

STRUCTURAL AND ULTRA-STRUCTURAL ORGANIZATION OF LYMPH GLANDS OF WILD PIGS IN CONDITIONS OF AFRICAN SWINE FEVER (EXPERIMENTAL STUDY)

E. Ryzhova¹, Senior lecturer, Candidate of Veterinary sciences
V.V. Pronin², Doctor of Biological sciences, Full Professor,
Head of a Chair
S.A. Beljanin³, Junior Research Associate
D.V. Kolbasov⁴, Doctor of Veterinary sciences, Full professor,
director
The State Research Institution National Ivanovo State
Agricultural Academy named after acad. D.K. Belyaev, Russia^{1,2}
Research Institute For Veterinary Virology and
Microbiology of Russia of The Russian Academy of
Agricultural Science, Russia^{3,4}

The authors presents data on the structural and ultra-structural organization of the immune system organs (lymph glands) of wild pigs in terms of experimental reproduction of the African Swine Fever (ASF) with highly virulent field isolate of the second genotype ASF virus circulating on the Russian Federation territory.

Keywords: African Swine Fever, wild pigs (boars), the second genotype virus, structural and ultra-structural organization of immune system organs (lymph glands).

Conference participant, National championship in scientific analytics,
Open European and Asian research analytics championship

СТРУКТУРНАЯ И УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ДИКИХ СВИНЕЙ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Рыжова Е.В.¹, канд. ветеринар. наук, ст. преподаватель
Пронин В.В.², д-р биол. наук, профессор
Белянин С.А.³, мл. науч. сотр.
Колбасов Д.В.⁴, д-р ветеринар. наук, проф.
Ивановская государственная сельскохозяйственная
академия имени академика Д.К. Беляева, Россия^{1,2}
Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской
академии сельскохозяйственных наук, Россия^{3,4}

В статье представлены данные по структурной и ультраструктурной организации органов иммунной системы (лимфатические узлы) у диких свиней при экспериментальном воспроизведении африканской чумы свиней (АЧС) высоковирулентным полевым изолятом вируса АЧС второго генотипа, который циркулирует на территории России.

Ключевые слова: африканская чума свиней, дикие свиньи (кабаны), вирус второго генотипа, структурная и ультраструктурная организация органов иммунной системы (лимфатические узлы).

Участник конференции, Национального первенства по научной аналитике,
Открытого Европейско-Азиатского первенства по научной аналитике

Африканская чума свиней (АЧС), так же известная, как африканская лихорадка, болезнь Монтгомери – это легко передающаяся вирусная болезнь домашних и диких свиней. Согласно Международной классификации заразных болезней животных (OIE), данная болезнь относится к списку А, протекает в форме эпизоотии, при которой болезнь способна к широкому распространению, охватывающему все поголовье свиней хозяйства, района, области, страны, что приводит к огромному экономическому ущербу в сельском хозяйстве.

Впервые африканская чума свиней зарегистрирована в 1903 году в Южной Африке. В середине прошлого века она была занесена с Черного континента в страны Европы, затем попала в Советский Союз. Тогда очаги заражения удалось быстро ликвидировать. В настоящее время для Российской Федерации эпизоотическая ситуация по АЧС более критичная и напряженная [1,2,3].

Первые вспышки африканской чумы свиней в России были отмечены в конце 2007 года в Шатойском райо-

не Чечни. Затем чума охватила Южный, Северо-Кавказский федеральные округа и продолжала продвигаться на север. С 2007 года АЧС зарегистрирована на территории 24 субъектов РФ, в стране выявлено около 254 неблагополучных пунктов и 37 инфицированных вирусом объектов. При ликвидации очагов АЧС уничтожено более 440 тысяч голов свиней [2,3].

Анализ источников распространения АЧС показал, что основную роль в продвижении болезни играют два фактора: распространение заболевания в популяции диких свиней и пищевые отходы, скармливаемые свиньям. Наибольшую опасность в распространении АЧС представляет миграция диких свиней (кабанов), т.к. для диких животных не существует границ между регионами и невозможен постоянный контроль популяций диких животных [1].

С точки зрения патогенеза заболевания, при АЧС первичная репликация вируса происходит в моноцитах и макрофагах лимфатических узлов, расположенных недалеко от места проникновения вируса. Вначале ви-

рус инфицирует моноциты и макрофаги миндалин, нижнечелюстных, околушных и мезентериальных лимфатических узлов, затем с кровью и лимфой распространяется во вторичные места репликации – селезенку, костный мозг, лимфатические узлы, легкие, печень и почки – и вызывает дистрофические и некротические изменения в этих органах. Независимо от путей проникновения вируса, постоянно отмечаются изменения в селезенке и лимфатических узлах желудка, печени, почек [2,3,4].

Цель исследования.

Выявить основные особенности структурной и ультраструктурной организации лимфатических узлов при заражении диких свиней высоковирулентным полевым изолятом вируса АЧС второго генотипа, который циркулирует на территории РФ.

Материалы и методы.

1. Дикие свиньи европейского подвиды живой массой 40-50 кг. – 4 животных, получены из национального парка «Завидово» Тверской области Российской Федерации.

2. Изолят вируса АЧС №154/20,

Схема обезвоживания:

Сканирующая микроскопия	Трансмиссионная микроскопия
Обезвоживание в 70% – 1x10мин	Обезвоживание в 70% – 1x10мин
80,90,96% – 2x10мин	80,90,96% – 2x10мин
100 – 2x15	100% – 2x15
абс. спирт+абс. ацетон 2x15 мин	абс. спирт+абс. ацетон 2x15 мин
абс. ацетон – 2x 15 мин	абс. ацетон – 2x 15 мин
Высушивание методом критической точки (на установке Hitachi HCP-2 (Япония)).	Смола (смесь Эпона и Аралдита):абс. ацетоном (1:2) – 18-24 часа
Монтаж объектов на столики	Смола (смесь Эпона и Аралдита):абс. ацетоном (1:1) – 24 часа
Напыление золотом (на установке Eiko – IB – 3 (Eiko – Япония)).	Смола (смесь Эпона и Аралдита):абс. ацетоном (2:1) – 18-24 часа
Просмотр препаратов на сканирующем (растровом) электронном микроскопе JSM – 6510 LV (JEOL (Япония)).	Смола (смесь Эпона и Аралдита) – 1 час с открытыми пробками – для удаления остатков ацетона
	Заливка в такую же смесь смолы в капсулы
	Полимеризация при 45°C – 24 часа
	Полимеризация при 60°C – 48-72 часа
	Приготовление ультратонких срезов 200-300Å
	Контрастирование срезов 1% водными растворами ураниацетата и цитрата свинца
	Просмотр препаратов на просвечивающем электронном микроскопе JEM1011 (JEOL (Япония)) (диапазон увеличения - от x50 до x1 000 000).

выделенный в 2009 г. от павшего кабана в ст. Калиновская, Наурского района Республики Чечня с инфекционной активностью 6,0 lgГАЕ₅₀/см³. Данный изолят вируса паспортизирован и в настоящее время его используют в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров при проведении фундаментальных и прикладных НИОКР.

3. Моноклональные антитела Ki – 67 (фирма «ДАКО»).

Одного кабана (№1) инфицировали внутримышечно изолятом вируса АЧС №154/20 (экстрактом 10%-ной суспензии селезенки) в объеме 2 см³. Остальные животные (№№2,3,4) находились в одном боксе на контакте с внутримышечно инфицированным кабаном (№1).

В течение эксперимента ежедневно проводили клинический осмотр животных. Для гистологического и иммуногистохимического исследований отбирали пробы соматических (нижнечелюстных и предлопаточных), а также висцеральных (портальных, желудочных и почечных) лимфатических узлов. Весь отобранный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, уплотняли в парафине, изготавливали срезы толщиной 4 – 5 мкм на ротормном микротоме.

Для гистологического исследования препараты окрашивали гематоксилином и эозином, изучали под микроскопом Leica DM1000, микрофотографирование осуществляли с помощью цифрового аппарата Leica DMB.

Иммуногистохимическое исследование (определение пролиферативной активности клеток – В- лимфоцитов во вторичных фолликулах лимфатических узлов) проводили с помощью иммунопероксидазного метода на срезах лимфатических узлов (толщиной 4-5 мкм) с использованием молекулярного биомаркера Ki 67 (ДАКО), который является показателем пролиферативной активности клеток и идентифицирует ядерный антиген, присутствующий на всех стадиях клеточного цикла, кроме G₀. Проллиферативную активность В-лимфоцитов во вторичных лимфатических фолликулах лимфатических узлов оценивали по индексу пролиферации (ИП,%), который представляет собой долю Ki-67-позитивных клеток в общей популяции клеток вторичных лимфатических фолликулов лимфатических узлов, при подсчете 100 клеток в 10 рандомизированных полях зрения по методике Г.Г. Автандилова

Результаты иммуногистохимического исследования обрабатывали статистически с применением программного комплекса Microsoft Exel 7.

Для электронной микроскопии материал после фиксации: 1) промывали в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,0 -15минут; 2) постфиксировали в 1% OsO₄ на том же буфере – 90минут; 3) промывали в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,0 -15минут; 4) Обезвоживание в батарее спиртов: 30, 50, 70% - 2x10минут.

Результаты исследования.

Гибель животного №1 наступила на 5-е сутки, животных №№2,3,4 - 10-е сутки.

Лимфатические узлы. При гистологическом исследовании в лимфатических узлах животных наблюдаются лимфатические фолликулы с центрами размножения (рис.1а), однако в отдельных фолликулах отмечается преобладание процессов кариопикноза и кариорексиса лимфоцитов (рис.1б). Кроме этого, в лимфатических узлах встречаются участки с гиперплазией фолликулов, что можно рассматривать как компенсаторную реакцию. В отдельных лимфатических узлах выявлен склероз краевых синусов, лимфоцитарная инфильтрация капсулы. В

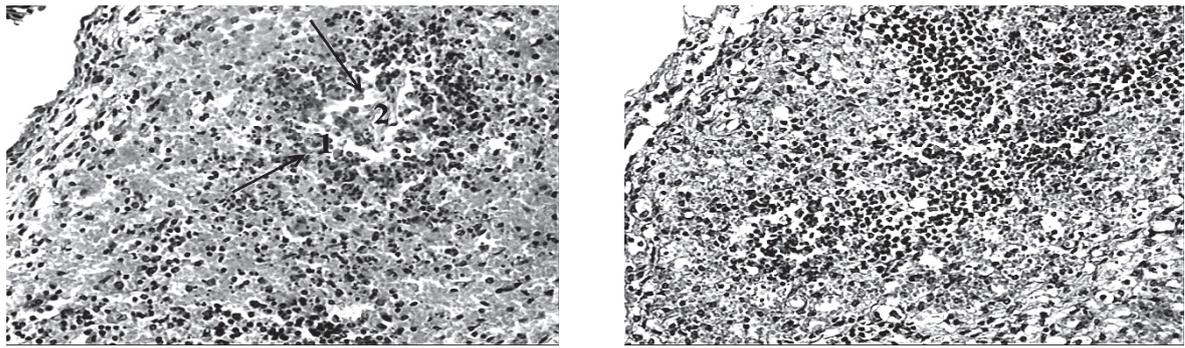


Рис. 1. Желудочный лимфатический узел: а) 1. гиперплазия фолликулов; 2. центры размножения (об.20 x ок.15; окраска гематоксилином и эозином); б) фолликулы без центров размножения (об.20 x ок.15; окраска гематоксилином и эозином)

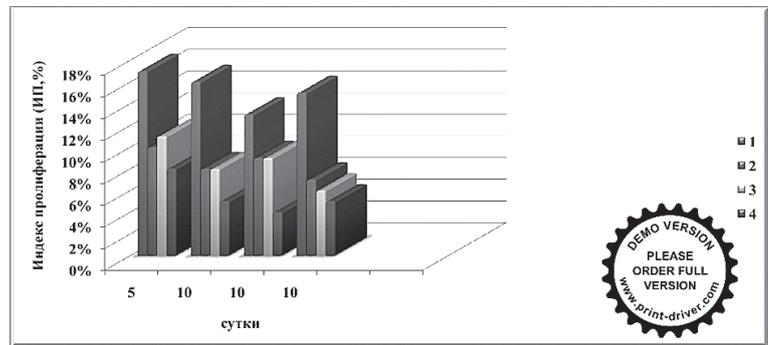
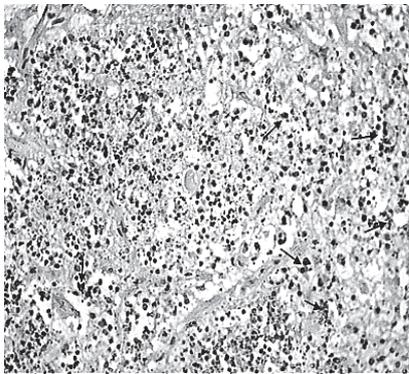


Рис.2. а) Желудочный лимфатический узел. Экспрессия маркера пролиферации Ki-67 (об.20 x ок. 15; иммунопероксидазный метод окраски); б) Индекс пролиферации (ИП,%) В-лимфоцитов в лимфатических узлах: 1.Нижнечелюстные лимфатические узлы; 2.Портальные лимфатические узлы; 3. Желудочные лимфатические узлы; 4. Почечные лимфатические узлы

периодальной клетчатке имеются образования, состоящие из переполненных кровью кавернозных полостей с утолщенными стенками. При иммуногистохимическом исследовании пролиферативной активности клеток в лимфатических узлах выявлен антиген Ki – 67, что представлено в виде

коричневого окрашивания ядер клеток. Наиболее отчетливо зона пролиферации клеток отмечается в лимфоидных фолликулах в центре размножения (рис.2а).

По результатам статистической обработки индекс пролиферации (ИП, %) в лимфатических узлах у диких

свиней (кабанов) составил (рис. 2б): 1) Нижнечелюстные лимфатические узлы: $15 \pm 0,4\%$; 2) Портальные лимфатические узлы: $8 \pm 0,4\%$; 3) Желудочные лимфатические узлы: $8 \pm 0,8\%$; 4) Почечные лимфатические узлы: $5,5 \pm 1,3\%$.

Снижение уровня пролиферации

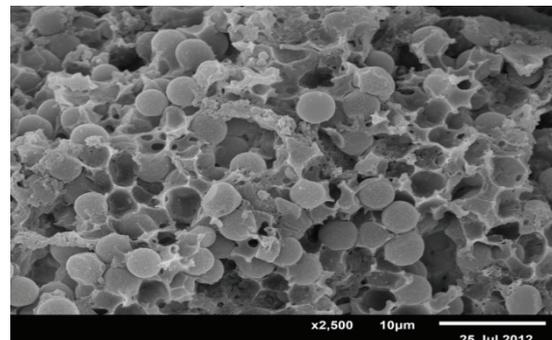
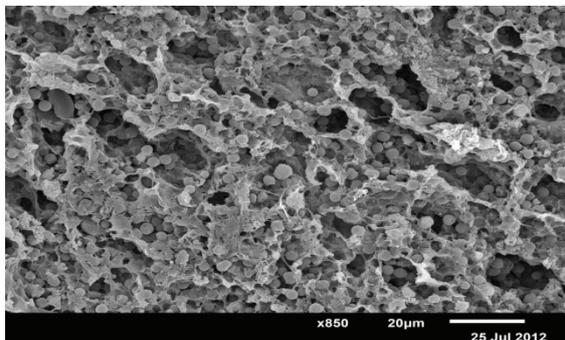


Рис.3. Желудочный лимфатический узел: а) на 5 сутки после заражения (сканирующая (растровая) электронная микроскопия, ув.× 850, 20µм); б) на 10 сутки после заражения (сканирующая (растровая) электронная микроскопия, ув.× 2500, 10µм).

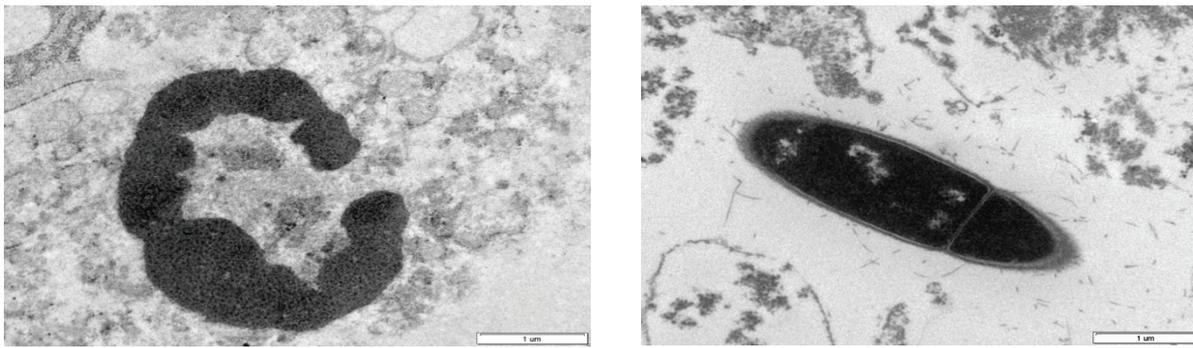


Рис.4. Желудочный лимфатический узел: а) апоптоз (конденсация хроматина, уплотнение цитоплазмы) (трансмиссионная микроскопия) 1µкм; б) апоптотное тельце (трансмиссионная микроскопия) 1µкм. Несмотря на апоптоз лимфоидный клеток, полное ингибирование процессов пролиферации лимфоцитов не происходит, о чем свидетельствует наличие на фоне клеток, которые подверглись апоптозу и активных лимфоцитов, а так же плазматических клеток (рис.5а, 5б).

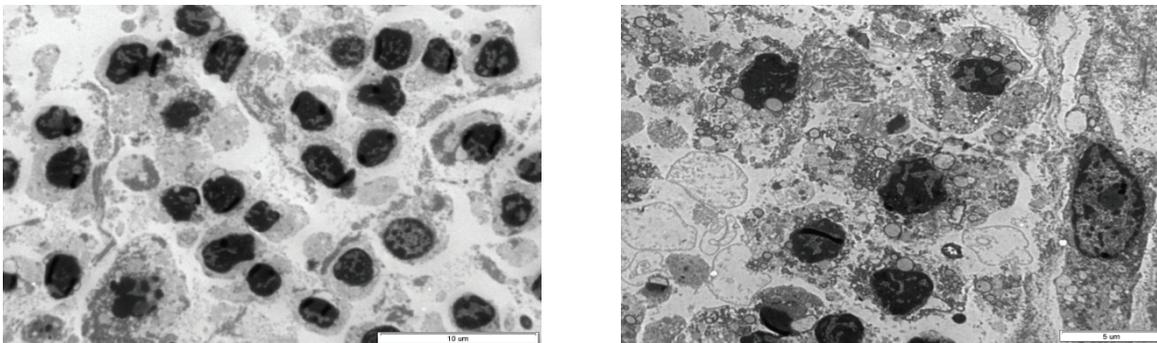


Рис. 5. Желудочный лимфатический узел: а) общий вид клеток (лимфоциты) (трансмиссионная микроскопия), 10µкм; б) общий вид клеток (плазматические клетки) (трансмиссионная микроскопия), 5µкм.

В- лимфоцитов, приводит к тому, что в ультраструктуре четко прослеживается «разрежение» лимфоидной ткани, за счет снижения количества лимфоцитов (рис.3а, 3б).

Уменьшение количества лимфоцитов связано с апоптозом лимфоидных клеток, в результате чего наблюдается уменьшение клеток в размерах, уплотнение цитоплазмы, конденсация хроматина по периферии, под мембраной ядра располагаются четко очерченные плотные массы различной формы и размеров (рис.4а), а так же наличие апоптотных телец (рис.4б).

Выводы.

В лимфатических узлах у диких свиней (кабанов) наблюдается, как гиперплазия фолликулов, с наличием центров размножения, так и редукция фолликулов, сочетающаяся с кариопикнозом и кариорексисом лимфоцитов. При иммуногистохимическом исследовании отмечается динамическое уменьшение процесса пролиферации В – лимфоцитов. В ультраструктуре

лимфатических узлов прослеживается «разрежение» лимфоидной ткани, за счет снижения количества лимфоцитов, подвергшихся апоптозу, однако полное ингибирование процессов пролиферации не происходит, что объясняется наличием активных лимфоцитов и плазматических клеток.

References:

1. Belyanin, S.A. Patogennost' virusa afrikanskoj chumy svinej, tsirkuliruyushchego na territorii RF [Pathogenicity of African hog cholera, circulating in the Russian Federation territory] S.A. Belyanin, A.P. Vasil'ev, D.V. Kolbasov i dr. Rol' veterinarnoi nauki v realizatsii prodovol'stvennoi doktriny RF: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii., GNU VNIIVViM [Role of the veterinary science in implementation of the RF food doctrine: Materials of the International Scientific-Practical Conference. GNU VNIIVViM]. - Pokrov, 2011., pp. 14-20.

2. Makarov, V.V. i dr. Dikii evropeiskii kaban. Veterinarnaya biologiya i epizootologiya [The wild European boar. Veterinary biology and epizootology]. Veterinariya. [Veterinary]. – 2010., No 7., pp. 28-31.

3. Makarov V.V. Afrikanskaya chuma svinei [African hog cholera]. - Moskva., Rossiiskii universitet druzhby narodov, 2011. - 268 p.

4. Serov, V.V. Patologicheskaya anatomiya. Atlas [Pathological anatomy. Atlas] V.V. Serov, N.E. Yarygin, V.S. Paukov. «Meditsina» - Moskva., 1986. - 185 p.

Литература:

1. Белянин, С.А. Патогенность вируса африканской чумы свиней, циркулирующего на территории РФ / С.А. Белянин, А.П. Васильев, Д.В. Колбасов и др. // Роль ветеринарной науки в реализации продовольственной доктрины РФ: материалы Международной научно-практической конференции/ ГНУ ВНИИВВиМ.-Покров, 2011.-С.14-20.

2. Макаров, В.В. и др. Дикий европейский кабан. Ветеринарная биология и эпизоотология //Ветеринария. – 2010. - №7. – С.28-31.

3. Макаров В.В. Африканская чума свиней. М.: Российский университет дружбы народов. 2011, 268с.

4. Серов, В.В. Патологическая анатомия. Атлас / В.В. Серов, Н.Е. Ярыгин, В.С. Пауков. «Медицина», Москва, 1986 год, 185 с.

Information about authors:

Elena Ryzhova - Candidate of Veterinary sciences, Senior Lecturer, The State Research Institution National Ivanovo State Agricultural Academy named after acad. D.K. Belyaev; address: Russia, Gus-Khrustalny city; e-mail: ryzhova_lena@mail.ru

Valerii Pronin - Doctor of Biological sciences, Full Professor, Head of a Chair, The State Research Institution National Ivanovo State Agricultural Academy

named after acad. D.K. Belyaev; address: Russia, Ivanovo city; e-mail: ryzhova_lena@mail.ru

Sergey Beljanin - Junior Research Associate, Research Institute For Veterinary Virology and Microbiology of Russia of The Russian Academy of Agricultural Science; address: Russia, Ivanovo city; e-mail: ryzhova_lena@mail.ru

Denis Kolbasov - Doctor of Veterinary sciences, Full Professor, Director, Research Institute For Veterinary Virology and Microbiology of Russia of The Russian Academy of Agricultural Science; address: Russia, Ivanovo city; e-mail: ryzhova_lena@mail.ru

Сведения об авторах:

Рыжова Елена - кандидат ветеринарных наук, старший преподаватель, Ивановская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д.К. Беляева; адрес: Рос-

сия, Гусь-Хрустальный; электронный адрес: ryzhova_lena@mail.ru

Пронин Валерий - доктор биологических наук, профессор, Ивановская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д.К. Беляева; адрес: Россия, Иваново; электронный адрес: ryzhova_lena@mail.ru

Белянин Сергей - младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук; адрес: Россия, Иваново; электронный адрес: ryzhova_lena@mail.ru

Колбасов Денис - доктор ветеринарных наук, профессор, Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук; адрес: Россия, Иваново; электронный адрес: ryzhova_lena@mail.ru



INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONGRESS

Multisectoral scientific-analytical forum for professional scientists and practitioners

Main goals of the IASHE scientific Congresses:

- Promotion of development of international scientific communications and cooperation of scientists of different countries;
- Promotion of scientific progress through the discussion comprehension and collateral overcoming of urgent problems of modern science by scientists of different countries;
- Active distribution of the advanced ideas in various fields of science.



FOR ADDITIONAL INFORMATION PLEASE CONTACT US:

www: <http://gisap.eu>
e-mail: congress@gisap.eu