

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

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

Научный руководитель – кандидат биологических наук
Стаффорд Виктория Васильевна

Официальные оппоненты:

Груздев Константин Николаевич – доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», главный научный сотрудник информационно-аналитического центра.

Матвеева Ирина Николаевна – доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», заведующая отделом молекулярной биологии и вирусологии.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина».

Защита состоится «___» _____ 2024 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.1.249.01, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской Академии Наук» по адресу: 109428, г. Москва, ул. Рязанский проспект, д.24, к.1., тел.: 8(945)970-03-68.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор ветеринарных наук, профессор

Найманов А.Х.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Свиноводство - одна из самых развитых отраслей сельскохозяйственного сектора экономики Российской Федерации и многих стран мира (Бутенков А.И., 2010; Орлянкин Б.Г., 2002). Интенсификация свиноводства зачастую сопровождается негативными последствиями, связанными с распространением инфекционных болезней, что приводит к появлению новых неблагополучных пунктов (Оганесян А.С., 2009; Орлянкин Б.Г., 2005; Стаффорд В.В., 2018; Afolabi К.О., 2017).

Согласно литературным данным, цирковирусная болезнь свиней (ЦВБС) имеет статус одной из самых распространенных в мире (Орлянкин Б.Г., 2002; Орлянкин Б.Г., 2002; Karuprannan А.К., 2017). Об этом свидетельствует уровень серопозитивности свиней, составляющий 20-80%, а также высокая заболеваемость до 60% и смертность в пределах 3-10% (Afolabi К.О., 2017).

Цирковирусной 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 (Прудников С.И., 2010; Karuprannan А.К., 2011; Segales J., 2005; Stafford V.V., 2017).

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 (Albina E., 2001; Allan G.M., 1999; Karuprannan А.К., 2017). 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 (Harms P.A., 2001; Karuprannan А.К., 2017; Opriessnig T., 2004; Opriessnig T., 2012; Opriessnig T., 2011; Ouyang T., 2019).

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 (URL: <https://www.pig333.com>). 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 (Стаффорд В.В., 2022; Opriessnig T., 2013; Shi R., 2021; Sinkora M., 2016). 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 (Андреев Д.А., 2008; Piriou-Guzylack L., 2008; Resendes A.R., 2004).

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 (Бутенков А.И., 2010; Орлянкин Б.Г., 2005). Особое внимание было уделено мониторингу болезни, включая генотипирование ЦВС-2 и филогенетический анализ изолятов вируса (Булгаков А.Д., 2014). В результате выполненных исследований российскими учеными был получен рекомбинантный капсидный белок С ЦВС-2 и моноклональные антитела (МАТ) к нему (Раев С.А., 2012). 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» (Козлов А.Ю., 2013; Раев С.А., 2014; Раев С.А., 2015).

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 (Андреев Д.А., 2008). 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 широкие 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 цирковирусной инфекции свиней второго типа прямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител».

Разработаны методические указания «Имуногистохимическая диагностика цирковирусной болезни свиней 2 типа», утвержденные секцией зоотехнии и ветеринарии отделения сельскохозяйственных наук РАН от 15.03.2018. 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».

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 цирковирусной инфекции свиней второго типа прямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител», 1 методическое указание «Имуногистохимическая диагностика цирковирусной 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.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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. Для проведения исследований было отобрано более 600 образцов патологического материала от свиней разных технологических групп из свиноводческих хозяйств Московской, Новосибирской, Кемеровской, Липецкой, Тамбовской и Белгородской областей.

Антитела, использованные в ИГХ реакции: МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2 (АНО «НИИ ДПБ», Россия), МАТ мыши к маркеру CD3, CD4, CD8, CD14, CD20 человека (ООО «Сорбент», Россия), поликлональные антивидовые антитела Donkey Anti-Mouse IgG Antibody, HRP conjugate (Sigma-Aldrich, США).

1. ПЦР-РВ и непрямой ИФА

Исследование 101 пробы сыворотки крови методом 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. Для ПЦР-РВ использовали набор - «Тест-система для обнаружения ЦВС-2 методом ПЦР-РВ» (ООО «Ветбиохим», Россия). Для ИФА использовали набор «ЦИРКО-СЕРОТЕСТ» (ООО «Ветбиохим», Россия).

2. Изготовление гистологических препаратов

Гистологические срезы изготавливали с помощью роторного микротомы Microm HM 325 (Thermo Scientific, Германия). Толщина готовых срезов составляла 5-6мкм. Окрашивание срезов гематоксилин-эозином выполняли в автоматической линейной установке Microm HMS 70 (Thermo Scientific, Германия). Для определения возраста фибрина в тканях, использовали готовый коммерческий набор «Окраска для выявления возраста фибрина» (БиоВитрум, Россия).

3. Криотомия нативного патологического материала

Нативные гистологические срезы получали с помощью криостата Microm HM 525 (Thermo Scientific, Германия) при температуре -34⁰С. Толщина срезов составляла 5-10мкм.

4. 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. Все этапы разработки метода подробно представлены в пункте 3.1.2 диссертации.

5. Непрямой метод иммуногистохимического исследования с целью идентификации иммунокомпетентных клеток в органах свиней

Для разработки непрямого метода ИГХИ с целью идентификации макрофагов и основных популяций лимфоцитов 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 (Андреев Д.А., 2008; Dawson H.D., 2018; Faldyna M., 2007); высокой экспрессией данных маркеров исследуемыми популяциями клеток у свиней (Shi R., 2021; Sinkora M., 2016). Подбор условий для выполнения исследования подробно представлен в пункте 3.1.2 диссертации.

6. 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; Δk – 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 иммунокомпетентных клеток в срезах органов, рассчитывали по формуле средней арифметической простой (3) и среднего линейного отклонения (4):

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

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

Где: L_{cp} – среднее количество антигенпозитивных лимфоцитов в срезе; n – количество исследованных полей; Li – количество антигенпозитивных лимфоцитов на 1 поле зрения среза; Δl – среднее линейное отклонение

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Лабораторная диагностика цирковирусной инфекции в исследуемых свиноводческих хозяйствах

Анализ клинико-морфологических данных из свиноводческих хозяйств 6-ти субъектов РФ, показал, что клиническая картина свойственная ЦВБС, наблюдалась во всех обследованных хозяйствах, за исключением хозяйства из Московской области, в котором у не привитых от ЦВБС поросят-отъемышей отсутствовали клинические признаки инфекции. Признаки у поросят-сосунов в возрасте до 40 дней и отъемышей (40-120 дней) соответствовали СПМИ. У свиноматок (280-560 дней) проявлялась картина репродуктивной патологии. Среди откормочного поголовья в возрасте 120-180 дней выявлены свиньи с признаками СДНП. При этом у свиной 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.

Исследование 101 пробы сыворотки крови методом ПЦР-РВ, показало, что 26,7% были положительными. Наибольшее количество положительных результатов обнаружено среди поросят-отъемышей, подтверждая, что наиболее часто ЦВБС проявляется СПМИ, который наблюдают у поросят до 120 дневного возраста.

Исследование 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.

Патологоанатомические изменения в органах при спонтанной цирковирусной инфекции

При патологоанатомическом исследовании материала обнаружено, что у поросят-отъемышей, аналогично откормочным свиньям, была выявлена кардиомегалия. Поверхность перикарда по всей площади неравномерно покрыта шероховатой неотделяемой пленкой розово-красного цвета, на разрезе стенки желудочков сердца незначительно гипертрофированы (рисунок 1А). Изменения в селезенке были найдены среди всех технологических групп свиной. Поверхность органа была насыщенно буровато-красного цвета, а по краям присутствовали светлые участки округлой формы, которые проникали в паренхиму селезенки (рисунок 1Б). Макроскопические изменения в паховых и бронхиальных лимфатических узлах также выявлены у свиной всех технологических групп. Лимфатические узлы были увеличенными, плотной консистенцией, поверхность была покрыта плотной оболочкой, под которой присутствовали обширные кровоизлияния сине-красного цвета. На разрезе обнаружены

разлитые участки кровоизлияний. При надавливании с поверхности среза выделялась буро-красная вязкая жидкость (рисунок 1В).



Рисунок 1 – А. Сердце инфицированного поросенка-отъемыша. Поверхность перикарда; Б. Селезенка инфицированного поросенка-отъемыша. Светлые участки на поверхности органа (черные кружочки) В. Паховый лимфатический узел инфицированного поросенка-отъемыша. Поверхность органа

Почки поросят-сосунов и поросят-отъемышей были анатомически правильной формы, размер органа соответствовал норме, консистенция упругая. По большой кривизне на поверхности органа выявлены обширные кровоизлияния, проникающие в корковый слой (рисунок 2А). У откормочных свиней выявили значительное увеличение в размере и дряблую консистенцию почек, поверхность органа буро-коричневого цвета. На разрезе обнаружены петехиальные кровоизлияния в корковом и мозговом веществе, сконцентрированные в почечных пирамидах и их сосочках (рисунок 2Б). 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 были полнокровным с крупными очагами белого цвета. Цвет ткани местами переходил от красного до насыщенно темно-бордового. При нажатии на легкое из бронхиол выделялся тягучий бело-желтый экссудат (рисунок 2В).

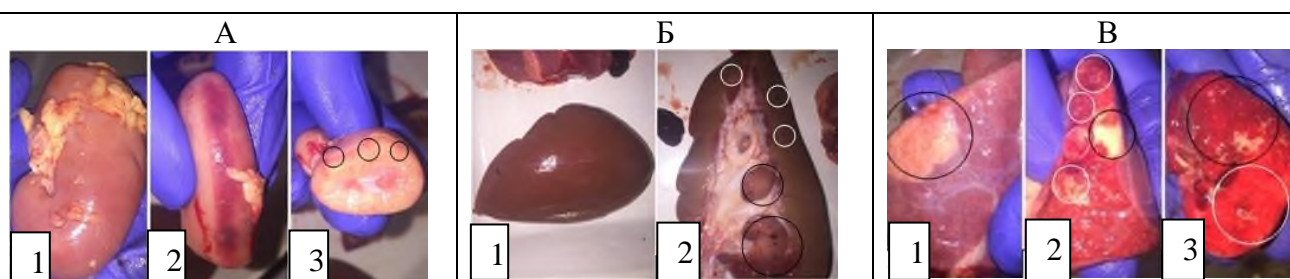


Рисунок 2 – А. Почки инфицированного поросенка-отъемыша. 1. Поверхность. 2. Кровоизлияние по большой кривизне. 3. Кровоизлияния под капсулой (отмечено черными кружочками); Б. Почки инфицированной откормочной свиньи. 1. Поверхность. 2. Кровоизлияния в почечных пирамидах (черные кружочки); Петехии в корковом веществе (белые кружочки); В. Легкое инфицированного поросенка-отъемыша. 1. Поверхность легкого с участком здоровой ткани (черный кружочек). 2. Кровоизлияния на разрезе легкого (белые кружочки) и очаг белого цвета в паренхиме и интерстиции (черный кружочек). 3. Участки обширного кровоизлияния (черный кружочек), граничащие с нормальной легочной тканью (белый кружочек)

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

Гистологические изменения в органах при естественном инфицировании цирковирусом свиней второго типа

Признаки некротизирующего спленита были выявлены в гистологических срезах селезенки от поросят-сосунов, поросят-отъемышей, откормочного поголовья и свиноматок (рисунок 3). Обнаружен отек красной и белой пульпы. 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 3А). На рисунке 3Б показан отек периваскулярной и периневральной соединительной ткани, а также разрастание стромы селезенки.



Рисунок 3 – Селезенка инфицированного поросенка-отъемыша. 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 миокардита и фибринозного перикардита выявлены в гистологических срезах сердца от поросят-отъемышей и откормочных свиней (рисунок 4). В структуре и на поверхности эпикарда обнаружили оксифильно окрашенные однородные образования неправильной формы. Эпикард утолщенный, с признаками лимфоцитарной инфильтрации (рисунок 4А). В стенке миокарда и в пространстве между его волокнами присутствовала мелкоочаговая лимфоцитарная инфильтрация и фокусные скопления эритроцитов (рисунок 4Б). Для выяснения природы оксифильно окрашенных масс в структуре эпикарда, выполнили окрашивание ткани на фибрин, которое показало, что на поверхности висцерального листка перикарда присутствуют скопления волокон фибрина (рисунок 4В).

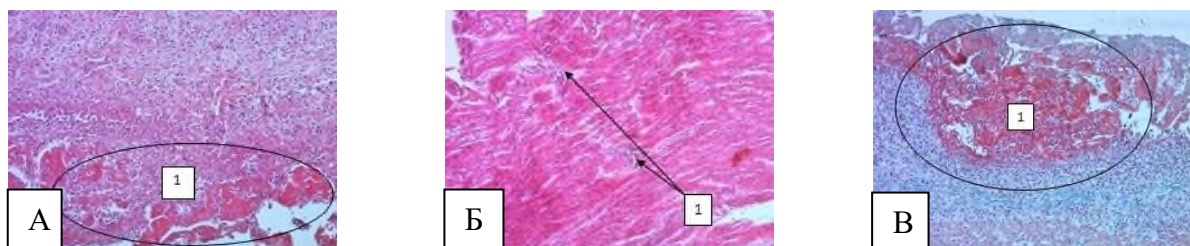


Рисунок 4 – Сердце инфицированного поросенка-отъемыша. А. Эпикард. 1- оксифильно окрашенные отложения; Б. Миокард. 1 – скопления эритроцитов и лимфоцитов в межтканевом пространстве. Гематоксилин и эозин; В. Эпикард. 1 - скопления зрелого фибрина, 6-18 часов с момента образования. Окраска на выявление фибрина. Ув. 100

При исследовании почек поросят-сосунов и поросят-отъемышей обнаружена разволокненная капсула органа, а предлежащая к ней паренхима в состоянии отека с признаками лимфоцитарной инфильтрации. В корковом слое найдены частично разрушенные почечные канальцы (рисунок 5А). Также в корковом веществе выявили отек периваскулярной соединительной ткани, а в пространстве сосудов наблюдали частично отслоившийся эндотелий и единичные лимфоидные клетки. Структура почечных телец плохо дифференцировалась,

просвет капсулы Шумлянско-Боумена был расширен (рисунок 5Б). В корковом веществе почек откормочных свиней выявили большое количество извитых канальцев с тотальным некрозом эпителия, частично сохранившейся базальной мембраной и остатками ядер эпителиальных клеток в виде пыли или скопления оксифильно окрашенного вещества в просветах (рисунок 5В). Вышеперечисленные изменения характерны для гломерулонефрита и нефропатии.

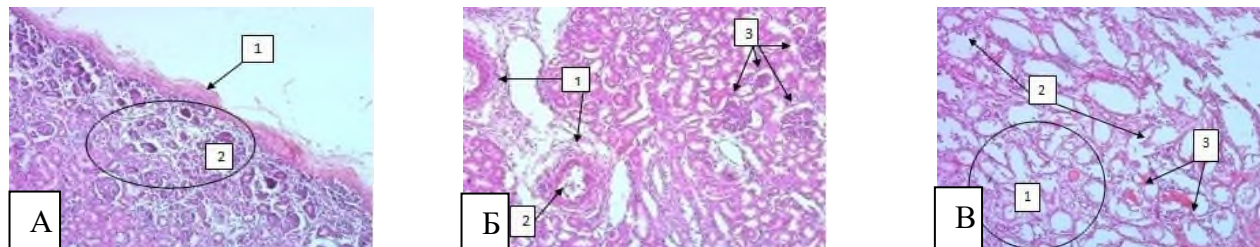


Рисунок 5 – А. Почка инфицированного поросенка-отъемыша. 1 – капсула органа, 2 – разрушенные почечные канальцы; Б. 1 – отек периваскулярной соединительной ткани, 2 – отслоение эндотелия в просвет артериального сосуда, 3 – почечные тельца; В. Почка инфицированной откормочной свиньи. 1 – некроз эпителия канальцев, 2 – остатки ядер эпителиальных клеток, 3 – оксифильное вещество в просвете канальцев. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

Признаки характерные для геморрагической пневмонии, а также катарального бронхита с бронхообструкцией и ателектазом, были обнаружены в гистологических срезах легких от поросят-сосунов, поросят-отъемышей и откормочных свиней (рисунок 6). В легких выявлены множественные крупные участки ателектаза, в просвете альвеол и утолщенных межальвеолярных перегородках присутствовал геморрагический экссудат. Венозные сосуды в ткани находились в состоянии гиперемии. Слизистая оболочка и подслизистая основа бронха в состоянии отека, а в просвете были найдены разрушенные клетки эпителия и лейкоциты (рисунок 6А). В ткани, предлежащей к вышеописанному участку, обнаружена альвеолярная эмфизема (рисунок 6Б). Дополнительно гистологическая картина в легких характеризовалась гиперплазией перибронхиальной лимфоидной ткани, которая привела к сужению просвета бронхов и ателектазу близлежащих альвеол (рисунок 6В).

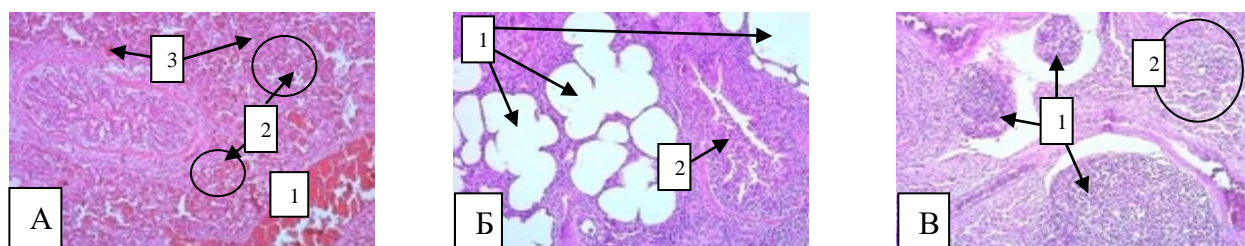


Рисунок 6 – Легкое инфицированного поросенка-отъемыша. А. 1 – гиперемизированный венозный сосуд, 2 – ателектаз, 3 – геморрагический экссудат в просвете альвеол; Б. 1 – участки эмфиземы, 2 – остатки эпителия и лейкоциты в просвете бронха. В. 1 – гиперплазия перибронхиальной лимфоидной ткани, 2 – ателектаз. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

Гистологическая картина паховых лимфатических узлов характеризовалась наличием мультифокальных кровоизлияний в корковом веществе и паракортикальном слое органа. Обнаружены нарушения структуры лимфоидных фолликулов, связанные с разжижением клеточного состава вследствие отека ткани, сдавливанием клеток и массовой гибелью лимфоцитов (рисунок 7А). Исследование бронхиальных лимфатических узлов показало наличие некротических участков в корковом веществе органа. Выявили как слияние нескольких

лимфоидных фолликулов, так и тотально разрушенные фолликулы. В паракортикальной зоне были обнаружены мультифокальные кровоизлияния и обширные участки некроза (рисунок 7Б). Данные изменения свойственны геморрагическому и некротическому лимфадениту.



Рисунок 7 – А. Паховый лимфатический узел инфицированной откормочной свиньи. 1 – кровоизлияния в паренхиме, 2 – первичные лимфоидные фолликулы; Б. Бронхиальный лимфатический узел инфицированного поросенка-отъемыша. 1 – некроз паракортикальной зоны, 2 – мультифокальные кровоизлияния. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

Оценка гистологических изменений показала, что генерализация цирковиральной инфекции в организме свиней может способствовать развитию полиорганной недостаточности.

Выявление антигена цирковирала второго типа прямым методом иммуногистохимического исследования

В результате выполненной работы был разработан прямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши 6h12 для выявления АГ ЦВС-2 в нативных гистологических срезах согласно протоколу, представленному в пункте 4.4 диссертации. При оценке результатов исследования антигенпозитивные клетки распознавали по окрашиванию мембраны или цитоплазмы хромогеном в красно-коричневый цвет на светооптическом уровне. При интерпретации результатов положительным результатом считается обнаружение двух и более антигенпозитивных клеток в одном гистологическом срезе органа (Opriessnig T., 2007).

На рисунке 8А представлен положительный результат 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 присутствует специфическое красно-коричневое окрашивание хромогеном. Из 101 исследованного гистологического препарата легкого, 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, где не обнаружено специфическое окрашивание, что является отрицательным результатом (рисунок 8Б).



Рисунок 8 – Результат прямой ИГХ реакции. А. Легкое инфицированного поросенка-отъемыша. 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 обнаружен в срезах органа от поросят-сосунов (2 головы), поросят-отъемышей (20 голов), откормочного поголовья (17 голов) и свиноматок (2 головы). На рисунке 9А показан положительный результат прямой ИГХ реакции в срезе пахового лимфатического узла. Отрицательный результат представлен на рисунке 9Б. Из 101 исследованного препарата бронхиального лимфатического узла свиней разных технологических групп, положительный результат был выявлен в срезах органа поросят-сосунов (4 головы), поросят-отъемышей (24 головы), откормочного поголовья (13 голов) и свиноматок (2 головы). На рисунке 9В показан положительный результат прямой ИГХ реакции в срезе бронхиального лимфатического узла инфицированного поросенка-отъемыша.

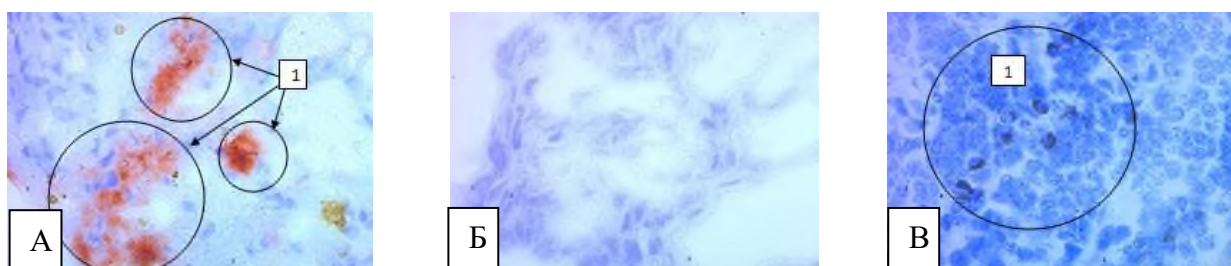


Рисунок 9 – Результат прямой ИГХ реакции. А. Паховый лимфатический узел инфицированной откормочной свиньи. 1 – Положительная реакция; Б. Паховый лимфатический узел интактного поросенка-отъемыша. Отрицательный результат; В. Бронхиальный лимфатический узел инфицированного поросенка-отъемыша. 1- Положительная реакция. Гематоксилин Майера. Ув. 630

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

Для статистической оценки результатов был проведен подсчет среднего количества антигенпозитивных клеток в цитоплазме и на мембране которых обнаружено специфическое окрашивание хромогеном. Формулы расчета представлены в разделе материалы и методы (п. 6) автореферата.

При анализе результатов, полученных 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 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 1.

Таблица 1 – Среднее число антигенпозитивных клеток в одном гистологическом срезе органа

| Исследуемые свиньи | Среднее количество антигенпозитивных клеток | | | | |
|------------------------|---|------------------------------|--------|-------|-----------|
| | Легкое | Л/у (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 1 данных, следует, что в результате прямой ИГХ реакции, среднее количество антигенпозитивных клеток в одном срезе легкого составляет $5,64 \pm 0,91$. В одном срезе пахового и/или бронхиального лимфатического узла количество антигенпозитивных клеток незначительно отличается от результатов, полученных в срезах легкого, и составляет $5,99 \pm 0,86$. 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 у 30 из 41 головы (73,2%), откормочных свиней - 17 из 30 голов, 70% соответственно. Среди свиноматок АГ ЦВС-2 в органах выявлен у 4 голов из 10 (40%).

Идентификация лимфоцитов и макрофагов в органах свиней непрямым методом иммуногистохимического исследования

В результате проделанной работы был разработан непрямым метод ИГХИ на основе МАТ мыши к CD маркерам иммунокомпетентных клеток человека для идентификации лимфоцитов и макрофагов в нативных гистологических срезах органов свиней, согласно протоколу, представленному в разделе 4.5 диссертации. При оценке результатов исследования антигенпозитивные клетки распознавали по окрашиванию мембраны и цитоплазмы хромогеном в красно-коричневый цвет на светооптическом уровне. Результат непрямого ИГХ реакции для идентификации $CD3^+$ Т-лимфоцитов в срезах бронхиальных лимфатических узлов и легких поросят-отъемышей представлен на рисунке 10.

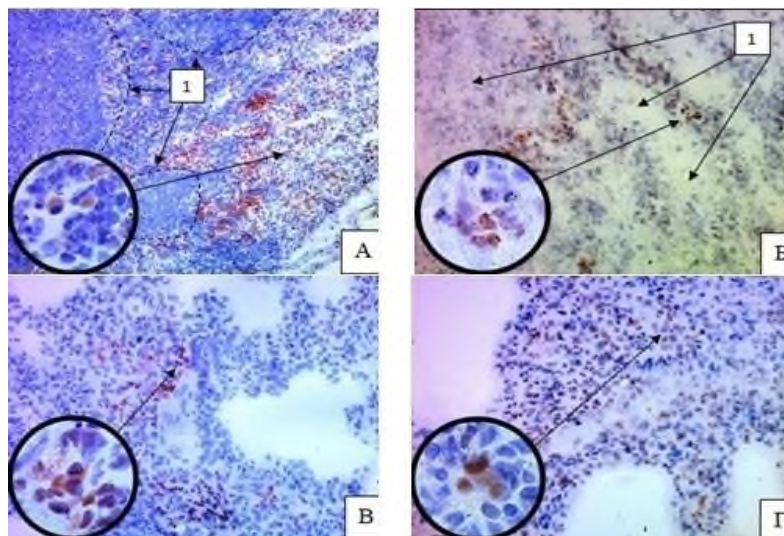


Рисунок 10 – Результат непрямого ИГХ реакции. А. Бронхиальный лимфатический узел интактного поросенка. $CD3^+$ Т-лимфоциты в паракортикальной зоне (ув. 100, 630); Б. Бронхиальный лимфатический узел поросенка, естественно инфицированного ЦВС-2. $CD3^+$ Т-лимфоциты в паракортикальной зоне. 1- участки некроза (ув. 200, 630); В. Легкое интактного поросенка. $CD3^+$ Т-лимфоциты в паренхиме; Г. Легкое инфицированного поросенка. $CD3^+$ Т-лимфоциты в паренхиме. Гематоксилин Майера. Ув. 200 и 630

На рисунке 10А представлен срез бронхиального лимфатического узла интактного 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 паракортикальной зоне бронхиального лимфатического узла инфицированного поросенка-отъемыша, 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 (рисунок 10Б). Подсчетом антигенпозитивных клеток, установили, что среднее количество $CD3^+$ Т-лимфоцитов в одном поле зрения (ув. х630) среза бронхиального лимфатического узла 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 4,04 раза ниже аналогичного показателя интактных особей.

На рисунке 10В показан срез легкого интактного 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 специфическое красно-коричневое окрашивание (рисунок 10Г). Подсчет антигенпозитивных клеток, показал, что среднее количество $CD3^+$ Т-лимфоцитов в одном поле зрения (ув. х630) среза легкого 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 1,14 раз больше аналогичного показателя интактных животных.

Результат непрямой ИГХ реакции для идентификации $CD4^+$ Т-хелперов в срезах бронхиальных лимфатических узлов и легких поросят-отъемышей показан на рисунке 11.

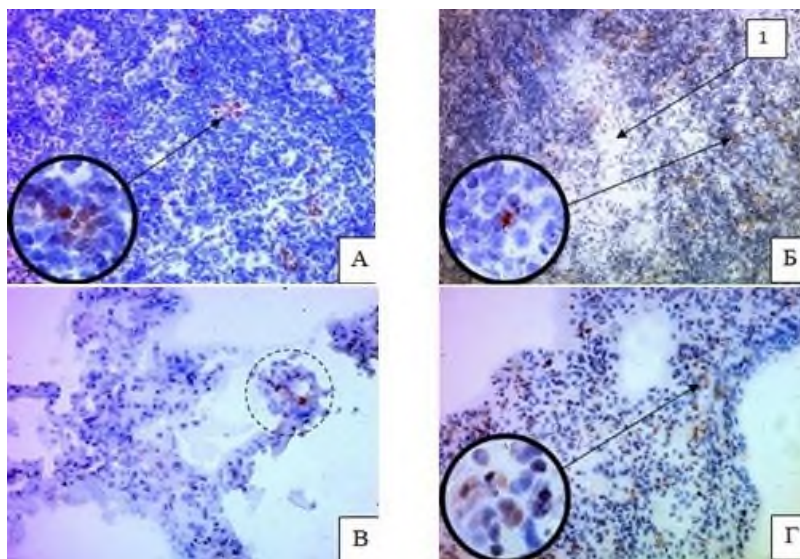


Рисунок 11 – Результат непрямой ИГХ реакции. А. Бронхиальный лимфатический узел интактного поросенка. $CD4^+$ Т-хелперы в паракортикальной зоне; Б. Бронхиальный лимфатический узел поросенка, естественно инфицированного ЦВС-2. $CD4^+$ Т-хелперы в паракортикальной зоне. 1- участок некроза; В. Легкое интактного поросенка. $CD4^+$ Т-хелперы в паренхиме и интерстиции; Г. Легкое инфицированного поросенка. $CD4^+$ Т-хелперы в паренхиме. Гематоксилин Майера. Ув. 200 и 630

На рисунке 11А представлен срез бронхиального лимфатического узла интактного поросенка-отъемыша. В паракортикальной зоне антигенпозитивные $CD4^+$ Т-хелперы были расположены небольшими группами. Специфическое красно-коричневое окрашивание цитоплазмы и мембраны антигенпозитивных клеток было разной интенсивности, что связано с концентрацией рецептора $CD4^+$. Т-хелперы с интенсивным окрашиванием обладают высокой концентрацией рецептора $CD4^+$, а со слабым – низкой. У поросенка-отъемыша, естественно инфицированного ЦВС-2, в паракортикальной зоне органа обнаружили обширный участок некроза. В окружающей ткани выявили единично расположенные антигенпозитивные $CD4^+$ Т-

хелперы (рисунок 11Б). Среднее количество $CD4^+$ Т-хелперов в одном поле зрения (ув. $\times 630$) среза бронхиального лимфатического узла 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 5,57 раза меньше аналогичного показателя интактных животных.

На рисунке 11В показан срез легкого интактного 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 (рисунок 11Г). Среднее количество $CD4^+$ Т-хелперов в одном поле зрения (ув. $\times 630$) среза легкого 5 голов инфицированных поросят-отъемышей 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 12.

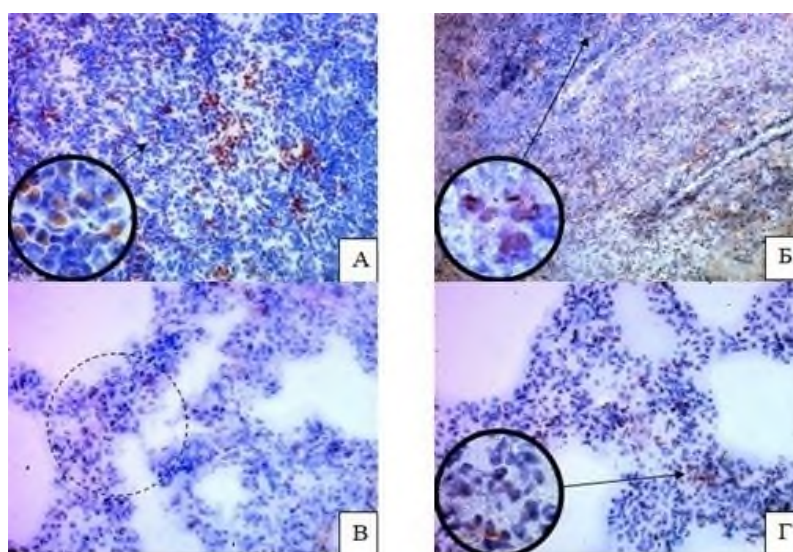


Рисунок 12 – Результат непрямой ИГХ реакции. А. Бронхиальный лимфатический узел интактного поросенка. $CD8^+$ Т-клетки в паракортикальной зоне (ув. 200, 630); Б. Бронхиальный лимфатический узел инфицированного поросенка. $CD8^+$ Т-клетки в паракортикальной зоне (ув. 100, 630); В. Легкое интактного поросенка. $CD8^+$ Т-клетки в паренхиме; Г. Легкое поросенка, естественно инфицированного ЦВС-2. $CD8^+$ Т-клетки в паренхиме. Гематоксилин Майера. Ув. 200 и 630

На рисунке 12А представлен срез бронхиального лимфатического узла интактного поросенка-отъемыша, где в паракортикальной зоне мультифокально расположены группы антигенпозитивных $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток. В паракортикальной зоне бронхиального лимфатического узла инфицированного поросенка-отъемыша выявили антигенпозитивные $CD8^+$ цитотоксические Т-клетки без патологий, а также неспецифически окрашенные патологически измененные Т-клетки (рисунок 12Б). Подсчетом антигенпозитивных клеток, установили, что среднее количество $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток в одном поле зрения (ув. $\times 630$) среза бронхиального лимфатического узла 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 3,13 раз ниже аналогичного показателя интактных поросят.

На рисунке 12В показан срез легкого интактного поросенка-отъемыша, где единично расположены цитотоксические Т-клетки. В срезе легкого инфицированного поросенка-отъемыша в паренхиме выявили антигенпозитивные $CD8^+$ цитотоксические Т-клетки с

интенсивным внутрицитоплазматическим окрашиванием (рисунок 12Г). Подсчетом антигенпозитивных клеток, установили, что среднее количество $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток в одном поле зрения (ув. $\times 630$) среза легкого 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 1,04 раза больше аналогичного показателя интактных поросят.

Результат непрямого ИГХ реакции для идентификации $CD20^+$ В-лимфоцитов в срезах бронхиальных лимфатических узлов и легких поросят-отъемышей представлен на рисунке 13.

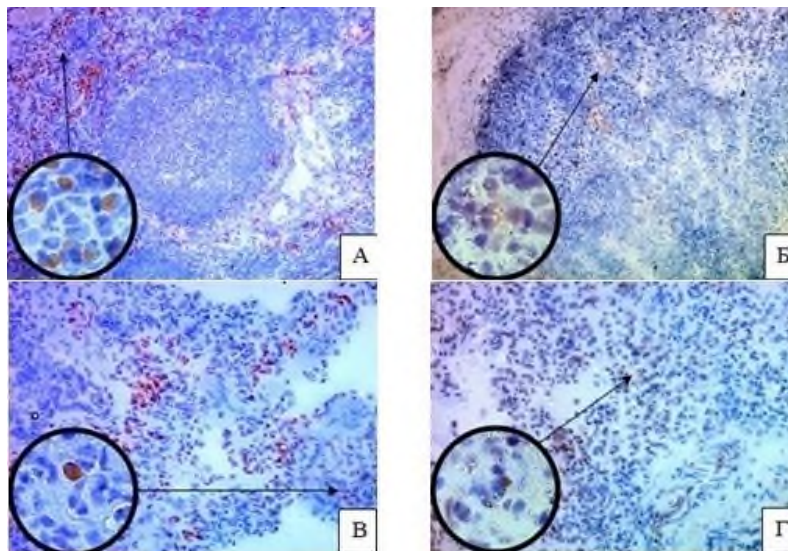


Рисунок 13 – Результат непрямого ИГХ реакции. А. Бронхиальный лимфатический узел интактного поросенка. $CD20^+$ В-лимфоциты в корковой и паракортикальной зоне (ув. 100, 630); Б. Бронхиальный лимфатический узел поросенка, естественно инфицированного ЦВС-2. $CD20^+$ В-лимфоциты в корковой и паракортикальной зоне; В. Легкое интактного поросенка. $CD20^+$ В-лимфоциты в паренхиме; Г. Легкое инфицированного поросенка. $CD20^+$ В-лимфоциты в паренхиме. Гематоксилин Майера. Ув. 200 и 630

На рисунке 13А представлен срез бронхиального лимфатического узла интактного поросенка-отъемыша, в котором обнаружены антигенпозитивные $CD20^+$ 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 $CD20^+$ В-лимфоциты, на поверхности и в цитоплазме которых обнаружено не интенсивное специфическое окрашивание. Также единичные антигенпозитивные В-лимфоциты выявлены в паракортикальной зоне и мозговом веществе органа (рисунок 13Б). Подсчет антигенпозитивных клеток, показал, что среднее количество $CD20^+$ В-лимфоцитов в одном поле зрения (ув. $\times 630$) среза бронхиального лимфатического узла 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 6,77 раз ниже аналогичного показателя интактных животных.

На рисунке 13В показан срез легкого интактного поросенка-отъемыша, в котором, цитоплазма антигенпозитивных $CD20^+$ В-лимфоцитов ярко окрашена хромогеном в красно-коричневый цвет. В паренхиме легкого инфицированного поросенка-отъемыша выявлены единичные антигенпозитивные $CD20^+$ В-лимфоциты, а также В-клетки в состоянии некроза (рисунок 13Г). Среднее количество $CD20^+$ В-лимфоцитов в одном поле зрения (ув. $\times 630$) среза

легкого 5 голов инфицированных поросят-отъемышей в 2,11 раз меньше аналогичного показателя интактных поросят.

Результат не прямой ИГХ реакции для идентификации CD14⁺ макрофагов в срезах бронхиальных лимфатических узлов и легких поросят-отъемышей продемонстрирован на рисунке 14.

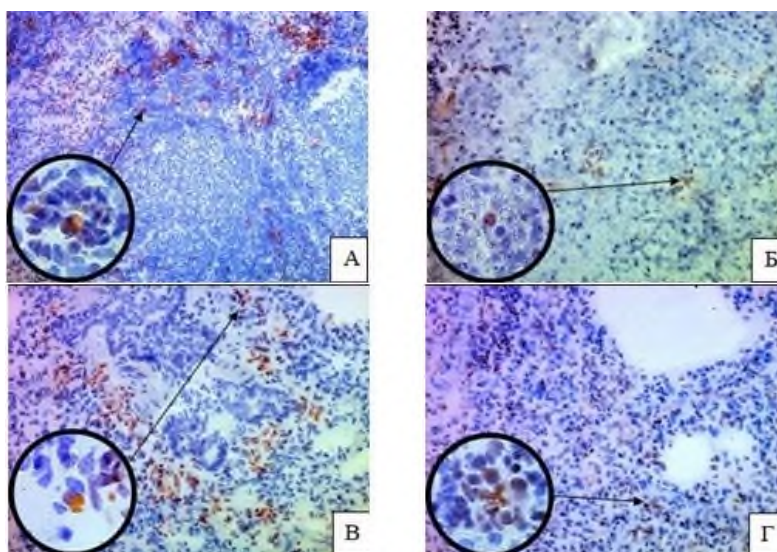


Рисунок 14 – Результат не прямой ИГХ реакции. А. Бронхиальный лимфатический узел интактного поросенка. CD14⁺ макрофаги в корковой и паракортикальной зоне (ув. 100, 630); Б. Бронхиальный лимфатический узел инфицированного поросенка. CD14⁺ макрофаги в корковой и паракортикальной зоне; В. Легкое интактного поросенка. CD14⁺ макрофаги в паренхиме; Г. Легкое инфицированного поросенка. CD14⁺ Макрофаги в паренхиме. Гематоксилин Майера. Ув. 200 и 630

На рисунке 14А представлен срез бронхиального лимфатического узла интактного 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⁺ макрофаги в цитоплазме которых, присутствовало специфическое окрашивание (рисунок 14Б). Среднее количество CD14⁺ 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 14В показан срез легкого интактного поросенка-отъемыша, где антигенпозитивные макрофаги сконцентрированы в стенках альвеол, перибронхиальной и периваскулярной соединительной ткани. В срезе легкого инфицированного поросенка-отъемыша в паренхиме обнаружили CD14⁺ макрофаги, на мембране и в цитоплазме которых выявлено специфическое красно-коричневое окрашивание (рисунок 14Г). Среднее количество CD14⁺ 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 выполняли подсчетом антигенпозитивных клеток в срезах в 15 полях зрения под увеличением микроскопа в 630 раз. Считали только клетки без патологии, неспецифическое окрашивание не учитывали. Формулы для расчета представлены в разделе материалы и методы (п. 6) автореферата.

На рисунке 15 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).

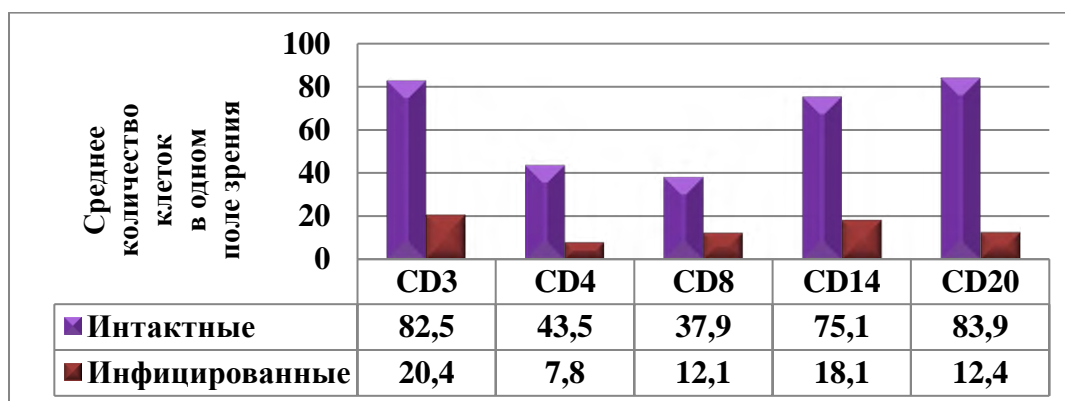


Рисунок 15 – Соотношение показателей макрофагов и основных популяций лимфоцитов в срезе бронхиального лимфатического узла исследованных поросят-отъемышей

Согласно данным, представленным на рисунке 15, у интактных поросят-отъемышей среднее количество исследованных лимфоцитов и макрофагов, из расчета на одно поле зрения среза бронхиального лимфатического узла, выше, чем у инфицированных поросят-отъемышей, что отражает супрессивное действие ЦВС-2 на иммунокомпетентные клетки в тканях данного органа.

На рисунке 16 показано соотношение показателей исследованных популяций лимфоцитов и макрофагов в одном поле зрения среза легкого интактных (5 голов) и инфицированных поросят-отъемышей (5 голов).

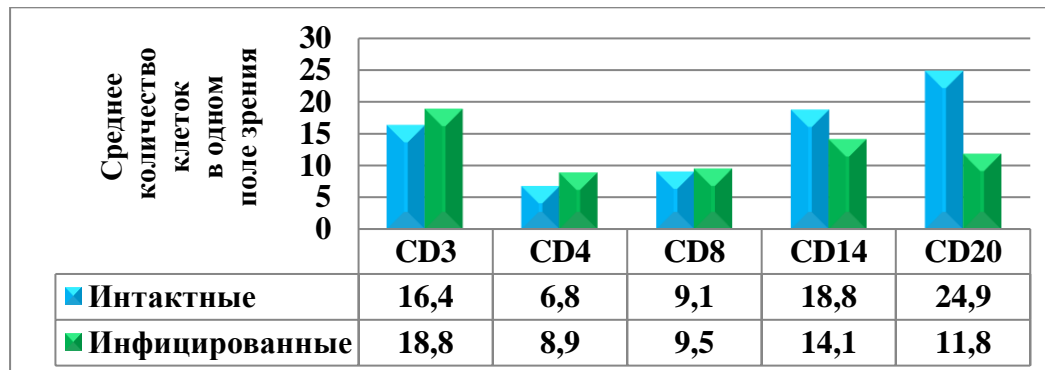


Рисунок 16 – Соотношение показателей макрофагов и основных популяций лимфоцитов в срезе легкого исследованных поросят-отъемышей

По данным, представленным на рисунке 16, в одном поле зрения среза легкого интактных поросят-отъемышей среднее количество $CD20^+$ В-лимфоцитов и $CD14^+$ макрофагов больше, чем у инфицированных поросят-отъемышей, что указывает на супрессивное действие вируса на эти популяции клеток в органе. Среднее количество $CD3^+$ Т-лимфоцитов, включая $CD4^+$ Т-хелперы и $CD8^+$ цитотоксические Т-клетки, наоборот, выше у инфицированных поросят-отъемышей, что обусловлено активацией локального Т-клеточного иммунного ответа.

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» и разработаны методические указания «Иммуногистохимическая диагностика цирковирусной болезни свиней 2 типа», утвержденные секцией зоотехнии и ветеринарии отделения сельскохозяйственных наук РАН от 15.03.2018.

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

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.

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.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Разработанный прямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши 6h12 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.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

1. * **Патент РФ 2695330.** Способ диагностики цирковирусной инфекции свиней второго типа прямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител/ В.В. Стаффорд, С.А. Раев, Л.В. Костина, А.Ю. Козлов, **Я.Б. Стрельцова**, Т.В. Степанова, Е.И. Дроздова, А.Д. Забережный, А.М. Гулюкин, Т.И. Алипер, М.И. Гулюкин, Ю.Д. Дробин 2018122228: заяв. 19.06.2018, опубл. 23.07.2019.

2. 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// **Методические указания.** Москва, - 2018. – С. 18.

3. * 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.

4. Стаффорд, В.В. Цирковиральная 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.
5. * 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.
6. Стаффорд, В.В. Цирковиральная инфекция 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.
7. * **Стрельцова, Я.Б.** Генетическое разнообразие возбудителей цирковиральной болезни свиней / Я.Б. Стрельцова, В.В. Стаффорд // Ветеринария и кормление. - 2021. - № 2. - С. 48-50.
8. **Стрельцова, Я.Б.** Проблемы ветеринарно-санитарной экспертизы свинины при цирковиральной инфекции свиней / Я.Б. Стрельцова, В.В. Стаффорд // В сборнике: Пища. Экология. Качество. Труды XVII Международной научно-практической конференции. – Екатеринбург. - 2020. - С. 620-622.
9. **Стрельцова, Я.Б.** Особенности строения и генетики возбудителей цирковиральной болезни свиней / Я.Б. Стрельцова // В книге: VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. - 2020. - С. 350-352.
10. * **Стрельцова, Я.Б.** Современная эпизоотологическая характеристика цирковиральной болезни свиней / Я.Б. Стрельцова // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. - 2018. - № 1 (25). - С. 129-135.
11. * **Стрельцова, Я.Б.** Патологические изменения лимфоидных тканей при цирковиральной инфекции свиней / Я.Б. Стрельцова // Ветеринария. - 2021. - № 10. - С. 26-28.
12. * **Стрельцова, Я.Б.** Влияние цирковиральной инфекции 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.
13. 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. – Т. 666. – P. 052017.

*- Издания рекомендованные ВАК РФ