

С.Н. Карташов, А.М. Ермаков, А.Г. Ключников, Д.А. Андреев
(ГНУ СКЗНИВИ Россельхозакадемии)

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИМФОУЗЛОВ ПРИ ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ

Цирковиральная инфекция свиней, впервые описанная в Канаде в 1991 г., во многих странах мира с развитым свиноводством причиняет ощутимый экономический ущерб. Существует два типа вируса PCV-1 и PCV-2. Цирковир тип 2 вызывает у свиней синдром мультисистемного истощения. Однако, болезнь проявляется в том случае, когда цирковир действует совместно с другими возбудителями или патогенными факторами. Синдром мультисистемного истощения наиболее часто наблюдается у поросят в возрасте 5-18 недель. Заболевшие поросята теряют в весе, становятся слабыми и худыми.

Клинически болезнь может проявляться как пневмониями, так и диареями. Но, несмотря на хорошие условия содержания и антибиотикотерапию, поросята все равно теряют в весе [3, 4, 5].

При патологоанатомическом исследовании больные поросята истощены, как правило, присутствуют признаки острого воспаления или дегенерации в почках, легких, печени и лимфоидной ткани. При микроскопии в тканях обнаруживают изменения, характерные для этих состояний, но поставить диагноз на цирковир возможно только в лабораторных условиях.

Заболевание обладает высокой contagiousностью. В стаде, где циркулирует вирус, заболевание клинически проявляется у 1-5% животных. При вспышке заболевания болезнь может проявиться у 50% поросят, при этом отмечают повышение смертности поросят.

Нами наблюдалось массовое заболевание свиней синдромом мультисистемного истощения, развившегося на фоне хронического отравления солью вследствие выпашивания свиньям воды из колодца с превышением ПДД соли в 1,5-1,7 раза, при одновременном превышении соли в комбикорме на 23%.

Известно, что при цирковиральной инфекции происходит поражение иммунной системы. В доступной литературе мы не нашли данных о структурно-клеточных преобразованиях в лимфатических узлах, это послужило отправным моментом нашего исследования.

Цель исследования: провести патоморфологическое исследование основных лимфатических узлов при цирковиральной инфекции свиней. Было проведено патоморфологическое исследование поверхностных шейных, краниальных грудных, наружных подвздошных, чревных и лимфатических узлов прямой кишки. Все животных были в возрасте от 1 до 3 месяцев.

Материалы и методы: объектом исследования служили секционно взятые лимфатические узлы свиней с симптомами цирковиральной инфекции. У всех животных диагноз был подтвержден выделением ДНК возбудителя методом ПЦР.

Из образцов лимфатических узлов, фиксированных в формалине и заключенных в парафин, изготавливали серийные срезы толщиной 4 мкм с последующей иммуногистохимической окраской антителами к маркеру Т-лимфоцитов CD2, CD3 (Dako, разведение 1:100); к маркеру В-лимфоцитов CD20, к маркеру пролиферации Ki-67. Срезы обрабатывали в микроволновой печи 10 минут на мощности 700 Вт с целью открытия антигенных детерминант, блокировали активность эндогенной пероксидазы и инкубировали с первичными антителами 18 часов при температуре 4°C. Затем срезы обрабатывали вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в течение 30 минут. Визуализацию осуществляли инкубацией с аминотилкарбазолом (АЕС), дающим продукт красно-коричневого цвета в месте локализации выявляемого антигена.

Проводили обзорную световую микроскопию, морфометрию структурных компонентов и клеточного состава по методу Г.Г. Автандилова [1, 2]. При увеличении микроскопа в 38,5 раз определяли площади коркового и мозгового вещества, первичных и вторичных лимфоидных узелков, коркового плато, паракортикальной зоны, мозговых тяжей, мозговых синусов, промежуточных корковых синусов, краевого синуса, капсулы и трабекул.

Цитоархитектонику структурно-функциональных зон лимфатических узлов проводили при увеличении микроскопа в

Таблица 1

Результаты морфометрического исследования внутренних подвздошных лимфатических узлов при цирковирусной инфекции у свиней

Структурные компоненты лимфатического узла	Площади структурных компонентов доли в процентах, М±m	Содержание клеточных элементов в структурнофункциональных зонах	
		Виды клеток	на площади (200 мкм)
Капсула	1,35±0,03%	Вторичные лимфоидные узелки	
		Бласты	27,3±1,55
Трабекулы	1,12±0,02%	Средние лимфоциты	59,42±2,61
Краевой синус	7,96±0,18%	Малые лимфоциты	15,2±1,16
Корковое вещество	1,22±1,17%	Макрофаги	7,26±0,6
Субсинусный слой	0,6±0,02%	Ретикулярные клетки	2,76±0,09
Корковое плато	8±0,16%	Клетки с фигурами митозов	3,61±0,04
Первичные лимфоидные узелки	14,48±0,2%	Мозговые тяжи	
		Плазмобласты	3,02±1,01
		плазмоциты	41,9±1,15
Вторичные лимфоидные узелки	9,34±0,13%	Малые лимфоциты	34,62±5,73
		Макрофаги	7,99±0,87
Паракортикальная зона	9,65±0,11%	Ретикулярные клетки	12,45±1,19
Промежуточные корковые синусы	10,81±0,24%	Клетки с фигурами митозов	1,21±0,01
Мозговое вещество	37,15±0,73%	Дегенерирующие клетки	4,21±0,25
		Паракортикальная зона	
		Бласты	1,11±0,02
Мозговые тяжи	20,08±0,61%	Средние лимфоциты	2,85±0,05
Мозговые синусы	17,39±0,89%	Малые лимфоциты	83,05±2,21
		Ретикулярные клетки	8,5±0,08
Корково-мозговой индекс	1,45±0,04	Макрофаги	12,9±0,08
Общая площадь лимфатического узла	100%	Дегенерирующие клетки	8,27±0,02

990 раз. Подсчитывали абсолютное количество клеток на стандартной площади. Дифференцировали бласты, средние и малые лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги, ретикулярные клетки, нейтрофильные и эозинофильные гранулоциты, митотически делящиеся клетки, дегенерирующие клетки (с пикнотическим ядром).

Цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики.

Результаты исследований. При макроскопическом исследовании установили, что все лимфатические узлы увеличены, особенно наружные подвздошные, прямокишечные и чревные. При поверхностном

осмотре лимфатические узлы шеи и грудной клетки достигают в диаметре 0,8-1,2 см, капсула лимфатического узла напряжена, лимфатические узлы грудной клетки с поверхности имеют кирпичную окраску.

Наружные подвздошные и прямокишечные лимфатические узлы достигают 2-2,5×0,7-1,2 см, имеют бугристую поверхность красно-кирпичного цвета. Чревные лимфоузлы удлинённой формы, на поперечном размере имеют диаметр 0,5-0,7 см, поверхность бледно-оранжевого цвета.

На разрезе все лимфатические узлы сочные, поверхность несколько выступает

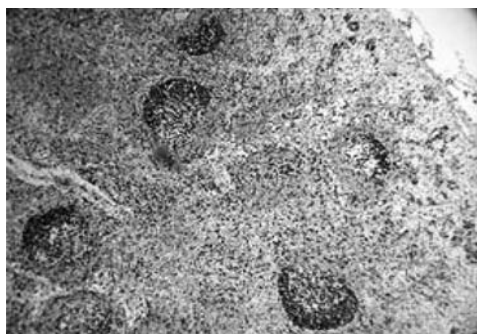


Рисунок 1а. Окраска антителами на маркеры CD20 (В-лимфоциты) поверхностный шейный лимфатический узел, у животных 4-7 мес. возраста.

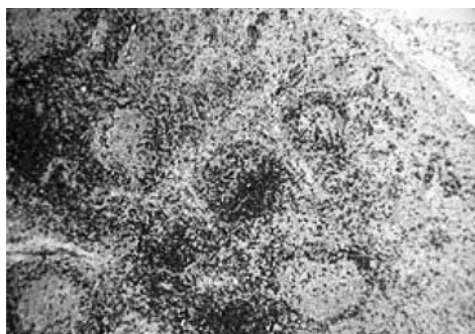


Рисунок 1б. Окраска антителами на маркеры CD2 (Т-лимфоциты) тот же лимфатический узел, что на рисунке 1а.

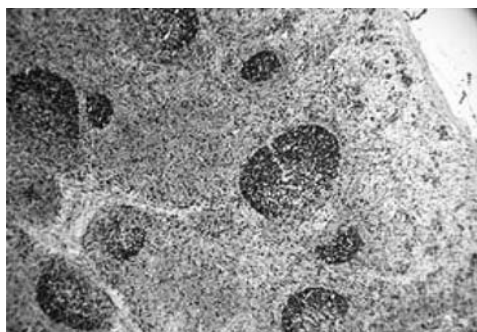


Рисунок 1в. Окраска антителами на маркеры CD20 прямокишечный лимфатический узел

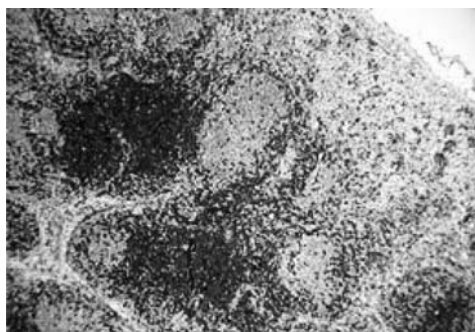


Рисунок 1г. Окраска антителами на маркеры CD2 (Т-лимфоциты) тот же лимфатический узел, что на рисунке 1в.

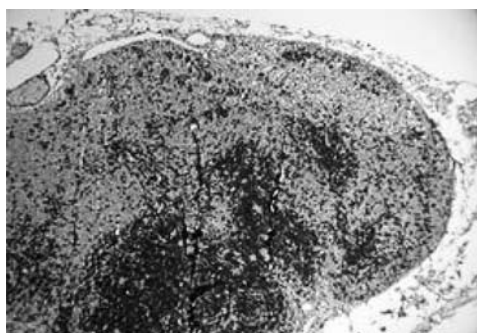


Рисунок 1д. Окраска антителами на маркеры CD20 у животных старше 8 мес.

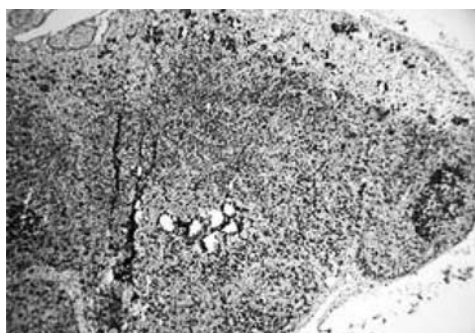


Рисунок 1е. Окраска антителами на маркеры CD2 (Т-лимфоциты) тот же лимфатический узел, что на рисунке 1д.

над капсулой, с одной стороны или по всей окружности поверхность лимфоузлов окрашена в кирпичный цвет, к центру лимфатические узлы приобретают саловидный вид и бледно-розовую окраску.

В результате морфологического и морфометрического исследований во всех лимфатических узлах животных выявлены однотипные изменения, которые заключались в гиперплазии коркового вещества за счет практически всех его структурно-функциональных зон – первичных и

вторичных лимфоидных узелков, коркового плато, паракортикальной зоны (рис. 1, 2.). Корово-мозговой индекс составлял $1,43 \pm 0,02$.

Из таблицы 1 видно, что в лимфатических узлах суммарная площадь первичных лимфоидных узелков превышает площадь вторичных лимфоидных узелков. Вторичные лимфоидные узелки, как правило, содержали полностью сформированные герминативные центры с дифференцировкой на темную и светлую зоны, довольно вы-

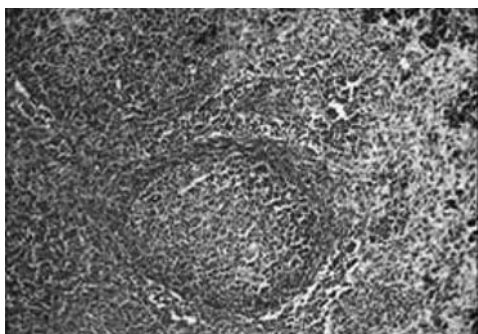


Рисунок 2а. Сформировавшийся герминативный центр. Гематоксилин с эозином, 10×20

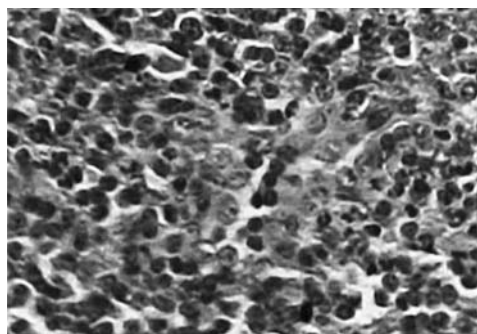


Рисунок 2б. Высокий процент бластов в темной зоне герминативного центра, превалирование клеток с пикнотическими ядрами. Гематоксилин с эозином, 10×40

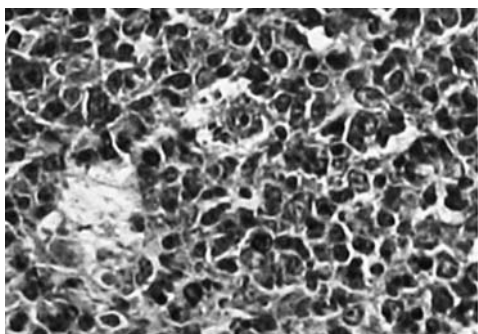


Рисунок 2в. Макрофаги, фагоцитирующие остатки погибших лимфоцитов. Гематоксилин с эозином, 10×40

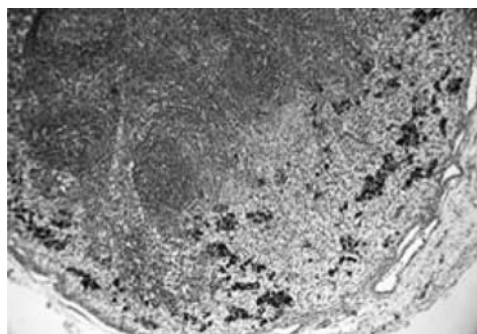


Рисунок 2г. Преобладание первичных лимфоидных узелков над вторичными. Гематоксилин с эозином, 10×10

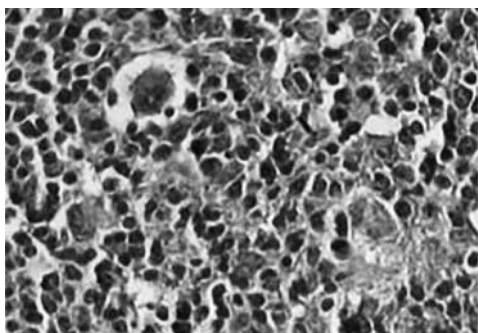


Рисунок 2д. Массовая гибель лимфоцитов в паракортикальной зоне. Гематоксилин с эозином, 10×40

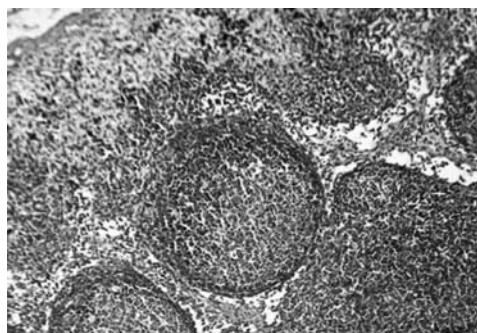


Рисунок 2е. Компенсаторное расширение мозговых синусов лимфатических узлов. Гематоксилин с эозином, 10×20

соким процентом бластов и сохранением митотической активности в темной зоне (рис. 2а, б).

Вместе с тем отмечалось преобладание первичных лимфоидных узелков над вторичными во всех лимфатических узлах, что возможно связано с постепенным угасанием пролиферативных процессов (рис. 2в.). Из литературных данных известно, что на начальных этапах практически любого инфекционного процесса наблюдается интенсивное образование центров размножения. О предшествующей

активности В-клеточных зон лимфатических узлов свидетельствует также клеточный состав мозговых тяжей, представленный зрелыми плазматическими клетками, малыми лимфоцитами, ретикулярными клетками, макрофагами, небольшим количеством плазмобластов и эозинофильных гранулоцитов; однако регистрируется превалирование клеток с пикнотическими ядрами над митотически делящимися клетками (рис. 2б.). Клеточный состав паракортикальной зоны представлен в основном малыми лимфоцитами и ретику-

лярными (интердигитирующими) клетками; содержание средних лимфоцитов и бластов незначительно. Как и в зоне мозговых тяжей, обращает на себя внимание преобладание процессов гибели лимфоцитов над их пролиферацией – число дегенерирующих лимфоцитов в 2,2 раза превышает число клеток с фигурами митозов, в некоторых лимфатических узлах фигуры митоза полностью отсутствуют. Довольно велика численность макрофагов, фагоцитирующих остатки погибших лимфоцитов.

Известно, что при вирусных заболеваниях в организме может формироваться протективный Th-1-зависимый цитотоксический иммунный ответ [1, 2]. Основные события при этом происходят в паракортикальной зоне регионарных основному процессу лимфатических узлов. Морфологически они проявляются увеличением размеров данной зоны, ростом численности лимфоцитов, усилением пролиферативных процессов. Развитие и длительное клиническое проявление заболевания в виде синдрома мультисистемного истощения свидетельствует о несостоятельности иммунной защиты против вирусной инфекции. По нашим данным, морфологическим подтверждением срыва противовирусного иммунного ответа может служить массовая гибель лимфоцитов в паракортикальной зоне практически всех лимфатических узлов.

Гиперплазия структурно-функциональных зон, ответственных как за клеточный, так и за гуморальный иммунный ответ, может быть расценена как отражение существующего на определенных стадиях развития инфекции антагонизма гуморального и клеточного иммунитета, что способствует функциональной недостаточности последнего (рис. 1а, б). Но такая гиперплазия отмечается у животных 4-7 недельного возраста.

У животных 8 недельного возраста и старше, отмечается пролиферация в зонах, ответственных за гуморальный иммунитет, и резкое ее снижение в зонах ответственных за клеточный иммунитет

SUMMARY

In lymph nodes at pigs infected with Circovirus (PCV-2), reveals structure changes. It testifies to activation T- and B-cellular zones which at the moment of research was in a fading stage, that proves to be true strengthening of processes of destruction lymphoid cells in all structurally functional zones

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. М., 1990. 384 с.
2. Гречухин А.Н. Особенности иммуногенеза свиней // Практик, 2002. №9-10. -С.58-65.
3. Орлянкин Б.Г., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. Цирковиральная инфекция свиней // БИО, 2002. №4. -С.20-21.
4. Орлянкин Б., Алипер Т., Непоклонов Е. Цирко-

(рис. 1д, е).

Перераспределение активности в пользу гуморального иммунного ответа в лимфатических узлах может в дальнейшем приводить к инаktivации Т-клеточных иммунных реакций и системы мононуклеарных фагоцитов при сохранении плазмоцитарной реакции с повышенной антителообразующей способностью клеток. В момент исследования лимфатических узлов происходит снижение общего количества Т-клеток, Т-лимфобластов, и, как следствие, активированных цитотоксических лимфоцитов – основных элементов защиты от зараженных цирковирусом клеток.

Во всех лимфатических узлах животных старше 8 недельного возраста отмечается увеличение содержания В-клеток, плазмобластов и антителообразующих плазмочитов, которые могут блокировать антителами Т-клеточный цитотоксический эффект (рис. 1д, е).

Мозговые синусы лимфатических узлов при цирковирозе у свиней, выглядели широкими крупнопетлистыми образованиями, пронизывающими всю ткань узла. Просвет их был довольно плотно заполнен клеточными элементами – ретикулярными клетками, макрофагами, лимфоцитами, гранулоцитами. Эти изменения можно трактовать как компенсаторные. Расширенные синусы являются структурной предпосылкой для замедления тока лимфы, что в условиях персистирующей инфекции может способствовать задержке возбудителя, пораженных клеток или их фрагментов в лимфатическом узле, созданию оптимальных условий для фагоцитоза, накопления лимфоцитов и межклеточных взаимодействий.

Заключение. В лимфатических узлах свиней с синдромом мультисистемного истощения выявлены изменения структуры, свидетельствующие об имевшей место активации как Т-клеточных, так и В-клеточных зон, которые на момент исследования находилась в стадии угасания, о чем свидетельствует усиление процессов гибели лимфоидных клеток во всех структурно-функциональных зонах.

**А.А. Коломыцев, Н.И. Закутский, А.Г. Гузалева,
С.В. Миколайчук, Ю.П. Моргунов
(ВНИИВВиМ)**

КОНТАГИОЗНЫЙ ПУСТУЛЕЗНЫЙ ДЕРМАТИТ ОВЕЦ И КОЗ (КОНТАГИОЗНАЯ ЭКТИМА ОВЕЦ И КОЗ, ОБЗОР)

Контагиозный пустулезный дерматит или контагиозная эктима овец и коз – специфическая болезнь, характеризующаяся образованием папул, везикул пустул, корок преимущественно на слизистой оболочке ротовой полости кожи губ, головы, молочных желез и конечностей, с преимущественным поражением одного какого-либо участка тела. Как правило, болезнь протекает в виде эпизоотий, главным образом среди молодняка. Взрослые животные переболевают в легкой форме или проявляют признаки смешанных инфекций (аборты, респираторные ассоциированные инфекции, некробактериоз).

Историческая справка

Впервые болезнь была установлена в Англии в 1787г. Раньше ее именовали - ветряная оспа, паравакцина, а с 1960 г. - получила название контагиозной эктимы овец и коз (КЭО) или контагиозный пустулезный дерматит (вирус орфа) [10]. Во многих странах с развитым овцеводством и козоводством она являлась стационарной инфекцией. Смертность среди взрослых животных составляет 5-10%, среди ягнят достигает 90% [5].

Болезнь до недавнего времени имела повсеместное распространение. Она встречалась в Европе, Азии, Америке, Африке, Австралии. В течение 1963-1981 гг. болезнь регистрировали в ряде областей Казахстана и России (Дагестан и др.). Официальных статистических данных о КЭО в период с 1961 по 1980 гг. не обнаружено. Однако сведения о КЭО за трехлетний период найдены в «Бюллетене о движении заболеваемости и падежа с/х животных МСХ СССР» за 1981 г. В этом бюллетене наряду с оспой КРС, мелкого рогатого скота, свиней, осподифтеритом птиц, также приведена информация на стр. 83 о *Контагиозном дерматите (стоматите) мелкого рогатого*

го скота. В России в 1976 г. отмечено 18 неблагополучных пунктов (НП) по КЭО, в 1980 г. - 38 НП, в 1981 г. - 20, где заболело соответственно 13,7; 35,7 и 22,8 тыс. животных. Также выявлены НП в 1976-1981 гг. в Казахстане, в 1976 и 1980 гг. в Молдавии, Украине, Киргизии [2]. Позже болезнь выявлялась в более южных районах, где и был налажен выпуск вакцин против этой инфекции (Ставрополье). С улучшением эпизоотической ситуации по КЭО потребность в вакцине отпала и одновременно стали исчезать в печати и публикации по этой болезни. В 1976 г. было лишь одно сообщение на конференции во Владимире [6]. В то же время сведения о характеристике прежних разработок вакцин опубликованы в 1981 г. в справочнике «Ветеринарные препараты» [1].

Характеристика возбудителя болезни

Впервые вирусная этиология контагиозной эктимы овец установлена в 1921 году, когда экспериментально была показана ведущая роль вируса в этиологии болезни КЭО. Также показана вторичная роль бактерий некробактериоза в развитии инфекционного процесса [15].

Возбудитель болезни – двухцепочечный ДНК-содержащий вирус из семейства осповирусы (поксвирусы) подсемейства хордопоксвирусы. Вирусы оспы широко распространены в природе. Это самые крупные вирусы, содержащие ДНК. Вирус КЭО под электронным микроскопом имеет овальную коконообразную форму размером 160-260 нм [14]. Подсемейство позвоночных включает 8 родов. В составе одного из этих родов наиболее опасными возбудителями являются вирусы оспы кур, человека, овец и коз, свиней, коров, тюленей, миксомы кроликов и др. К роду парапоксвирусы - относится типичный представитель и также опасный вирус контагиозно-