

УДК 619:616.98:578.833.314

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ИММУНОГИСТОХИМИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ЦИРКОВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ СВИНЕЙ

**Виктория Васильевна Стаффорд**, старший научный сотрудник, stafford.v.v@gmail.com

**Яна Борисовна Стрельцова**, аспирант, umesino@outlook.com

**Сергей Алексеевич Раев**, к.в.н., ведущий научный сотрудник, raevsergey@mail.ru

**Антон Геннадьевич Южак**, к.в.н., ведущий научный сотрудник, anton\_oskol@mail.ru

**Алексей Дмитриевич Забережный**, д.б.н., профессор, заместитель директора по науке, admin@viev.ru

**Тарас Иванович Алипер**, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией

*ФГБНУ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН (109428, г. Москва, ул. Рязанский проспект, д. 24, к. 1)*

Цирковиральные болезни свиней (ЦВБС) – одна из актуальных проблем в промышленном свиноводстве. Возбудителем заболевания является цирковир свиней 2 типа, повсеместно распространенный среди животных этого вида. В связи с отсутствием патогномичных признаков болезни для постановки диагноза на ЦВБС используют лабораторные методы диагностики, в частности, иммуногистохимию (ИГХ). В представленной работе приведены данные по разработке метода ИГХ для выявления капсидного белка ЦВС-2 в образцах патологического материала. В результате проведенной работы было показано, что данная методика позволяет установить взаимосвязь между наличием ЦВС-2 и проявлением патологии. **Ключевые слова:** ЦВБС, ЦВС-2, иммуногистохимия, моноклональные антитела, капсидный белок.

### Application of immunohistochemistry method in diagnosis of porcine circovirus associated diseases

**V.V. Stafford**, PhD in Biology, Older researcher

**E.B. Streltsova**, Graduate student

**S.A. Raev**, PhD in Veterinary Sciences, Leading researcher

**A.G. Yushakov**, PhD in Veterinary Sciences, Leading researcher

**A.D. Zaberezhny**, PhD in Biology, Professor

**T.I. Aliper**, PhD in Biology, Professor

*Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (109428, Moscow, Ryazanskiy av. 24-1)*

Porcine circovirus associated diseases (PCVAD) remain one of the urgent problems in pig industry. Porcine circovirus type 2 is a causative agent of the disease that has an ubiquitous distribution among pigs. In the absence of pathognomonic signs of the disease, laboratory diagnostic, in particular, immunohistochemistry (IHC) is required to establish the diagnosis – PCVAD. The present study describes the visualization of viral antigens based on development of the IHC method for detection of PCV-2 capsid protein in pathological material. As a result of this work, it was found that the developed IHC method allowed to establish a relationship between the presence of PCV-2 and pathologic observations. **Key words:** PCVAD, PCV-2, immunohistochemistry, monoclonal antibodies, capsid protein.  
DOI: 10.30896/0042-4846.2019.22.8.18-22

В настоящее время цирковиральные болезни свиней (ЦВБС) считают одним из наиболее экономически значимых заболеваний в промышленном свиноводстве. ЦВБС включают следующие болезни: синдром послеотъемного мультисистемного истощения (СПМИ), синдром дерматита и нефропатии свиней (СДНС), респираторные и репродуктивные нарушения свиней, а также субклиническую форму инфекции. В зависимости от вида ЦВБС клинические проявления возникают у поросят как на этапе дорастивания, так и в

откормочный период. Заболеваемость и летальность свиней в хозяйствах варьируют в широких пределах от 1 до 60 % и от 1 до 100 % соответственно [3, 4, 6].

Возбудитель ЦВБС – цирковир свиней 2 типа (ЦВС-2) относится к роду *Circovirus* семейства *Circoviridae*. Вирионы ЦВС-2 представляют икосаэдрические частицы (32 капсомера, построенные из капсидного белка размером 233 аминокислоты) диаметром 16 – 21 нм. Вирус распространен по всему миру, включая Россию [1, 5, 14].

На вскрытии поросят с синдромом послеотъемного мультисистемного истощения легкие тяжелые, спавшиеся, имеют каучукоподобную консистенцию. Лимфатические узлы гиперплазированы, кровенаполнены, желто-красного цвета. Может развиваться отек рыхлой соединительной ткани и увеличение паренхиматозных органов. Печень при данной патологии светлая, дряблой консистенции. Желчный пузырь переполнен густой темной желчью. Селезенка полнокровна. Почки с узелками белого цвета, кровоизлияния под капсулой, разрастание соединительной ткани [10].

При синдроме дерматита и нефропатии почки отечны, увеличены, плотные с кровоизлияниями, лимфатические узлы увеличены, темно-красного цвета. Инфицированные свиноматки часто рожают мертвых поросят, при вскрытии которых обнаруживают гипертрофию сердца и застойную гиперемии печени, а в миокарде участки некроза белого цвета [14].

Для лабораторной диагностики ЦВС используют ряд методов, в том числе ИФА (для выявления иммуноглобулинов класса М и/или G), ПЦР, гибридизацию *in situ*, а также иммуногистохимию (ИГХ). Выявление последним капсидного белка ЦВС-2 в органах и тканях позволяет проводить дифференциальную диагностику вызываемых этим агентом синдромов от сходно протекающих болезней другой этиологии, например, репродуктивного и респираторного синдрома, болезни Ауески, гриппа, микоплазмоза, актинобациллеза, бордетеллиоза [3, 4, 8, 9, 11, 13]. Это делает ИГХ анализ полезным инструментом для ежедневной работы ветеринарных специалистов в диагностических лабораториях и патоморфологов [7].

Цель исследования – разработка и применение прямого иммуногистохимического метода при диагностике ЦВС.

**Материалы и методы.** Патоморфологический и иммуногистохимический анализ выполняли в секторе патоморфологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН. Материалом для исследований служили пробы трахеи, почек, сердца, селезенки, пораженных участков верхушечной и добавочной долей легких, лимфатические узлы свиней из хозяйства РФ, в котором установлена циркуляция ЦВС-2, вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней, *Mycoplasma hyorhynchitidis* и ряда других респираторных патогенов. Патологический материал фиксировали 24 – 72 ч при комнатной температуре в 10%-ном растворе забуференного нейтрального формалина. При отсутствии фиксатора пробы органов доставляли в лабораторию в замороженном виде. Для длительного хранения материала использовали холодильники с температурой минус 60 °С.

Образцы органов фиксировали на специальных столиках для криотомной резки гелем Neg-50, формируя удобный для нарезания блок. После полного промерзания при температуре минус 34 °С из блоков получали срезы толщиной 5 мкм. Их прикрепляли к поляризованным стеклам или стеклам с адгезивным покрытием. Для использования нескольких гистотехнических методик (рутинное окрашивание, ИГХ реакция) из одного образца патологического материала готовили срезы для необходимого количества стекол. Часть из них окрашивали гематоксилин-эозином для обнаружения патоморфологических изменений; другую часть – выполняли ИГХ реакцию (с докраской гематоксилином Майера) для выявления капсидного белка ЦВС-2.

Перед проведением ИГХ полученные срезы выдерживали в смеси изопропилового спирта с физиологическим раствором при 4 °С – 60 минут. Далее их 3 раза по 3 – 5 минут промывали в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) (рН 7,6) при комнатной темпера-

туре. Для блокировки эндогенной пероксидазы на срезы наносили 3%-ный раствор перекиси водорода, инкубировали 40 мин в термостате при 37 °С и ополаскивали в ФСБ, как описано выше. В качестве блокирующего компонента использовали 5%-ный раствор обезжиренного сухого молока в ФСБ (рН 7,6) и 40 мин инкубировали при 37 °С. После этого срезы вновь промывали в ФСБ 3 раза по 3 – 5 минут при комнатной температуре. Далее их инкубировали 80 мин во влажной камере при 37 °С с 200 мкл предварительно подобранного разведения (на ФСБ, рН 7,6) конъюгата моноклональных антител 6h12 с пероксидазой хрена (предоставлен АНО "НИИ ДПБ") [2]. После чего срезы промывали в ФСБ при комнатной температуре, наносили рабочий раствор хромогена (диметилформамид и 3-амино-9-этилкарбазол) на 0,02М Натрифосфатном буфере рН 5,0 в объеме 200 мкл и помещали во влажную камеру термостата на 30 мин при 37 °С. Для прекращения реакции срезы аккуратно промывали в 3 этапа (каждый по 3 – 5 минут): первый – в дистиллированной воде; два последующих – в ФСБ. Далее, для лучшей визуализации клеток, срезы докрашивали гематоксилином Майера 5 – 10 минут с последующей отмывкой излишков краски дистиллированной водой и помещали на них монтирующую среду и покровные стекла.

**Результаты исследований и обсуждение.** Применение криотомной методики позволило нам выполнить гистологическое исследование и ИГХ реакцию на нативном материале в течение 1 – 2 дней и минимизировать затраты на гистотехническую обработку патологического материала.

Стандартный метод окраски (гематоксилин-эозином) выявил в легких свиней с респираторной патологией следующие патологические изменения (рис. 1, **см. на цветной вкладке между стр. 16 – 17**): разрыв стенок альвеол,

утолщение висцерального листка легочной плевры и пропитывание его клетками лимфоидного ряда. В просвете альвеол наблюдали выпот однородного по структуре эозинофильного содержимого и лимфоциты. Разрыв стенок альвеол сопровождался развитием стеноза просвета близлежащих респираторных структур. В лимфатических узлах (рис. 2, **см. на цветной вкладке между стр. 16 – 17**) обнаружили участки кровоизлияний, нарушение гистоархитектоники лимфатических фолликулов, характеризующееся изменениями их границ, местами – слияние структурных элементов двух и более фолликулов. У сохранившихся лимфатических фолликулов на рисунке 2 (1) наблюдали нарушение структуры клеточных границ, разжижение клеточного состава центральной части фолликулов. В местах слияния последних регистрировали некротические изменения стромы и паренхимы органа с диффузно расположенными клетками лимфоидного типа.

В трахее выявили воспалительный процесс, некроз структурных элементов, отеки различной локализации; в почках – участки кровоизлияния и некроза эпителия канальцев; в сердце – кардиомиопатию, фибринозные отложения на перикарде; в селезенке – очаги некроза, нарушение гистоархитектоники лимфоидных фолликулов, гиперемии с периваскулярным отеком стромы, скопление в паренхиме большого количества зернистых эозинофилов.

Методом ИГХ (при оптимальных условиях его проведения) в легких (рис. 3, **см. на цветной вкладке между стр. 16 – 17**) и лимфатических узлах (рис. 4, **см. на цветной вкладке между стр. 16 – 17**) поросят с выраженной респираторной патологией обнаружили характерно окрашенные конгломераты красно-коричневого цвета. При изучении срезов органов, полученных от поросят без респираторной патологии, характерно-

го окрашивания не наблюдали (данные не представлены). Также получили отрицательные результаты ИГХ при исследовании срезов образцов почек, селезенки, трахеи, сердца.

Развитие респираторной патологии, ассоциированной с ЦВС-2 или другими возбудителями, не всегда сопровождается характерными клиническими и/или патологоанатомическими изменениями. Кроме того, нередко респираторные болезни свиней имеют смешанную этиологию [13]. Поэтому при проведении диагностических исследований необходимо, с одной стороны – определить количество первичных возбудителей комплекса респираторных болезней, с другой – установить ведущий патоген.

В ходе выполнения исследований нами выявлены патологоанатомические изменения, указывающие на полиэтиологический характер респираторной патологии свиней. Воспалительные и дегенеративные процессы в разных паренхиматозных органах (селезенка, трахея, почки, сердце, лимфатические узлы, легкие) негативно отразились на их функциональном состоянии и создали необходимые условия для размножения бактериальных патогенов.

Использование криотомной методики позволило нам выполнить гистологические исследования и ИГХ нативного материала в течение 1 – 2 дней и минимизировать затраты химических реактивов. Высокую специфичность ИГХ обеспечило применение моноклональных антител к капсидному белку ЦВС-2.

В большинстве препаратов легких и лимфатических узлов свиней с респираторной патологией наряду с обширными воспалительными изменениями обнаружены капсидный белок ЦВС-2. Таким образом, можно сделать вывод о том, что ЦВС-2 является, по крайней мере, одним из ведущих патогенов респираторной патологии животных на данном свино-комплексе. Напротив, в почках, селезенке, трахее и сердце тех же свиней, а также

в легких и лимфатических узлах клинически здоровых поросят выявить антиген не удалось. Последнее свидетельствует, как минимум, о низкой вирусной нагрузке в исследуемом материале. Ранее также сообщалось о зависимости уровня концентрации ЦВС-2 в тканях и характера полученных в ИГХ результатов [12]. Для окончательного определения минимальной концентрации ЦВС-2, которую способен улавливать данный метод, а также для использования не только качественной, но и количественной оценки его результатов, необходимы дополнительные исследования.

**Заключение.** Обобщая данные, полученные при проведении патоморфологического и иммуногистохимического исследований, можно сделать вывод, что патологические изменения в легких и лимфатических узлах ассоциированы с наличием ЦВС-2, а изменения, выявленные в других паренхиматозных органах, обусловлены влиянием других патогенов. Разработанная методика ИГХ может быть использована как в диагностических исследованиях, так и при оценке эффективности вакцин против ЦВС-2.

**Работа выполнена в рамках утверждённого плана НИР ФГБУ ФНЦ ВИЭВ РАН на 2019 – 2021 гг.**

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Булгаков А.Д., Гребенникова Т.В., Южаков А.Г. и др. Молекулярно-генетический анализ геномов вирусов репродуктивного и респираторного синдрома свиней и цирковируса свиней второго типа, циркулирующих на территории Российской Федерации. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014; 4:29 – 33.
2. Козлов А.Ю., Костина Л.В., Алексеев К.П. и др. Получение моноклональных антител к цирковирусу свиней второго типа (ЦВС-2) и их применение для диагностики цирковиральной инфекции. Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2013; 2:20 – 22.
3. Орлянкин Б.Г. Цирковиральные болезни свиней: распространение, диагностика и специфическая профилактика. Ветеринария. 2013; 8:3 – 9.
4. Раев С.А., Орлянкин Б.Г., Мишин А.М., Забережный А.Д., Верховский О.А., Гребенникова Т.В., Алексеев К.П., Мусиенко М.И., Алипер Т.И. Цирковиральные болезни свиней. Методические реко-

мендации по диагностике и специфической профилактики. М., 2017.

5. Раев С.А., Южаков А.Г., Мишин А.М., Алипер Т.И. Распространение и филогенетический анализ циркулирующих в России штаммов цирковируса свиней второго типа и вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней. Материалы VII научно-практической конференции "Ветеринария в свиноводстве 2018". Новосибирск, 2018; 70.

6. Семенцов В.И., Васильев А.К., Пруцаков С.В., Болоцкий И.А. Цирковиральные болезни свиней (ЦВБС). Ветеринария Кубани. 2009; 5:8 – 10.

7. Семченко В.В., Барашкова С.А., Артемьев В.Н. Гистологическая техника. Омск – Орел: Омская областная типография, 2006.

8. Стаффорд В.В., Корицкая М.А., Раев С.А. и др. Иммуногистохимическая диагностика репродуктивно-респираторного синдрома свиней. Методические рекомендации, 2017.

9. Стаффорд В.В., Забережный А.Д., Гулюкин М.И. Патоморфологические изменения паренхиматозных органов поросят, экспериментально

зараженных вирусом репродуктивно-респираторного синдрома и цирковиром свиней типа 2. Ветеринария. 2016; 9:24 – 27.

10. Clark E. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 1997; 28:499 – 501.

11. Opriessnig T., Halbur P.G., Meng X.J. Porcine Circovirus Type 2-Associated Disease: Update on Current Terminology, Clinical Manifestations, Pathogenesis, Diagnosis, and Intervention Strategies. J. Vet. Diagn. Invest. 2007; 19:591 – 615.

12. Opriessnig T., Thacker E.L., Yu S. et al. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. Vet Pathol. 2004; 41(6):624 – 640.

13. Opriessnig T., Gimenez-Lirola L.G., Halbur P.G. Polymicrobial respiratory disease in pigs. Animal Health Research Reviews. 2011; 12(2):133 – 148.

14. Segales J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Res. 2012; 164:10 – 19.

УДК 619:616.988:578.842.1

## СОХРАНЯЕМОСТЬ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В ОСЕННИХ ЖИГАЛКАХ И ПАДАЛЬНЫХ МУХАХ

Михаил Евгеньевич Власов, аспирант, vlasovmikhail1993@yandex.ru

Алексей Дмитриевич Середа, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, sereda-56@mail.ru

Владимир Михайлович Балышев, д.в.н., профессор, главный научный сотрудник,  
balyshvmm@rambler.ru

ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии", info@vniivim.ru

Гепаринизированную вирусосодержащую кровь свиньи, полученную на основе вирулентного штамма Ставрополь 01/08 вируса АЧС, скармливали в лабораторных условиях осенним жигалкам и падальным мухам. По результатам исследования суспензий из этих насекомых методом ПЦР-РВ, а также выделения возбудителя АЧС в культуре клеток установлено, что вирус сохранялся в организме мух не менее 5 суток. После внутримышечного введения двум свиньям суспензий осенних жигалок и падальных мух, кормившихся вирусосодержащей кровью, животные заболели на 7- и 10-е сутки соответственно. Болезнь протекала с типичными клиническими признаками и в обоих случаях завершилась на 12- и 15-е сутки летальным исходом. При вскрытии трупов свиней выявили характерные для АЧС патологоанатомические изменения. Полученные данные свидетельствуют, что эти виды мух теоретически способны заразить восприимчивых животных. На это косвенно указывают сведения об увеличении количества вспышек АЧС у домашних свиней и кабанов в летне-осенний период. **Ключевые слова:** африканская чума свиней, гемадсорбция, мухи, инфекционная активность, геном вируса, свиньи.

### African swine virus maintenance in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and blowflies (*Calliphoridae*)

M.E. Vlasov, Postgraduate student, vlasovmikhail1993@yandex.ru

A.D. Sereda, PhD in Biology, Professor, sereda-56@mail.ru

V.M. Balyshv, PhD in Veterinary Sciences, Professor, balyshvmm@rambler.ru

Federal Research Center for Virology and Microbiology, info@vniivim.ru

The heparinized virus-containing blood of pigs, infected with the virulent strain Stavropol 01/08 of ASF virus, was being fed in the laboratory to stable flies and blowflies. As show the research results of suspensions from flies using PCR-RV, and the extraction of the agent of ASF in cell culture, virus persisted in the flies for at least 5 days. After intramuscular injection the homogenates of stable flies and blowflies, that feeding virus-containing blood, two pigs were infected on the 7th and 10th day. The disease was followed with typical symptoms and resulted in death on 12th and 15th day. Autopsies revealed pathological changes typical for this infection. The results suggest that these flies can be vectors of ASF. This is indirectly confirmed by the increase in the number of ASF outbreaks in domestic pigs and wild boars in the summer and autumn period. **Key words:** African swine fever, hemadsorption, flies, infectious activity, viral genome, pigs.

DOI:10.30896/0042-4846.2019.22.8.22-25