

УДК 577.4:578.835.11/636.4

**ДІАГНОСТИКА ВІРУСУ РЕПРОДУКТИВНОГО ТА  
РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ ЗА ДОПОМОГОЮ  
АНАЛІЗУ ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗМІН ТКАНИН ОРГАНІВ  
ІНФІКОВАНОЇ ТВАРИНИ**

**О. А. ІВАЩЕНКО**, аспірантка\*

**І. Г. БУДЗАНІВСЬКА**, доктор біологічних наук  
*ННЦ «Інститут Біології» КНУ ім. Т. Г. Шевченка*

**І. В. ІВАЩЕНКО**, кандидат біологічних наук  
*Житомирський національний агроекологічний університет*

*Висвітлено проблеми у діагностиці вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (ВРРСС). Досліджено патологічний матеріал тканин органів тварин з 32 господарств України, в яких попередньо було встановлено наявність циркуляції ВРРСС. Показано можливість використання патоморфологічного дослідження для диференціальної діагностики вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней у складних клінічних випадках змішаної інфекції для встановлення ролі збудника в розвитку патології. Встановлено оптимальні для дослідження тканини органів та характерні патоморфологічні зміни в них для діагностики ВРССС. Підтверджено причетність ВРРСС до розвитку змін у тканинах органів за допомогою безпосередньої детекції антигену ВРРСС у тканинах органів, що досліджувались.*

**Ключові слова:** *вірус репродуктивного і респіраторного синдрому свиней (ВРРСС), діагностика ВРРСС, гістологічний метод дослідження, імуногістохімічне дослідження.*

---

\* Науковий керівник - доктор біологічних наук І. Г. Будзанівська

Вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней є збудником висококонтагіозного захворювання. З часу його відкриття (1987 р.) це захворювання набуло поширення в більшості країн Америки, Європи, Азії, а у 2006 році воно зареєстроване як атиповий репродуктивний та респіраторний синдром свиней, після чого виявлено десятки варіантів штамів вірусу в різних країнах світу [4, 5, 10, 13, 14, 16, 18].

Вірус РРСС має складний патогенез і залежно від генотипу та штаму збудника перебіг інфекції, спричиненої ВРРСС, може різнитись. Хіао та співавтори в своїх дослідженнях ідентифікували різну експресію генів протеїнів макрофагів легень, інфікованих атиповим ВРРСС (китайський тип-високопатогенний ВП-ВРРСС) та Північно-Американським ВРРСС (ПА-ВРРСС), які філогенетично споріднені. Крім того, ідентифіковано 45 протеїнів, які беруть участь в різних біологічних процесах та сигнальних шляхах. Було виділено декілька напрямів змін, спричинених ВРРСС в інфікованій клітині: в будові цитоскелета та клітинних взаємодіях, відповідь на стрес, в редокс-реакціях та метаболізмі, регуляції апоптозу та інші [11,16].

Вхідними воротами для ВРРСС є слизова оболонка дихальних шляхів господаря, він має тропізм до макрофагів, саме тому первинна реплікація вірусу відбувається в місцевих макрофагах з наступною віремією та поширенням у регіональні лімфоїдні тканини. Антиген ВРРСС (АГ-ВРРСС) був знайдений в регіональних макрофагах різних тканин, а також в інших типах клітин, включаючи м'язову тканину [15]. АГ-ВРРСС виявлений вже через 12 годин після інфікування в бронхіальних епітеліальних і артеріальних ендотеліальних клітинах, моноцитах та інтерстиціальних макрофагах. На перший, другий та третій дні після інфікування та на п'ятий день після інфікування АГ-ВРРСС можна детектувати в інтерстиціальних та альвеолярних макрофагах. В ендотеліальних клітинах, моноцитах та макрофагах (інтерстиціальних, альвеолярних, інтраваскулярних) було виявлено АГ-ВРРСС на сьомий, чотирнадцятий, двадцять перший дні після

інфікування, але інтенсивність пофарбування та розповсюдження була значно вищою на 14-й та 21-й дні. [12, 15].

Також АГ-ВРРСС виявлений в назальному епітелії слизової в 12 годин після інфікування та знову на 14-й, 21-й день після ураження тварини збудником. Цікавою особливістю є наявність вірусу в ендотелії судин легень, тоді як в ендотеліальних клітинах судин інших органів його не було виявлено. Експериментально встановлено наявність динамічної взаємодії між двома клітинними типами (популяції макрофагів та ендотеліальних клітин судин), що може полегшувати реплікацію ВРРСС. АГ-ВРРСС був виявлений на культурі клітин моноцитів та ендотеліальних клітин артерій, проте не спостерігався в артеріальних ендотеліальних клітинах, що інкубувались без присутності моноцитів. Зафіксована також реплікація ВРРСС в моноцитах *in vitro* [12].

Спочатку вірус проникає до організму чутливої тварини через епітелій верхніх дихальних шляхів. Реплікуючись в макрофагах мигдалин, легень та епітелію бронхів, ВРРСС через 12 годин після інфікування призводить до віремії і розвитку міокардитів, енцефалітів, васкулітів та некрозу лімфоїдної тканини [6, 7, 12, 16].

З огляду на те, що ВРРСС виявлений в 19 областях України та спостерігається тенденція до його поширення на території України, нами було проведено дослідження для розробки підходів та впровадження методів діагностики цього захворювання. Враховуючи високий рівень варіабельності вірусу та можливість отримання хибно негативних результатів необхідним є комплексний підхід до його діагностики. Одним з методів, який був нами запропонований для встановлення ВРРСС як першопричини розвитку патології, є гістологічне дослідження тканин органів інфікованих тварин.

**Матеріали та методи дослідження.** Беручи до уваги наявність інших збудників захворювань свиней, що спричиняють схожу з РРСС клінічну картину [3], було проведено дослідження зразків від клінічно хворих тварин з господарств серопозитивних за ВРРСС. Дослідження проводили в Центрі

ветеринарної діагностики з 2012 до червня 2014 року. Для з'ясування причин виникнення патологій (абортів у останньому семестрі поросності; мертвонароджені, ослаблені, різної маси поросята; розвиток респіраторних захворювань у поросят технологічних груп відлучення та дорощування) відбирали зразки тканин органів – нирок, печінки, селезінки, легень, серця, мозку, трахей, лімфатичних вузлів, тимусу, на гістологічне дослідження. При цьому враховували мікроскопічну будову органів та тканин. Відібрані зразки одразу переносили в 10%-ний розчин формаліну. Контейнер зі зразками маркували: вказували дату відбору зразка та номер супровідного документу. Всього було проаналізовано зразки від 93 тварин з 32 господарств України. Одночасно проводили відбір зразків для імуногістохімічного дослідження. Для безпосереднього виявлення антигену вірусу РРСС відбирали секційний матеріал легень та лімфатичних вузлів тварин. Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження тканин органів здійснювали у випадку виявлення характерних патолого-морфологічних змін у тканинах органів. Таким чином ІГХ була використана у 24 клінічних випадках.

Приготування гістологічних препаратів проводили за раніше описаною методикою [1, 2]. Для попередньої обробки досліджуваних тканин використовували автоматизовану станцію MicromSTP-120, для заливки в парафін та охолодження зразків станцію «MicromEC 350», для приготування тонких зрізів із патологічного матеріалу, залитого у парафін, – мікротом «Microm HM 340-E» та ножі для гістологічних досліджень «Sec-130». Прирізку виконували встановлюючи «крок» мікротому 50 мкм, а для виготовлення зразків тканин органів – 5 мкм [1]. Гістологічні зрізи фарбували розчинами еозину та гематоксиліну [1].

Мікроскопіювання досліджуваних зразків проводили за збільшення у 100 та 200 разів та в 1000 разів із використанням відповідних об'єктивів мікроскопу Axioskop 2 plus (CarlZeiss). Зразки для подальшого аналізу фотографували фотоапаратом за чотириразового оптичного збільшення.

Для імуногістохімічного дослідження використовували первинні моноклональні антитіла на антиген, що кодує ORF 7, виробництва Ingenasa (Spain) та вторинні моноклональні антитіла anti-mouse (Sigma, USA). Для виконання реакції використовували раніше опубліковану методику [12].

**Результати дослідження та їх обговорення.** Під час експерименту було досліджено тварин з 32 серологічно позитивних за ВРРСС господарств України. У зразках 11 з них виявили характерні цитопатичні зміни в тканинах легень, мозку та антиген збудника в тканинах легень, тимусу, лімфатичних вузлів.

Rossow та співавтори на третій день після інфікування ВРРСС в каудальній частині легень спостерігали незначне збільшення кількості макрофагів і поодинокі альвеоли, заповнені клітинним детритом та білковим ексудатом. На п'ятий день після інфікування з'явилися зміни в усіх частинах легень, проте найбільше уражалась їх краніальна частина [8, 15]. У нашому дослідженні цитопатичні зміни, спричинені ВРРСС, були зафіксовані в легенях та лімфатичних вузлах тварин. Слід відзначити, що одержані нами дані підтвердили раніше опубліковані результати [8, 15]. Так, у нашому дослідженні в зразках тканини легень були виявлені різного ступеня ураження інтерстиції з характерними макрофагальними інфільтратами, заповненням просвіту альвеол клітинним детритом, білковим ексудатом та макрофагами (рис. 1А). Характер поширення патогістологічних змін у паренхімі легень досліджуваних зразків повністю відповідає раніше опублікованим результатам.

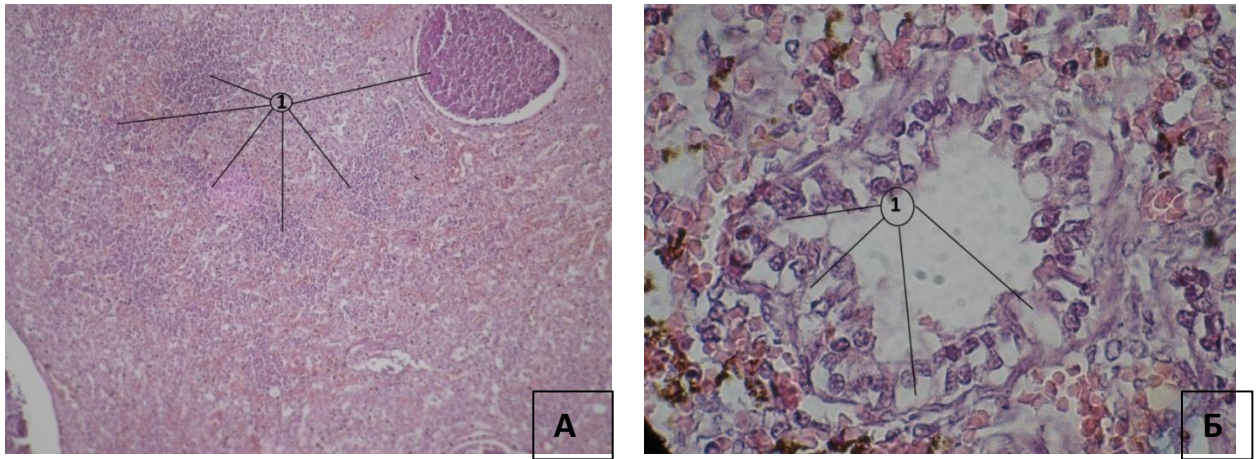


Рис. 1. Препарат тканини легень зразка взятого від тварини з клінічними проявами, характерними для РРСС, фарбування еозином та гематоксиліном x100 ( А), x400 ( Б):

А 1 – Просвіт альвеол заповнений макрофагами та незначною кількістю лімфоцитів; Б 1 – гіперплазія, гіпертрофія альвеолоцитів другого порядку.

Збільшена кількість гіпертрофованих пневмоцитів другого порядку є ще однією ознакою ВРРСС-індукованої інфекції. [8, 15]. У нашому дослідженні в усіх пізніше підтверджених клінічних випадках РРСС була виявлена значна кількість альвеолоцитів другого порядку з ознаками гіпертрофії та гіперплазії, що свідчить про специфічність та показовість цієї ознаки у постановці діагнозу РРСС гістологічним методом дослідження ( рис. 1 Б).

Rossow та співавтори у своїх дослідженнях зазначали, що мікроскопічні зміни в тканині легень на п'ятий день після інфікування характеризуються альвеолами, заповненими клітинним детритом та білковим ексудатом, потужним збільшенням кількості альвеолярних макрофагів, незначним потовщенням інтерстиції за рахунок інфільтрації макрофагами (тільки в краніальній зоні), наявністю незначної кількості ( один-два в полі зору при збільшенні 400) альвеолярних синцитій та збільшенням кількості гіпертрофованих пневмоцитів другого порядку. На сьомий, 14-ий та 21-ий день після інфікування у всіх частках легень наявні аналогічні зміни, проте у більш інтенсивній та поширеній формі. Значним збільшенням кількості

синцитій-подібних характеризувались 14-ий та 21-ий день після інфікування [15]. У досліджених нами зразках легень від тварин, інфікованих ВРРСС, не було виявлено ознак наявності/формування синцитій. Ці розбіжності в результатах можуть пояснюватись різницею патогенезу штамів, які циркулюють в західній та східній Європі [7], або ж все ж таки утворення синцитій не є специфічною ознакою, яку можна використовувати у діагностиці ВРРСС гістологічним методом. Загалом інтерстиціальна пневмонія вперше може фіксуватись на п'ятий день, на 14-ий день після інфікування припадає пік розвитку захворювання та близько 35-ого дня після інфікування спостерігається початковий етап відновлення нормальної структури органа [8].

Необхідно наголосити на тому, що в наших дослідженнях характерних ознак розвитку міокардитів виявлено не було, хоча Rossow та співавтори відзначали наявність змін в серцевому м'язі. Автори статті вказували, що на 14-ий день після інфікування у серцевій тканині можуть з'являтися зони некрозу зі значною кількістю макрофагів і меншою кількістю лімфоцитів у субендокарді, міокарді та периваскулярних ділянках. Інколи може спостерігатись фібриноідний некроз ендотелію судин органів.

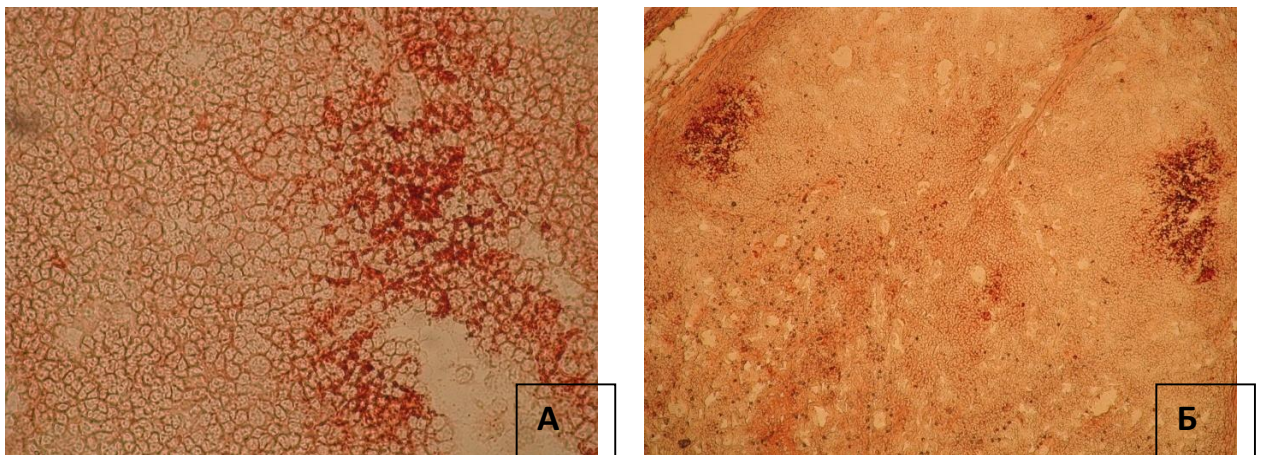
На 21-й та 35-й дні після інфікування спостерігали потужні лімфоцитарні інфільтрації субендокардіальних, міокардіальних та периваскулярних ділянок [8, 15]. Можливою причиною відсутності цих змін у міокарді та субендокарді могли бути терміни відбору зразків тканин органів після інфікування ВРРСС, оскільки вони в серцевому м'язі зазвичай є досить пізньою ознакою інфікування тварини ВРРСС [17]. Іншою можливою причиною відмінності отриманих результатів від результатів Rossow та співавторів, могла бути генетична відмінність вірусу РРСС, що циркулює в Україні, від раніше досліджених.

Раніше опубліковані дані про специфіку патогістологічних змін у разі інфікування вірусом РРСС та характер виявлених нами у зразках легень змін свідчить про те, що лише у 23 % випадків ВРРСС був причиною розвитку

патологій репродуктивного та респіраторного тракту. Локалізація патогістологічних змін та їх характер вказує на те, що матеріал був відібраний на ранніх термінах інфікування тварини вірусом РРСС.

При дослідженні тканин мозку лише в одному зразку виявили зміни, характерні для ураження тварини вірусом РРСС, а саме периваскулярні лімфоцитарні інфільтрати. Раніше опубліковані дані свідчать про можливість формування лімфоцитарно-гістіоцитарних інфільтрацій в мозку інфікованих тварин на пізніх етапах захворювання [8, 15, 17]. На 21-й день після інфікування можна зафіксувати мікроскопічні зміни, серед яких виділяють інфільтрацію лімфоцитами та плазматичними клітинами [15]. Характер виявлених нами змін у зразку мозку вказує на пізній етап розвитку інфекції, спричиненої ВРРСС.

Для підтвердження причетності ВРРСС до виникнення патолого-морфологічних змін та унеможливлення хибно позитивних результатів, ми паралельно проводили імуногістохімічне дослідження для виявлення антигену збудника безпосередньо в тканині органів (рис. 2). Антиген ВРРСС у зразках абортіваних плодів у найбільшій кількості виявлявся в тканині тимусу, поодинокі в легенях (рис. 2). У випадку респіраторного прояву РРСС, найбільшу кількість антигену детектували в легенях та трахіобронхіальних лімфатичних вузлах (рис 2).





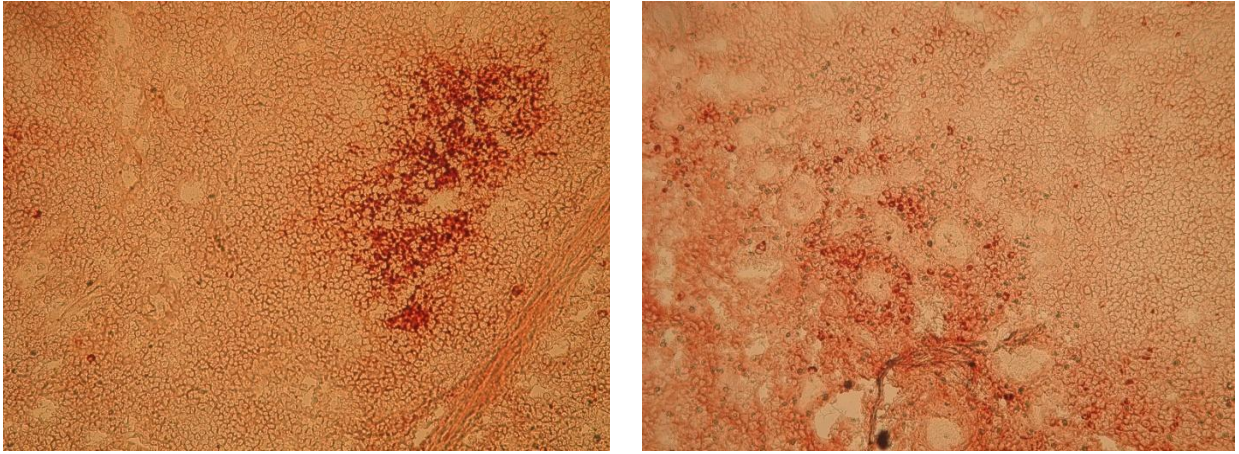


Рис 2. Препарат зразка від абортіваного плоду тканини тимусу (А, В) та легень (Б, Г), імуногістохімія x 400 (А), x100 (Б, В), x200 (Г).

Результати наших досліджень вказують на можливість та доцільність використання патоморфологічного дослідження для диференційної діагностики ВРСС у складних клінічних випадках. Основними патоморфологічними змінами при інфікуванні ВРСС є наявність гіпертрофії та гіперплазії альвеолоцитів другого порядку, заповнення клітинним детритом та білковим ексудатом просвіту альвеол, потужне збільшення кількості альвеолярних макрофагів у легенях, незначне потовщення інтерстиції легень внаслідок інфільтрації макрофагами. Проте слід наголосити на відсутності певних патоморфологічних змін, що вважаються, за раніше опублікованими даними, класичними для РСС, як, наприклад, інфільтрація м'яза серця макрофагами і лімфоцитами та утворення синцитій подібних клітин у паренхімі легень. Враховуючи це, необхідним є виключення наявності молекулярно-біологічних аспектів різності патогенезу ВРСС, що циркулює в Україні, з раніше дослідженими штамами. Наступним етапом нашого дослідження буде сіквенування ділянки ORF 5 для вивчення поліморфізму геному українських ізолятів ВРСС та, можливо, встановлення причин різності патоморфологічних розбіжностей у прояві захворювання.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Горальский Л. П. Основы гистологической техники у нормі та при патології / В. Т. Хомич, О. І. Кононський – Житомир.: Полісся, 2005. – 288 с.
2. Пат.2104513, С1, Ру, МПК 6 G01N1/28, G01N33/483. Способ изготовления гистологических срезов: Зубкова Т.В., Тарнопольская О.В., Мармарова Т.Ю..-№95103182/14; Заявл. 6.03.1995; Опубл. 10.02.1998. – 4 с.
3. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs / [K. D. Rossow, D. A. Benfield, S. M. Goyal, J. E. Collins] // Vet. Pathol. –1999. – Vol.33. – P.551-556.
4. Comparative analysis of complete nucleotide sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome Virus (PRRSV) isolates in Thailand (US and EU genotypes) / [A. Amonsing, R. Kedkovid, S. Puranaveja et al.] // Virology Journal. – 2009. – Vol.6. – P.280-289.
5. Emergence of fetal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark / Tian K., Yu X., Zhao T. et al. // PloS One. – 2007. – Vol.7. – P.125-132.
6. Endoribonuclease activities of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp11 was essential for nsp11 to inhibit IFN- $\beta$  induction / [Shi X., Wang L., Li X. et al. ] // Mol. Immunol. – 2011, – Vol.8. – №7. –P.148-161.
7. Evans C.M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in GB pig herds: farm characteristics associated with heterogeneity in seroprevalence / C. M. Evans, G. F. Medley, L. E. Green // vBMC Veterinary Research. – 2008. – Vol.4. – P.165-178.
8. 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 et al.] // Veth. Pathol. – 2001. – Vol.38. – P.528-539.

9. Genetic analysis of ORF5 of recent Korean porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSVs) in viremic sera collected from MLV-vaccinating or non-vaccinating farms / [H. K. Kim, J. S. Yang, H. J. Moon et. al.] // Journal of Veterinary Science. – 2009. – Vol.10. – P.121-133.
10. Genetic diversity of European genotype PRRS in Central and Eastern Europe – an update / [Balka G., Chabros K., Lipej Z. et. al. // 21<sup>st</sup> international pig veterinary society congress. – Vancouver, 2010 – P. 12-16.
11. Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus / [S. Genini, P. L. Delputte, R. Malinverni et al.] // Journal of General Virology. – 2008. – Vol.89. – P. 2550-2564.
12. Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated swine alveolar macrophages / [T. Ait-Ali, A. D. Wilson, D. G. Westcott et al.] // Viral Immunology. – 2007. – Vol.20. – P.105-118.
13. *Kedkovid R.* NSP2 gene variation of the North American genotype of the Thai PRRSV in central Thailand / *Kedkovid R.* // Virology Journal. – 2010, – Vol.7. – P.340-352.
14. *Lipej Z.* An overview about PRRS in Croatia / *Z. Lipej, D. Novosel* // The Balkan meeting on PRRS diagnostic. – Hrvatska: Split, 2011. – P.8 – 12.
15. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs / [K. D. Rossow, S. M. Goyal, J. E. Collins et. al.] // Vet. Pathol. – 1999. – Vol.32. – P.361-373.
16. Profiling of cellular proteins in porcine reproductive and respiratory syndrome virus virions by proteomic analysis / [Zhang Chengwen, Xue Chunyi, Li Yan et al.] // Virology Journal. – 2010. – Vol.7. – P.320-334.
17. *Rossow K. D.* Porcine Reproductive and respiratory syndrome. Review article / *Rossow K. D.* // Vet. Pathol. – 1998. – Vol. 35. – P.1-20.

18. *Tong G.-Z.* Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China / *Tong G.-Z., Zhou Y.-J., Hao X.-F.* // *Emerging Infectious Diseases.* – 2007. – Vol.13, №9. – P.1434-1435.
19. Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing / [Shuki Xiao, Jianyu Jia, Delin Mo et al.] // *PLoS ONE.* – 2010. – Vol.5. – №6. –P.145-159.

**ДИАГНОСТИКА ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНОГО И  
РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ С ПОМОЩЬЮ  
АНАЛИЗА ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТКАНЯХ  
ОРГАНОВ ИНФИЦИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ**

*О. А. ИВАЩЕНКО, І. Г. БУДЗАНИВСЬКА,  
І. В. ИВАЩЕНКО*

Проанализировано проблемы в диагностике вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (ВРРСС). Исследовано патологический материал тканей органов животных с 32 хозяйств Украины. Показана возможность использования патолого-морфологического исследования тканей органов для дифференциальной диагностики вируса РРСС в сложных клинических случаях смешанных инфекций для определения роли возбудителя в развитии патологии. Установлены оптимальные для исследования ткани органов и характерные патолого-морфологические изменения в них для диагностики РРСС. С помощью детекции антигена возбудителя в тканях органов, что исследовались, методом иммуногистохимии подтверждено причастность ВРРСС к развитию изменений в тканях органов.

*Ключевые слова:* вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней (ВРРСС), диагностика ВРРСС, гистологический метод исследования, иммуногистохимические исследования

**DIAGNOSIS OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY  
SYNDROME VIRUS (PRRSV) USING ANALYSIS OF HISTOLOGY  
LESION IN THE ORGANS OF INFECTED ANIMAL**

*O. A. Ivashchenko, I. G. Budzanivska  
I. V. Ivashchenko*

The problems of PRRSV diagnostics were analyzed. The pathological material of animal from 32 farms were analyzed. The possibility of usage of

histopathology method for PRRSV diagnostics in case of mixed infections were showed. The optimum tissues and the specific for PRRSV lesion for PRRSV diagnosis were established. The results of PRRSV infection were confirmed by detection of PRRSV antigen in the tissues of infected animals using immunohistochemistry method.

***Key words:*** *porcine reproductive and respiratory syndrome virus ( PRRSV), diagnostics of PRRSV, histology and immunohistochemistry methods.*