических исследований в области ветеринарии. Более того, было проведено изучение перекрестной реактивности между АТ к CD маркерам лимфоцитов и макрофагов человека и свиньи, что позволило использовать гетерологичные реагенты для детального изучения иммунного ответа при ЦВБС [1, 137].

В нашей стране, практически отсутствуют данные об использовании ИГХИ для диагностики цирковиральной инфекции. В публикации Андреева Д.А. описан опыт применения ИГХИ на срезах лимфатических узлов свиней с признаками

СПМИ для изучения распределения лимфоцитов в структурах органов, используя зарубежный протокол исследования.

Учитывая сложившуюся ситуацию, для нашей страны является актуальным разработка ИГХИ с целью выявления АГ ЦВС-2 в тканях свиней, в качестве метода диагностики ЦВБС, для выявления бессимптомных носителей, а также изучения патогенеза цирковирусной инфекции.

Аналогичная ситуация обстоит с идентификацией лимфоцитов в органах свиней. Разработка отечественного метода ИГХИ, актуальна, поскольку позволит определить фенотип иммунокомпетентных клеток и их количество в гистологических срезах органов-мишеней, что способствует углубленному изучению иммунного ответа и расширению знаний о патогенезе ЦВБС [35].

Стоит обратить внимание на то, что наличие кросс-реактивности между АТ к CD маркерам лимфоцитов человека и свиньи открывает возможность для исследований в этой области, используя АТ отечественного производства [35].

Исходя из этого, актуальным, при изучении ЦВБС, является выявление связи между патологическими изменениями, присутствием АГ ЦВС-2 и количеством основных популяций иммунокомпетентных клеток в органах-мишенях инфицированных свиней, что стало целью данной диссертационной работы. Для выполнения этой цели необходимо определить гистологические изменения в органах инфицированных ЦВС-2 животных, разработать методы прямого и непрямого ИГХИ для выявления АГ ЦВС-2 и идентификации лимфоцитов и макрофагов, что позволит определить их количество и распределение в тканях лимфатических узлов и легких. Кроме этого, развитие данного направления также важно для разработки вакцин нового поколения и при использовании свиней в качестве модели для биомедицинских исследований.

### 3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 Материалы и методы

Работу выполняли в 2017-2022 гг. в секторе патоморфологии на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», где осуществляли гистологическое исследование, разработку и апробацию прямого и непрямого методов ИГХИ с целью выявления АГ ЦВС-2 и идентификации иммунокомпетентных клеток в органах свиней, а также статистический анализ и обработку результатов.

Исследования методами ПЦР-РВ и ИФА выполняли совместно с сотрудниками лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики вирусных болезней свиней, а также лаборатории биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

##### 3.1.1 Материалы

###### *1. Исследуемый материал*

Для патологоанатомического, гистологического и иммуногистохимического исследования было отобрано более 600 образцов органов от павших и вынуждено убитых свиней в период с 2017-2022 гг.

Для ИФА и ПЦР-РВ была получена 101 проба сыворотки крови из свиноводческих хозяйств и комплексов Московской, Новосибирской, Кемеровской, Липецкой, Тамбовской и Белгородской областей.

###### *2. Диагностические наборы*

Исследование сыворотки крови выполняли с помощью коммерческих наборов:

- Набор реагентов для выявления АТ к ЦВС-2 методом непрямого ИФА «ЦИРКО-СЕРОТЕСТ» (ООО "Ветбиохим", Россия).



- Тест-система для обнаружения ЦВС-2 методом ПЦР-РВ (ООО "Ветбиохим", Россия).

Для определения возраста фибрина в ткани использовали готовый набор «Окраска для выявления возраста фибрина» (ООО «ЭргоПродакшн», Россия).

### ***3. Лабораторное оборудование***

В исследованиях было использовано следующее оборудование: установка карусельного типа STP 120 (Thermo Scientific, Германия), заливочный аппарат ЕС 350-1 с криоконсолью ЕС 350-2 (Thermo Scientific, Германия), роторный микротом Microm HM325 (Thermo Scientific, Германия), столик с функцией подогрева (Medax, Германия), автоматическая установка линейного типа для окраски срезов Microm HMS 70 (Thermo Scientific, Германия), микроскоп AxioScope A1 (ZEISS, Германия), камера AxioCam ERc 5s (ZEISS, Германия), термостат Incubator MIR 262 (Sanyo, Япония), криостат Microm HM 525 (Thermo Scientific, Германия), холодильник бытовой электрический (ATLANT, Белоруссия), весы лабораторные аналитические Pioneer PA214C (OHAUS, США), весы лабораторные DL-2000 WP (AND, Япония), лабораторный pH-метр Starter 2100 (OHAUS, США), фотометр планшетный iMark (Bio-Rad, США), 1-канальная автоматическая пипетка Proline (1000мкл) (Biohit, Финляндия), 1-канальная автоматическая пипетка Pipetman (100мкл) (Gilson, Великобритания).

### ***4. Лабораторная посуда и расходные материалы***

Лабораторная посуда: колбы лабораторные стеклянные конические (100-1000мл), бюксы с крышкой стеклянные разной емкости, стеклянные чашки Петри, лабораторные стаканы стеклянные и химически стойкие пластиковые, банки широкогорлые химически стойкие пластиковые, ложки мерные лабораторные пластиковые, крючки стеклянные гистологические, кисть для очищения микротомы, заливочные формы из нержавеющей стали TurboFlow (Microm, Германия), пинцет анатомический из нержавеющей стали, ножницы хирургические с разными браншами из нержавеющей стали.

Расходные материалы: пробирки вакуумные BD Vacutainer Plus ЭДТА (Becton Dickinson and Company, США), пластиковые контейнеры для

гистологического материала с крышкой (Россия), пробирки 0,5мл типа Эппендорф (Greetmed, Китай), гистологические кассеты (Sakura Finetek, Нидерланды), заливочные кольца (БиоВитрум, Россия), биопсийные прокладки (БиоВитрум, Россия), стекла предметные гистологические с матовым краем (БиоВитрум, Россия), стекла Polysineslides и Superfrostplus (Thermo Scientific, Германия), стекла покровные (БиоВитрум, Россия), лезвия для микротомы Ассу-Edge Low Profile Microtome Blades (Sakura Seiki Co, Япония), лезвия для криотома SEC 35 (Microm, Германия), маркер перманентный (Китай), наконечники для дозаторов (0-200мкл) (Артаса, Италия), наконечники для дозаторов с фильтром (100-1000мкл) (Jet Bio-Filtration, Китай), перчатки медицинские одноразовые нитриловые (Venovu, Малайзия).

### **5. Реактивы**

Использованные реактивы: 10% забуференный формалин Histosafe (БиоВитрум, Россия), Изопреп (БиоВитрум, Россия), Орто-Ксилол, ЧДА (Россия), парафиновая среда Мистер Вакс ЭКСТРА (БиоВитрум, Россия), жидкость адгезивная для обработки предметных стекол (БиоВитрум, Россия), матричная среда для криотомии O.C.T. Compound containing (Sakura Finetek, Нидерланды), вода дистиллированная (Россия), гематоксилин Майера (БиоВитрум, Россия), 1% водный раствор эозина (БиоВитрум, Россия), заключающая среда безводная Sub-X Clearing Medium (Leica Biosystems, Германия), физиологический раствор 0,9% (Россия), 3% раствор перекиси водорода (Россия), Tween-50 (Thermo Fisher Scientific, США), сухое обезжиренное молоко (Россия), глицерин (AppliChem, Германия), натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный (Россия), натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный (Россия), N,N-диметилформаид (Россия), 3-амино-9-этилкарбазол (Россия), АЕС Straining Kit (Sigma-Aldrich, США).

Антитела: МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2 (АНО «НИИ ДПБ», Россия), МАТ мыши к маркеру CD3 человека (ООО «Сорбент», Россия), МАТ мыши к маркеру CD4 человека (ООО «Сорбент», Россия), МАТ мыши к маркеру CD8 человека (ООО «Сорбент», Россия), МАТ мыши к маркеру

CD14 человека (ООО «Сорбент», Россия), МАТ мыши к маркеру CD20 человека (ООО «Сорбент», Россия), поликлональные антивидовые АТ Donkey Anti-Mouse IgG Antibody, HRP conjugate (Sigma-Aldrich, США).

### 3.1.2 Методы

#### 1. Отбор патологического материала, транспортировка и подготовка образцов

Для исследовательской работы выполняли отбор патологического материала из хозяйств с подозрением на присутствие цирковирусной инфекции, в которых проявлялась клиническая картина болезни. Материал был отобран от 101 головы свиней разных возрастных групп из хозяйств Новосибирской, Московской, Кемеровской, Тамбовской, Липецкой и Белгородской областей, у которых наблюдали клинические признаки инфекции и от животных без признаков, но находившихся в контакте с заболевшими (таблица 2).

Таблица 2 – Общее количество голов свиней исследованных в работе

Возрастная группа	Возраст в днях	Новосибирская область	Московская область	Кемеровская область	Тамбовская область	Липецкая область	Белгородская область	Всего голов в возрастной группе
		Количество голов						
Поросята-сосуны	1-40	10	-	5	-	5	-	20
Поросята-отъемыши	40-120	10	10	5	7	5	4	41
Откормочное поголовье	120-210	20	-	10	-	-	-	30
Свиноматки	280-560	10	-	-	-	-	-	10
Итого		50	10	20	7	10	4	101

По данным, указанным в таблице 2 следует, что в Новосибирской области отбирали патологический материал от 50 голов, включая пробы от 10 голов поросят-сосунов, 10 голов поросят-отъемышей, 20 голов откормочного поголовья и 10 голов свиноматок. В Московской области был отобран патологический материал только от 10 голов поросят-отъемышей (не привитых от ЦВБС), аналогично в Белгородской области отбирали материал только от 4 голов, а в Тамбовской области от 7 голов данной возрастной группы. В Кемеровской

области отбирали материал от 5 голов поросят-сосунов, 5 голов поросят-отъемышей и 10 голов откормочного поголовья. В Липецкой области материал отбирали от 5 голов поросят-сосунов и 5 голов поросят-отъемышей.

Для исследования методами ИФА и ПЦР-РВ сыворотку получали из венозной крови отстаиванием с удалением сгустка и центрифугированием. Готовые сыворотки расфасовывали в пробирки 0,5мл типа Эппендорф и маркировали. Температурный режим транспортировки проб не превышал 8<sup>0</sup>С. Для дальнейшего исследования пробы замораживали при температуре -70<sup>0</sup>С.

Для макроскопического исследования органов и криотомии от павших и вынуждено убитых свиней отбирали верхние доли легкого, селезенку, паховые и бронхиальные лимфатические узлы, почки и сердце. Работу осуществляли с использованием перчаток, лезвий, нержавеющей эмалированных поддонов и емкостей для проб. Транспортировку образцов осуществляли в сумке-холодильнике с хладоэлементами при температуре ниже 0<sup>0</sup>С.

Для изготовления гистологических срезов из органов с помощью лезвия иссекали образцы и помещали их в маркированные контейнеры с забуференным 10% раствором формалина на 24-72 часа при комнатной температуре. Размер образца в контейнере составлял 2-3см. Непосредственно перед проводкой фрагменты тканей укладывали в гистологические кассеты. При этом размер фрагментов не превышал 1-2см в длину и ширину и 0,5см в толщину.

## ***2. Полимеразная цепная реакция***

Исследование сывороток крови методом ПЦР-РВ выполняли с помощью набора - «Тест-система для обнаружения цирковируса свиней II типа методом полимеразной цепной реакции в реальном времени» (ООО «Ветбиохим», Россия). Данная тест-система позволяет выделить ДНК и осуществить амплификацию специфического фрагмента. Постановку реакции и анализ результатов выполняли согласно инструкции производителя.

## ***3. Иммуноферментный анализ***

Для исследования сывороток крови методом непрямого ИФА использовали коммерческий набор «ЦИРКО-СЕРОТЕСТ» (ООО «Ветбиохим», Россия). Анализ

проводили согласно инструкции производителя. Считывание оптической плотности субстратной смеси выполняли на планшетном фотометре iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 450нм. Интерпретацию и оценку результатов проводили по формулам, приведенным в инструкции.

#### **4. Изготовление гистологических препаратов**

Гистологическую проводку материала осуществляли в установке карусельного типа STP 120 (Thermo Scientific, Германия). Аппарат в своем оснащении имеет 12 равных емкостей с ручками. Первую чашу заполняли 10% забуференным формалином. Чаши со второй по девятую наполняли концентрированным изопропиловым спиртом. В десятую чашу заливали орто-ксилол. Последние две емкости обладают функцией подогрева, в них насыпали гранулированный парафин. Для поддержания жидкого состояния парафина в этих чашах установлена температура 56<sup>0</sup>С. Аппарат по часовой стрелке передвигает корзину с гистологическими кассетами из чаши в чашу согласно заданной программе. Программа P06 для проводки материала была выбрана с учетом толщины и размера исследуемых объектов, а также концентрации используемых растворов и времени пропитывания тканей (таблица 3).

Таблица 3 – Схема проводки материала по программе P06

Номер тары	Раствор	Концентрация, %	Температура, °С	Экспозиция, минуты
1	Раствор забуференного формалина	10	15-25	Зависит от запуска программы
2	Изопропиловый спирт	100	15-25	10
3	Изопропиловый спирт	100	15-25	30
4	Изопропиловый спирт	100	15-25	40
5	Изопропиловый спирт	100	15-25	40
6	Изопропиловый спирт	100	15-25	40
7	Изопропиловый спирт	100	15-25	60
08	Изопропиловый спирт	100	15-25	60
9	Изопропиловый спирт	100	15-25	60
10	Орто-ксилол	-	15-25	240
11	Парафин	-	57	150
12	Парафин	-	57	210

Гистологические кассеты с фрагментами органов укладывали в корзину. При движении корзины по емкостям, ткани поэтапно пропитывались растворами необходимыми для дегидратации и обезжиривания.

После проводки гистологические кассеты извлекали из корзины и переносили в горячий отсек полуавтоматического заливочного аппарата ЕС 350-1 с криоконсолью ЕС 350-2 (Thermo Scientific, Германия). Затем кассеты, вынутые из горячего отсека, открывали, оценивали качество проводки и размер объекта для правильного подбора заливочной формы. Используя пинцет, материал забирали из кассеты и укладывали в заливочную форму необходимого размера. Для формирования блока материал быстро располагали в необходимой проекции до застывания парафина, избегая при этом образование пузырей. Форму с уложенным в нее объектом переносили на охлаждающую платформу. После чего на слегка остывшую поверхность крепили заливочное кольцо, либо нижнюю часть гистологической кассеты с маркировкой. Затем сформированный блок переносили на криоконсоль с температурой поверхности  $-10^{\circ}\text{C}$  для застывания. Через 30 минут с блока удаляли заливочную форму, а сам блок использовали по назначению.

Гистологические срезы изготавливали с помощью роторного микротомы Microm HM 325 (Thermo Scientific, Германия). В режущую часть аппарата устанавливали одноразовые гистологические лезвия. Толщина готовых срезов составляла 5-6 микрон. В комплектацию роторного микротомы встроена водяная баня, срезы расправляются током воды, которая циркулирует между режущей частью аппарата и водяной баней. После расправленные срезы переносили на стекла, используя стеклянный крючок. Предметные стекла предварительно обрабатывали адгезивной жидкостью, необходимой для плотного крепления срезов. По окончании работы, стекла сушили в горизонтальном положении на нагревательном столике при температуре  $40^{\circ}\text{C}$ . Для экспресс-сушки стекла с гистологическими срезами устанавливали в держатель в вертикальном положении при температуре поверхности нагревательного столика  $60^{\circ}\text{C}$ , время экспозиции - 2 часа. Для обычной сушки стекла оставляли на ночь при комнатной температуре.

Готовые гистологические срезы окрашивали в автоматической линейной установке Microm HMS 70 (Thermo Scientific, Германия). Аппарат использовали для окрашивания гематоксилин – эозином, согласно заданной программе. Кюветы аппарата заполняли жидкостями согласно протоколу окрашивания. В программу вводили данные о времени необходимом для окрашивания структур ткани и ее промывания от избытков растворов. Программа для автоматической окраски срезов представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Программа для автоматической окраски срезов гематоксилин-эозином

Номер этапа	Реактив	Экспозиция, минуты
1	Орто-ксилол I	15
2	Орто-ксилол II	15
3	Изопропиловый спирт I	15
4	Изопропиловый спирт II	15
5	Вода I	15
6	Вода II	20
7	Гематоксилин Майера	10
8	Вода	5
9	Проточная вода	30
10	Эозин 1% водный	10
11	Изопропиловый спирт I	10
12	Изопропиловый спирт II	5
13	Изопропиловый спирт III	5
14	Орто-ксилол I	10
15	Орто-ксилол II	15

После окрашивания срезы закрывали покровным стеклом, используя монтирующую среду Sub-X.

Сложные методы окраски срезов выполняли вручную в лабораторном боксе. Для определения возраста фибрина в тканях, использовали готовый коммерческий набор «Окраска для выявления возраста фибрина» (БиоВитрум, Россия). Окрашенные срезы закрывали покровными стеклами с помощью монтирующей среды и сушили 10-12 часов под грузом.

Готовые гистологические препараты исследовали в световом микроскопе AxioScore A.1 (ZEISS, Германия), для оценки качества срезов и патологических изменений в тканях. Фотосъемку гистологических препаратов выполняли с

помощью камеры AxioCam ERc 5s (ZEISS, Германия). Обработку полученных изображений осуществляли в компьютерной программе AxioVision Release 4.8.2.

### ***5. Криотомия нативного патологического материала***

Из охлажденных проб иссекали объекты размером 1,0x1,5x2см. Иссеченные объекты фиксировали на столиках для криотомии, используя гелеобразную матричную среду. Получившийся блок на 2-3 минуты помещали в камеру криостата Microm HM 525 (Thermo Scientific, Германия) для равномерного замораживания объекта при температуре  $-34^{\circ}\text{C}$ . Затем блок дополнительно покрывали порцией среды по всей поверхности объекта и оставляли в камере на 30-60 минут для полного застывания. Из готового блока получали срезы толщиной 5-10мкм. Перенос срезов осуществляли на поляризованные стекла. Благодаря особым свойствам покрытия, срез надежно фиксировался на стекле без адгезивной среды.

### ***6. Прямой метод иммуногистохимического исследования с целью выявления АГ ЦВС-2 в органах свиней***

Для выявления антигена ЦВС-2 в органах свиней, была необходима разработка прямого метода ИГХИ на основе МАТ мыши клона 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2, меченных пероксидазой хрена.

Разработку метода осуществляли на парафиновых и нативных (криотомия) срезах толщиной 5мкм и 10мкм соответственно (п. 3.1.2), полученных из органов от 101 головы свиней.

В качестве отрицательного контроля брали органы от свиней без клинической и патологической картины цирковиральной инфекции, а также с отсутствием генома ЦВС-2 и АТ к вирусу.

Обработка парафиновых срезов заключалась в депарафинировании, с помощью ксилола и очистке от ксилола изопропиловым спиртом. После обработки спирт смывали дистиллированной водой. Нативные срезы после изготовления сушили при комнатной температуре.

В парафиновых и нативных срезах выполняли демаскировку АГ ЦВС-2, а также удаление остатков формалина (парафиновые срезы), липидов и криогеля



(нативные срезы). Результаты подбора условий для демаскировки представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Процентное содержание изопропилового спирта в демаскировочном растворе и его влияние на результат реакции

Раствор	Температура, °С	Концентрация, %	Результат ИГХ реакции
Изопропиловый спирт	+4	100	Отрицательный
Раствор изопропилового спирта в 0,1М ФСБ (рН=7,6)	+4	30	Фоновое окрашивание
	+4	50	Отрицательный
	+4	70	Отрицательный
Раствор изопропилового спирта в NaCl (0,9%)	+4	30	Положительный
	+4	50	Фоновое окрашивание
	+4	70	Фоновое окрашивание

Демаскировку АГ ЦВС-2 в растворах выполняли в холодильной камере при температуре +4°С в течение 60 минут. Исходя из данных, представленных в таблице 5, видно, что одной из проблем мешающей правильно интерпретировать результат явилось фоновое окрашивание хромогеном всей поверхности стекла. Фоном является неспецифическое окрашивание, при котором хромоген связывается не только с метками АТ в местах образования иммунного комплекса, но и с различными структурами исследуемого органа или, иногда, с предметным стеклом. Такое окрашивание считается неспецифическим и может возникать при недостаточной очистке среза, переизбытке антител в рабочем растворе или кристаллов N,N-диметилформаида в рабочем растворе хромогена и т.п. Учитывая данный факт, подбирали растворы в разных концентрациях изопропилового спирта для улучшения очистки среза и сохранения антигена. Обработка срезов в 50% и 70% растворе изопропилового спирта в NaCl (0,9%) приводила к неспецифической фоновой окраске, аналогичный результат был получен при обработке срезов 30% раствором изопропилового спирта в 0,1М ФСБ (рН=7,6). При использовании 50 и 70% растворов изопропилового спирта в 0,1М ФСБ (рН=7,6) и концентрированного изопропилового спирта был получен отрицательный результат реакции. При обработке срезов 30% раствором

изопропилового спирта в NaCl (0,9%) отсутствовала фоновая окраска, а антигенспецифичные клетки были четко заметны.

Последующие этапы выполнения прямого ИГХИ были одинаковыми как для парафиновых, так и для нативных срезов.

После процесса демаскировки АГ ЦВС-2 срезы промывали в 0,1М ФСБ. При этом рН буфера подбирали опытным путем среди значений равных 7,4, 7,6 и 7,8. Результаты подбора представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Подбор рН 0,1М ФСБ

Значение рН	Результат ИГХ реакции
7,4	Фоновое окрашивание
7,6	Положительный
7,8	Отрицательный

Согласно данным, указанным в таблице 6, видно, что при 0,1М ФСБ рН=7,6, не происходило фоновое окрашивание хромогеном. Изменение среды ФСБ в более щелочную или кислую сторону приводило к отрицательному результату иммуногистохимической реакции (рН=7,8) или неспецифическому окрашиванию (рН=7,4).

Следующим этапом обработки являлось удаление эндогенной пероксидазы. С этой целью на срезы наносили 3% раствор перекиси водорода. Указанную концентрацию раствора не меняли, так как реакция проходила стабильно. После удаления эндогенной пероксидазы срезы промывали в 0,1М ФСБ рН=7,6.

Затем на срезы наносили 5% блокирующий раствор на основе обезжиренного сухого молока в 0,1М ФСБ рН=7,6 и инкубировали в термостате 40 минут при температуре 37<sup>0</sup>С (в условиях влажной камеры для предотвращения неспецифического связывания АТ и высыхания блокирующего раствора).

Далее осуществляли подбор оптимальной концентрации МАТ мыши 6h12. Определение чувствительности метода выполняли в рабочих разведениях АТ: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 и 1:1600. Концентрат АТ разбавляли в 0,1М ФСБ рН=7,6. Подбор оптимальной концентрации АТ для приготовления рабочего раствора представлен в таблице 7.

Таблица 7 – Подбор оптимальной концентрации МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2 для рабочего раствора

ФСБ рН	Концентрация АТ	Результат ИГХ реакции
7,6	1:50	Фоновое окрашивание
	1:100	Фоновое окрашивание
	1:200	Фоновое окрашивание
	1:400	Положительный
	1:800	Отрицательный
	1:1600	Отрицательный

Согласно полученным данным, представленным в таблице 7, рабочее разведение МАТ мыши 6h12 в 0,1М ФСБ (рН = 7,6) составило 1:400, так как разведение 1:50, 1:100, 1:200 приводило к интенсивному неспецифическому окрашиванию хромогеном, при разведении 1:800 и 1:1600 наблюдали отрицательный результат реакции.

Положительный результат ИГХ реакции был получен после того, как срезы с нанесенным раствором АТ инкубировали в термостате при температуре 37<sup>0</sup>С (в условиях влажной камеры), в течение 90 минут. При инкубации раствора АТ меньше 60 минут, реакция была отрицательной, как в чистом контроле, так и в образцах от инфицированных свиней. Тогда как инкубация больше 90 минут, никак не влияла на результат реакции.

После инкубации с АТ срезы промывали в 0,1М ФСБ (рН = 7,6). Затем наносили рабочий раствор хромогена, который готовили разведением маточного раствора хромогена (0,02г 3-амино-9-этилкарбазола + 3мл N,N-диметилформамида) в 0,02М Na-фосфатном буфере с рН = 5,0. Перед нанесением рабочего раствора хромогена на срезы, в него добавляли 1мкл 3% раствора перекиси водорода для активации красителя. Время, которое необходимо для качественной окраски пероксидазной метки определяли экспериментальным путем, с этой целью хромоген на срезах выдерживали 20, 40 и 60 минут. В результате установили, что оптимальное время выдержки хромогена на срезах 20-40 минут. Экспозиция рабочего раствора хромогена менее 20 минут не окрашивает метки, тогда как передержка хромогена на срезах более 40 минут приводит к неспецифическому окрашиванию.

На последнем этапе ИГХ реакции необходимо удаление не связавшегося хромогена отмыванием срезов в 0,1М ФСБ (рН = 7,6). Закрытие срезов покровным стеклом после реакции осуществляли с помощью глицерина.

### ***7. Непрямой метод иммуногистохимического исследования с целью идентификации иммунокомпетентных клеток в органах свиней***

Для разработки непрямого метода ИГХИ с целью идентификации основных популяций иммунокомпетентных клеток свиней, использовали МАТ мыши к маркерам CD3, CD4 и CD8 - Т-лимфоцитов, CD20 - В-лимфоцитов и CD14 – макрофагов человека. Антитела для эксперимента были выбраны с учетом:

- отсутствия в РФ АТ к вышеперечисленным маркерам лимфоцитов и макрофагов свиней;
- сообщений о возможности межвидовой перекрестной реактивности АТ к данным маркерам лимфоцитов и макрофагов человека и свиней [1, 64, 69];
- высокой экспрессией данных маркеров исследуемыми популяциями клеток у свиней [155, 156].

По результатам ПЦР-РВ, ИФА, гистологического и прямого иммуногистохимического исследования, 10 голов невакцинированных поросят-отъемышей из хозяйства Московской области были признаны интактными, так как в сыворотках крови и патологическом материале не обнаружено генома, АГ ЦВС-2, а также АТ к вирусу, отсутствовала клиническая картина и патологические изменения в органах (бронхиальные и паховые лимфатические узлы, легкие, селезенка, сердце и почки) при вскрытии и гистологическом исследовании.

Для непрямого ИГХИ срезы (толщина 10мкм) бронхиальных лимфатических узлов и легких от интактных (5 голов) и инфицированных ЦВС-2 (5 голов) поросят-отъемышей были изготовлены методом криотомии.

На первом этапе исследования выполняли демаскировку дифференцировочных АГ лимфоцитов и макрофагов в ткани, а также удаление остатков липидов и криогеля. Результаты подбора условий для демаскировки АГ представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Процентное содержание изопропилового спирта в демаскировочном растворе и его влияние на результат реакции

Раствор	Температура, °С	Концентрация, %	Результат ИГХ реакции
Изопропиловый спирт	+4	100	Фоновое окрашивание
Раствор изопропилового спирта в 0,1М ФСБ (рН=7,2)	+4	30	Отрицательный
	+4	50	Отрицательный
	+4	70	Фоновое окрашивание
Раствор изопропилового спирта в NaCl (0,9%)	+4	30	Отрицательный
	+4	50	Отрицательный
	+4	70	Положительный

Согласно данным, представленным в таблице 8, демаскировку АГ в нативных срезах следует выполнять в 70% растворе изопропилового спирта в NaCl (0,9%) в холодильной камере при температуре +4°C в течение 60 минут. При применении 70% раствора изопропилового спирта в 0,1М ФСБ (рН=7,2), а также концентрированного изопропилового спирта выявили неспецифическое фоновое окрашивание структур ткани хромогеном. Обработка срезов в 30 и 50% растворах изопропилового спирта в 0,1М ФСБ (рН=7,2) и NaCl (0,9%) приводила к отрицательному результату.

Спустя час, срезы извлекали из раствора и сушили в вытяжном шкафу 30-40 минут, такая манипуляция способствовала максимальному испарению изопропилового спирта из среза. Затем на высушенные срезы наносили 3% раствор перекиси водорода для удаления эндогенной пероксидазы, время экспозиции раствора на срезах 40 минут.

Обработанные срезы отмывали в трех порциях 0,1М ФСБ, рН которого, подбирали опытным путем, среди значений равных 7,0, 7,2 и 7,4 (таблица 9).

Таблица 9 – Подбор рН 0,1М ФСБ

Значение рН	Результат ИГХ реакции
7,0	Фоновое окрашивание
7,2	Положительный
7,4	Отрицательный

Согласно данным, указанным в таблице 9, ИГХ реакцию следует выполнять в 0,1М ФСБ рН =7,2. В срезах обработанных 0,1М ФСБ рН=7,0, обнаружено неспецифическое окрашивание. Использование 0,1М ФСБ рН=7,4 приводило к отрицательному результату реакции.

После ополаскивания на срезы наносили 5% блокирующий раствор на основе обезжиренного сухого молока в 0,1М ФСБ рН=7,2 и инкубировали в термостате (сохраняя условия влажной камеры для препятствия испарению раствора с поверхности среза) при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 30 минут для предотвращения неспецифического связывания АТ.

В инструкции производителя АТ ООО «Сорбент» указана оптимальная концентрация МАТ мыши к АГ иммунокомпетентных клеток человека: CD3, CD4 и CD8 (маркеры Т-лимфоцитов), CD20 (маркер В-лимфоцитов) и CD14 (маркер макрофагов) в рабочем растворе, составляющая 1:100. Время инкубации раствора первичных АТ в 0,1М ФСБ рН=7,2 на срезе – 120 минут. Инкубация меньше 90 минут, приводила к отрицательному результату, тогда как больше 120 минут никак не влияла на результат реакции. Проведенное исследование показало, что данная концентрация АТ в рабочем растворе подходит для выполнения непрямого ИГХИ на нативных гистологических срезах органов свиней, а окрашивание, выявленное в результате проведенной ИГХ реакции, является специфичным.

Далее определяли оптимальную концентрацию вторичных антивидовых АТ, меченых пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США). Рабочее разведение АТ составляло 1:50, 1:100, 1:200 и 1:400. Антитела разбавляли в 0,1М ФСБ рН=7,2. Подбор оптимальной концентрации вторичных АТ показан в таблице 10.

Таблица 10 – Подбор оптимальной концентрации вторичных АТ в рабочем растворе

ФСБ рН	Разведение АТ	Результат ИГХ реакции
7,2	1:50	Фоновое окрашивание
	1:100	Положительный
	1:200	Отрицательный
	1:400	Отрицательный

Для предотвращения неспецифического связывания в рабочий раствор АТ добавляли 5% обезжиренного сухого молока. По данным, отраженным в таблице 10, следует, что рабочее разведение вторичных АТ в 0,1М ФСБ (рН=7,2) составляло 1:100. Инкубация рабочего раствора вторичных АТ на срезе составляло 90 минут. При использовании рабочего разведения вторичных АТ

равного 1:50 выявлена неспецифическая фоновая окраска, 1:200 и 1:400 - отрицательный результат реакции.

Для окрашивания пероксидазной метки готовили рабочий раствор хромогена, используя готовый набор АЕС Straining Kit (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции производителя. Раствор наносили на срезы и выдерживали 10-20 минут при комнатной температуре, наблюдая за процессом окрашивания. Удаление не связавшегося хромогена выполняли в ФСБ (рН=7,2). После остановки реакции срезы дополнительно окрашивали гематоксилином Майера и закрывали покровным стеклом, используя глицерин.

#### **8. Формулы для статистической оценки результатов иммуногистохимического анализа**

Статистическую оценку результатов, полученных прямым ИГХ методом исследования для выявления АГ ЦВС-2 в тканях и органах, выполняли по формуле средней арифметической простой (1) и среднего линейного отклонения (2):

$$K_{\text{ср}} = \frac{\sum_{i=1}^n K_i}{n} \quad (1)$$

$$\Delta k = \frac{\sum_{i=1}^n |K_{\text{ср}} - K_i|}{n} \quad (2)$$

Где:

$K_{\text{ср}}$  – среднее количество антигенпозитивных клеток в срезе

$\Delta k$  – среднее линейное отклонение

$n$  – общее количество срезов с антигенпозитивными клетками

$K_i$  – количество антигенпозитивных клеток в 1 срезе

Статистическую оценку результатов непрямого ИГХ метода исследования с целью идентификации CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов и CD14<sup>+</sup> макрофагов в срезах органов, рассчитывали по формуле средней арифметической простой (3) и среднего линейного отклонения (4):

$$L_{\text{ср}} = \frac{\sum_{i=1}^n Li}{n} \quad (3)$$

$$\Delta l = \frac{\sum_{i=1}^n |L_{\text{ср}} - Li|}{n} \quad (4)$$

Где:

$L_{\text{ср}}$  – среднее количество антигенпозитивных лимфоцитов в срезе

$n$  – количество исследованных полей

$Li$  – количество антигенпозитивных лимфоцитов на 1 поле зрения среза

$\Delta l$  – среднее линейное отклонение



## 4 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 4.1 Лабораторная диагностика цирковиральной инфекции в исследуемых свиноводческих хозяйствах

Для исследования в период с 2017 по 2022 гг. отбирали патологический материал из свиноводческих хозяйств, в которых регистрировали клиническую картину характерную для ЦВБС в условиях естественного заражения. Клинические признаки варьировали в зависимости от возраста и физиологического состояния свиней:

- У поросят подсосного (20 голов) и отъемного периодов (31 голова из 41) выявили признаки свойственные СПМИ, а именно, отставание в росте, низкий набор веса, гиперемия и эритему кожного покрова, лихорадочное состояние, и диарею. Уровень смертности среди исследуемых технологических групп свиней составил 62,3% (38 голов из 61);

- У 20 из 30 голов откормочного поголовья в возрасте 120-210 дней были обнаружены некротизированные участки на иктеричном кожном покрове, увеличение лимфатических узлов, учащенное дыхание, иногда приводящее к летальному исходу вследствие асфиксии (8 голов – 26,7%);

- У свиноматок была выражена репродуктивная патология, проявляющаяся абортами во второй половине супоросности. Были зафиксированы случаи мертворождения или рождения слабых поросят с низкой выживаемостью (5 из 10 голов).

Полученные данные указывают, что, несмотря на проводимые противоэпизоотические мероприятия, в исследованных свиноводческих хозяйствах наблюдается неблагополучие по цирковиральной инфекции.

Из хозяйств с подозрением на ЦВБС были отобраны пробы сыворотки крови от свиней с признаками инфекции и животных без признаков, но находившихся в контакте с заболевшими для диагностического исследования методами ПЦР-РВ и ИФА.

Методом ПЦР-РВ, была исследована 101 проба сыворотки крови свиней разных возрастных групп с целью выявления ДНК ЦВС-2. Результаты исследования представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты исследования сывороток крови свиней на наличие ДНК ЦВС-2 методом ПЦР-РВ

Возрастная группа	Возраст в днях	Новосибирская область	Московская область	Кемеровская область	Тамбовская область	Липецкая область	Белгородская область	Всего положительных проб в возрастной группе	% положительных проб от общего числа голов в возрастной группе
		Количество голов							
Поросята сосуны	1-40	3	-	1	-	0	-	4	20
Поросята отъемыши	40-120	5	0	2	2	1	0	10	24,4
Откормочное поголовье	120-210	5	-	4	-	-	-	9	30
Свиноматки	280-560	4	-	-	-	-	-	4	40
Итого		17	0	7	2	1	0	27	26,7

В таблице 11 показано, что геном ЦВС-2 в сыворотке крови был выявлен у 27 голов свиней, что составляет 26,7% от общего числа проб. Согласно исследованию ДНК ЦВС-2 было найдено в 4 пробах от поросят-сосунов (Новосибирская и Кемеровская область), в 10 пробах от поросят-отъемышей (Новосибирская, Кемеровская, Тамбовская и Липецкая область) и в 9 пробах от откормочного поголовья (Новосибирская и Кемеровская область). При этом поросят-сосунов из хозяйства Липецкой области методом ПЦР-РВ присутствие ДНК ЦВС-2 не обнаружено, также как и у поросят-отъемышей из хозяйств Московской и Белгородской области. У свиноматок положительный результат выявлен в 4 пробах из 10, что составило 40%. При этом наибольшее количество положительно реагирующих проб в ПЦР-РВ на наличие ДНК ЦВС-2 выявлено в свиноводческих хозяйствах Новосибирской и Кемеровской областей.

Методом ИФА выполняли исследование 101 пробы сыворотки крови свиней разных возрастных групп для определения АТ к ЦВС-2. Результаты исследования приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты исследования сывороток крови свиней на наличие АТ к ЦВС-2 методом ИФА

Возрастная группа	Возраст в днях	Новосибирская область	Московская область	Кемеровская область	Тамбовская область	Липецкая область	Белгородская область	Всего положительных проб в возрастной группе	% положительных проб от общего числа голов в возрастной группе
		Количество голов							
Поросята-сосуны	1-40	4	-	2	-	3	-	9	45
Поросята-отъемыши	40-120	8	0	3	5	3	4	23	56,1
Откормочное поголовье	120-210	9	-	6	-	-	-	15	50
Свиноматки	280-560	10	-	-	-	-	-	10	100
Итого		36	0	12	4	5	4	57	56,4

Согласно данным представленным в таблице 12, АТ к рекомбинантному белку ORF 2 ЦВС-2 в сыворотке крови были обнаружены у 57 голов свиней, что соответствует 56,4% от общего количества исследованных проб. У поросят-сосунов АТ к ЦВС-2 обнаружены в 45% проб. Среди поросят-отъемышей положительный результат на наличие АТ к ЦВС-2 выявлен у 23 голов из 41, что составляет 56,1%. Пробы от 10 голов поросят-отъемышей из хозяйства Московской области, не привитых от ЦВБС, показали отрицательный результат, как и в исследовании методом ПЦР-РВ. У откормочного поголовья АТ к ЦВС-2 найдены в 50% проб. Среди свиноматок АТ к ЦВС-2 выявлены в 100% проб.

Соотношение количества положительных результатов, полученных методами ПЦР-РВ и ИФА к общему количеству проб, представлено на рисунке 4.



Рисунок 4 – Результаты исследования сывороток крови свиней на наличие ДНК и АТ к ЦВС-2 методами ПЦР-РВ и ИФА

Как показано на рисунке 4, исследование методом непрямого ИФА выявило 57 положительных проб, а методом ПЦР-РВ - 27 положительных проб из общего числа исследованных образцов. Необходимо учитывать, что выявленные методом ИФА АТ могут свидетельствовать, как о реакции иммунной системы на присутствие вируса, так и о наличии поствакцинальных АТ. Кроме этого, полученные данные указывают, что ЦВБС, чаще наблюдается у поросят в возрасте 40-120 дней. Клинические признаки у таких поросят соответствовали СПМИ, подтверждая, что данный синдром является наиболее распространенным среди других синдромов, характерных для ЦВБС.

#### 4.2 Патологоанатомические изменения в органах при спонтанной цирковиральной инфекции

При патологоанатомическом исследовании материала от свиней, нами было выявлено, что патологические изменения в сердце присутствовали у поросят-

отъемышей и откормочного поголовья. У поросят-отъемышей, аналогично откормочным свиньям, была выявлена кардиомегалия. Поверхность перикарда по всей площади была неравномерно покрыта шероховатой неотделяемой пленкой розово-красного цвета, на разрезе стенки желудочков сердца незначительно гипертрофированы (рисунок 5).



Рисунок 5 – Сердце поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. Поверхность перикарда

Изменения в селезенке были найдены среди всех технологических групп свиней. Как показано на рисунке 6, поверхность селезенки была насыщенно буровато-красного цвета, а по краям присутствовали более светлые участки округлой формы, которые проникали в паренхиму органа.



Рисунок 6 – Селезенка поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. Светлые участки на поверхности органа (черные кружочки)

Патологические изменения в легких были обнаружены среди поросят-сосунов, поросят-отъемышей и откормочного поголовья, и характеризовались наличием светлых участков здоровой ткани, окруженных гиперемизированными тканями. На разрезе ткани органа были полнокровным с крупными очагами

белого цвета. Цвет ткани местами переходил от красного до насыщенно темно-бордового, что объясняется разной интенсивностью геморрагического пропитывания. При нажатии на легкое из бронхиол выделялся тягучий бело-желтый экссудат (рисунок 7).

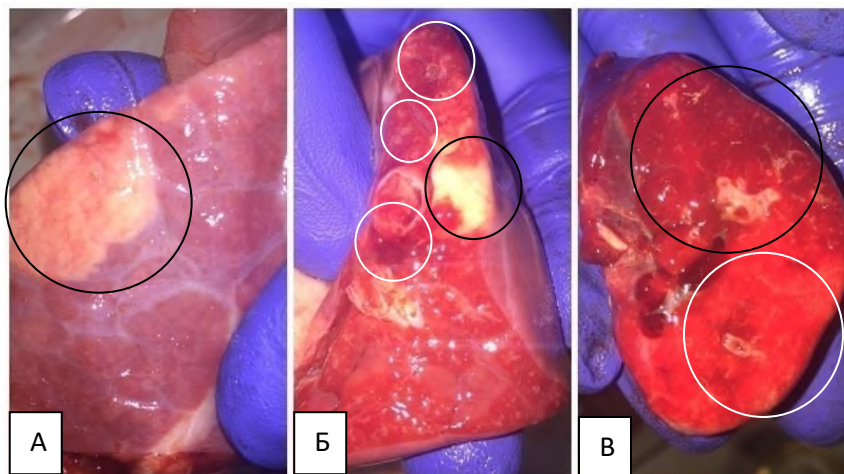


Рисунок 7 – Легкое поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. А. Поверхность легкого с участком здоровой ткани (черный кружочек). Б. Кровоизлияния на разрезе легкого (белые кружочки) и очаг белого цвета в паренхиме и интерстиции (черный кружочек). В. Участки обширного кровоизлияния (черный кружочек), граничащие с нормальной легочной тканью (белый кружочек)

Патологические изменения в паховых и бронхиальных лимфатических узлах были выявлены среди свиней каждой технологической группы. Паховые и бронхиальные лимфатические узлы инфицированных свиней были увеличенными, плотной консистенции. Поверхность лимфатических узлов была покрыта плотной оболочкой, под которой присутствовали обширные кровоизлияния сине-красного цвета. На разрезе были найдены разлитые участки кровоизлияний. При надавливании с поверхности среза выделялась буро-красная вязкая жидкость (рисунок 8).



Рисунок 8 – Паховый лимфатический узел поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. Поверхность органа

Макроскопические изменения в почках были обнаружены у поросят-сосунов, поросят-отъемышей и откормочного поголовья. Почки поросят-сосунов и поросят-отъемышей были анатомически правильной формы, размер органа соответствовал норме, консистенция упругая. По большой кривизне на поверхности органа были выявлены обширные кровоизлияния, проникающие в корковый слой (рисунок 9).

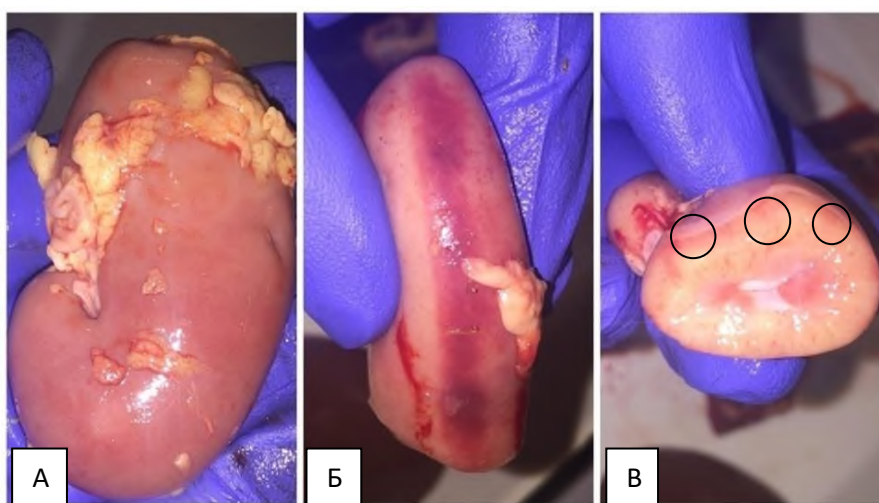


Рисунок 9 – Почка поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. А. Поверхность. Б. Кровоизлияние по большой кривизне. В. Кровоизлияния под капсулой (отмечено черными кружочками)

При исследовании почек от откормочных свиней выявили значительное увеличение в размере и дряблую консистенцию органа, поверхность которого была буро-коричневого цвета. На разрезе найдены петехиальные кровоизлияния в корковом и мозговом веществе, сконцентрированные в почечных пирамидах и их сосочках (рисунок 10).



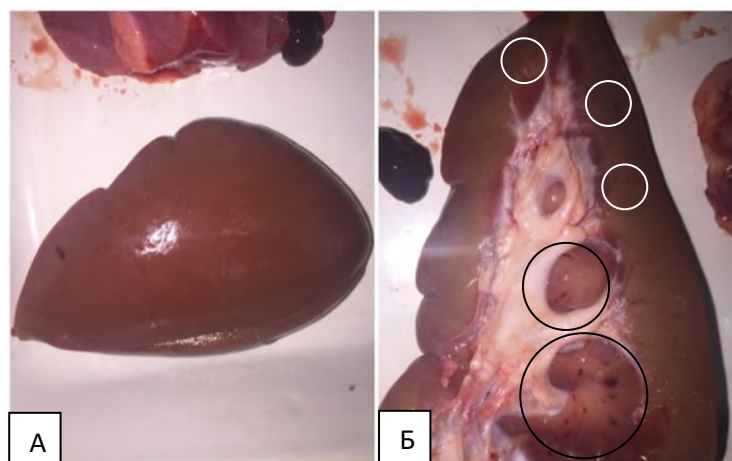


Рисунок 10 – Почка откормочной свиньи, инфицированной ЦВС-2. А. Поверхность. Б. Кровоизлияния в почечных пирамидах (черные кружочки); Петехии в корковом веществе (белые кружочки)

Количество голов разных технологических групп свиней, у которых были выявлены патологические изменения в органах, представлено в таблице 13.

Таблица 13 – Количество голов с выявленными патологическими изменениями органов в соответствии с возрастной группой

Возрастная группа	Возраст в днях	Сердце	Легкие	Почки	Селезенка	Паховые лимфатические узлы	Бронхиальные лимфатические узлы	Всего голов в группе
Поросята-сосуны	1-40	0	4	4	2	4	4	20
Поросята-отъемыши	40-120	13	26	19	15	24	26	41
Откормочное поголовье	120-210	6	8	16	10	17	8	30
Свиноматки	280-560	0	0	0	2	4	2	10

Согласно полученным результатам, представленным в таблице 13:

- Макроскопические изменения в сердце обнаружены у 13 голов поросят-отъемышей и 6 голов откормочного поголовья, частота встречаемости патологии в данных возрастных группах составила 31,7% и 20% соответственно;

- Патологические изменения в легких были выявлены у 4 голов поросят-сосунов, 26 голов поросят-отъемышей и 8 голов откормочных свиней, частота



встречаемости патологии в данных возрастных группах составила 20%, 63,4% и 26,6% соответственно;

- Макроскопические изменения в почках регистрировали у 4 голов поросят-сосунов, 19 голов поросят-отъемышей и 16 голов откормочного поголовья, частота встречаемости патологии в данных возрастных группах составила 20%, 46,3% и 53,3% соответственно;

- Патологические изменения в селезенке обнаружены у 2 голов поросят-сосунов, 15 голов поросят-отъемышей, 10 голов откормочных свиней и 2 голов свиноматок, частота встречаемости патологии в данных возрастных группах составила 10%, 36,6%, 33,3% и 20% соответственно;

- Макроскопические изменения в паховых лимфатических узлах были выявлены у 4 голов поросят-сосунов, 24 голов поросят-отъемышей, 17 голов откормочных свиней и 4 голов свиноматок, частота встречаемости патологии в данных возрастных группах составила 20%, 58,5%, 56,6% и 40% соответственно;

- Патологические изменения в бронхиальных лимфатических узлах регистрировали у 4 голов поросят-сосунов, 26 голов поросят-отъемышей, 8 голов откормочных свиней и 2 голов свиноматок, частота встречаемости патологии в данных возрастных группах составила 20%, 63,4%, 26,7% и 20% соответственно.

Таким образом, патологоанатомические изменения органов наиболее часто наблюдали в группе поросят-отъемышей и откормочного поголовья. Причем у поросят-отъемышей патологические изменения в основном локализовались в паховых, бронхиальных лимфатических узлах и легких, что характерно для СПМИ, тогда как у откормочных свиней патологические изменения чаще регистрировали в почках и паховых лимфатических узлах, что свойственно СДНП. Патологические изменения в паховых, бронхиальных лимфатических узлах и селезенке были выявлены во всех возрастных группах животных.

### 4.3 Гистологические изменения в органах при естественном инфицировании цирковирусом свиней второго типа

Признаки миокардита и фибринозного перикардита были выявлены в гистологических срезах патологически измененного сердца (таблица 13) от поросят-отъемышей и откормочных свиней (рисунок 11). В структуре и на поверхности эпикарда обнаружили оксифильно окрашенные однородные образования неправильной формы. При этом эпикард был утолщенный, с признаками лимфоцитарной инфильтрации (рисунок 11А). В стенке миокарда и в пространстве между его волокнами присутствовала мелкоочаговая лимфоцитарная инфильтрация и фокусные скопления эритроцитов (рисунок 11Б).

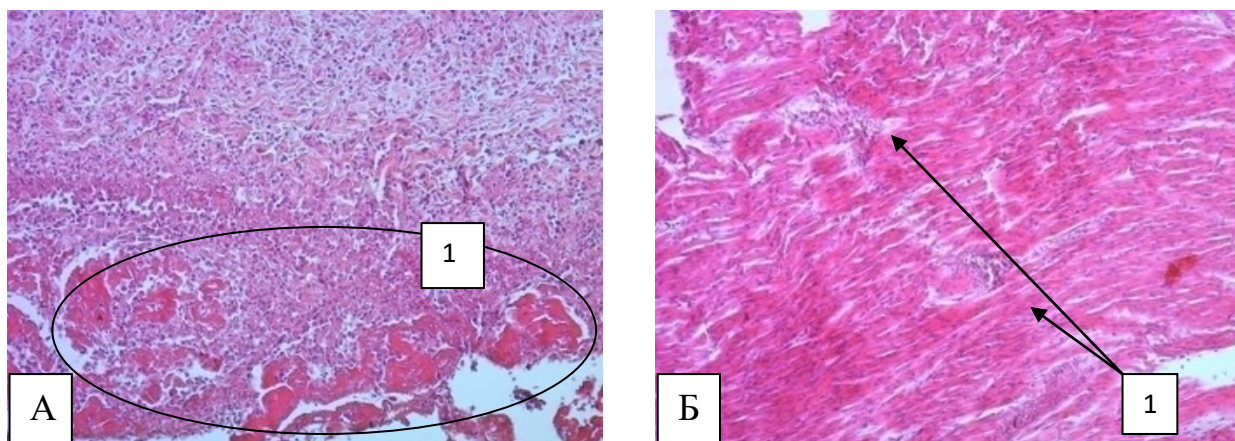


Рисунок 11 – Сердце поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. А. Эпикард. 1- оксифильно окрашенные отложения; Б. Миокард. 1 – скопления эритроцитов и лимфоцитов в межтканевом пространстве. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

Для выяснения природы оксифильно окрашенных масс в структуре эпикарда, выполнили дополнительное окрашивание ткани на фибрин (рисунок 12). В результате чего установили, что на поверхности висцерального листка перикарда присутствуют скопления волокон фибрина. Причем возраст фибрина, окрашенного в синий цвет, составляет более 24 часов с момента его образования, что соответствует старому фибрину и указывает на давнее повреждение коронарных сосудов в данной области. Тогда как волокна фибрина, окрашенные

красным цветом, являются зрелым фибрином, и с момента его образования прошло от 6 до 18 часов.

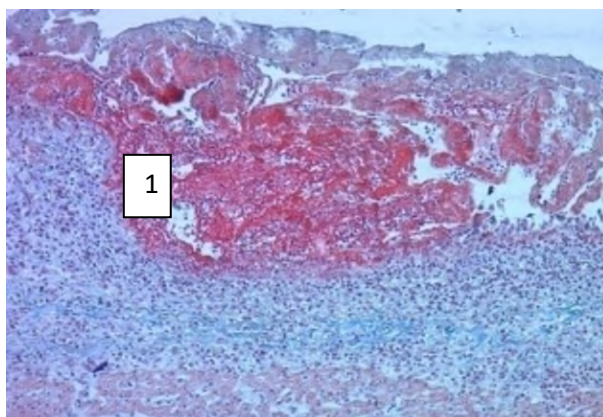


Рисунок 12 – Эпикард поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. 1 - скопления зрелого фибрина, 6-18 часов с момента образования. Окраска на выявление фибрина. Ув. 100

Признаки гломерулонефрита и нефропатии были обнаружены в гистологических срезах патологически измененных почек (таблица 13) от поросят-сосунов, поросят-отъемышей и откормочного поголовья (рисунок 13). В корковом веществе почек от инфицированных свиней из группы откорма, были найдены участки с периваскулярно расположенной лимфоцитарно-клеточной инфильтрацией, стенки сосудов пропитаны плазмой и увеличены вследствие отека (рисунок 13). Плазморрагия распространилась в паренхиму органа, в оксифильно окрашенной жидкости присутствуют участки диапедеза. Избытки плазмы оказывали давление на окружающую ткань, деформируя близлежащие извитые канальцы. Более того, эпителий некоторых канальцев находился в состоянии зернистой дистрофии (рисунок 13А). Кроме описанной выше патологии в корковом слое выявили большое количество извитых канальцев с тотальным некрозом эпителия, который происходил под токсическим воздействием продуктов распада клеток. Также наблюдали частично сохранившуюся базальную мембрану таких канальцев и остатки ядер эпителиальных клеток в виде пыли или скопления оксифильно окрашенного вещества в просветах (рисунок 13Б).



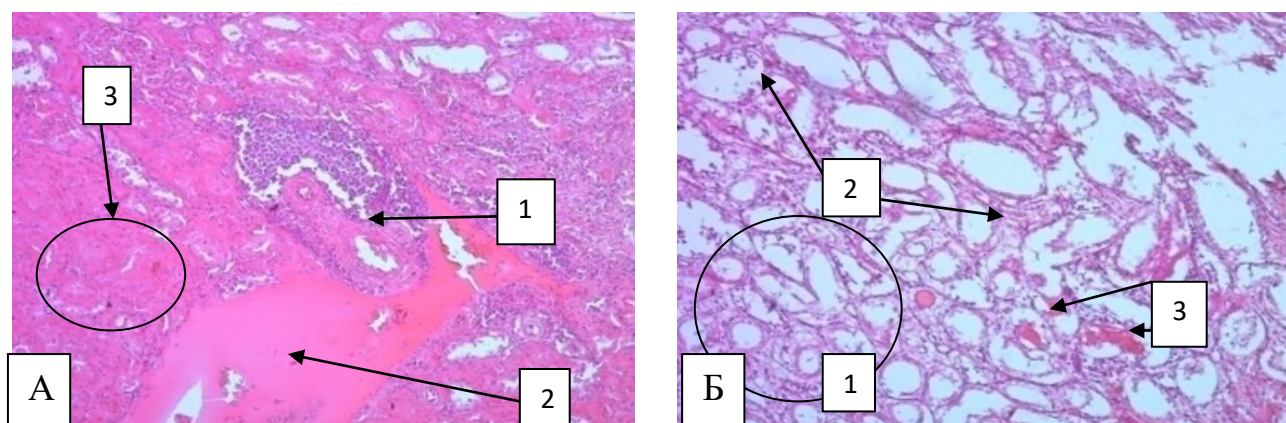


Рисунок 13 – Почка откормочной свиньи, инфицированной ЦВС-2. А. 1 – лимфоцитарно-клеточная инфильтрация, 2 – плазморрагия, 3 – эпителий канальцев в состоянии зернистой дистрофии; Б. 1 – некроз эпителия канальцев, 2 – остатки ядер эпителиальных клеток, 3 – оксифильное вещество в просвете канальцев. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

При гистологическом исследовании почек от поросят-сосунов и поросят-отъемышей, инфицированных ЦВС-2, было установлено, что капсула органа разволокненная, а предлежащая к ней паренхима в состоянии отека с признаками лимфоцитарной инфильтрации. В корковом слое найдены частично разрушенные почечные канальцы (рисунок 14А). При большем увеличении выявили, что базальная мембрана почечных канальцев была с участками перфорации. В эпителии канальцев присутствовали клетки с разрушенным апикальным полюсом и клетки в состоянии некроза, а в просвете канальцев были локализованы скопления белковой части цитоплазмы (рисунок 14Б).

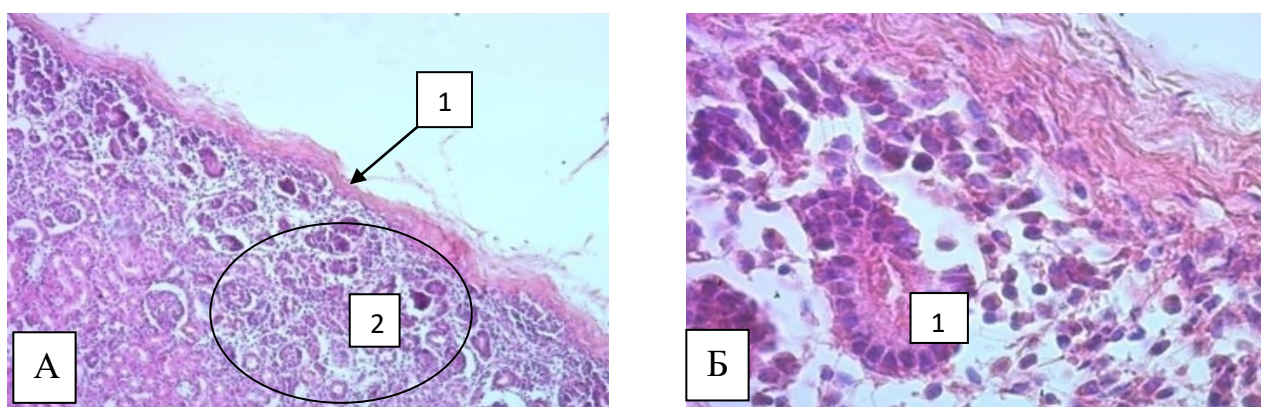


Рисунок 14 – Почка поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. А. 1 – капсула органа, 2 – разрушенные почечные канальцы (ув. 100); Б. 1 - частично сохранившийся почечный каналец. Гематоксилин и эозин. Ув. 630

Кроме вышеперечисленного в корковом веществе выявили отек периваскулярной соединительной ткани, при этом в пространстве сосудов наблюдали частично отслоившийся эндотелий и единичные лимфоидные клетки (рисунок 15). Структура почечных телец плохо дифференцировалась, просвет капсулы Шумлянско-Боумана был расширен за счет избыточного выхода жидкости, которая сдавливала сосудистые клубочки (рисунок 15А). Вместе с тем выявили нарушение гистоархетиктоники извитых канальцев, при котором клетки эпителия проксимальных и дистальных канальцев отходили от базальной мембраны и находились в состоянии выраженного некроза (рисунок 15Б).

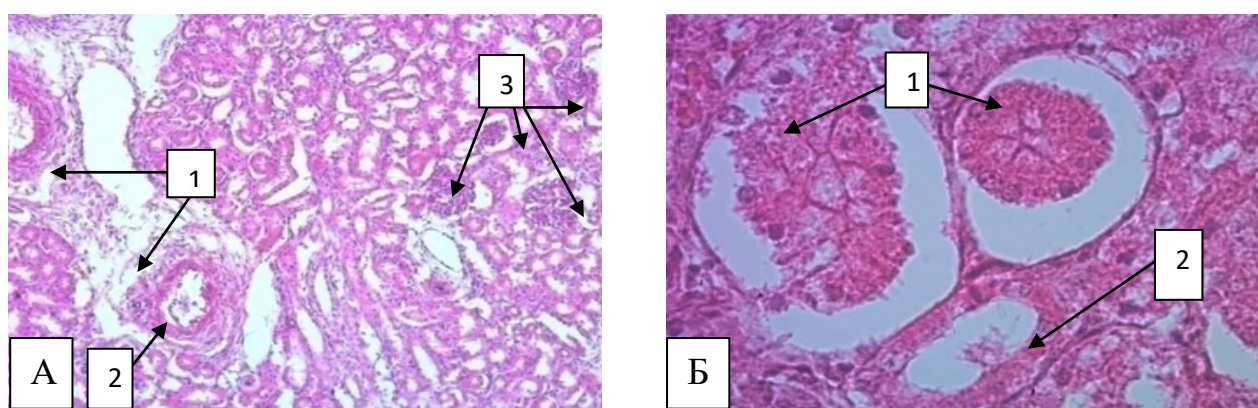


Рисунок 15 – Почки поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. А. 1 – отек периваскулярной соединительной ткани, 2 – отслоение эндотелия в просвет артериального сосуда, 3 – почечные тельца (ув. 100); Б. 1 – некротизированный эпителий проксимальных канальцев отходит от базальной мембраны, 2 – эпителий дистальных канальцев с частичным некрозом клеток. Гематоксилин и эозин. Ув. 630

Гистологическим исследованием срезов патологически измененных паховых и бронхиальных лимфатических узлов от свиней разных технологических групп (таблица 13), были установлены признаки геморрагического и некротического лимфаденита (рисунок 16 и 17). Гистологическая картина паховых лимфатических узлов характеризовалась наличием мультифокальных кровоизлияний в корковом веществе и паракортикальном слое органа. Кроме того, обнаружены нарушения структуры лимфоидных фолликулов, характеризующиеся разжижением клеточного состава вследствие отека ткани, сдавливанием клеток и массовой гибелью лимфоцитов (рисунок 16А). При большем увеличении (x630) в паракортикальной зоне



пахового лимфатического узла выявили лизис клеток лимфоцитарного ряда (рисунок 16Б).

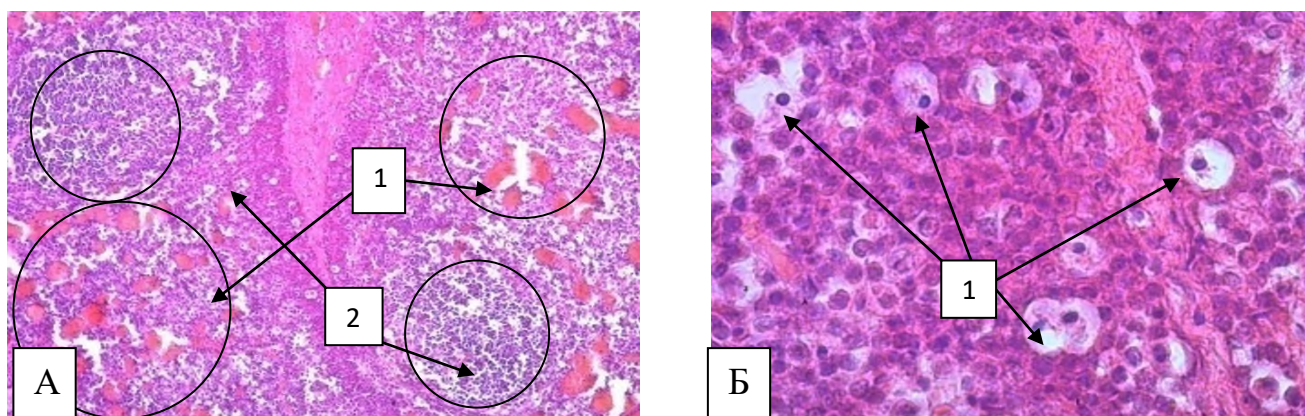


Рисунок 16 – Паховый лимфатический узел откормочной свиньи, инфицированной ЦВС-2. А. 1 – кровоизлияния в паренхиме, 2 – первичные лимфоидные фолликулы (ув. 100); Б. 1- лизис клеток паракортикального слоя. Гематоксилин и эозин. Ув. 630

Гистологическое исследование бронхиальных лимфатических показало наличие некротических участков в корковом веществе органа. При этом выявили как слияние нескольких лимфоидных фолликулов, так и тотально разрушенные фолликулы. Также в паракортикальной зоне были обнаружены мультифокальные кровоизлияния и обширные участки некроза (рисунок 17А). При большем увеличении (x630) установили, что участки некроза местами были инфильтрированы лимфоцитами и эозинофилами (рисунок 17Б).

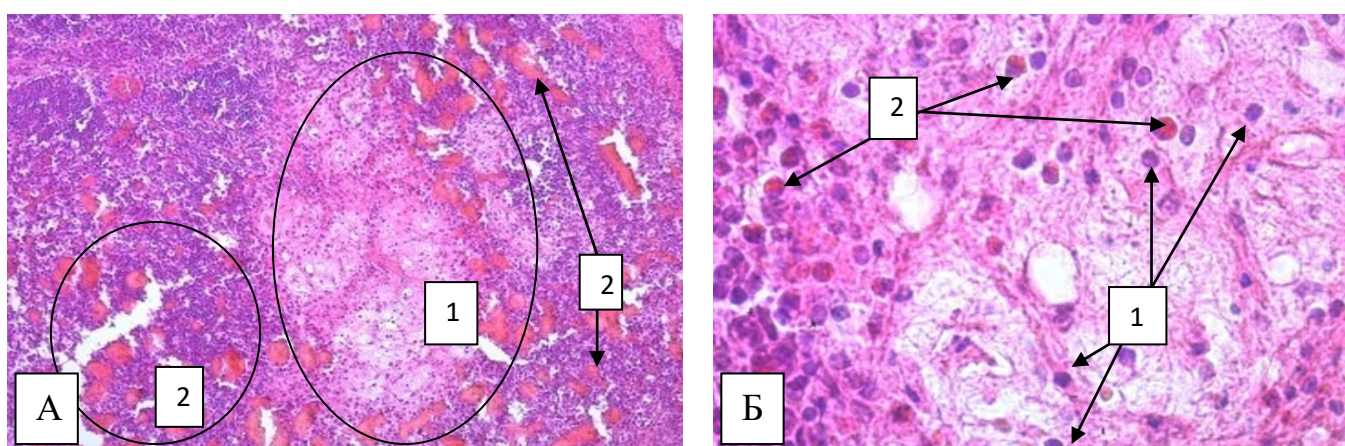


Рисунок 17 – Бронхиальный лимфатический узел поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. А.1 – некроз паракортикальной зоны, 2 – мультифокальные кровоизлияния (ув. 100); Б. Участок некроза, 1 – лимфоциты, 2 – эозинофилы. Гематоксилин и эозин. Ув. 630

Признаки некротизирующего спленита были выявлены в гистологических срезах патологически измененной селезенки (таблица 13) от поросят-сосунов, поросят-отъемышей, откормочного поголовья и свиноматок (рисунок 18). Гистологическим исследованием селезенки был обнаружен отек красной и белой пульпы, характеризующийся увеличением межклеточного пространства и сдавливанием клеток. В красной пульпе найдены мультифокальные участки некроза ткани. В белой пульпе, в лимфоидных фолликулах наблюдали отсутствие герминативных центров и уменьшение количества лимфоцитов в периартериальной тимусзависимой зоне (рисунок 18А). На рисунке 18Б показан отек периваскулярной и периневральной соединительной ткани, а также разрастание стромы селезенки.

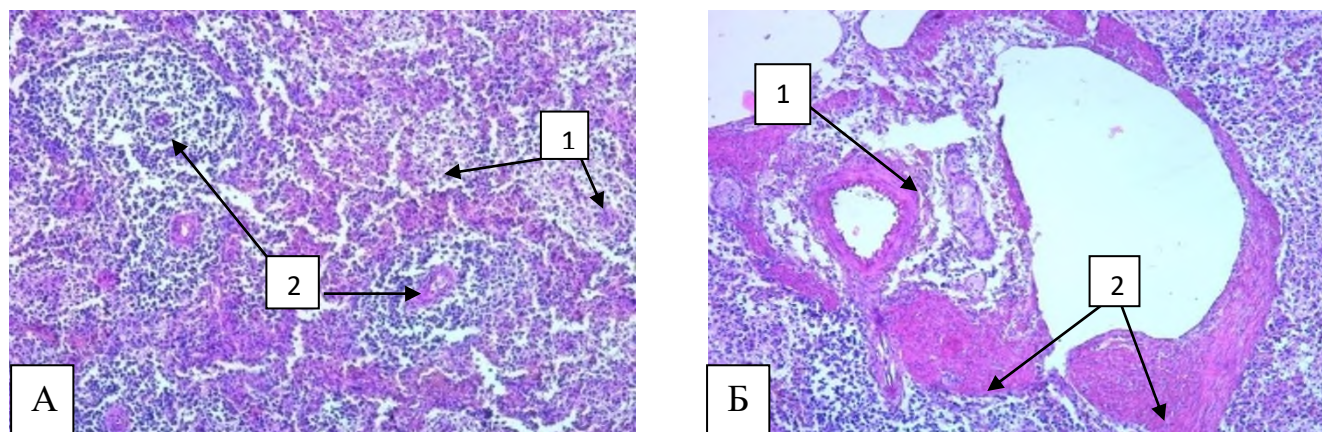


Рисунок 18 – Селезенка поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. А. 1 – некротизированные участки в красной пульпе, 2 – периартериальная зона лимфоидных фолликулов; Б. 1 – периваскулярный и периневральный отек, 2 – разрастание соединительной ткани в строме. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

Признаки характерные для геморрагической пневмонии, а также катарального бронхита с бронхообструкцией и ателектазом, были обнаружены в гистологических срезах патологически измененных легких (таблица 13) от поросят-сосунов, поросят-отъемышей и откормочных свиней (рисунок 19 и 20). При исследовании гистологической картины легких были выявлены множественные крупные участки ателектаза, в просвете альвеол и утолщенных межальвеолярных перегородках присутствовал геморрагический экссудат. Венозные сосуды в ткани находились в состоянии гиперемии. Также выявили незначительный отек перибронхиальной соединительной ткани. Слизистая



оболочка и подслизистая основа бронха в состоянии отека, а в просвете были найдены разрушенные клетки эпителия и лейкоциты, указывающие на активный воспалительный процесс (рисунок 19А). В ткани, предлежащей к вышеописанному участку, обнаружена альвеолярная эмфизема (рисунок 19Б).

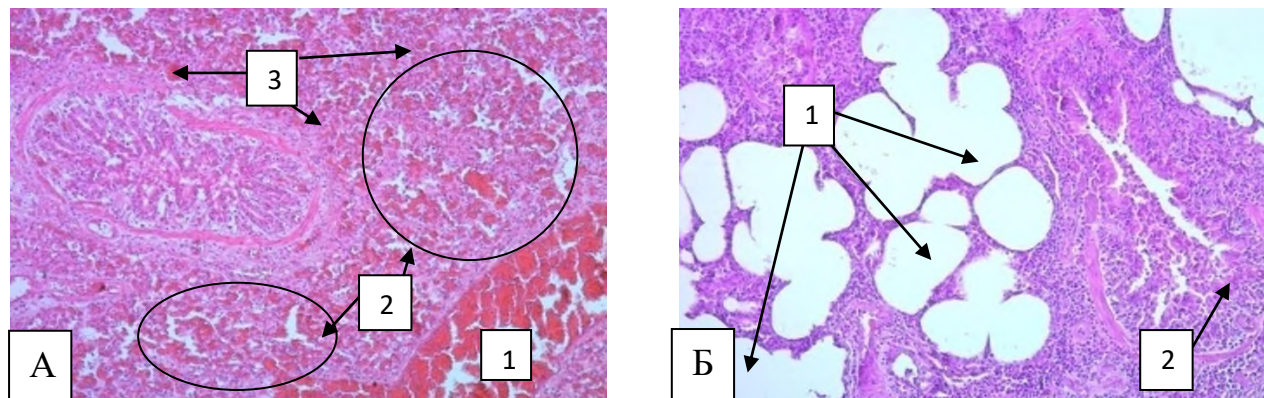


Рисунок 19 – Легкое поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. А. 1 – гиперемизированный венозный сосуд, 2 – участки ателектаза, 3 – геморрагический экссудат в просвете альвеол; Б. 1 – участки эмфиземы, 2 – остатки эпителия и лейкоциты в просвете бронха. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

Дополнительно гистологическая картина в легких характеризовалась наличием гиперплазии перибронхиальной лимфоидной ткани, которая привела к сужению просвета бронхов и ателектазу близлежащих альвеол (рисунок 20А). При большем увеличении (х630) в просвете бронха выявили десквамированный эпителий слизистой оболочки, лимфоциты и макрофаги (рисунок 20Б).

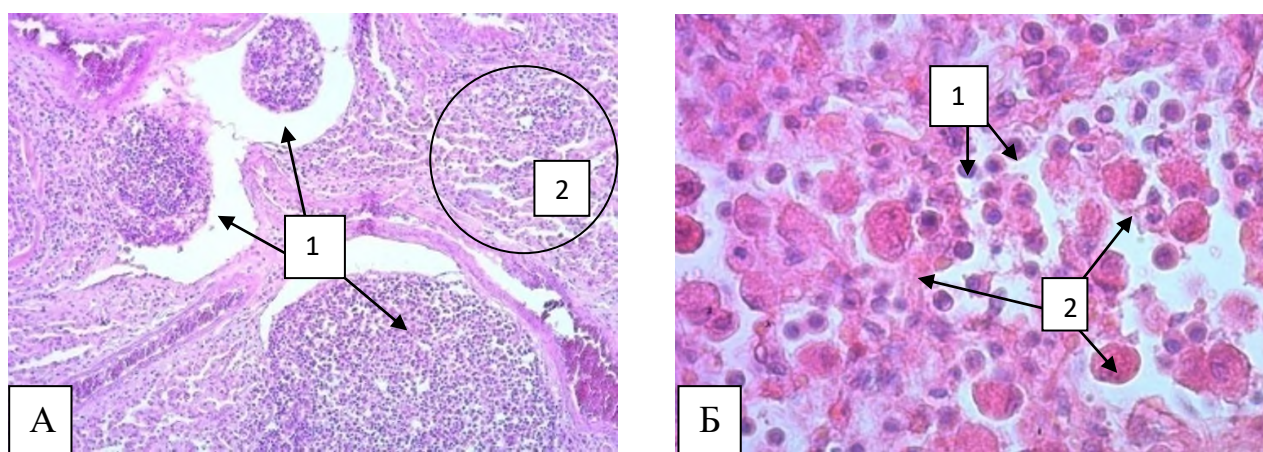


Рисунок 20 – Легкое поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. А. 1 – гиперплазия перибронхиальной лимфоидной ткани, 2 – ателектаз просвета альвеол (ув. 100); Б. 1 – лимфоциты, 2 – макрофаги. Гематоксилин и эозин. Ув. 630



Таким образом, анализ результатов гистологического исследования показал, что наиболее часто встречаемой патологией является геморрагический и некротический лимфаденит, который выявили в патологически измененных паховых и бронхиальных лимфатических узлах от свиней разных технологических групп. Реже регистрировали изменения характерные для геморрагической пневмонии, катарального бронхита с бронхообструкцией и ателектазом (в основном у поросят-отъемышей), гломерулонефрита и нефропатии (у откормочных свиней и поросят-отъемышей), а также некротизирующего спленита (среди всех исследованных технологических групп). Фибринозный перикардит и миокардит является наиболее редкой патологией (обнаружены среди поросят-отъемышей и откормочного поголовья). Полученные данные соотносятся с результатами макроскопического исследования органов (таблица 13) и дополняют их.

#### **4.4 Выявление антигена цирковируса второго типа прямым методом иммуногистохимического исследования**

В результате выполненной работы (п. 3.1.2) нами был разработан прямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши 6h12 для выявления АГ ЦВС-2 в нативных гистологических срезах согласно следующему протоколу:

Стекла с нативными срезами инкубировали в 30% растворе изопропилового спирта в NaCl (0,9%) - 60 минут при температуре +4<sup>0</sup>С. После инкубации срезы трижды отмывали по 3-5 минут в 0,1М ФСБ рН=7,6 при комнатной температуре. Далее на срезы наносили 3% раствор перекиси водорода и инкубировали в термостате (сохраняя условия влажной камеры) - 40 минут при температуре +37<sup>0</sup>С. После инкубации срезы отмывали в трех порциях 0,1М ФСБ рН=7,6 по 3-5 минут при комнатной температуре. Готовили 5% блокирующий раствор на основе обезжиренного сухого молока в 0,1М ФСБ рН=7,6. Срезы с блокирующим раствором инкубировали в термостате (сохраняя условия влажной камеры) при температуре 37<sup>0</sup>С - 40 минут. Затем срезы отмывали в 0,1М ФСБ рН=7,6, - 3 раза

по 3-5 минут при комнатной температуре. Готовили рабочий раствор МАТ 6h12 в 0,1М ФСБ рН=7,6. Оптимальное разведение АТ - 1:400. На срезы наносили рабочий раствор АТ и инкубировали в термостате (сохраняя условия влажной камеры) при 37<sup>0</sup>С – 90 минут. После инкубации срезы трижды промывали в 0,1М ФСБ рН=7,6 по 3-5 минут при комнатной температуре. Готовили маточный раствор хромогена, растворяя 0,02г 3-амино-9-этилкарбазола в 3мл N,N-диметилформамида. Работу выполняли в вытяжном шкафу, так как реактивы обладают канцерогенными свойствами. Рабочий раствор хромогена получали из 300мкл маточного раствора добавлением в него 5мл 0,02М Na-фосфатного буфера (рН=5,0) и 1мкл 3% раствора перекиси водорода. Рабочий раствор наносили на срезы и инкубировали в термостате (сохраняя условия влажной камеры) 30 минут при температуре 37<sup>0</sup>С. Реакцию останавливали отмыванием срезов в дистиллированной воде (1 раз) и 0,1М ФСБ рН=7,6 - 2 раза по 3-5 минут при комнатной температуре. На промытые срезы без окрашивания гематоксилином Майера наносили пару капель глицерина и закрывали покровным стеклом. На срезы с дополнительным окрашиванием после остановки реакции и промывания наносили гематоксилин Майера на 5-10 минут (дополнительное окрашивание помогает визуализировать ядра клеток). После окрашивания срезы ополаскивали в дистиллированной воде, наносили глицерин, закрывали покровным стеклом и просматривали под микроскопом при увеличении x400 - x630.

При оценке результатов исследования антигенпозитивные клетки в нативных гистологических срезах органов свиней распознавали по окрашиванию мембраны или цитоплазмы хромогеном в красно-коричневый цвет на светооптическом уровне. При интерпретации результатов, необходимо учитывать, что положительным результатом считается обнаружение двух и более антигенпозитивных клеток в одном гистологическом срезе органа [131].

На рисунке 21А представлен положительный результат разработанной прямой ИГХ реакции для выявления АГ ЦВС-2 в срезе легкого с дополнительным окрашиванием ядер клеток гематоксилином Майера. На поверхности и в цитоплазме антигенпозитивных клеток детектировали наличие специфического

красно-коричневого окрашивания хромогеном. Из 101 исследованного гистологического препарата легкого свиней разных технологических групп, положительный результат прямой ИГХ реакции был выявлен в срезах органа от поросят-сосунов (11 голов), поросят-отъемышей (29 голов) и откормочного поголовья (23 головы). Контролем служили препараты легких от неинфицированных и невакцинированных против ЦВБС поросят-отъемышей, в которых отсутствовало специфическое окрашивание, что является отрицательным результатом ИГХ реакции (рисунок 21Б).

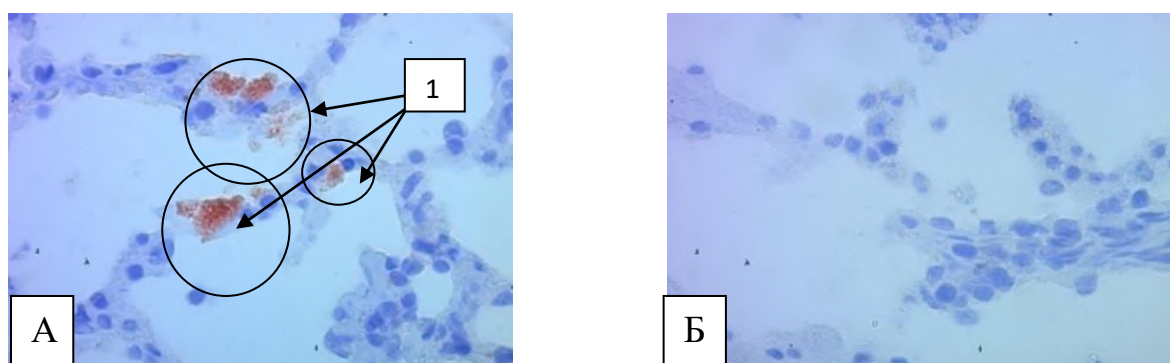


Рисунок 21 – Результат прямой ИГХ реакции. А. Легкое поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВБС-2. 1- Положительная реакция; Б. Легкое интактного поросенка-отъемыша. Отрицательный результат. Гематоксилин Майера. Ув. 630

Из 101 исследованного гистологического препарата пахового лимфатического узла свиней разных технологических групп, положительный результат прямой ИГХ реакции был обнаружен в срезах органа от поросят-сосунов (2 головы), поросят-отъемышей (20 голов), откормочного поголовья (17 голов) и свиноматок (2 головы). На рисунке 22А показан положительный результат прямой ИГХ реакции в срезе пахового лимфатического узла. Отрицательный результат ИГХ реакции в срезе пахового лимфатического узла от интактного поросенка-отъемыша, представлен на рисунке 22Б.

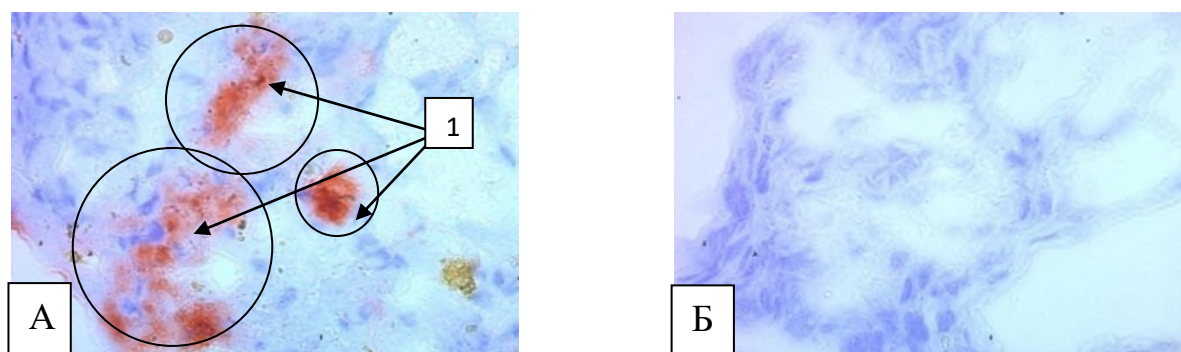


Рисунок 22 – Результат прямой ИГХ реакции. А. Паховый лимфатический узел откормочной свиньи, инфицированной ЦВС-2. 1 – Положительная реакция; Б. Паховый лимфатический узел интактного поросенка-отъемыша. Отрицательный результат. Гематоксилин Майера. Ув. 630

Положительный результат прямой ИГХ реакции для выявления АГ ЦВС-2 в срезе пахового лимфатического узла без дополнительной окраски ядер клеток гематоксилином Майера продемонстрирован на рисунке 23А. Отрицательный результат прямой ИГХ реакции в срезе пахового лимфатического узла интактного поросенка-отъемыша представлен на рисунке 23Б.

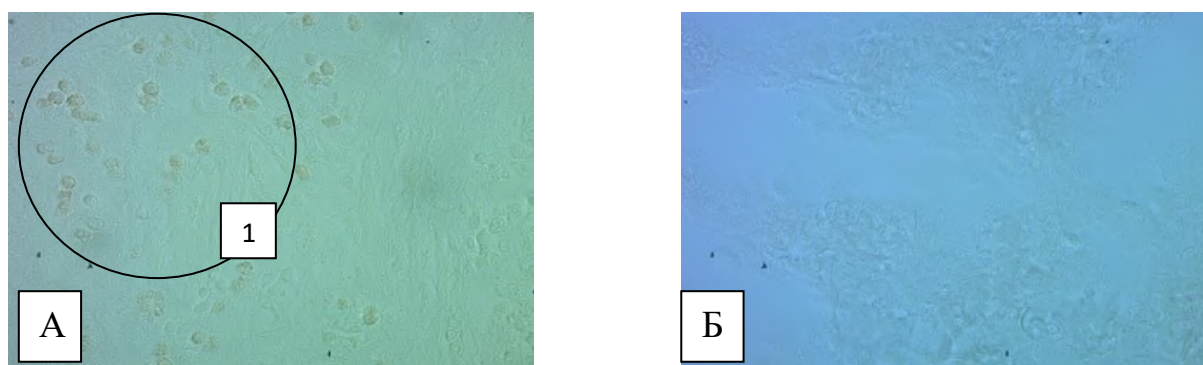


Рисунок 23 – Результат прямой ИГХ реакции. А. Паховый лимфатический узел откормочной свиньи, инфицированной ЦВС-2. 1 - Положительная реакция; Б. Паховый лимфатический узел интактного поросенка-отъемыша. Отрицательный результат. Ув. 400

Из 101 исследованного препарата бронхиального лимфатического узла свиней разных технологических групп, положительный результат прямой ИГХ реакции был выявлен в срезах органа от поросят-сосунов (4 головы), поросят-отъемышей (24 головы), откормочного поголовья (13 голов) и свиноматок (2 головы). На рисунке 24А показан положительный результат прямой ИГХ реакции в срезе бронхиального лимфатического узла поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. Отрицательный результат прямой ИГХ реакции в срезе

бронхиального лимфатического узла интактного поросенка-отъемыша представлен на рисунке 24Б.

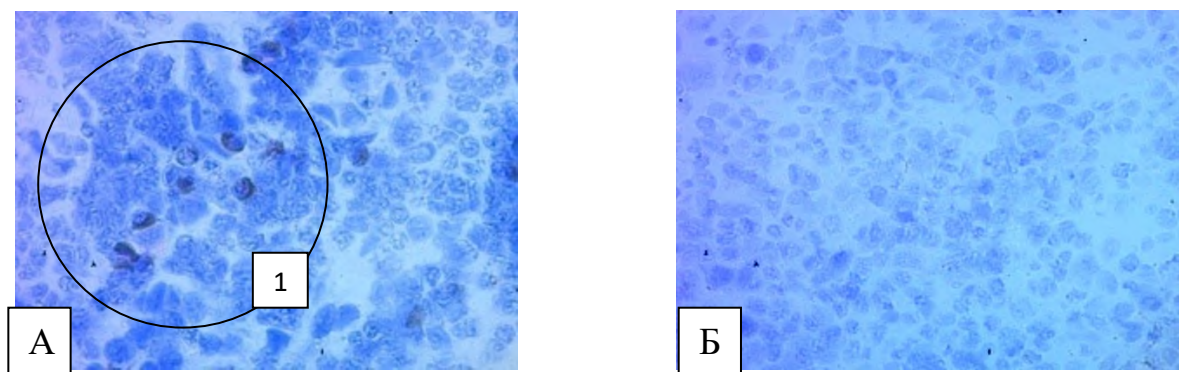


Рисунок 24 – Результат прямой ИГХ реакции. А. Бронхиальный лимфатический узел поросенка-отъемыша, инфицированного ЦВС-2. 1- Положительная реакция; Б. Бронхиальный лимфатический узел интактного поросенка-отъемыша. Отрицательный результат. Гематоксилин Майера. Ув. 630

В гистологических препаратах сердца, селезенки и почек от инфицированных свиней АГ ЦВС-2 не обнаружен, несмотря на присутствие патологических изменений, что, по нашим предположениям, указывает на развитие общей полиорганной недостаточности при цирковиральной инфекции, а не прямое действие ЦВС-2 на клетки данных органов.

Для статистической оценки результатов, полученных прямым ИГХ методом с целью выявления АГ ЦВС-2 в тканях, был проведен подсчет среднего количества антигенпозитивных клеток в цитоплазме и на мембране которых обнаружено специфическое окрашивание хромогеном. Формулы расчета представлены в пункте 3.1.2.

При анализе результатов, полученных разработанным прямым методом ИГХИ, установили, что АГ ЦВС-2 присутствовал в 63 срезах легкого и 84 срезах паховых (41) и бронхиальных (43) лимфатических узлов из всех исследованных гистологических срезов, полученных от 101 головы разных технологических групп свиней.

Среднее количество клеток с присутствием АГ ЦВС-2 в одном гистологическом срезе органа представлено в таблице 14.

Таблица 14 – Среднее количество антигенпозитивных клеток в одном гистологическом срезе органа

Исследуемые свиньи	Среднее количество антигенпозитивных клеток				
	Легкое	Лимфатические узлы (паховые и бронхиальные)	Сердце	Почки	Селезенка
Инфицированные	5,64±0,91	5,99±0,86	0	0	0
Отрицательный контроль	0	0	0	0	0

Из приведенных в таблице 14 данных, следует, что в результате прямой ИГХ реакции, среднее количество антигенпозитивных клеток с наличием АГ ЦВС-2 в одном срезе легкого составляет 5,64±0,91. При этом в одном срезе пахового и/или бронхиального лимфатического узла количество антигенпозитивных клеток незначительно отличается от результатов, полученных в срезах легкого, и составляет 5,99±0,86.

Согласно результатам проведенного ИГХИ, АГ ЦВС-2 был обнаружен в одном или нескольких органах у 63 из 101 головы исследованных животных (таблица 15).

Таблица 15 – Результаты прямого ИГХИ с целью выявления АГ ЦВС-2 в срезах органов от 101 головы разных технологических групп свиней

Возрастная группа	Возраст в днях	Новосибирская область	Московская область	Кемеровская область	Тамбовская область	Липецкая область	Белгородская область	Всего положительных голов в возрастной группе	Процент положительных голов от общего числа голов в возрастной группе
Поросята сосуны	1-40	10	-	2	-	0	-	12	60
Поросята отъемыши	40-120	10	0	5	6	5	4	30	73,2
Откормочное поголовье	120-210	10	-	7	-	-	-	17	56,6
Свиноматки	280-560	4	-	-	-	-	-	4	40
Итого		34	-	11	5	5	4	63	62,4

Согласно результатам, представленным в таблице 15, следует, что разработанным прямым методом ИГХИ, АГ ЦВС-2 обнаружен в одном из органов у 62,4% исследованных свиней. Среди группы поросят-сосунов присутствие в органах АГ ЦВС-2 выявлено у 12 из 20 голов, что соответствует 60%. В группе поросят-отъемышей наличие АГ ЦВС-2 в органах установлено у 30 из 41 головы (73,2%). У откормочных свиней АГ ЦВС-2 найден в органах 17 из 30 голов, 70% соответственно. Среди свиноматок АГ ЦВС-2 в органах выявлен у 4 голов из 10 (40%).

Полученные прямым ИГХ методом исследования результаты сопоставили с данными, полученными методами ИФА и ПЦР-РВ для отражения эффективности разработанной методики при диагностике цирковирусной болезни свиней (рисунок 25).

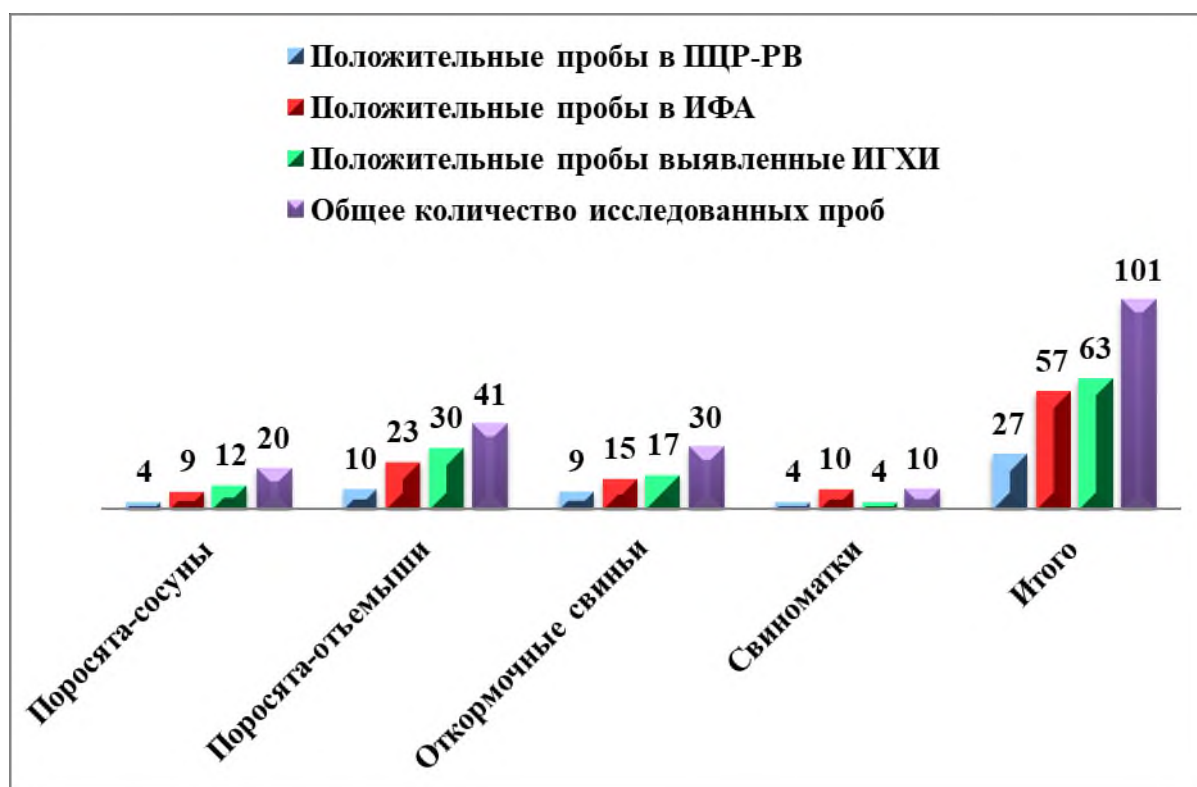


Рисунок 25 – Сопоставление результатов исследований 101 головы свиней разных технологических групп методами ПЦР-РВ, ИФА и ИГХИ

Из данных, показанных на рисунке 25, следует, что разработанным прямым ИГХ методом исследования обнаружено 63 положительно реагирующих головы свиней. При этом наибольшее количество положительно реагирующих голов



выявлено в группе поросят-отъемышей, что соотносится с данными ИФА и ПЦР-РВ.

#### **4.5 Идентификация лимфоцитов и макрофагов в органах свиней непрямой методом иммуногистохимического исследования**

В результате проделанной работы (п. 3.1.2) был разработан непрямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши к CD маркерам иммунокомпетентных клеток человека для идентификации лимфоцитов и макрофагов в нативных гистологических срезах органов свиней, согласно следующему протоколу:

Нативные гистологические срезы фиксировали в 70% растворе изопропилового спирта в NaCl (0,9%) - 60 минут при температуре +4<sup>0</sup>C. После фиксации срезы сушили в потоке воздуха - 30-40 минут. На высушенные срезы наносили 3% раствор перекиси водорода на 30 минут при комнатной температуре. После срезы трижды отмывали в 0,1М ФСБ рН 7,2 по 5 минут при комнатной температуре. Затем на срезы наносили 5% блокирующий раствор на основе обезжиренного сухого молока в ФСБ рН 7,2 и инкубировали в термостате (сохраняя условия влажной камеры) при 37<sup>0</sup>C - 40 минут. Выполняли трехкратное отмывание срезов в 0,1М ФСБ рН 7,2 по 5 минут при комнатной температуре. Готовили рабочий раствор первичных АТ в 0,1М ФСБ рН 7,2. Разведение АТ - 1:100. Готовый раствор наносили на срезы и инкубировали в термостате (сохраняя условия влажной камеры) при 37<sup>0</sup>C - 120 минут. Выполняли трехкратное ополаскивание срезов в 0,1М ФСБ рН 7,2 по 5 минут при комнатной температуре. Готовили рабочий раствор вторичных АТ, меченных пероксидазой хрена в 0,1М ФСБ рН 7,2 с добавлением 5% обезжиренного сухого молока. Разведение вторичных АТ - 1:100. Готовый раствор наносили на срезы и инкубировали в термостате (сохраняя условия влажной камеры) при 37<sup>0</sup>C - 90 минут. Повторяли процесс трехкратного отмывания в 0,1М ФСБ рН 7,2 по 5 минут при комнатной температуре. Готовили рабочий раствор хромогена по инструкции к набору АЕС Straining Kit (Sigma-Aldrich, США). Готовый раствор



наносили на срезы на 10-20 минут при комнатной температуре. После 3 раза ополаскивали в 0,1М ФСБ рН 7,2 по 5 минут при комнатной температуре. Наносили гематоксилин Майера на 10 минут для визуализации ядер клеток. Окрашенные гематоксилином срезы промывали в дистиллированной воде 3 раза по 5 минут. После промывания на срезы наносили глицерин, закрывали покровным стеклом и просматривали под микроскопом при увеличении x100 - x630.

При оценке результатов исследования антигенпозитивные клетки в нативных гистологических срезах легких и бронхиальных лимфатических узлов поросят-отъемышей распознавали по окрашиванию мембраны и цитоплазмы хромогеном в красно-коричневый цвет на светооптическом уровне.

Результат непрямой ИГХ реакции для идентификации CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в срезах бронхиальных лимфатических узлов и легких поросят-отъемышей представлен на рисунке 26.

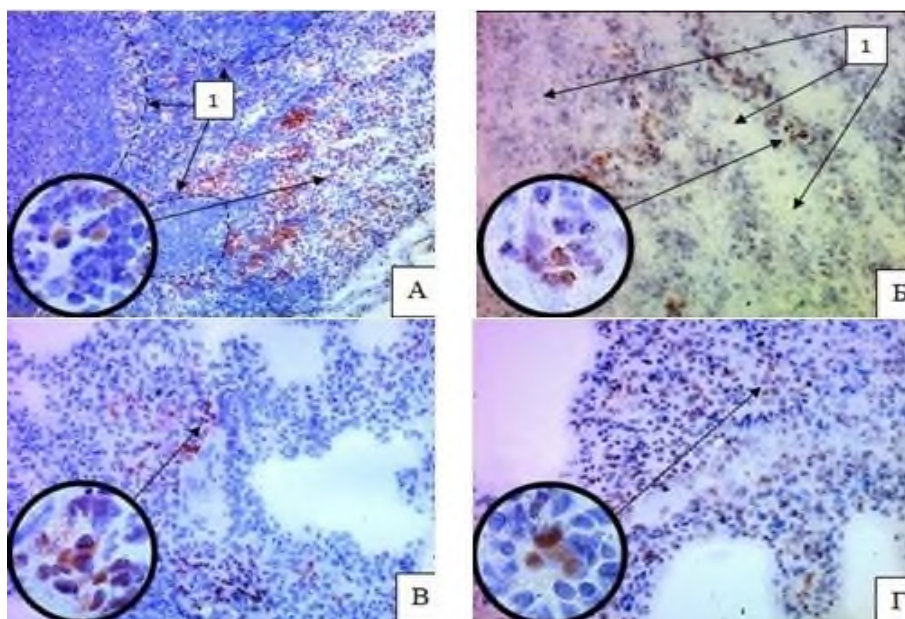


Рисунок 26 – Результат непрямой ИГХ реакции. А. Бронхиальный лимфатический узел интактного поросенка. CD3<sup>+</sup> Т-лимфоциты в паракортикальной зоне (ув. 100, 630); Б. Бронхиальный лимфатический узел поросенка, инфицированного ЦВС-2. CD3<sup>+</sup> Т-лимфоциты в паракортикальной зоне. 1- участки некроза (ув. 200, 630); В.

Легкое интактного поросенка. CD3<sup>+</sup> Т-лимфоциты в паренхиме; Г. Легкое инфицированного поросенка. CD3<sup>+</sup> Т-лимфоциты в паренхиме. Гематоксилин Майера. Ув. 200 и 630

На рисунке 26А представлен срез бронхиального лимфатического узла неинфицированного ЦВС-2 поросенка-отъемыша. В органе хорошо заметна корковая зона с расположенными в ней первичными фолликулами (выделены пунктиром) и паракортикальная зона с антигенпозитивными  $CD3^+$  Т-лимфоцитами, в цитоплазме которых, присутствует специфическое красно-коричневое окрашивание. В паракортикальной зоне бронхиального лимфатического узла поросенка-отъемыша, естественно инфицированного ЦВС-2, выявлены локальные участки некроза лимфоцитов. В сохранившейся лимфоидной ткани мультифокально расположены  $CD3^+$  Т-лимфоциты, как с сохраненной структурой и специфическим внутрицитоплазматическим окрашиванием, так и патологической формы с признаками пикноза, лизиса и некроза, окрашенные неспецифично, что не учитывается при подсчете клеток (рисунок 26Б). Подсчетом антигенпозитивных клеток, установили, что среднее количество  $CD3^+$  Т-лимфоцитов в одном поле зрения (ув. х630) среза бронхиального лимфатического узла 5 голов поросят-отъемышей, инфицированных ЦВС-2 в 4,04 раза ниже аналогичного показателя интактных особей.

На рисунке 26В представлен срез легкого неинфицированного ЦВС-2 поросенка-отъемыша с антигенпозитивными  $CD3^+$  Т-лимфоцитами в паренхиме и интерстиции. В срезе легкого инфицированного поросенка-отъемыша выявили антигенпозитивные  $CD3^+$  Т-лимфоциты без изменений и с патологией, характеризующейся лизисом ядра или частичным разрушением мембраны. В цитоплазме не измененных  $CD3^+$  Т-лимфоцитов присутствовало специфичное красно-коричневое окрашивание. Тогда как поврежденные клетки были окрашены тотально, что указывает на неспецифическое связывание (рисунок 26Г). Подсчет антигенпозитивных клеток, показал, что среднее количество  $CD3^+$  Т-лимфоцитов в одном поле зрения (ув. х630) среза легкого 5 голов поросят-отъемышей, инфицированных ЦВС-2 в 1,14 раз больше аналогичного показателя интактных животных.

Результат непрямой ИГХ реакции для идентификации CD4<sup>+</sup> Т-хелперов в срезах бронхиальных лимфатических узлов и легких поросят-отъемышей показан на рисунке 27.

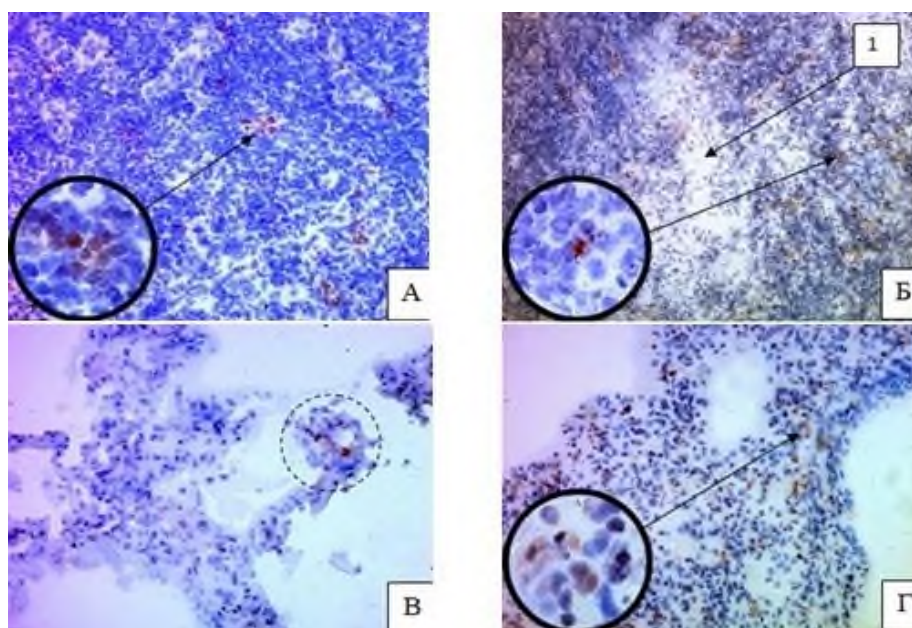


Рисунок 27 – Результат непрямой ИГХ реакции. А. Бронхиальный лимфатический узел интактного поросенка. CD4<sup>+</sup> Т-хелперы в паракортикальной зоне; Б. Бронхиальный лимфатический узел поросенка, инфицированного ЦВС-2. CD4<sup>+</sup> Т-хелперы в паракортикальной зоне. 1- участок некроза; В. Легкое интактного поросенка. CD4<sup>+</sup> Т-хелперы в паренхиме и интерстиции; Г. Легкое инфицированного поросенка. CD4<sup>+</sup> Т-хелперы в паренхиме. Гематоксилин Майера. Ув. 200 и 630

На рисунке 27А представлен срез бронхиального лимфатического узла неинфицированного ЦВС-2 поросенка-отъемыша. В паракортикальной зоне антигенпозитивные CD4<sup>+</sup> Т-хелперы были расположены небольшими группами. Специфическое красно-коричневое окрашивание цитоплазмы и мембраны антигенпозитивных клеток было разной интенсивности, что связано с концентрацией рецептора CD4<sup>+</sup>. Т-хелперы с интенсивным окрашиванием обладают высокой концентрацией рецептора CD4<sup>+</sup>, а со слабым – низкой. У поросенка-отъемыша, естественно инфицированного ЦВС-2, в паракортикальной зоне бронхиального лимфатического узла обнаружили обширный участок некроза. В окружающей ткани выявили единично расположенные антигенпозитивные CD4<sup>+</sup> Т-хелперы (рисунок 27Б). Среднее количество CD4<sup>+</sup> Т-

хелперов в одном поле зрения (ув. х630) среза бронхиального лимфатического узла 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 5,57 раза меньше аналогичного показателя интактных животных.

На рисунке 27В показан срез легкого неинфицированного ЦВС-2 поросенка-отъемыша, в паренхиме и интерстиции которого, единично расположены антигенпозитивные  $CD4^+$  Т-хелперы. В срезе легкого инфицированного поросенка-отъемыша в паренхиме выявили мультифокально расположенные группы антигенпозитивных  $CD4^+$  Т-хелперов, в цитоплазме которых присутствовало не интенсивное красно-коричневое окрашивание (рисунок 27Г). Среднее количество  $CD4^+$  Т-хелперов в одном поле зрения (ув. х630) среза легкого 5 голов поросят-отъемышей, инфицированных ЦВС-2 в 1,31 раза больше аналогичного показателя интактных особей.

Результат непрямой ИГХ реакции для идентификации  $CD8^+$  цитотоксических Т-клеток в срезах бронхиальных лимфатических узлов и легких поросят-отъемышей показан на рисунке 28.

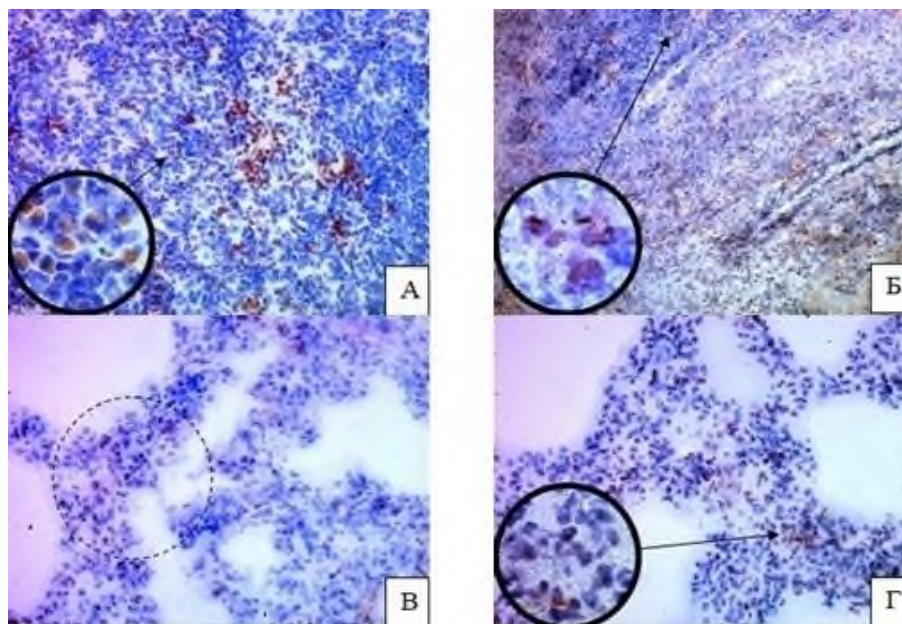


Рисунок 28 – Результат непрямой ИГХ реакции. А. Бронхиальный лимфатический узел интактного поросенка.  $CD8^+$  Т-клетки в паракортикальной зоне (ув. 200, 630); Б. Бронхиальный лимфатический узел инфицированного поросенка.  $CD8^+$  Т-клетки в паракортикальной зоне (ув. 100, 630); В. Легкое интактного поросенка.  $CD8^+$  Т-клетки в паренхиме; Г. Легкое поросенка, инфицированного ЦВС-2.  $CD8^+$  Т-клетки в паренхиме. Гематоксилин Майера. Ув. 200 и 630



На рисунке 28А продемонстрирован срез бронхиального лимфатического узла неинфицированного ЦВС-2 поросенка-отъемыша, где в паракортикальной зоне мультифокально расположены группы антигенпозитивных CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток. В паракортикальной зоне бронхиального лимфатического узла поросенка-отъемыша, естественно инфицированного ЦВС-2, выявили антигенпозитивные CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-клетки без патологий, а также неспецифически окрашенные патологически измененные Т-клетки (рисунок 28Б). Подсчетом антигенпозитивных клеток, установили, что среднее количество CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток в одном поле зрения (ув. х630) среза бронхиального лимфатического узла 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 3,13 раз ниже аналогичного показателя интактных поросят.

На рисунке 28В показан срез легкого неинфицированного ЦВС-2 поросенка-отъемыша, где единично расположены цитотоксические Т-клетки. В срезе легкого инфицированного поросенка-отъемыша в паренхиме выявили антигенпозитивные CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-клетки с интенсивным внутрицитоплазматическим окрашиванием (рисунок 28Г). Подсчетом антигенпозитивных клеток, установили, что среднее количество CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток в одном поле зрения (ув. х630) среза легкого 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 1,04 раза больше аналогичного показателя интактных поросят.

Результат непрямой ИГХ реакции для идентификации CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов в срезах бронхиальных лимфатических узлов и легких поросят-отъемышей представлен на рисунке 29.

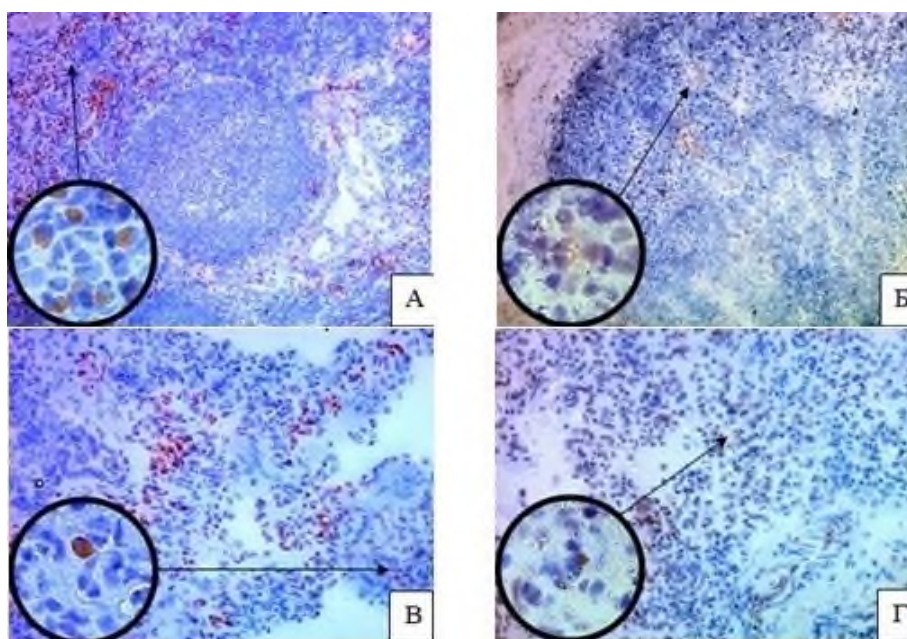


Рисунок 29 – Результат непрямой ИГХ реакции. А. Бронхиальный лимфатический узел интактного поросенка. CD20<sup>+</sup> В-лимфоциты в корковой и паракортикальной зоне (ув. 100, 630); Б. Бронхиальный лимфатический узел поросенка, инфицированного ЦВС-2. CD20<sup>+</sup> В-лимфоциты в корковой и паракортикальной зоне; В. Легкое интактного поросенка. CD20<sup>+</sup> В-лимфоциты в паренхиме; Г. Легкое инфицированного поросенка. CD20<sup>+</sup> В-лимфоциты в паренхиме. Гематоксилин Майера. Ув. 200 и 630

На рисунке 29А представлен срез бронхиального лимфатического узла неинфицированного ЦВС-2 поросенка-отъемыша, в котором обнаружены антигенпозитивные CD20<sup>+</sup> В-лимфоциты, располагающиеся в коронах фолликулов коркового вещества, реже в паракортикальной зоне и мозговом веществе, что характерно для зрелых не активированных В-лимфоцитов. В корковой зоне бронхиального лимфатического узла инфицированного поросенка-отъемыша наблюдали первичные лимфоидные фолликулы со стертой границей трудно различимой от паракортикальной зоны. В структуре фолликулов найдены CD20<sup>+</sup> В-лимфоциты, на поверхности и в цитоплазме которых обнаружено не интенсивное специфическое окрашивание. Помимо этого, единичные антигенпозитивные В-лимфоциты были выявлены в паракортикальной зоне и мозговом веществе бронхиального лимфатического узла (рисунок 29Б). Подсчет антигенпозитивных клеток, показал, что среднее количество CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов в одном поле зрения (ув. х630) среза бронхиального лимфатического

узла 5 голов поросят-отъемышей, инфицированных ЦВС-2 в 6,77 раз ниже аналогичного показателя интактных животных.

На рисунке 29В показан срез легкого неинфицированного ЦВС-2 поросенка-отъемыша, в котором, цитоплазма антигенпозитивных CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов ярко окрашена хромогеном в красно-коричневый цвет. В паренхиме легкого поросенка-отъемыша, естественно инфицированного ЦВС-2, были выявлены единичные антигенпозитивные CD20<sup>+</sup> В-лимфоциты, а также В-клетки в состоянии некроза (рисунок 29Г). Среднее количество CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов в одном поле зрения (ув. х630) среза легкого 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 2,11 раз меньше аналогичного показателя интактных поросят.

Результат непрямой ИГХ реакции для идентификации CD14<sup>+</sup> макрофагов в срезах бронхиальных лимфатических узлов и легких поросят-отъемышей продемонстрирован на рисунке 30.

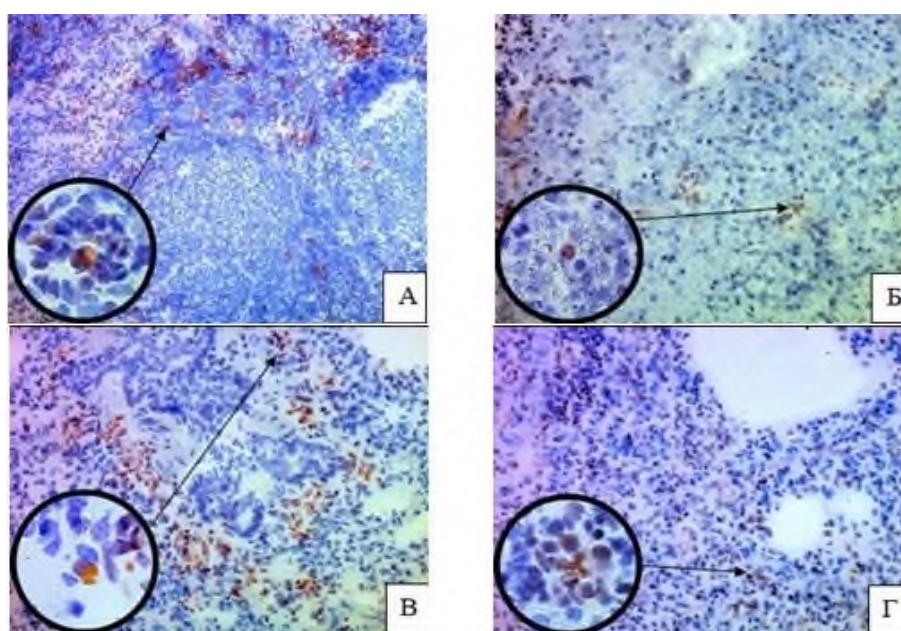


Рисунок 30 – Результат непрямой ИГХ реакции. А. Бронхиальный лимфатический узел интактного поросенка. CD14<sup>+</sup> макрофаги в корковой и паракортикальной зоне (ув. 100, 630); Б. Бронхиальный лимфатический узел инфицированного поросенка. CD14<sup>+</sup> макрофаги в корковой и паракортикальной зоне; В. Легкое интактного поросенка. CD14<sup>+</sup> макрофаги в паренхиме; Г. Легкое инфицированного поросенка. CD14<sup>+</sup> Макрофаги в паренхиме. Гематоксилин Майера. Ув. 200 и 630

На рисунке 30А представлен срез бронхиального лимфатического узла неинфицированного ЦВС-2 поросенка-отъемыша. Антигенпозитивные макрофаги

были расположены в структурах лимфоидных фолликулов, а также в паракортикальной зоне и мозговом веществе. В срезе бронхиального лимфатического узла инфицированного поросенка-отъемыша в паракортикальной зоне выявили CD14<sup>+</sup> макрофаги в цитоплазме которых, присутствовало специфическое окрашивание (рисунок 30Б). Среднее количество CD14<sup>+</sup> макрофагов в одном поле зрения (ув. х630) среза бронхиального лимфатического узла 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 4,15 раз ниже аналогичного показателя интактных особей.

На рисунке 30В показан срез легкого неинфицированного ЦВС-2 поросенка-отъемыша, где антигенпозитивные макрофаги сконцентрированы в перибронхиальной соединительной ткани, в стенках альвеол и периваскулярной соединительной ткани. В срезе легкого инфицированного поросенка-отъемыша в паренхиме обнаружили CD14<sup>+</sup> макрофаги, на мембране и в цитоплазме которых выявлено специфическое красно-коричневое окрашивание (рисунок 30Г). Среднее количество CD14<sup>+</sup> макрофагов в одном поле зрения (ув. х630) среза легкого 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 1,33 раза меньше аналогичного показателя интактных животных.

Статистическую оценку результатов разработанного непрямого метода ИГХИ для идентификации CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> - Т-лимфоцитов, CD20<sup>+</sup> - В-лимфоцитов и CD14<sup>+</sup> - макрофагов в нативных срезах бронхиальных лимфатических узлов и легких спонтанно инфицированных ЦВС-2 (5 голов) и интактных (5 голов) поросят-отъемышей, выполняли подсчетом антигенпозитивных клеток в 15 полях зрения под увеличением микроскопа в 630 раз. Считали только клетки без патологии, неспецифическое окрашивание не учитывали. Формулы для расчета представлены в пункте 3.1.2.

По результатам непрямой ИГХ реакции был выполнен подсчет антигенпозитивных иммунокомпетентных клеток в срезах бронхиальных лимфатических узлов 5 голов неинфицированных ЦВС-2 поросят-отъемышей (таблица 16).



Таблица 16 - Среднее количество исследованных популяций лимфоцитов и макрофагов из расчета на одно поле зрения среза бронхиального лимфатического узла интактных поросят-отъемышей

Маркер	Зона органа*	Головы					Среднее количество по всем пробам	Среднее количество по всем зонам органа
		1	2	3	4	5		
CD3	1	31,87±3,6	19,73±3,3	23,47±3,8	10,87±2	27,73±2,6	22,7±3,1	82,5±8
	2	72,73±8,2	65,27±4,9	63,13±3,5	27,6±3,4	70,4±4,9	59,8±4,9	
CD4	1	7,27±1,6	8±1,7	13,47±4,1	5,13±1,2	11,8±3,4	9,1±2,4	43,5±6
	2	42,13±7,2	39,13±1,9	37,6±3,9	14,47±1,6	38,73±3,3	34,4±3,6	
CD8	1	24,4±2,6	11,87±1,9	10±1,3	4,8±1,3	16,87±2,4	13,6±1,9	37,9±5,4
	2	27,13±2,5	24,07±3,7	26,2±3,8	12,53±4,7	31,47±2,6	24,3±3,5	
CD20	1	43,3±11,5	32,93±3,8	37,87±2,3	25,13±1,5	41,2±3,9	36,1±4,6	83,9±8,7
	2	40,27±11,1	49,47±2,3	51,53±2,1	38,6±2,9	59±2	47,8±4,1	
CD14	1	30,53±8,2	18±4,8	27,93±5,4	20,6±4,1	29,67±5,5	25,3±5,6	75,1±13,2
	2	33,2±7,5	57±8	54,93±10,8	45,6±6,2	58,2±5,5	49,8±7,6	

\*1 – Кортикальная зона

2 – Паракортикальная зона, мозговое вещество и синусы

Согласно данным, представленным в таблице 16, в одном поле зрения среза бронхиального лимфатического узла неинфицированного ЦВС-2 поросенка-отъемыша, среднее количество CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов превышает показатель CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на 1,4±0,7 кл/пз. При этом в корковой зоне среднее количество В-лимфоцитов выше количества Т-лимфоцитов, тогда как в паракортикальной зоне, мозговом веществе и синусах наоборот среднее количество В-лимфоцитов ниже, чем Т-лимфоцитов. При анализе популяций CD4<sup>+</sup> Т-хелперов и CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток выявили, что среднее количество Т-хелперов, из расчета на одно поле зрения среза бронхиального лимфатического узла, превышает среднее количество цитотоксических Т-клеток на 5,6±0,6 кл/пз. В корковой зоне среднее количество Т-хелперов ниже, чем цитотоксических Т-клеток, в то время как в других зонах, напротив, показатель Т-хелперов превышает среднее количество цитотоксических Т-клеток. Среднее количество CD14<sup>+</sup> макрофагов из расчета на одно поле зрения среза бронхиального лимфатического узла ниже, чем среднее количество Т- и В-лимфоцитов. Кроме

того, в корковой зоне показатель макрофагов выше среднего количества CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, но ниже среднего количества CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов, а в остальных зонах наоборот.

Для сравнительной оценки среднего количества исследуемых иммунокомпетентных клеток в тканях бронхиальных лимфатических узлов интактных и инфицированных ЦВС-2 поросят-отъемышей, был выполнен подсчет данных клеток у инфицированных животных. Результат статистической обработки данных, полученных разработанным непрямой ИГХ методом исследования с целью идентификации макрофагов и основных популяций лимфоцитов в срезах бронхиальных лимфатических узлов от 5 голов поросят-отъемышей, естественно инфицированных ЦВС-2, представлен в таблице 17.

Таблица 17 - Среднее количество исследованных популяций лимфоцитов и макрофагов из расчета на одно поле зрения среза бронхиального лимфатического узла поросят-отъемышей, инфицированных ЦВС-2

Маркер	Зона органа*	Головы					Среднее количество по всем пробам	Среднее количество по всем зонам органа
		1	2	3	4	5		
CD3	1	2,1±1,2	2,67±1,8	3,8±3,4	3,73±3,1	2,47±1,6	2,9 ±2,2	20,4 ±7,5
	2	17,07±7,5	18,07±5,2	21,8±4,5	18,4±4,3	11,93±5,1	17,5±5,3	
CD4	1	1,07±0,9	1,13±1,1	1±0,8	1,33±1,2	1±0,8	1,1±0,9	7,8±3,8
	2	8,27±2,4	7,13±4,5	6,93±3	7,07±2,5	4,2±2,4	6,7±2,9	
CD8	1	1±0,8	1,27±1,1	2,27±1,8	1,47±1,2	2,47±1,8	1,7±1,3	12,1±4,4
	2	8,8±2,7	11,6±2,9	13±3,3	11±3,1	7,67±3,3	10,4±3,1	
CD20	1	2,27±1,9	2,2±1,9	2,67±2,3	1,27±1,1	1±0,9	1,9±1,6	12,4±4,7
	2	11,4±3	12,4±3,5	11,73±3,7	10,33±2,7	6,67±2,4	10,5±3,1	
CD14	1	2,67±1,9	1,73±1,4	7,93±5,1	7,47±4,7	1,13±1,1	4,2±2,8	18,1±7,8
	2	18,27±6,9	12,8±6,7	19,13±5,6	10,53±3,4	9±2,5	13,9±5	

\*1 – Корковая зона

2 – Паракортикальная зона, мозговое вещество и синусы

Из данных, указанных в таблице 17 видно, что в одном поле зрения среза бронхиального лимфатического узла инфицированных поросят-отъемышей среднее количество CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов во все зонах органа превышает показатель CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов на 8±2,8 кл/пз. Среди CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов

среднее количество  $CD4^+$  Т-хелперов ниже показателя  $CD8^+$  цитотоксических Т-лимфоцитов на  $4,3 \pm 0,6$  кл/пз, что прямо противоположно данным, полученным в срезах бронхиальных лимфатических узлов от интактных поросят-отъемышей. Среднее количество  $CD14^+$  макрофагов превышает показатель  $CD3^+$  Т-лимфоцитов в корковой зоне, тогда как в других зонах бронхиального лимфатического узла среднее количество макрофагов ниже, чем Т-лимфоцитов. При этом показатель макрофагов превышает среднее количество  $CD20^+$  В-лимфоцитов во всех зонах органа на  $5,7 \pm 3,1$  кл/пз.

На рисунке 31 показано соотношение среднего количества макрофагов и основных популяций лимфоцитов в одном поле зрения среза бронхиального лимфатического узла интактных (5 голов) и инфицированных поросят-отъемышей (5 голов).

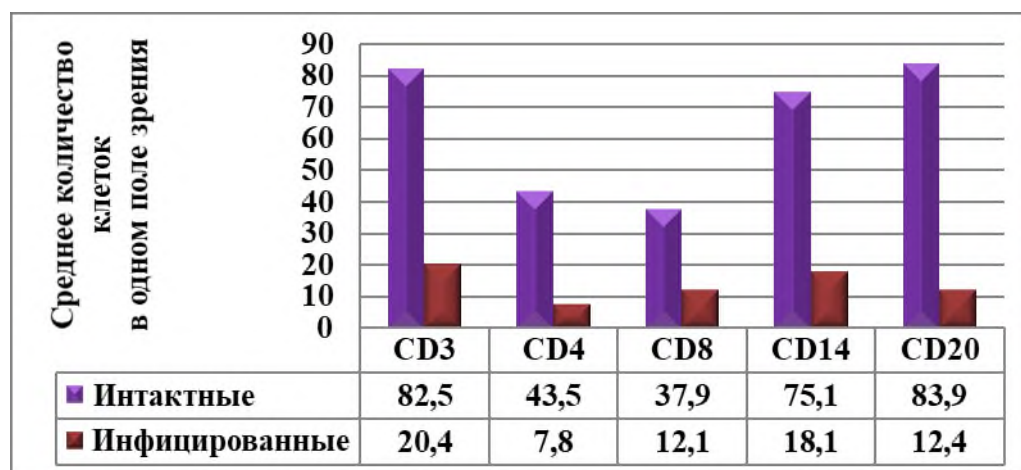


Рисунок 31 – Соотношение показателей макрофагов и основных популяций лимфоцитов в срезе бронхиального лимфатического узла исследованных поросят-отъемышей

Согласно данным, представленным на рисунке 31, у неинфицированных поросят-отъемышей среднее количество исследованных популяций лимфоцитов и макрофагов, из расчета на одно поле зрения среза бронхиального лимфатического узла, выше, чем у поросят-отъемышей, естественно инфицированных ЦВС-2. Полученные данные указывают, что ЦВС-2 оказывает супрессивное действие на макрофаги и основные популяций лимфоцитов в тканях бронхиальных лимфатических узлов инфицированных животных.

Результат подсчета антигенпозитивных иммунокомпетентных клеток, выявленных разработанным непрямым методом ИГХИ для идентификации лимфоцитов и макрофагов в срезах легких 5 голов неинфицированных ЦВС-2 поросят-отъемышей, представлен в таблице 18.

Таблица 18 - Среднее количество исследованных популяций лимфоцитов и макрофагов в одном поле зрения среза легкого интактных поросят-отъемышей

Проба	CD3	CD4	CD8	CD20	CD14
1	17,13±2,7	8,67±3,2	8,33±2,4	17,87±3,8	20,33±5,7
2	19,4±5	5,33±2,7	13,07±1,7	28,13±1,7	28,4±6,4
3	13,4±4,4	5,87±1,5	6,67±2,3	29,73±1,6	14,47±3,9
4	10,53±1,6	3,53±1,3	7,33±2	24,93±1,4	12,13±3,4
5	21,67±5,1	10,6±2,5	10,33±2,9	24,13±1,4	18,93±3
Среднее кол-во по всем пробам	16,4±3,8	6,8±2,2	9,1±2,3	24,9±1,9	18,8±4,5

Из данных, указанных в таблице 18, следует, что в одном поле зрения среза легкого неинфицированных ЦВС-2 поросят-отъемышей среднее количество CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов превышает показатель CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на 8,5±1,9 кл/пз. Среднее количество CD4<sup>+</sup> Т-хелперов ниже показателя CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов на 2,3±0,1 кл/пз. Показатель CD14<sup>+</sup> макрофагов в одном поле зрения среза легкого превышает среднее количество CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на 2,4±0,7 кл/пз, но ниже показателя CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов на 6,1±2,6 кл/пз.

Среднее количество макрофагов и основных популяций лимфоцитов в срезах легкого 5 голов поросят-отъемышей, естественно инфицированных ЦВС-2, представлено в таблице 19.

Таблица 19 - Среднее количество исследованных популяций лимфоцитов и макрофагов в одном поле зрения среза легкого инфицированных поросят-отъемышей

Проба	CD3	CD4	CD8	CD20	CD14
1	20,07±3,7	10,87±2,9	9,33±2,6	14,33±4,1	13,13±5,1
2	14,87±6,6	7,53±3,5	6,4±3,1	8,6±2,9	10,27±4,2
3	23,87±4,1	10,07±2,7	12,27±2,8	7,93±2,3	14,67±6,1
4	17,6±3,4	7,6±1,7	10,07±2,9	9±2,4	10,33±1,8
5	17,53±7,4	8,73±1,6	9,53±2,5	19,33±2,9	21,93±5
Среднее кол-во по всем пробам	18,8±5	8,9±2,5	9,5±2,8	11,8±2,9	14,1±4,4

Согласно данным, отраженным в таблице 19, в одном поле зрения среза легкого поросят-отъемышей, естественно инфицированных ЦВС-2, среднее

количество  $CD3^+$  Т-лимфоцитов больше показателя  $CD20^+$  В-лимфоцитов  $CD20^+$  на  $7 \pm 2,1$  кл/пз, что прямо противоположно данным, полученным в срезах легких интактных особей. Среднее количество  $CD4^+$  Т-хелперов ниже показателя  $CD8^+$  цитотоксических Т-лимфоцитов на  $0,6 \pm 0,3$  кл/пз. Показатель  $CD14^+$  макрофагов в одном поле зрения среза легкого инфицированных поросят-отъемышей ниже среднего количества  $CD3^+$  Т-лимфоцитов на  $4,7 \pm 0,6$  кл/пз, но выше показателя В-лимфоцитов на  $2,3 \pm 1,5$  кл/пз, что также противоположно показателям интактных животных.

На рисунке 32 показано соотношение показателей исследованных популяций лимфоцитов и макрофагов в одном поле зрения среза легкого интактных (5 голов) и инфицированных поросят-отъемышей (5 голов).

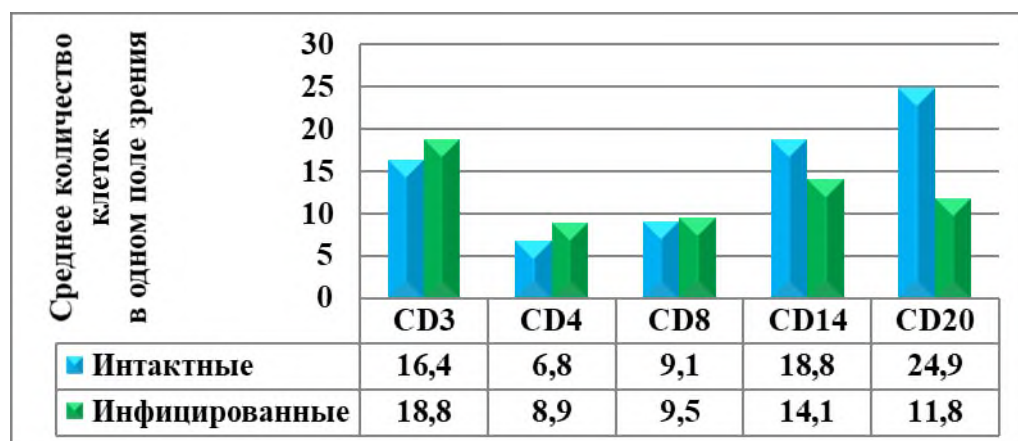


Рисунок 32 – Соотношение показателей макрофагов и основных популяций лимфоцитов в срезе легкого исследованных поросят-отъемышей

Согласно данным, представленным на рисунке 32, в одном поле зрения среза легкого интактных поросят-отъемышей среднее количество  $CD20^+$  В-лимфоцитов и  $CD14^+$  макрофагов больше, чем у поросят-отъемышей, спонтанно инфицированных ЦВС-2, что указывает на супрессивное действие вируса на эти популяции клеток в органе. Тогда как среднее количество  $CD3^+$  Т-лимфоцитов, включая  $CD4^+$  Т-хелперы и  $CD8^+$  цитотоксические Т-клетки, выше у инфицированных поросят-отъемышей по сравнению с показателями интактных животных, что обусловлено активацией локального Т-клеточного иммунного ответа.

## 5 ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время ЦВБС, обусловленная ЦВС-2, остается одной из значимых вирусных инфекций в свиноводческих хозяйствах по всему миру. Несмотря на проводимые противоэпизоотические мероприятия, смертность поросят-отъемышей и молодых свиней на откорме остается на высоком уровне, что приводит к существенным экономическим потерям. Этому способствует тот факт, что ЦВБС сопровождается большим разнообразием синдромов и зачастую усугубляется возбудителями других инфекций. Учитывая данные особенности цирковиральной инфекции, невозможно поставить точный диагноз без лабораторных исследований, направленных на идентификацию возбудителя болезни. Диагноз - ЦВБС - устанавливают на основании трех критериев: присутствие у свиней характерных клинических признаков, наличие ЦВС-2 в исследуемом материале и подтверждение гистологическим исследованием патологии лимфоидных тканей [20].

Анализ клинико-морфологических данных из свиноводческих хозяйств 6-ти субъектов РФ (Новосибирская, Московская, Кемеровская, Тамбовская, Липецкая и Белгородская область), показал, что клиническая картина свойственная ЦВБС, наблюдалась во всех обследованных хозяйствах, за исключением хозяйства из Московской области, в котором у не привитых от ЦВС-2 поросят-отъемышей отсутствовали клинические признаки инфекции. Признаки у поросят-сосунов в возрасте до 40 дней и отъемышей (40-120 дней) соответствовали СПМИ. Данные подтверждаются работами Chaе С. (2012), Charreyre С. (2000), Kim J. (2004), Семенцова В.И. (2009), которые указывают, что клинические признаки характерные для СПМИ развиваются у поросят с 14 до 120 дневного возраста [26, 53, 55, 100]. Среди клинических признаков обнаружены: отставание в росте, гиперемия, лихорадочное состояние и диарея, что соотносится с данными других ученых [47, 57, 78, 124, 149]. У свиноматок (280-560 дней) проявлялась картина репродуктивной патологии, характеризующаяся абортами, мертворождением и рождением слабых поросят, что также соотносится с информацией из работ

других специалистов [26, 131, 136, 146]. Среди откормочного поголовья в возрасте 120-180 дней выявлены свиньи с признаками СДНП, у которых наблюдали тахипноэ, асфиксию, увеличение лимфатических узлов и иктеричный кожный покров. Перечисленные признаки также были выявлены у молодых свиней в работах других ученых [26, 143, 148]. При этом у свиней в возрасте 180-210 дней клинические признаки ЦВБС не регистрировались. Данные, полученные в результате исследования, указывают, что, несмотря на проводимые противоэпизоотические мероприятия, исследованные свиноводческие хозяйства неблагополучны по ЦВБС.

Для подтверждения присутствия ЦВС-2 в свиноводческих хозяйствах, было выполнено диагностическое исследование сывороток крови от 101 головы свиней разных технологических групп методом ПЦР-РВ, которое показало, что 26,7% из всех проверенных проб были положительными. Причем наибольшее количество положительных результатов было обнаружено среди поросят-отъемышей, что согласуется с данными других исследований и указывает на то, что наиболее часто ЦВБС проявляется СПМИ, который наблюдают у поросят до 120 дневного возраста [26, 53, 55, 57, 100].

Исследование сывороток крови от 101 головы свиней разных технологических групп методом непрямого ИФА выявило положительный результат в 56,4% из всех исследованных проб, свидетельствуя о наличии АТ к ЦВС-2 вследствие иммунной реакции на присутствие вируса в организме или поствакцинального иммунитета. Аналогично результатам ПЦР-РВ наибольшее количество положительных результатов ИФА было получено в технологической группе поросят-отъемышей.

Для изучения патологических изменений в организме естественно инфицированных свиней было выполнено патологоанатомическое исследование органов 101 головы разных технологических групп животных, которое показало, что ЦВБС обязательно сопровождается патологическими изменениями в лимфатических узлах (паховые и бронхиальные), такая патология была выявлена во всех технологических группах, что подтверждается данными из работ других

ученых [129, 154, 155]. Среди поросят-сосунов и отъемышей, помимо макроскопических изменений в лимфатических узлах, в 63,4% случаев обнаружены патологические изменения в легких, реже в других исследованных органах (сердце, почки, селезенка), что характерно для развития СПМИ. В отличие от поросят, у откормочного поголовья в 53,3% случаев были найдены патологические изменения в почках, нежели в других исследованных органах, что соответствует развитию СДНП.

В подтверждение результатов патологоанатомического исследования, в гистологических препаратах сердца были выявлены признаки миокардита и фибринозного перикардита. Мы считаем, что механизм воспалительной реакции заключался в следующем: токсины от распавшихся клеток, распространяясь по гематогенному пути, воздействовали на стенки кровеносных сосудов, повышая их проницаемость, что приводило к экссудации фибриногена и жидких фракций крови в перикардальную полость. В препаратах почек были обнаружены процессы свойственные гломерулонефриту и нефропатии, что соотносится с данными из статьи Opriessnig T. (2013) [129]. Развитие такой патологии приводит к нарушению фильтрационного механизма почек и соответственно к отекам и общей интоксикации организма. Помимо этого, развитие гломерулонефрита зачастую связано с аутоиммунными реакциями в организме, которые могут возникать при ЦВБС [148]. Гистологическое исследование препаратов селезенки показало наличие некротизирующего спленита, что подтверждается данными, отраженными в работе Opriessnig T. (2013) [129]. В препаратах легкого выявили изменения свойственные геморрагической пневмонии, катаральному бронхиту с бронхообструкцией и ателектазом. Гистологическим исследованием бронхиальных и паховых лимфатических узлов были установлены изменения характерные для геморрагического и некротического лимфаденита. Оценка гистологических изменений показала, что генерализация цирковирусной инфекции в организме свиней может способствовать развитию полиорганной недостаточности, что подтверждается данными из статей Opriessnig T. (2013) и Segales J. (2012) [129, 148].



Для установления взаимосвязи найденных в органах патологий с наличием в них АГ вируса, был разработан прямой метод ИГХИ с целью определения локализации АГ ЦВС-2 в тканях. На данный момент применение метода ИГХИ в лабораторной диагностике инфекционных болезней животных на территории РФ не имеет широкого распространения ввиду ограниченного набора коммерческих антител отечественного производства к антигенам возбудителей и методик выполнения анализа с их использованием. Такая ситуация обстоит с диагностикой ЦВБС в том числе. С развитием технологий отечественным ученым удалось обнаружить, выделить, генотипировать вирус и впоследствии получить МАТ к рекомбинантному белку С ЦВС-2, что расширило возможности диагностики цирковирусной инфекции [4, 9, 138].

При разработке метода были подобраны оптимальные условия для проведения прямой ИГХ реакции в гистологических срезах органов свиней. Установлено, что выполнение реакции на нативных срезах, изготовленных методом криотомии, менее затратно, нежели на парафиновых срезах, работа с которыми удлиняет время выполнения исследования на 48 часов. Реакцию выполняли с применением одного вида специфичных АТ, что сделало ее постановку еще быстрее. Разработанный прямой метод ИГХИ был апробирован в ходе диагностического скрининга ЦВБС в свиноводческих хозяйствах РФ.

В результате проведенного ИГХИ установили, что ЦВС-2 в организме естественно инфицированных животных оказывает патологическое действие на ткани бронхиальных, паховых лимфатических узлов и легких, где обнаружено большое количество антигенпозитивных клеток. Следовательно, данные органы являются мишенями для ЦВС-2. В местах скопления клеток нагруженных АГ вируса наиболее часто наблюдали выраженные и необратимые патологии, что также отражено в статье Shi R. (2021), где указано, что тяжесть патологических изменений напрямую зависит от количества генома вируса в тканях, что подтверждается результатами нашего исследования [154]. Поскольку искомым нами АГ представляет собой капсидный белок ЦВС-2, его обнаружение в тканях указывает на имевшееся ранее или нынешнее присутствие вируса в ткани, а

соответственно, и его генома. В тканях сердца, селезенки и почек АГ ЦВС-2 не обнаружен, а патологические изменения в этих органах не связаны с прямым действием ЦВС-2 и являются вторичными.

Для уточнения особенностей иммунного ответа при ЦВБС был разработан непрямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши к CD маркерам иммунокомпетентных клеток человека с целью идентификации и подсчета макрофагов и основных популяций лимфоцитов в органах свиней. Разработку осуществляли, опираясь на данные иностранных и отечественных специалистов о возможности межвидовой перекрестной реактивности АТ к CD маркерам клеток человека и свиньи [1, 137].

Согласно ранее полученным данным о расположении АГ ЦВС-2 в органах инфицированных свиней, подсчет и идентификацию иммунокомпетентных клеток выполняли на гистологических срезах органов-мишеней (бронхиальные лимфатические узлы и легкие). Более того, в тканях лимфатических узлов происходит антигензависимая пролиферация и дифференцировка Т- и В-лимфоцитов, которые в свою очередь являются центральными клетками иммунной системы. Основным маркером субпопуляции Т-лимфоцитов – CD3, который является частью комплекса с TCR для распознавания различных АГ, в том числе АГ ЦВС-2 [176]. Распознавание любых АГ, связанных с молекулами МНС II класса, осуществляют CD4<sup>+</sup> Т-хелперы, тогда как АГ, связанные с молекулами МНС I класса, распознают CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-клетки [176]. За повышение аффинности антигенраспознающего комплекса В-клеточного рецептора ответственен маркер CD20 В-лимфоцитов [176]. Основным маркером субпопуляций тканевых макрофагов, в частности альвеолярных, является CD14. В связи с чем в проводимой ИГХ реакции использовали МАТ мыши к вышеперечисленным маркерам.

Разработанным непрямой методом ИГХИ, установили, что в одном поле зрения среза бронхиального лимфатического узла 5 голов инфицированных ЦВС-2 поросят-отъемышей среднее количество CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, CD4<sup>+</sup> Т-хелперов, CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток, CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов и CD14<sup>+</sup> макрофагов

меньше по сравнению с показателями интактных поросят. По нашему мнению, резкое снижение количества макрофагов и основных популяций лимфоцитов в бронхиальных лимфатических узлах зараженных особей, связано с разрушением инфицированных вирусом клеток. Массовая гибель лимфоцитов после внедрения вируса, приводит к накоплению продуктов распада и некрозу окружающих клеток в тканях лимфатических узлов, нарушая работу органа, что может спровоцировать развитие иммунодефицита в организме животного. Результаты исследования подтверждаются данными из работы Shi R. (2021), о том, что некроз и лизис лимфоцитов, вызванный репликацией ЦВС-2 играет основную роль в механизме лимфоидного истощения при СПМИ [154].

Было установлено, что при действии ЦВС-2 на ткани бронхиальных лимфатических узлов поросят-отъемышей, спонтанно инфицированных вирусом, происходит изменение соотношения  $CD4^+$  Т-хелперов и  $CD8^+$  цитотоксических Т-клеток, количество первых снижается, а вторых увеличивается, что прямо противоположно показателям интактных особей. Соответственно ЦВС-2 первоначально действует на Т-хелперы, а уже после на цитотоксические Т-лимфоциты, что характерно для СПМИ, признаки которого были обнаружены у исследованных поросят-отъемышей. Схожие результаты были получены ранее исследованиями иностранных специалистов [126, 147].

Полученные результаты также указывают на снижение количества В-лимфоцитов в тканях бронхиальных лимфатических узлов и легких поросят-отъемышей, естественно инфицированных ЦВС-2. Эти данные также соотносятся с информацией Sinkora M. (2014) о том, что ЦВС-2 снижает количество В-лимфоцитов [156]. При действии вируса на  $CD20^+$  В-клетки, учитывая, что  $CD20$  является корцептором способствующим повышению аффинности антигенраспознающего комплекса В-клеточного рецептора, нарушается процесс активации сигнальных путей для индуцирования пролиферации и созревания В-лимфоцитов в герминативных центрах. Соответственно происходит снижение количества вторичных лимфоидных фолликулов, клетки которых играют важную роль в осуществлении адаптивного иммунитета в организме животного.

Нарушение процесса созревания В-лимфоцитов в последующем влияет на синтез иммуноглобулинов и дифференцировку в плазматические клетки, что опосредует снижение выработки противовирусных АТ и нарушение гуморального иммунного ответа [156].

При анализе результатов, полученных непрямым методом ИГХИ, в срезах легкого инфицированных поросят-отъемышей, помимо снижения количества В-лимфоцитов, выявили, снижение количества макрофагов по сравнению с аналогичными показателями неинфицированных особей, что указывает на угнетение местного адаптивного иммунитета.

Несмотря на это, показатели  $CD3^+$  Т-лимфоцитов,  $CD4^+$  Т-хелперов и  $CD8^+$  цитотоксических Т-клеток, в срезах легкого, наоборот, выше у инфицированных поросят-отъемышей, чем у интактных. Такое явление указывает на активацию регуляторно-вспомогательных функций Т-хелперов и клеточной формы иммунного ответа цитотоксическими Т-клетками. Sinkora M. (2014), наблюдавший подобную картину, утверждает, что данные изменения можно встретить у свиней с субклинической формой инфекции или при ЦВС со слабым проявлением клинических признаков, что объясняется особенностями взаимодействия ЦВС-2 с Т-лимфоцитами, в частности с  $CD8^+$  цитотоксическими Т-клетками [156].

Сопоставляя результаты гистологического, прямого и непрямого метода ИГХИ, установили, что в бронхиальных лимфатических узлах АГ ЦВС-2 сконцентрирован на мембране и в цитоплазме лимфоцитов и макрофагов коркового вещества, а также паракортикальной зоны. В легких АГ ЦВС-2 находится в цитоплазме и на поверхности лимфоцитов и макрофагов, расположенных в стенках альвеол, а также в просвете бронхов. Результаты нашего исследования совпадают с данными иностранных ученых о том, что в зараженном организме ЦВС-2 проявляет тропизм к тканевым макрофагам и лимфоцитам [99, 142, 154].

Проведенные в рамках данной диссертационной работы исследования, указывают, что ЦВС-2 индуцирует тяжелые патологические изменения в органах-

мишенях за счет гибели инфицированных иммунокомпетентных клеток. Что, в свою очередь, опосредует нарушение функциональной активности органов, снижение иммунной защиты животных и повышение риска возникновения вторичных и оппортунистических инфекций в организме.

## 6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного диссертационного исследования впервые в РФ был разработан прямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2 для обнаружения локализации АГ вируса в тканях свиней. Используя разработанный метод, были установлены органы-мишени (легкие, паховые и бронхиальные лимфатические узлы), в клетках которых локализовался АГ вируса. Выявлена зависимость между развивающимися патологиями в органах-мишенях и количеством антигенпозитивных клеток, нагруженных АГ ЦВС-2, подтвердив, что именно присутствие вируса в данных органах инициировало необратимые патологические изменения, нарушив тем самым, их функцию.

Для идентификации клеток, в которых обнаружен АГ ЦВС-2, впервые в РФ был разработан непрямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши к маркерам CD3, CD4 и CD8 - Т-лимфоцитов, CD20 - В-лимфоцитов и CD14 - макрофагов человека, с целью подсчета иммунокомпетентных клеток в органах-мишенях инфицированных свиней. Для изучения патологического действия ЦВС-2 на данные клетки, было проведено сравнение среднего количества лимфоцитов и макрофагов в тканях инфицированных ЦВС-2 и интактных поросят-отъемышей. Исследование показало, что ЦВС-2 более чем в 3 раза снижает количество CD3, CD4 и CD8 - Т-лимфоцитов, CD20 - В-лимфоцитов и CD14 - макрофагов в структурах бронхиальных лимфатических узлов естественно инфицированных поросят, по сравнению с показателями интактных. Что напрямую доказывает супрессивное действие ЦВС-2 на иммунную систему организма хозяина.

При разработке методов ИГХИ использовали 95% реактивов отечественного производства, что важно в условиях импортозамещения и современной экономической политики.

За время исследования было отобрано более 600 образцов патологического материала (сыворотки крови и органы). Совместно с сотрудниками лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики вирусных болезней свиней, а также

лаборатории биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН было проведено более 100 исследований методами ПЦР-РВ и непрямого ИФА. Для гистологического и иммуногистохимических исследований было изготовлено более 1500 срезов органов. Работа выполнена 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».

В подтверждение полученных результатов был получен патент № 2695330 от 23.06.2019 «Способ диагностики цирковирусной инфекции свиней второго типа прямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител» (Приложение 1) и разработаны методические указания «Иммуногистохимическая диагностика цирковирусной болезни свиней 2 типа», утвержденные секцией зоотехнии и ветеринарии отделения сельскохозяйственных наук РАН от 15.03.2018 (Приложение 2).

Использование метода ИГХИ в диагностике ЦВБС, расширит область применения данного исследования в ветеринарии, а также способствует получению новых данных об особенностях патогенеза цирковирусной инфекции.

## 7 ВЫВОДЫ

1. Клиническая картина характерная синдрому послеотъемного мультисистемного истощения выявлена у поросят-сосунов и отъемышей, дерматита и нефропатии у откормочных свиней, репродуктивному синдрому у свиноматок. Обнаружение антител к ЦВС-2 у 56,4% и генома вируса у 26,7% исследованных животных в хозяйствах Новосибирской, Московской, Кемеровской, Тамбовской, Липецкой и Белгородской областей свидетельствуют об их неблагополучии по цирковирусной инфекции.

2. Патологоанатомическим и гистологическим исследованием органов свиней разных технологических групп из неблагополучных по цирковирусной инфекции стад выявлены фибринозный перикардит, гломерулонефрит и нефропатия, некротизирующий спленит, геморрагическая пневмония, катаральный бронхит с бронхообструкцией и ателектазом, геморрагический и некротический лимфаденит паховых и бронхиальных лимфатических узлов.

3. Разработанным прямым методом иммуногистохимического исследования на основе отечественных моноклональных антител мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2, установлено, что антиген вируса локализуется в легких, паховых и бронхиальных лимфатических узлах спонтанно инфицированных свиней.

4. Установлено, что концентрация антигенпозитивных клеток выше в очагах необратимых патологических изменений тканей, что отражает корреляцию между количеством инфицированных клеток и интенсивностью развития патологии в органе-мишени.

5. Разработанным непрямым методом иммуногистохимического исследования на основе моноклональных антител к маркерам иммунокомпетентных клеток человека были идентифицированы макрофаги и основные популяции лимфоцитов в структурах органов-мишеней свиней, спонтанно инфицированных ЦВС-2.



6. В гистологических срезах бронхиальных лимфатических узлов спонтанно инфицированных поросят-отъемышей выявлено снижение количества  $CD3^+$  Т-лимфоцитов в 4,04 раза,  $CD4^+$  Т-хелперов в 5,57 раз,  $CD8^+$  цитотоксических Т-лимфоцитов в 3,13 раза,  $CD20^+$  В-лимфоцитов в 6,77 раз и  $CD14^+$  макрофагов в 4,15 раза по сравнению с показателями интактных животных, что отражает нарушение работы адаптивного иммунитета.

7. В гистологических срезах легких спонтанно инфицированных поросят-отъемышей выявлено увеличение количества  $CD3^+$  Т-лимфоцитов в 1,14 раза,  $CD4^+$  Т-хелперов в 1,31 раза,  $CD8^+$  цитотоксических Т-лимфоцитов в 1,04 раза по сравнению с показателями интактных животных, свидетельствуя о локальной активации Т-клеточной формы иммунного ответа. Количество  $CD20^+$  В-лимфоцитов в 2,11 раз и  $CD14^+$  макрофагов в 1,33 раза ниже, чем у интактных животных, что указывает на угнетение адаптивного иммунитета, как на местном, так и на системном уровне.

8. Применение прямого и непрямого иммуногистохимического исследования позволило обнаружить антиген ЦВС-2 на мембране и в цитоплазме Т-, В-лимфоцитов и макрофагов бронхиального лимфатического узла и в альвеолярных макрофагах инфицированных поросят-отъемышей.

## 8 ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанный прямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2 для выявления локализации АГ вируса в органах свиней, может быть использован в ветеринарных лабораториях при проведении диагностики ЦВБС и для дифференциальной диагностики схожих по клинической картине заболеваний. Данный метод позволяет обнаружить АГ ЦВС-2 на мембране и в цитоплазме клеток, а также сопоставить патологические изменения и локализацию АГ вируса в органах инфицированных свиней, что необходимо для научной практики специалистов патоморфологов.

2. Разработаны, утверждены и опубликованы методические указания «Иммуногистохимическая диагностика цирковирусной болезни свиней 2 типа», которые утверждены секцией зоотехнии и ветеринарии отделения сельскохозяйственных наук РАН. Данные указания созданы для ветеринарных диагностических лабораторий.

3. Разработан непрямой метод ИГХИ на основе перекрестно-реагирующих МАТ мыши к CD маркерам иммунокомпетентных клеток человека, который позволяет идентифицировать и подсчитать лимфоциты и макрофаги в органах, а также может быть необходимым для исследования особенностей иммунного ответа при инфекционных болезнях свиней.

## 9 ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Разработанный прямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши bH12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2 для выявления локализации АГ вируса в органах свиней, способствует расширению потенциального применения ИГХИ для мониторинга ЦВБС в свиноводческих хозяйствах.

2. Данным методом можно осуществлять контроль эффективности разрабатываемых вакцин, так как позволяет определить диссеминацию вируса в органах и тканях, а также элиминацию его из организма, что является важным критерием для оценки иммунобиологических препаратов.

3. Разработанный непрямой метод ИГХИ на основе перекрестно-реагирующих МАТ к CD маркерам иммунокомпетентных клеток человека для определения основных популяций лимфоцитов и макрофагов в органах свиней, может способствовать изучению особенностей иммунного ответа при других инфекционных болезнях свиней.

4. Разработанный метод идентификации лимфоцитов можно применять для изучения как пред, так и поствакцинального иммунитета при разработке вакцин.

**10 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АГ- антиген

АТ – антитела

ВЭДС – вирус эпидемической диареи свиней

ДК – дендритная клетка

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ИГХ – иммуногистохимия

ИГХИ – иммуногистохимическое исследование

ИЛ - интерлейкин

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФН – интерферон

Кл/пз – клеток в одном поле зрения

М-клетки – микроскладчатые клетки

МАТ – моноклональные антитела

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени

РРСС – репродуктивно-респираторный синдром свиней

СДНП - синдром дерматита и нефропатии поросят

СПМИ - синдром послеотъемного мультисистемного истощения

ЦВБС – цирковирусная болезнь свиней

ЦВС-1 – цирковирус свиней первого типа

ЦВС-2 – цирковирус свиней второго типа

ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

pH – Водородный показатель

CD - cluster of differentiation, кластер дифференцировки лимфоцитов

СрG-олигонуклеотиды – controlled pore glass, олигонуклеотид ковалентно связанный с твердофазным носителем

МНС – главный комплекс гистосовместимости

ORF - open reading frame, открытая рамка считывания

PK-15 - перевиваемая линия клеток почки свиньи

TCR – Т-клеточный рецептор

TRL – toll-подобный рецептор

## 11 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев, Д.А. Иммуногистохимическое исследование лимфоузлов при цирковиральной инфекции свиней / Д.А. Андреев, С.Н. Карташов, А.М. Ермаков, и др. // Ветеринарная патология. - 2008. - № 4. - С. 26-30.

2. Балабанова, В.И. Патоморфологические изменения при энзоотической пневмонии свиней на фермах промышленного типа / В.И. Балабанова, А.А. Кудряшов // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2020. - № 2 (46). – С. 55-61.

3. Бирюченкова, М.В. Этиологическая структура респираторных болезней свиней в свиноводческих хозяйствах России в 2013-2017 гг / М.В. Бирюченкова, А.М. Тимина, А.В. Щербаков // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. - 2018. - Т. 16. - С. 265-281.

4. Булгаков, А.Д. Молекулярно-генетический анализ геномов вирусов респираторно-репродуктивного синдрома свиней и цирковирала второго типа, циркулирующих на территории российской федерации / А.Д. Булгаков, Т.В. Гребенникова, А.Г. Южаков, Т.И. Алипер, Е.А. Непоклонов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2014. - № 4. - С. 29-33.

5. Бутенков, А.И. Патогенетическое обоснование развития и прогнозирования тяжести течения цирковиральной инфекции у поросят // автореф. дисс. док. вет. наук / А.И. Бутенков. - Новочеркасск, 2010.

6. Гречухин, А.Н. Особенности проявления цирковиральной инфекции свиней и ее специфическая профилактика / А.Н. Гречухин // Ветеринария Кубани. - 2010. - № 1. - С. 9-12.

7. Емельянов, И.А. Разработка иммунопероксидазного монослойного анализа в культуре клеток для определения инфекционной активности цирковирала свиней второго типа / И.А. Емельянов, И.Н. Матвеева // В сборнике: Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии. Сборник научных трудов Международной учебно-методической и научно-

практической конференции, посвященной 100-летию со дня основания ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина. - 2019. - С. 113-114.

8. Ключников, А.Г. Синдром дерматита и нефропатии поросят (СДНП) при цирковиральной инфекции / А.Г. Ключников, А.И. Бутенков, С.Н. Карташов, В.В. Карташев // Ветеринария Кубани. – 2009. - № 6. – С. 4-8.

9. Козлов, А.Ю. Получение моноклональных антител к цирковиральной инфекции второго типа (ЦВС-2) и их применение для диагностики цирковиральной инфекции / А.Ю. Козлов, Л.В. Костина, К.П. Алексеев, М.А. Арутюнова, Ю.О. Терехова, В.В. Цибезов, Т.И. Алипер, О.А. Верховский // РВЖ СХЖ. - 2013. - № 2. - С. 20-22.

10. Майоров, Р.В. Методы оценки иммунного статуса / Р.В. Майоров, Е.В. Нусинов // Методическое пособие ГБОУ ВПО Тверская ГМА. – Тверь. - 2012.

11. Малоголовкин, А.С. Особенности клинического проявления заболеваний, ассоциированных с цирковирусами свиней / А.С. Малоголовкин // БИО. - 2009. - № 12. - С. 25-27.

12. Малоголовкин, А.С. Оптимизация полимеразной цепной реакции для идентификации генома цирковиральной инфекции свиней / А.С. Малоголовкин, Г.А. Надточей, О.Н. Жигалева, В.Г. Бурдинский, М.Б. Новикова // Ветеринарная патология. - 2007. - № 2.- С.49-51.

13. Малоголовкин, А.С. Выделение цирковиральной инфекции свиней 2-го типа от поросят с синдромом мультисистемного истощения отъемышей / А.С. Малоголовкин, Г.А. Надточей, Д.В. Колбасов // Ветеринарный врач. - 2009. - № 2. - С. 27-30.

14. Оганесян, А.С. Серопревалентность к некоторым возбудителям, участвующим в этиологии респираторного симптомо-комплекса среди свинопоголовья центрального федерального округа Российской Федерации / А.С. Оганесян, О.П. Бьядовская, Л.Б. Прохватилова, С.А. Дудников // Ветеринарная патология. - 2009. - № 3 (30). - С. 105-113.

15. Орлянкин, Б.Г. Перспективы использования в ветеринарии ДНК-вакцин / Б.Г. Орлянкин // Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки в России. — М., 1999. — Т. I. — С. 265-268.
16. Орлянкин, Б. Г. Цирковиральная инфекция свиней / Б. Г. Орлянкин, Т. И. Алипер, Е. А. Непоклонов // Ветеринария. - 2002. - № 11. - С. 48-51.
17. Орлянкин, Б.Г. Современные представления о цирковирусах свиней / Б.Г. Орлянкин, Т.И. Алипер, Е.А. Непоклонов // Сельскохозяйственная биология. - 2002. - № 6. - С. 29-37.
18. Орлянкин, Б. Г. Инфекционные респираторные болезни свиней: этиология, диагностика и профилактика / Б. Г. Орлянкин, Т. И. Алипер, Е. А. Непоклонов // Ветеринария. - 2005. - № 11. - С. 3–6.
19. Петрова, О.Г. Рекомендации по борьбе с ЦВС-2 / О.Г. Петрова, И.М. Донник, А.Г. Исаева, Ю.Г. Крысенко // Аграрный вестник Урала. - 2014. - № 6 (124). - С. 34-39.
20. Петрова, О.Г. Патоморфологические признаки при цирковиральной инфекции свиней / О.Г. Петрова, И.М. Донник, А.Г. Исаева, Ю.Г. Крысенко // Аграрный вестник Урала. - 2013. - № 12 (118). - С. 35-41.
21. Прудников, С.И. Цирковиральная инфекция свиней и проблемы ее профилактики / С.И. Прудников, А.Н. Шкрылев, А.И. Колобаев и др. // Ветеринария. - 2010. - № 11. - С. 15.
22. Раев, С.А. Специфическая профилактика цирковиральных болезней свиней: современное состояние и перспективы / С.А. Раев // Российский ветеринарный журнал. - 2014. – С. 26-29.
23. Раев, С.А. Получение рекомбинантного капсидного белка цирковируса свиней второго типа (генотип 2b) в бакуловиральной системе и использование его для изготовления вакцины / С.А. Раев, К.П. Алексеев, Е.В. Шемельков, А.Д. Булгаков, М.И. Мусиенко, Б.Г. Орлянкин, О.А. Верховский, Т.И. Алипер // Российский ветеринарный журнал. - 2012. - № 3. - С. 17-19.
24. Раев, С.А. Влияние колострального иммунитета на антигенную активность вакцины "ВЕРРЕС-ЦИРКО" и распределение изотип-специфических



антител в иммунном ответе к цирковирусу свиней второго типа / С.А. Раев, М.А. Арутюнова, В.В. Цибезов, К.П. Алексеев, А.Д. Булгаков, М.И. Мусиенко, О.А. Верховский, А.Д. Забережный, Т.И. Алипер // Ветеринария. - 2015. - № 11. - С. 26-31.

25. Сатина, Т.А. Цирковирусные инфекции свиней / Т.А. Сатина // Обзор литературы. – ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, - 2003.

26. Семенцов, В.И. Цирковирусные болезни свиней (ЦВБС) / В.И. Семенцов, И.А. Болоцкий, А.К. Васильев, С.В. Пруцаков // Ветеринария Кубани. – 2009. – № 5. – С. 8–10.

27. Семченко, В.В. Гистологическая техника / В.В. Семченко, С.А. Барашкова, В.Н. Артемьев // Омск – Орел.: Омская областная типография. - 2006. - С. 38 – 43.

28. Снимщикова, И.А. Курс лекций по общей иммунологии / И.А. Снимщикова // Орел – ОГУ. - 2015. – С. 122.

29. Стаффорд, В.В. Применение иммуногистохимического метода в диагностике / В.В. Стаффорд // RJOAS. – 2016. – 8(56). – С. 18-21.

30. Стаффорд, В.В. Иммуногистохимическая диагностика цирковирусной болезни свиней 2 типа / В.В. Стаффорд, С.А. Раев, Я.Б. Стрельцова, Т.И. Алипер, А.Д. Забережный, А.М. Гулюкин // Москва, - 2018.

31. Стаффорд, В.В. Цирковирусная инфекция свиней. Обзорные данные / В.В. Стаффорд, Я.Б. Стрельцова, М.А. Аноятбеков // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. - 2018. - Т. 80. - № 1. - С. 324-330.

32. Стаффорд, В.В. Иммуногистохимия и гибридизация *in situ* в диагностике классической чумы свиней / В.В. Стаффорд, Я.Б. Стрельцова // Ветеринария и кормление. - 2018. - № 6. - С. 14-16.

33. Стаффорд, В.В. Цирковирус свиней 2 типа. Синдром послеотъемного мультисистемного истощения / В.В. Стаффорд, Я.Б. Стрельцова // В сборнике: Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии,

товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения  
Материалы национальной научно-практической конференции. - 2019. - С. 95-96.

34. Стаффорд, В.В. Использование метода иммуногистохимии при диагностике цирковирусных болезней свиней / В.В. Стаффорд, Я.Б. Стрельцова, С.А. Раев, А.Г. Южаков, А.Д. Забережный, Т.И. Алипер // Ветеринария. - 2019. - № 8. - С. 18-22.

35. Стаффорд, В.В. Использование иммуногистохимической реакции для иммунофенотипирования лейкоцитов в тканях и органах свиней/ В.В. Стаффорд, Я.Б. Стрельцова // Труды Кубанского государственного аграрного университета. - 2022. - № 5(98). - С. 159-162.

36. Стрельцова, Я.Б. Современная эпизоотологическая характеристика цирковирусной болезни свиней / Я.Б. Стрельцова // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. - 2018. - № 1 (25). - С. 129-135.

37. Стрельцова, Я.Б. Проблемы ветеринарно-санитарной экспертизы свинины при цирковирусной инфекции свиней / Я.Б. Стрельцова, В.В. Стаффорд // В сборнике: Пища. Экология. Качество. труды XVII Международной научно-практической конференции. – Екатеринбург. - 2020. - С. 620-622.

38. Стрельцова, Я.Б. Особенности строения и генетики возбудителей цирковирусной болезни свиней / Я.Б. Стрельцова // В книге: VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. - 2020. - С. 350-352.

39. Стрельцова, Я.Б. Патологические изменения лимфоидных тканей при цирковирусной инфекции свиней / Я.Б. Стрельцова // Ветеринария. - 2021. - № 10. - С. 26-28.

40. Стрельцова, Я.Б. Влияние цирковируса свиней второго типа на основные популяции лимфоцитов и макрофагов в тканях бронхиальных лимфатических узлов инфицированных поросят-отъемышей / Я.Б. Стрельцова // Труды Кубанского государственного аграрного университета. - 2023. - № 103. - С. 247-252.

41. Стрельцова, Я.Б. Генетическое разнообразие возбудителей цирковирусной болезни свиней / Я.Б. Стрельцова, В.В. Стаффорд // Ветеринария и кормление. - 2021. - № 2. - С. 48-50.
42. Тимина, А.М. Детекция цирковируса свиней второго типа методом ПЦР в реальном времени / А.М. Тимина, А.С. Яковлева // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2014. – Т. 12. - № 1. – С. 154-164.
43. Хайдуков, С.В. Стандартизованная технология "Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов" / С.В. Хайдуков, Л.В. Байдун, А.В. Зурочка, А.Т. Арег // Российский иммунологический журнал. - Т. 8(17). - № 4. - 2014. - С. 974-992.
44. Albina, E. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets / E. Albina, C. Truong, E. Hutet, P. Blanchard, R. Cariolet, R. L'Hospitalier, D. Mahe, C. Allee, H. Morvan, N. Amenna, et al. // J. Comp. Pathol. – 2001. - Vol.125. - P. 292–303.
45. Allan, G.M. Porcine circoviruses: a review / G.M. Allan, J.A. Ellis // J Vet Diag Invest. – 2000. – Vol. 12. – P. 3–14.
46. Allan, G.M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus / G.M. Allan, S. Kennedy, F. McNeilly, J.C. Foster, J.A. Ellis, S.J. Krakowka, B.M. Meehan, B.M. Adair // J. Comp. Pathol. – 1999. – Vol. 121. - P. 1–11.
47. Allan, G.M. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe/ G.M. Allan, F. McNeilly, S. Kennedy, et al. // J Vet Diagn Invest. - 1998. - Vol. 10. - P. 3–10.
48. Afolabi, K. O. Global Status of Porcine circovirus Type 2 and Its Associated Diseases in Sub-Saharan Africa / K. O. Afolabi, B. C. Iweriebor, A. I. Okoh, L. C. Obi // Advances in Virology. – 2017. – P. 1-16.
49. Bao, F. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f / F. Bao, S. Mi, Q. Luo, H. Guo, C. Tu, G. Zhu, et al. // Transbound Emerg Dis. – 2018. – Vol. 65. – P. 432–440.

50. Beach, N.M. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2) / N.M. Beach, X.J. Meng // *Virus Res.* – 2012. – Vol. 164. - P. 33–42.

51. Calsamiglia, M. Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) / M. Calsamiglia, L. Fraile, A. Espinal, A. Cuxart, C. Seminati, M. Martin, E. Mateu, M. Domingo, J. Segales // *Res Vet Sci.* – 2006. – Vol. 82. - P. 299-304.

52. Carman, S. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease—2004–2006 / S. Carman, H.Y. Cai, J. DeLay, S.A. Youssef, B.J. McEwen, C.A. Gagnon, D. Tremblay, M. Hazlett, P. Lulis, J. Fairles, et al. // *Can. J. Vet. Res.* – 2008. – Vol. 72. - P. 259–268.

53. Chae, C. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in Korea / C. Chae // *Virus Research.* – 2012. - Vol. 164. - No. 1-2. - P. 107–113.

54. Charreyre, C. Natural transmission of PCV 2 in seronegative 9-week-old pigs / C. Charreyre, L. Boeuf, S. Brunet, G. Reynaud // In 16th Congress of the International Pig Veterinary Society. - 2000. Melbourne: Merial.

55. Charreyre, C. Natural decrease of anti PCV2 maternal antibodies in conventional piglets / C. Charreyre, L. Boeuf, G. Reynaud // In 16th Congress of the International Pig Veterinary Society. - 2000. - Melbourne: Merial.

56. Choi, J. Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome / J. Choi, G.W. Stevenson, M. Kiupel, B. Harrach, L. Anothayanontha, C.L. Kanitz, S.K. Mittal // *Can. J. Vet. Res.* – 2002. – Vol. 66. - P. 217–224.

57. Clark, E. G. Post-weaning multisystemic wasting syndrome / E.G. Clark // *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners* - 1997. – Vol. 28. – P. 499-501.

58. Cook, A. J. C. A case control study of PMWS and PDNS / A. J. C. Cook, S. R. Pascoe, A. C. J. Gresham, J. W. Wilesmith // *The Pig Journal* – 2001. – Vol. 48. – P. 53-61.
59. Cortey, M. Low levels of diversity among genomes of porcine circovirus type 1 (PCV1) points to differential adaptive selection between porcine circoviruses / M. Cortey, J. Segales // *Virology*. – 2012. – Vol. 422. - P. 161–164.
60. Crowther, R.A. Comparison of the Structures of Three Circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus / R.A. Crowther, J.A. Berriman, W.L. Curran, G.M. Allan, D. Todd // *J Virol*. - 2003. – Vol. 77 (24). – P. 13036– 13041.
61. Davies, B. Diagnostic phylogenetics reveals a new porcine circovirus 2 cluster / B. Davies, X. Wang, C. M. T. Dvorak, D. Marthaler, M. P. Murtaugh // *Virus Res*. – 2016. – Vol. 217. - P. 32–37.
62. Darwich, L. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens / L. Darwich, M. Balasch, J. Plana-Duran, J. Segales, M. Domingo, E. Mateu // *J Gen Virol*. – 2003. – Vol. 84. – P. 3453-3457.
63. Darwich, L. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome / L. Darwich, S. Pie, A. Rovira, J. Segales, M. Domingo, I.P. Oswald, E. Mateu // *J Gen Virol*. – 2003. – Vol. 84. – P. 2117-2125.
64. Dawsona, H.D. Porcine cluster of differentiation (CD) markers 2018 update / H.D. Dawsona, J.K. Lunney // *Research in Veterinary Science*. – Vol. 118. – 2018. – P. 199-246.
65. Delwart, E. Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes / E. Delwart, L. Li // *Virus Research*. - 2012. - Vol. 164. - No. 1-2. - P. 114–121.
66. Done, S. PMWS and PDNS - two recently recognised diseases of pigs in the UK / S. Done, A. Gresham, R. Potter, D. Chennells // *In Practice*. – 2001. – No. 23. – P. 14-21.

67. Dupont, K. Transmission of different variants of PCV2 and viral dynamics in a research facility with pigs mingled from PMWS-affected herds and non-affected herds / K. Dupont, C. K. Hjulsgaard, C. S. Kristensen, P. Baekbo, L. E. Larsen // *Veterinary Microbiology*. – 2009. - Vol. 139. - No. 3-4. - P. 219–226.

68. Ellis, J.A. Porcine Circovirus: A Historical Perspective/ J.A. Ellis // *Veterinary Pathology*. - 2014. - Vol. 51(2). - P. 315-327.

69. Faldyna, M. Cross-reactive anti-human monoclonal antibodies as a tool for B-cell identification in dogs and pigs / M. Faldyna, P. Samankova, L. Leva, J. Cerny, J. Oujezdská, Z. Rehakova, J. Sinkora // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2007. - Vol. 119. – P. 56-62.

70. Faurez, F. The protective immune response against pseudorabies virus induced by DNA vaccination is impaired if the plasmid harbors a functional porcine circovirus type 2 rep and origin of replication / F. Faurez, B. Grasland, V. Beven, R. Cariolet, A. Keranflec'h, A. Henry, A. Jestin, D. Dory // *Antiviral Res.* – 2012. – Vol. 96. – P. 271–279.

71. Franzo, G. Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution / G. Franzo, M. Cortey, A.M.M.G.D. Castro, U. Piovezan, M.P.J. Szabo, M. Drigo, J. Segales, L.J. Richtzenhain // *Vet. Microbiol.* – 2015. – Vol. 178. - P. 158–162.

72. Franzo, G. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms / G. Franzo, M. Cortey, J. Segalés, J. Hughes, M. Drigo // *Mol. Phylogen. Evolut.* – 2016. – Vol. 100. - P. 269–280.

73. Franzo, G. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology / G. Franzo, J. Segalés // *PLoS One*. - 2018. – Vol. 13. – e0208585.

74. Franzo, G. Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study / G. Franzo, C.M. Tucciarone, M. Cecchinato, M. Drigo // *Sci. Rep.* – 2016. – No. 6. - 39458.

75. Franzo, G. International trades, local spread and viral evolution: the case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy / G. Franzo, C. M. Tucciarone, G. Dotto, A. Gigli, L. Ceglie, M. Drigo // *Infection, Genetics and Evolution*. - 2015. - Vol. 32. - P. 409–415.

76. Gao, Z. ORF4-protein deficient PCV2 mutants enhance virus-induced apoptosis and show differential expression of mRNAs in vitro / Z. Gao, Q. Dong, Y. Jiang, T. Opriessnig, J. Wang, Y. Quan, et al. // *Virus Res*. – 2014. – Vol. 183. – P. 56–62.

77. Gerner, W. Porcine T lymphocytes and NK cells – An update / W. Gerner, T. Kaser, A. Saalmuller // *Developmental & Comparative Immunology*. – Vol. 33 (3). – 2009. – P. 310-320.

78. Gillespie, J. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease / J. Gillespie, T. Opriessnig, X. J. Meng, K. Pelzer, and V. Buechner-Maxwell // *Journal of Veterinary Internal Medicine*. – 2009. - Vol. 23. - No. 6. – P. 1151–1163, 2009.

79. Gilpin, D. F. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system / D. F. Gilpin, K. McCullough, B. M. Meehan, F. McNeilly, I. McNair, L. S. Stevenson, J. C. Foster, J. A. Ellis, S. Krakowka, B. M. Adair, G. M. Allan // *Vet Immunol Immunopathol*. – 2003. – Vol. 94. – P. 149-161.

80. Grierson, S.S. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK / S.S. Grierson, D.P. King, T. Sandvik, D. Hicks, Y. Spencer, T.W. Drew, M. Banks // *Arch. Virol*. – 2004. – Vol. 149. – P. 1171–1183.

81. Grierson, S.S. Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study / S.S. Grierson, D.P. King, G.J. Wellenberg, M. Banks // *Res Vet Sci*. – 2004. – Vol. 77. – P. 265–268.

82. Gu, J. Characterization of specific antigenic epitopes and the nuclear export signal of the Porcine circovirus 2 ORF3 protein / J. Gu, L. Wang, Y. Jin et al. // *Veterinary Microbiology*. – 2016. - Vol. 184. - P. 40–50.

83. Ha, Y. Lack of evidence of porcine circovirus type 1 and type 2 infection in piglets with congenital tremors in Korea / Y. Ha, K. Jung, C. Chae // *Veterinary Record*. – 2005. - Vol. 156. - No. 12. – P. 383–384.
84. Hamel, A.L. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs / A.L. Hamel, L. Lin, G.S.P. Nayar // *J Virol*. – 1998. – Vol. 72. – P. 5262–5267.
85. 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. – Vol. 38. – P. 528–539.
86. He, J. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus Type 2 / J. He, J. Cao, N. Zhou, Y. Jin, J. Wu, J. Zhou // *J Virol*. – 2013. - Vol. 87(3). – P. 1420–1429.
87. Huang, L.P. Identification of one critical amino acid that determines a conformational neutralizing epitope in the capsid protein of porcine circovirus type 2 / L.P. Huang, Y.H. Lu, Y.W. Wei, L.J. Guo, C.M. Liu // *BMC Microbiol*. – 2011. – Vol. 188.
88. Huang, L. Capsid proteins from PCV2a genotype confer greater protection against a PCV2b strain than those from PCV2b genotype in pigs: evidence for PCV2b strains becoming more predominant than PCV2a strains from 2000 to 2010s / L. Huang, Y. Wang, Y. Wei et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2016. - Vol. 100. - No. 13. - P. 5933–5943.
89. Jacobsen, B. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in northern Germany / B. Jacobsen, L. Krueger, F. Seeliger, M. Bruegmann, J. Segales, W. Baumgaertner // *Vet. Microbiol*. – 2009. Vol. 138. – P. 27–33.
90. Jung, K. Identification of porcine circovirus type 2 in retrospective cases of pigs naturally infected with porcine epidemic diarrhoea virus / K. Jung, Y. Ha, S.K. Ha, J. Kim, C. Choi et al. // *Vet. J*. – 2006. – Vol. 171. – P. 166–168.



91. Karuppanan, A.K. ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the virus / A.K. Karuppanan, J. Kwang // *Virology*. – 2011. – Vol. 410. – P. 248–56.
92. Karuppanan, A.K. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology / A.K. Karuppanan, T. Opriessnig // *Viruses*. – 2017. – Vol. 9(5). – P. 99.
93. Kawai, T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // *Nat Immunol*. – 2010. – Vol. 11. – P. 373–84.
94. Kennedy, S. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus / S. Kennedy, D. Moffett, F. McNeilly, B. Meehan, J. Ellis, S. Krakowka, G.M. Allan // *J. Comp. Pathol.* - 2000. – Vol. 122. – P. 9–24.
95. Kennedy, S. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors / S. Kennedy, J. Segales, A. Rovira et al. // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2003. - Vol. 15. - No. 2. - P. 151–156.
96. Kekkarainen, T. Genetic variability of porcine circovirus 2 in vaccinating and non-vaccinating commercial farms / T. Kekkarainen, A. Gonzalez, A. Llorens, J. Segales // *J. Gen. Virol.* – 2014. – Vol. 95. – P. 1734–1742.
97. Kekkarainen, T. Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses / T. Kekkarainen, M. Montoya, J. Dominguez, E. Mateu, J. Segales // *Vet Immunol Immunopathol.* – 2008. – Vol. 124. – P. 41–9.
98. Kekkarainen, T. Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution / T. Kekkarainen, J. Segales // *Porcine Health Manag.* – 2015. – Vol. 1. – P. 17.
99. Kim, J. Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Macrophage Inflammatory Protein-1 in Porcine Circovirus 2-induced Granulomatous Inflammation / J. Kim, C. Chae // *J Comp Pathol* – 2004. – Vol. 131. – P. 121-126.

100. Kim, J. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex / J. Kim, H.K. Chung, C. Chae // *Veterinary Journal*. – 2003. - Vol. 166. - No. 3. - P. 251–256.
101. Kim, J. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs / J. Kim, Y. Ha, K. Jung, C. Choi, C. Chae // *Canadian Journal of Veterinary Research*. – 2004. - Vol. 68. - No. 3. - P. 218–221.
102. Klaumann, F. Current Knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): A Novel Virus with a Yet Unknown Impact on the Swine Industry / F. Klaumann, F. Correa-Fiz, G. Franzo, M. Sibila, J. I. Nunez, J. Segales // *Front Vet Sci*. – 2018. – Vol. 5. – P. 315.
103. Krakowka, S. A nine-base nucleotide sequence in the porcine circovirus type 2 (PCV2) nucleocapsid gene determines viral replication and virulence / S. Krakowka, G. Allan, J. Ellis, A. Hamberg, C. Charreyre, E. Kaufmann, C. Brooks, B. Meehan // *Virus Res*. – 2012. – Vol. 164. – P. 90–99.
104. Kwon, T. Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in korean pig population / T. Kwon, D.-U. Lee, S.J. Yoo, S.H. Je, J.Y. Shin, Y.S. Lyoo // *Virus Res*. – 2017. – Vol. 228. – P. 24–29.
105. Lager, K.M. Mortality in pigs given porcine circovirus type 2 subgroup 1 and 2 viruses derived from DNA clones / Lager K.M., Gauger P.C., Vincent A.L., Opriessnig T., Kehrli Jr. M.E., Cheung A.K. // *Veterinary Record*. – 2007. - Vol. 161. - No. 12. - P. 428–429.
106. Larochelle, R. Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 (PCV2) in boar semen following experimental infection / R. Larochelle, A. Bielanski, P. Muller, R. Magar // *In 16th Congress of the International Pig Veterinary Society*. – 2000. - Melbourne: Merial.
107. Larochelle, R. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome / R. Larochelle, R. Magar, S. D'Allaire // *Can J Vet Res*. - 2003. – Vol. 67. – P. 114-20.
108. Lefebvre, D.J. Recombination of two porcine circovirus type 2 strains / D.J. Lefebvre, J. Van Doorselaere, P.L. Delputte, H.J. Nauwynck // *Arch Virol*. – 2009. – Vol. 154. – P. 875-879.

109. Lefebvre, D.J. Increased porcine circovirus type 2 replication in porcine leukocytes in vitro and in vivo by concanavalin A stimulation / D.J. Lefebvre, P. Meerts, S. Costers, G. Misinzo, F. Barbe, K. Van Reeth, H.J. Nauwynck // *Vet Microbiol.* – 2008. – Vol. 132. – P. 74-86.

110. Liu, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis / J. Liu, I. Chen, J. Kwang // *J Virol.* – 2005. – Vol. 79. - P. 8262–8274.

111. Lin, W.L. The porcine circovirus type 2 nonstructural protein ORF3 induces apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells / W.L. Lin, M.S. Chien, P.C. Wu, C.L. Lai, C. Huang // *Open Virol J.* – 2011. – Vol. 5. – P. 148–153.

112. Lin, C.M. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in swine lymphocytes using mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from healthy PCV2-carrier pigs / C.M. Lin, C.R. Jeng, H.W. Chang, I.C. Guo, Y.L. Huang, Y.C. Tsai, M.Y. Chia, V.F. Pang // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2008. – Vol.124. – P. 355-66.

113. Lunney, J.K. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (prrsv): Pathogenesis and interaction with the immune system / J.K. Lunney, Y. Fang, A. Ladinig, N. Chen, Y. Li, B. Rowland, G.J. Renukaradhya // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* – 2016. – Vol. 4. - P. 129–154.

114. Magar, R. Experimental Transmission of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in Weaned pigs: a Sequential Study / R. Magar, R. Larochele, S. Thibault, L. Lamontagne // *J Comp Pathol.* – 2000. – Vol. 123. - P. 258-269.

115. Mandrioli, L. Immunohistochemical MHC-II and Interleukin 2-R (CD25) Expression in Lymph Nodes of Pigs with Spontaneous Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) / L. Mandrioli, G. Sarli, M. Zengarini, S. Panarese, P.S. Marcato // *Vet Pathol.* – 2006. – Vol. 43. – P. 993-997.

116. Mateusen, B. Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection / B. Mateusen, R.E. Sanchez, A. Van Soom, P. Meerts, D. G. D. Maes, H. J. Nauwynck // *Theriogenology.* – 2004. – Vol. 61. – P. 91-101.

117. Matzinger, S.R. A chimeric virus created by DNA shuffling of the capsid genes of different subtypes of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against the predominant PCV2b and the emerging PCV2d in pigs / S.R. Matzinger, T. Opriessnig, C.T. Xiao, N. Catanzaro, N.M. Beach, D.E. Slade, G.P. Nitzel, X.J. Meng // *Virology*. – 2016. – Vol. 498. P. 82–93.

118. McKeown, N.E. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2 / N.E. McKeown, T. Opriessnig, P. Thomas et al. // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 2005. - Vol. 12. - No. 11. - P. 1347–1351.

119. McIntosh, K.A. Detection of Porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn / K.A. McIntosh, J.C. Harding, J.A. Ellis, G.D. Appleyard // *Can J Vet Res*. – 2006. – Vol. 70. – P. 58-61.

120. McIntosh, K.A. Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars / K.A. McIntosh, J.C.S. Harding, S. Parker, J.A. Ellis, G.D. Appleyard // *J Vet Diagn Invest* – 2006. – Vol. 18. – P. 380-384.

121. Meehan, B.M. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses / B.M. Meehan, J.L. Creelan, M.S. McNulty, D. Todd // *J Gen Virol*. – 1997. – Vol. 78. - P. 221–227.

122. Meehan, B.M. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs / B.M. Meehan, F. McNeilly, D. Todd et al. // *Journal of General Virology*. – 1998. - Vol. 79. - No. 9. - P. 2171–2179.

123. Meiners, C. Field study on swine influenza virus (siv) infection in weaner pigs and sows / C. Meiners, S. Loesken, S. Doehring, E. Starick, S. Pesch, A. Maas, T. Noe, M. Beer, T. Harder, E. Grosse Beilage // *Tierarztl. Prax. Ausg. G Grosstiere. Nutztiere*. – 2014. – Vol. 42. – P. 351–359.

124. Meng, X.J. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system / X.J. Meng // *Annual Review of Animal Biosciences*. – 2013. - Vol. 1. - P. 43–64.

125. Misinzo, G. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31 / G. Misinzo, P. Meerts, M. Bublot, J. Mast, H. M. Weingartl, H. J. Nauwynck, // *J Gen Virol.* – 2005. – Vol. 86. – P. 2057-2068.

126. Nielsen, J. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) / J. Nielsen, I.E. Vincent, A. Botner, A.S. Ladekaer-Mikkelsen, G. Allan, et al. // *Vet Immunol Immunopathol.* – 2003. – Vol. 92. – P. 97–111.

127. Opriessnig, T. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus / T. Opriessnig, M. Fenaux, S. Yu, R.B. Evans, D. Cavanaugh, J.M. Gallup, et al. // *Vet. Microbiol.* – 2004. – Vol. 98. P. 209–220.

128. Opriessnig, T. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease / T. Opriessnig, P.G. Halbur, // *Virus Res.* – 2012. – Vol. 164. – P. 20–32.

129. Opriessnig, T. Current State of Knowledge on Porcine Circovirus Type 2-Associated Lesions / T. Opriessnig, I. Langohr // *Vet Pathol.* – 2013. – Vol. 50 (1). – P. 23-38.

130. Opriessnig, T. Experimental reproduction of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated enteritis in pigs infected with PCV2 alone or concurrently with lawsonia intracellularis or salmonella typhimurium / T. Opriessnig, D.M. Madson, M. Roof, S.M. Layton, S. Ramamoorthy, X.J. Meng, P.G. Halbur // *J. Comp. Pathol.* – 2011. – Vol. 145. – P. 261–270.

131. Opriessnig, T. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies / T. Opriessnig, X.J. Meng, P.G. Halbur // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* – 2007. - Vol. 19. - No. 6. - P. 591–615.

132. Opriessnig, T. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection / T. Opriessnig, S. Ramamoorthy, D.M. Madson, A.R. Patterson, N. Pal, S. Carman, X.J. Meng, P.G. Halbur // *J Gen Virol.* – 2008. – Vol. 89. – P. 2482-2491.

133. Opriessnig, T. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2 / T. Opriessnig, E.L. Thacker, S. Yu, M. Fenaux, X.J. Meng, P.G. Halbur // *Veterinary Pathology*. – 2004. - Vol. 41. - No. 6. - P. 624–640.

134. Ouyang, T. Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses / T. Ouyang, X. Zhang, X. Liu, L. Ren // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11(2). – P. 185.

135. Palinski, R. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure / R. Palinski, P. Pineyro, P. Shang, F. Yuan et al. // *J Virol*. – 2017. – Vol. 91. - e01879-16.

136. Palinski, R. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure/ R. Palinski, P. Pineyro, P. Shang, F. Yuan, R. Guo, Y. Fang, E. Byers, B.M. Hause. // *J Virol*. — 2017. — Vol. 1. — P. 16.

137. Piriou-Guzylack, L. Membrane markers of the immune cells in swine: an update / L. Piriou-Guzylack, H. Salmon // *Veterinary Research. BioMed Central*. – 2008. – Vol. 39(6). - P. 1-28.

138. Raev, S.A. Transmission of porcine circovirus genotype type 2 (PCV2) in Russia and genotype association (PCV2D) with porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) / S.A. Raev, A.G. Yuzhakov, K.P. Alekseev, L.V. Kostina, M.I. Gulyukin, T.V. Stepanova, A.D. Zaberezhniy, T.I. Aliper // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering Associations*. - 2019. – Vol. 315. – 042026.

139. Resendes, A.R. Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2 / A.R. Resendes, N. Majo, J. Segales, E. Mateu, M. Calsamiglia, M. Domingo // *J Gen Virol*. – 2004. – Vol. 85. – P. 2837-2844.

140. Resendes, A. Lack of an effect of a commercial vaccine adjuvant on the development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine

circovirus type 2 (PCV2) experimentally infected conventional pigs / A. Resendes, J. Segalés, M. Balasch, M. Calsamiglia, M. Sibila, H. Ellerbrok, E. Mateu, J. Plana-Duran, A. Mankertz, M. Domingo // *Vet Res.* – 2004. – Vol. 35. – P. 83-90.

141. Rosario, K. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus / K. Rosario, M. Breitbart, B. Harrach et al. // *Archives of Virology.* – 2017. - P. 1–17.

142. Rosell, C. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs / C. Rosell, J. Segales, J. Plana-Duran, M. Balasch, G.M. Rodriguez-Arriola, S. Kennedy, G.M. Allan, F. McNeilly, K.S. Latimer, M. Domingo // *J. Comp. Pathol.* – 1999. – Vol. 120. – P. 59–78.

143. Rosell, C. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome / C. Rosell, J. Segales, J. A. Ramos-Vara et al. // *Veterinary Record.* – 2000. - Vol. 146. - No. 2. - P. 40–43.

144. 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-Duran, C. Rosell, H. Ellerbrok, A. Mankertz, M. Domingo // *J Virol.* – 2002. – Vol. 76. – P. 3232-3239.

145. Saha, D. Single amino acid mutations in the capsid switch the neutralization phenotype of porcine circovirus 2 / D. Saha, et al. // *J. Gen. Virol.* – 2012. – Vol. 93. – P. 1548–1555.

146. Salogni, C. Infectious agents identified in aborted swine fetuses in a high-density breeding area: A Three-Year Study / C. Salogni, M. Lazzaro, E. Giacomini et al. // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* – 2016. - Vol. 28. - No. 5. – P. 550–554.

147. Sarli, G. Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) / G. Sarli, L. Mandrioli, M. Laurenti, L. Sidoli, C. Cerati, G. Rolla, P.S. Marcato // *Vet Immunol Immunopathol.* – 2001. – Vol. 83. – P. 53-67.

148. Segales, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis / J. Segales // *Virus Research*. - 2012. - Vol. 164. - No. 1-2. - P. 10–19.
149. Segales, J. Porcine circovirus diseases. Animal health research reviews / J. Segales, G.M. Allan, M. Domingo // *Conference of Research Workers in Animal Diseases*. – 2005. - Vol. 6. - No. 2. - P. 119–142.
150. Segales, J. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review / J. Segales, M. Domingo // *Veterinary Quarterly*. – 2002. – Vol. 24(3). – P. 109-124.
151. Segales, J. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs / J. Segales, M. Domingo, F. Chianini, N. Majo, J. Dominguez, L. Darwich, E. Mateu, // *Vet. Microbiol.* – 2004. – Vol. 98. – P. 151–158.
152. Segales, J. PCV-2 genotype definition and nomenclature / J. Segales, A. Olvera, L. Grau-Roma, C. Charreyre, H. Nauwynck, L. Larsen, K. Dupont, K. McCullough, J. Ellis, S. Krakowka, et al. // *Vet. Rec.* – 2008. – Vol.162. – P. 867–868.
153. Shao, L.Z. Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations/ L.Z. Shao, Z. Xia, Z. He, B.M. Hause, T. Lin, R. Liu, Q.L. Chen, W.K. Wei, et al. // *Virology*. — 2017. — Vol. 14. — P. 222.
154. Shi, R. Host immune response to infection with porcine circoviruses / R. Shi, L. Hou, J. Liu // *Animal Diseases*. – 2021. – Vol. 1(23).
155. Sinkora, M. Progress in the use of swine in developmental immunology of B and T lymphocytes / M. Sinkora, J.E. Butler // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2016. – Vol. 58. – P. 1-17.
156. 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 // *Veterinary Research*. – 2014. – Vol. 45(91).
157. Stafford, V.V. Second type of pigs' circovirus infection/ Stafford V.V. // *Russian journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. — 2017. — T. 65. — №5. — P. 306-309.



158. Stafford, V.V. Immunohistochemical Method for Detection PCV-2 Antigen in Pigs / V.V. Stafford, Y.B. Streltsova, A.D. Zaberezhny, T.I. Aliper, A.M. Gulyukin // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.- 2021. – T. 666. – P. 052017.

159. Stevenson, G.W. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors / G.W. Stevenson, M. Kiupel, S.K. Mittal, J. Choi, K.S. Latimer, C.L. Kanitz // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. -2001. - Vol. 13. - No. 1. - P. 57–62.

160. Tsai, G.T. Phylogeographic and genetic characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan from 2001–2017 / G.T. Tsai, Y.C. Lin, W.H. Lin, J.H. Lin, M.T. Chiou, H.F. Liu, C.N. Lin // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – 10782.

161. Tummaruk, P. Porcine circovirus type 2 expression in the brain of neonatal piglets with congenital tremor / P. Tummaruk, P. Pearodwong // Comparative Clinical Pathology. – 2016. - Vol. 25. - No. 4. – P. 727–732.

162. Vidigal, P.M.P. Tripping over emerging pathogens around the world: a phylogeographical approach for determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading / P.M.P. Vidigal, C.L. Mafra, F.M.F. Silva, J.L.R. Fietto, A. Silva Junior, M.R. Almeida // Virus Research. – 2012. - Vol. 163. - No. 1. - P. 320–327.

163. Vincent, I.E. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2 / I.E. Vincent, C.P. Carrasco, L. Guzylack-Piriou, B. Herrmann, F. McNeilly, G.M. Allan, A. Summerfield, K.C. McCullough // Immunology. – 2005. – Vol. 115. – P. 388-398.

164. Wellenberg, G.J. Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: A Case-Control Study / G.J. Wellenberg, N. Stockhofe-Zurwieden, M.F. De Jong, W.J.A., Boersma, A.R.W. Elbers // Veterinary Microbiology. – 2004. - Vol. 99. - No. 3-4. – P. 203–214.

165. West, K. H. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2 / K.H. West, J.M. Bystrom, C. Wojnarowicz, N.

Shantz, M. Jacobson, G.M. Allan, D.M. Haines, E.G. Clark, S. Krakowka, F. McNeilly, C. Konoby, K. Martin, J. A. Ellis // *J Vet Diagn Invest.* – 1999. – Vol. 11. – P. 530-532.

166. Wiederkehr, D.D. A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland / D.D. Wiederkehr, T. Sydler, E. Buergi, M. Haessig, D. Zimmermann, A. Pospischil, E. Brugnera, X. Sidler // *Vet. Microbiol.* – 2009. – Vol. 136. – P. 27–35.

167. Xiao, C.T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d / C.T. Xiao, P.G. Halbur, T. Opriessnig // *J. Gen. Virol.* – 2015. – Vol. 96. – P. 1830–1841.

168. Yang, X. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) in mosquitoes from pig farms by PCR / X. Yang, L. Hou, J. Ye, Q. He, S. Cao // *Pakistan Veterinary Journal.* – 2012. - Vol. 32. - No. 1. – P. 134–135.

169. Yuzhakov, A.G., First detection and full genome sequence of porcine circovirus type 3 In Russia / A.G. Yuzhakov, S.A. Raev, K.P. Alekseev, T.V. Grebennikova, O.A. Verkhovsky, A.D. Zaberezhny, T.I. Aliper // *Virus Genes.* - 2018. - T. 54. - № 4. - P. 608-611.

170. Zachary, J.F. Mechanisms of Microbial Infections / J.F. Zachary // *Pathologic Basis of Veterinary Disease.* - 2017. – P. 219-220.

171. Zhai, S.L. Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from china / S.L. Zhai, S.N. Chen, Z.Z. Wei, J.W. Zhang, L. Huang, T. Lin, et al. // *Virol. J.* – 2011. – Vol. 8. – P. 517.

172. Zhang, H.H. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus Hunan province, China / H. H. Zhang, W.Q. Hu, J.Yu Li, T.N. Liu, J.Y. Zhou, T. Opriessnig, C.T. Xiao // *Transbound Emerg Dis.* - 2019 – P. 1–5.

173. Zhou, N. In vitro coinfection and replication of classical swine fever virus and porcine circovirus type 2 in pk15 cells / N. Zhou, G. Xing, J. Zhou, Y. Jin, C. Liang, J. Gu, B. Hu, M. Liao, Q. Wang, J. Zhou // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10. - e0139457.

174. Интернет-сайт Professional Pig Community (Испания) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://www.pig333.com/articles/diagnosis-of-pcv2-related-diseases-a-matter-of-order\\_7996](https://www.pig333.com/articles/diagnosis-of-pcv2-related-diseases-a-matter-of-order_7996).

175. Интернет-сайт International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/circoviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/circoviridae).

176. Интернет-сайт Beckman Coulter Life Sciences [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.mybeckman.ru/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits>.

## 12 ПРИЛОЖЕНИЯ

## Приложение 1 – Патент



Приложение 2 – Методическое указание

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

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Секции  
зоотехнии и ветеринарии  
отделения сельскохозяйственных наук РАН  
академик РАН

В.В. Калачников

  
«15» апреля 2018г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЦИРКОВИРУСНОЙ БОЛЕЗНИ  
СВИНЕЙ 2 ТИПА