

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

Д.А. Бирюченков¹, Е.П. Баборенко², Е.А. Авситидийский³, Д.Л. Долгов⁴, Ж.Ю. Мурадян⁵, А.И. Албулов⁶

¹ старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: biruchenkov@arriah.ru

² старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: baborenko@arriah.ru

³ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: avsitidiysky@arriah.ru

⁴ старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: dolgov@arriah.ru

⁵ аспирант, ФГНБУ «ВНИТИБП», г. Щелково

⁶ заведующий отделом, доктор биологических наук, профессор, ФГНБУ «ВНИТИБП», г. Щелково

РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты изучения антигенной активности и местной тканевой реакции у свиней, иммунизированных экспериментальной вакциной против репродуктивно-респираторного синдрома свиней, изготовленной на основе коммерческих адъювантов фирмы SEPPIC (Франция) с включением в состав водорастворимых производных хитозана.

Ключевые слова: репродуктивно-респираторный синдром свиней, вакцина, адъювант, хитозан.

ВВЕДЕНИЕ

Репродуктивно-респираторный синдром свиней (PPCC) наносит значительный экономический ущерб свиноводству многих стран мира. Появление PPCC в конце 80-х гг. прошлого века связывают со вспышками в Канаде и США «загадочной болезни свиней», которую впоследствии именовали «синим ухом». В дальнейшем подобная инфекция была зафиксирована и во многих странах мира [7, 9]. В России первые клинически зарегистрированные случаи обнаружения PPCC отмечались в 90-х гг. прошлого века. Впервые PPCC был диагностирован в 1993 г. в ряде свиноводческих хозяйств Курской области [6].

Возбудителем PPCC является вирус, который был впервые выделен и классифицирован как артеривирус только в 1991 г. Инфекционный агент, лишь однократно попав в свиноводческое хозяйство, сохраняется и остается активным в течение неопределенно долгого времени.

У вируса PPCC имеется высокоспецифическое сродство к макрофагам; вирус способен размножаться в них, что ведет к утрате основной части механизма защиты организма восприимчивого животного и позволяет другим инфекциям наслаиваться и вызывать тяжелые осложнения. Ярким примером такого явления может служить заметное усиление тяжести течения эн-

зоотической пневмонии, гемофилезного полисерозита, цирковирусной инфекции 2 типа и гриппа свиней после заражения животных вирусом PPCC [8].

Известно, что в мире наиболее широко распространен вирус PPCC двух генотипов: европейский и американский, последний широко распространен в Америке и Юго-Восточной Азии. В свиноводствах России до 2007 г. в основном циркулировали изоляты вируса PPCC, принадлежащие европейской генетической группе [3].

Совершенствование средств специфической профилактики PPCC является одной из актуальных задач современного свиноводства. В настоящий момент существует широкий ассортимент препаратов против PPCC зарубежного производства, однако их высокая стоимость в значительной степени ограничивает возможности российских производителей свинины, на своем опыте столкнувшихся с проблемой PPCC.

Одним из аспектов совершенствования вакцины является поиск и внедрение современных иммуномодуляторов и сорбентов, обладающих максимально выраженным биологическим сродством [5, 7, 10].

Природный хитозан обладает такими свойствами, как высокая сорбционная емкость, нетоксичность, бактериостатическая активность [2]. Также он является хорошим флокулянт, загустителем, а его низкомолекулярные фракции, получаемые из высокомолекулярного природного сырья путем химического или ферментативного гидролиза, обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами благодаря способности в максимально короткие сроки активизировать выработку белков иммунного ответа, поэтому попытка совершенствования инактивированной вакцины против PPCC с использованием хитозана является актуальной задачей [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 1–1,5-месячных подсвинок живой массой 15–20 кг, полученных из хозяйств, благополучных по инфекционным заболеваниям. Подо-

пытных поросят выдерживали в карантине в течение 7 дней с ежедневным клиническим осмотром и измерением температуры тела.

В качестве адъювантов использовали продукцию фирмы SEPPIC™ (Франция), давно зарекомендовавшую себя на российском рынке с положительной стороны. В частности, в свиноводстве рекомендованы к использованию Montanide ISA 70 VG™ и Montanide ISA 206 VG™.

Адъювант Montanide ISA 206 VG стерилизовали «холодным» способом с применением стерилизующего фильтра Sartobran (производитель Sartorius) с диаметром пор не более 0,22 мкр.

Адъювант Montanide ISA 70 VG серии U40218 36018A стерилизовали в автоклаве в строгом соответствии с рекомендациями производителя (при температуре 121°C и давлением 1,0 атм в течение 40 мин).

В работе использовали европейский штамм вируса PPCC «КПР-96», депонированный в ФГБУ «ВГНКИ» в 2004 г. и выращенный в монослое перевиваемой культуры клеток почки макаки резус (Marc-145).

Стерильную форму препарата сукцината хитозана (далее хитозана) (ЗАО «Биопродгесс», г. Щелково) добавляли в водный раствор инактивированного антигена до конечной концентрации 0,25%.

Изготовление образцов с добавлением хитозана или без него проводили строго в соответствии с рекомендациями производителя адъюванта: № 1 — на основе Montanide ISA 206 VG; № 2 — на основе Montanide ISA 206 VG + хитозан; № 3 — на основе Montanide ISA 70 VG + хитозан; № 4 — на основе Montanide ISA 70 VG.

Все полученные опытные образцы вакцин вводили внутримышечно в дозе 2 см³/гол. В течение 10 последующих дней проводили пальпацию кожи в области введения вакцины на предмет гиперемии, гипертермии и припухлости, а также проводили ректальное измерение температуры тела.

Ревакцинацию проводили через 21 день после вакцинации. Повторную клиническую диагностику местной реакции с посуточной термометрией проводили вышеописанным способом.

От животных отбирали пробы крови и исследовали полученные сыворотки крови на наличие антител к вирусу PPCC с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции нейтрализации (РН) до вакцинации, перед ревакцинацией (21 сутки), 14, 21 и 42 суток после нее. Сыворотки крови получали посредством центрифугирования проб крови (1500 г, 4°C) в течение 30 мин и хранили при температуре –20°C до проведения анализа.

Сыворотки крови свиней исследовали на наличие антител против вируса PPCC с использованием коммерческого набора Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus Antibody Test Kit™ (IDEXX™, Europe) согласно прилагаемой инструкции по применению и в РН по стандартной методике [4].

Убой подопытных животных проводили через 63 дня после вакцинации с последующим проведением патологоанатомического вскрытия и тщательного изучения места введения опытных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В опыте было 5 групп по 4 подсвинка в каждой, одну из которых, выбранную случайным образом, использовали как контроль. Все вышеперечисленные группы содержались изолированно друг от друга.

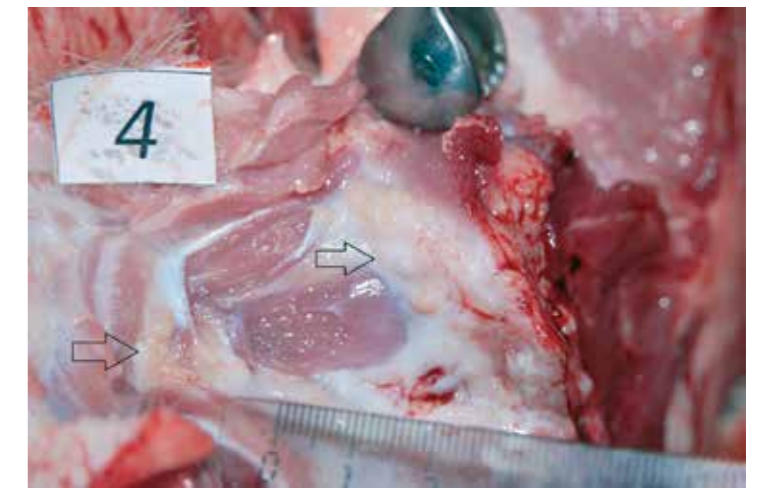


Рис. 1. Изменения в месте введения образца № 1 у поросенка

У отдельных животных через 24 ч после вакцинации наблюдали гипертермию. Так, у 2 из 4 поросят, привитых препаратом № 2, отмечено повышение температуры тела до (40,8±0,2)°C. Гипертермию в пределах (40,4±0,1)°C в указанные сроки зафиксировали также у 3 поросят, которым вводили опытный образец № 3. Угнетения, снижения аппетита и каких-либо иных отклонений от нормы при этом у животных не наблюдали.

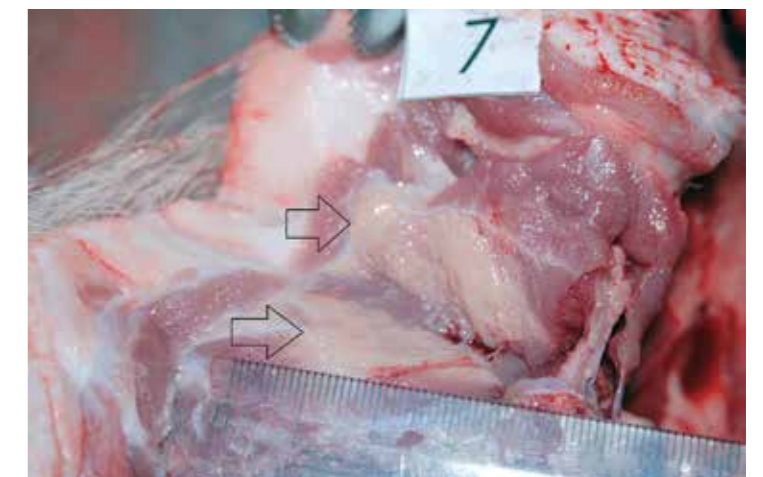
Повышение температуры тела свыше 40°C через 24 ч после повторного введения вакцины было зафиксировано у 2 поросят из группы, в которой животным вводили препарат № 2, у 1 поросенка из группы, в которой вводили препарат № 3, без каких-либо клинических признаков недомогания (в т.ч. угнетения, ухудшения аппетита и т.п.). В дальнейшем испытываемые животные оставались здоровыми в течение всего срока наблюдения.

По окончании опыта все животные были подвергнуты диагностическому убою гуманным методом с проведением патологоанатомического вскрытия.

У поросят, которым вводили образец вакцины № 1, в месте инъекции наблюдали значительное разрастание рыхлой соединительной ткани, пронизанной мелкими каплями испытуемого препарата («икринками»), площадью 2,0×3,5 см (рис. 1).

У поросят, которым вводили образец вакцины № 2, в месте инъекции наблюдали обширные изменения соединительной ткани, пронизанной мелкими пузырька-

Рис. 2. Изменения в месте введения образца № 2 у поросенка



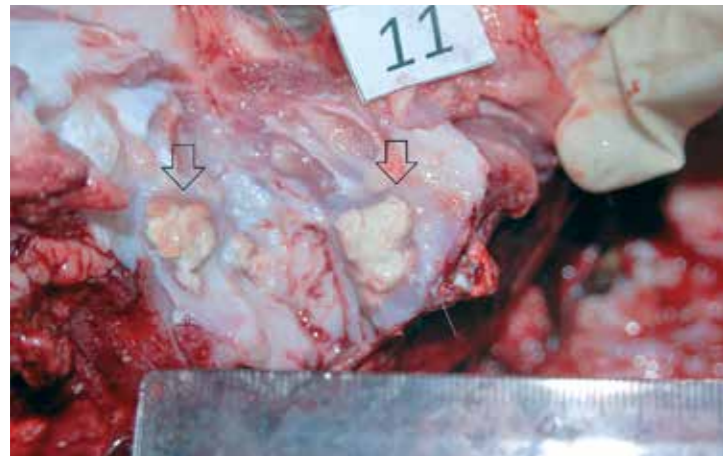


Рис. 3. Изменения в месте введения образца № 3 подопытному животному №11

ми вакцины. Общая площадь измененной ткани значительно превышала 3 см² (рис. 2).

У свиней, которым вводили образец вакцины № 3, в месте инъекции отмечали незначительные изменения соединительной ткани с образованием выраженного «депо» вакцины в месте введения препарата, а общая площадь измененной ткани не превышала 1 см² (рис. 3).

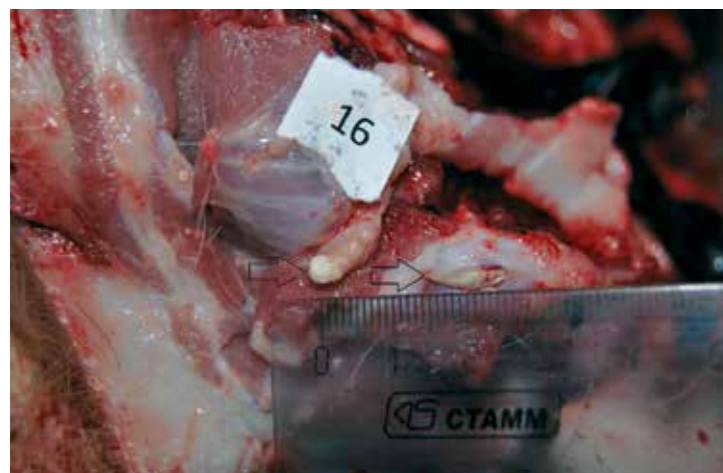
У поросят, которым вводили опытный образец вакцины № 4, в месте инъекции наблюдали незначительные изменения соединительной ткани с образованием выраженного «депо» вакцины в месте введения препарата, а общая площадь измененной ткани составляла от 0,9 до 1,5 см² (рис. 4).

От животных до иммунизации, перед ревакцинацией (21 сутки), через 14 дней после ревакцинации, затем на 21 сутки и по окончании опыта отбирали пробы крови, затем исследовали сыворотки крови на наличие антител к вирусу РРСС в ИФА и РН. Результаты исследования представлены в таблице.

Из представленных в таблице данных видно, что до вакцинации антитела к РРСС в сыворотках крови свиней не обнаруживались.

Через 21 день после вакцинации в сыворотках крови опытных животных, вакцинированных образцами № 1 и № 2, в ИФА специфические антитела к вирусу РРСС не выявили, средние значения оптической плотности (s/p) достигали значений 0,04 и 0,06 соответственно. В то время как в группах животных, вакцинированных

Рис. 4. Изменения в месте введения опытного образца № 4 у свиньи



образцами № 3 и № 4, выявили специфические антитела к вирусу РРСС; средние значения s/p составляли 0,83 и 0,65 соответственно.

Через 14, 21 и 42 дня после ревакцинации в сыворотках крови опытных животных, вакцинированных образцами № 1 и № 2, уровень антигенной активности к вирусу РРСС в ИФА практически не изменялся. Положительная динамика накопления специфических антител наблюдалась в группах, вакцинированных образцами № 3 и № 4: средние значения s/p составили от 1,6 до 2,6 и от 1,04 до 2,25 соответственно.

Таким образом, у привитых вакцинами № 1 и № 2 свиней отсутствие специфических антител может свидетельствовать о низком уровне адъювантных свойств Montanide ISA 206 VG, который в достаточной степени не смогло нивелировать даже добавление хитозана.

В то же время уровень специфических антител к вирусу РРСС у животных, иммунизированных образцами вакцин на основе адъюванта Montanide ISA 70 VG как с хитозаном, так и без его добавления на всех сроках отбора подтверждает высокую антигенную активность препаратов и устойчивую положительную динамику антителообразования у привитых поросят.

ВЫВОДЫ

1. Результаты проведенных исследований показали, что после введения опытных образцов вакцины у всех поросят наблюдали кратковременное повышение температуры тела в пределах физиологической нормы, что в целом не оказывало видимых негативных последствий для состояния здоровья подопытных животных.

2. У свиней, привитых препаратами на основе адъюванта Montanide ISA 206 VG как в чистом виде, так и в ассоциации с хитозаном, при патологоанатомическом исследовании регистрировали значительное разрастание рыхлой соединительной ткани в месте введения вакцины. При этом у данной группы животных не наблюдалось образования специфических антител в достаточном для защиты организма количестве. В то же время у животных, которым вводили вакцину на основе адъюванта Montanide ISA 70 VG как с хитозаном, так и без него, уже через 1,5 месяца после ревакцинации в крови наблюдалось значительное повышение уровня вируснейтрализующих антител, сопровождаемое образованием в месте введения компактного по своим размерам «депо» вакцины, способствующего развитию стойкого и продолжительного иммунитета.

3. Темпы нарастания титров специфических антител при изначально равных в отношении использования адъюванта условиях в группе № 3 значительно превышают таковые в группе № 4, что может свидетельствовать о положительной роли водорастворимого хитозана в совершенствовании инактивированных вакцин против РРСС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние хитозана на иммунную и эндокринную системы поросят / А.А. Буянов, В.Н. Виденин, А.Н. Гречухин, В.Д. Нифантов // Ветеринария. — 2004. — № 2. — С. 47–51.
2. Воробьева А.А., Медуницын Н.В. Новые принципы и методы создания иммунобиологических препаратов // Медицина. — 1999. — № 10. — С. 16–17.
3. Генетическое обилие вируса РРСС / А.В. Щербаков, В.Ф. Ковалишин, В.А. Пыльнов [и др.] // Актуал. проблемы инфекц. патологии животных: матери-

Таблица

Изучение антигенной активности опытных образцов вакцин против РРСС инактивированных эмульгированных с использованием адъювантов SEPPIC и хитозана

№ опытного образца вакцины	№ жив-го	Антигенная активность в ИФА — s/p значения*; в реакции нейтрализации — log ₂									
		до вакцинации		21 сутки после вакцинации**		14 суток после ревакцинации		21 сутки после ревакцинации		42 суток после ревакцинации	
		ИФА	РН	ИФА	РН	ИФА	РН	ИФА	РН	ИФА	РН
№1 (ISA 206)	1	0,01	<2,0	0,08	<2,0	0,09	<2,0	0,09	2,0	0,09	2,0
	2	0,02	-***	0,02	-	0,03	3,25	0,04	3,25	0,09	3,0
	3	0,02	-	0,02	-	0,03	<2,0	0,03	3,0	0,03	3,0
	4	0,02	-	0,03	-	0,03	3,0	0,03	3,0	0,04	2,75
		0,02±0,001	0,5±0,003	0,04±0,002	0,5±0,003	0,045±0,001	2,5±0,002	0,05±0,001	2,8±0,002	0,06±0,001	2,7±0,004
№2 (ISA 206+ хитозан)	5	0,01	<2,0	0,04	-	0,06	3,25	0,08	3,25	0,2	3,25
	6	0,02	-	0,06	-	0,06	3,0	0,09	3,0	0,15	3,25
	7	0,02	-	0,05	-	0,08	<2,0	0,13	3,75	0,16	3,0
	8	0,05	-	0,1	<2,0	0,2	<2,0	0,4	3,0	0,5	3,0
		0,02±0,001	0,5±0,003	0,06±0,001	0,5±0,003	0,1±0,003	2,5±0,002	0,2±0,001	3,25±0,002	0,3±0,001	3,1±0,002
№3 (ISA 70+ хитозан)	9	0,03	-	0,8	5,25	0,7	7,5	1,8	7,75	2,71	8,5
	10	0,02	-	1,5	7,0	1,5	8,0	2,4	8,5	2,64	8,5
	11	0,01	-	0,3	7,0	2,2	8,5	1,9	9,0	2,0	8,75
	12	0,02	-	0,74	7,0	2,0	7,75	2,4	8,5	3,0	8,75
		0,02±0,001	-	0,83±0,003	6,56±0,002	1,6±0,001	8,0±0,004	2,1±0,002	8,4±0,005	2,6±0,001	8,6±0,002
№4 (ISA 70)	13	0,02	-	0,7	4,75	0,97	5,7	1,2	5,75	2,4	6,0
	14	0,02	-	0,4	5,0	1,1	6,0	1,9	6,0	2,1	6,25
	15	0,01	-	0,6	5,75	0,8	6,25	2,0	6,5	2,3	6,5
	16	0,06	-	0,9	5,5	1,3	6,0	1,4	6,0	2,2	7,25
		0,03±0,001	-	0,65±0,003	5,25±0,004	1,04±0,001	6,0±0,005	1,6±0,002	6,1±0,006	2,25±0,003	6,5±0,004
Контроль	17	0,03	-	0,01	<2,0	0,01	-	0,03	-	0,03	-
	18	0,02	-	0,02	-	0,02	-	0,02	-	0,02	-
	19	0,01	-	0,04	-	0,01	-	0,02	-	0,03	-
	20	0,03	-	0,05	-	0,02	-	0,01	-	0,04	-
		0,02±0,001	-	0,03±0,001	0,5±0,003	0,015±0,002	-	0,02±0,001	-	0,03±0,003	-

* значение s/p < 0,4 — положительное; ** ревакцинация; *** не улавливаемое в реакции значение вируснейтрализующих антител.

алы Междунар. науч. конф., посвящ. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2003. — С. 150–155.

4. Методика постановки реакции нейтрализации для ретроспективной диагностики репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) / Т.З. Байби-ков, Л.Г. Жучкова, Ш.К. Куляшбекова, В.Л. Гаврилова; ВНИИЗЖ. — Владимир, 1995. — 5 с.

5. Нудьга Л.А. Производные хитина и хитозана и их свойства // Хитин и хитозан. Получение, свойства, применение. — М., 2002. — С. 141–142.

6. Репродуктивно-респираторный синдром свиней («синее ухо») / В.А. Мищенко, В.М. Авилов, В.М. Захаров [и др.] // Ветеринария. — 1994. — № 9. — С. 22–24.

7. Chitosan — mediated stimulation of macrophage function / G. Peluso, O. Petillo, M. Ranieri [et al.] // Biomaterials. — 1994. — Vol. 15, № 15. — P. 1215–1220.

8. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody / E.M. Bautista, S.M. Goyal, I.J. Yoon [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. — 1993. — Vol. 5, № 2. — P. 163–165.

9. Morin M., Robinson Y. Causes of mystery swine disease // Can. Vet. J. — 1992. — Vol. 33, № 1. — P. 6.

10. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator / Y.-W. Cho, Y.-N. Cho, S.-H. Chung [et al.] // Biomaterials. — 1999. — Vol. 20, № 22. — P. 2139–2145.

IMPROVEMENT OF INACTIVATED VACCINE AGAINST PORCINE REPRODUCTIVE RESPIRATORY SYNDROME

D.A. Biruchenkov¹, Ye.P. Baborenko², Ye.A. Avsitiyevskiy³, D.L. Dolgov⁴, Zh.Yu. Muradyan⁵, A.I. Albulov⁶

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: biruchenkov@arriah.ru

² Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: baborenko@arriah.ru

³ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: avsitiyevskiy@arriah.ru

⁴ Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: dolgov@arriah.ru

⁵ PhD student, Federal State Budgetary Scientific Institution «VNITIBP», Shelkovo

⁶ Head of the Department, Doctor of Science (Biology), Professor, Federal State Budgetary Scientific Institution «VNITIBP», Shelkovo

SUMMARY

The paper presents results of studying antigenicity and local tissue reaction in pigs immunized with the experimental PRRS vaccine produced on the basis of commercial SEPPIC (France) adjuvants with addition of water-soluble chitosan derivatives.

Key words: porcine reproductive respiratory syndrome, vaccine, adjuvant, chitosan.

INTRODUCTION

Porcine reproductive respiratory syndrome (PRRS) causes great economic losses to pig production in many countries of the world. PRRS occurrence in the end of 80s last century is associated with «mystery swine disease» registered in Canada and USA which was later called «blue ear». Hereafter the disease was registered in many countries of the world [7, 9]. In Russia the disease was firstly registered in the 90s of the last century. For the first time PRRS was diagnosed on Russia in 1993 in several pig farms of Kursk Oblast. [6].

PRRS agent is the virus which was for the first time recovered and classified as Arterivirus only in 1991. The infectious agent once penetrating a pig farm remains present and active indefinitely.

PRRS virus has highly specific affinity for macrophages; the virus multiplies in them thus removing a major part of the bodies defense mechanism and allowing other infections penetrate and cause severe complications. A common example of this is increase of severity of enzootic pneumonia, hemophilic polyserositis, circovirus infection Type 2, and swine influenza when pigs become infected with PRRS virus [8].

It is known that two PRRS genotypes are widely spread in the world: European and American, the latter is widely spread in America and South-East Asia. PRRS virus isolates belonging to the European genetic group circulated in Russian pig farms before 2007 [3].

Improvement of PRRS specific prophylaxis is one of topical tasks of the contemporary pig production. Today there

is a wide range of foreign drugs against PRRS but their high price considerably restricts opportunities of Russian pork producers facing PRRS problem.

One of the aspects of the vaccine improvement is searching and implementation of new immune response modifiers and sorbents having apparent biological affinity [5, 7, 10].

Natural chitosan possesses such qualities as high sorption capacity, nontoxicity, and bacteriostatic activity [2]. It is also a good flocculant, and a thickening agent and its low molecular fractions obtained from high molecular weight natural raw materials by chemical and enzymic hydrolysis possess vivid immunomodulating characteristics due to their capability to promptly activate the production of immune response associated proteins. That's why the attempt to improve the inactivated PRRS vaccine using chitosan is a topical task [1].

MATERIALS AND METHODS

1–1,5 month old piglets, 15–20 kg BW, from infectious disease free farms were used in the investigation.

Experimental pigs were quarantined for 7 days. They were subject to daily clinical examination and temperature check.

SEPPIC™ (France) products, well established in the Russian market, were used as adjuvants. In particular Montanide ISA 70 VG™ и Montanide ISA 206 VG™ are recommended for use in pig production.

Montanide ISA 206 VG adjuvant were sterilized using Sartobran sterilizing filter (Sartorius), at least, 0,22 μm diameter. Montanide ISA 70 VG adjuvant, batch U40218 36018A, was sterilized in autoclave in compliance with the producer's recommendations (at 121°C and 1,0 atm for 40 min)

European PRRS virus strain «KPR-96» deposited in FGBI «VGNKI» in 2004 and grown in the monolayer of the monkey kidney Marc-145 continuous cell line was used in the experiment.

Sterile form of chitosan succinate (hereafter chitosan) (ZAO Bioprogress, Shelkovo) was added to inactivated antigen water solution to reach the final 0,25% concentration.

Samples with chitosan or without it were prepared in compliance with adjuvant producer's recommendations: № 1 – based on Montanide ISA 206 VG; № 2 – based on Montanide ISA 206 VG + chitosan; № 3 – based on Montanide ISA 70 VG + chitosan; № 4 – based on Montanide ISA 70 VG.

All prepared vaccine samples were administered intramuscularly in doses of 2 cm³ per animal. Within the next 10 days the skin at the site of the vaccine administration was palpated for hyperemia, hyperthermia or swell. Rectal temperature was also measured.

Revaccination was performed in 21 days post vaccination. The specified above method was used to perform repeated clinical diagnosis of the local reaction and daily thermometry.

Blood samples were collected from animals. Prepared blood sera were tested for antibodies to PRRS virus using ELISA and neutralization test prior to vaccination, prior to revaccination (21 days), 14, 21, and 42 days after it. Blood sera were prepared by blood sample centrifuging (1500 g, 4°C) for 30 minutes and kept at -20°C till the analysis was performed.

Swine blood sera were tested for antibodies to PRRS virus using commercial Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus Antibody Test Kit™ (IDEXX™, Europe) according to the attached package insert and NT according to the standard method [4].

Experimental animals were slaughtered in 63 days post vaccination with subsequent autopsy and thorough examination of the administration site.

RESULTS AND DISCUSSION

5 groups of 4 piglets were used in the experiment. One of the randomly selected groups was used as a control group. All specified above groups were kept separately from each other.

Hyperthermia was observed in several animals in 24 hours post vaccination. Thus, body temperature increased to (40,8±0,2)°C in 2 out of 4 piglets vaccinated with preparation № 2. Hyperthermia (40,4±0,1)°C was observed in 3 piglets injected with experimental sample № 3 in the time specified. In appetite, low appetite and other abnormalities were not observed in animals.

Fig. 2. Lesions at sample № 2 injection site in a piglet

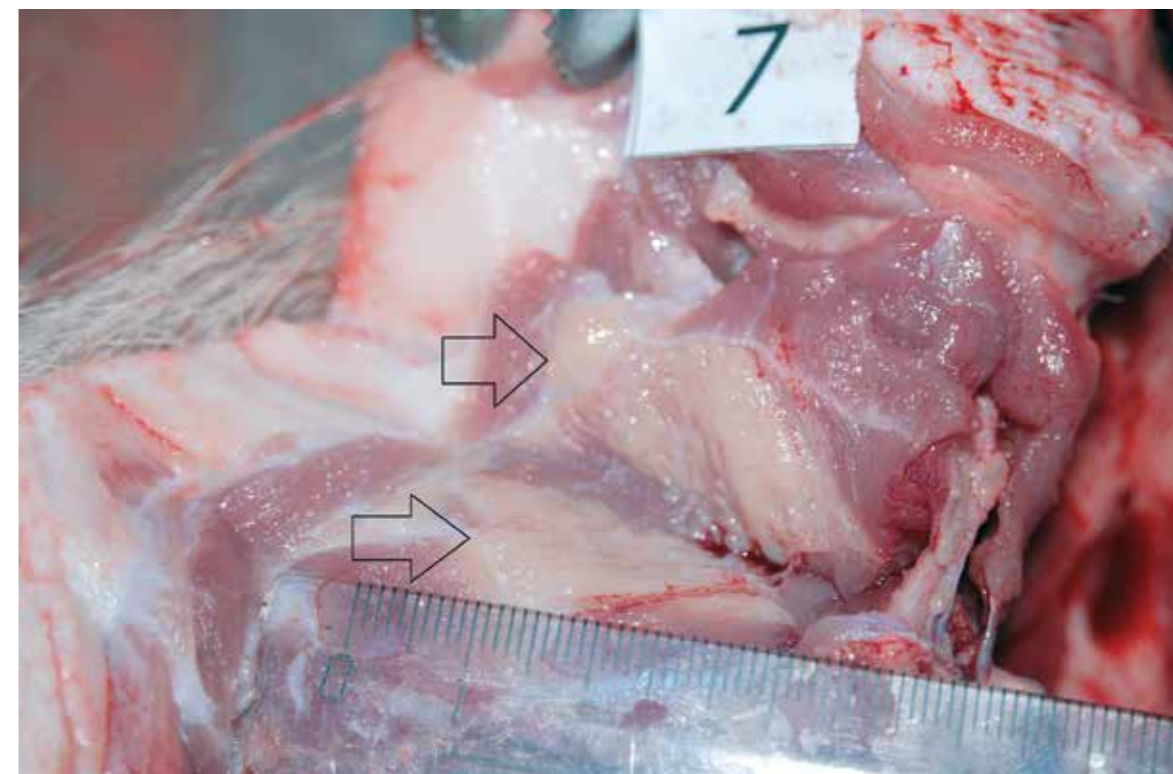


Fig. 1. Lesions at sample № 1 injection site in a piglet

In 24 hours after the repeated administration of the vaccine temperature increased to more than 40°C in 2 piglets of the group vaccinated with preparation № 2, and in 1 piglet of the group vaccinated with preparation № 3. No abnormalities (including inappetence, low appetite, etc.) were observed. Hereafter the experimental animals remained healthy within the whole observation period.

At the end of the experiment all animal were subject to diagnostic humane slaughter with subsequent autopsy.

Considerable proliferation of loose connective tissue (2,0×3,5 cm) pierced with small drops of the tested preparation («roe») was observed at the administration site in piglets injected with vaccine sample № 1 (Fig. 1).

Considerable lesions of connective tissue pierced with the vaccine bubbles were observed in animals injected with vaccine sample № 2. The total area of lesions considerably exceeded 3 cm² (Fig. 2).

Slight lesions of connective tissue with formation of vaccine depot at the site of injection were observed in pigs injected with vaccine sample № 3. The total area of lesions did not exceed 1 cm² (Fig. 3).

Slight lesions of connective tissue with formation of vaccine depot at the site of injection were observed in piglets injected with vaccine sample № 4. The total area of lesions was 0,9–1,5cm² (Fig. 4).

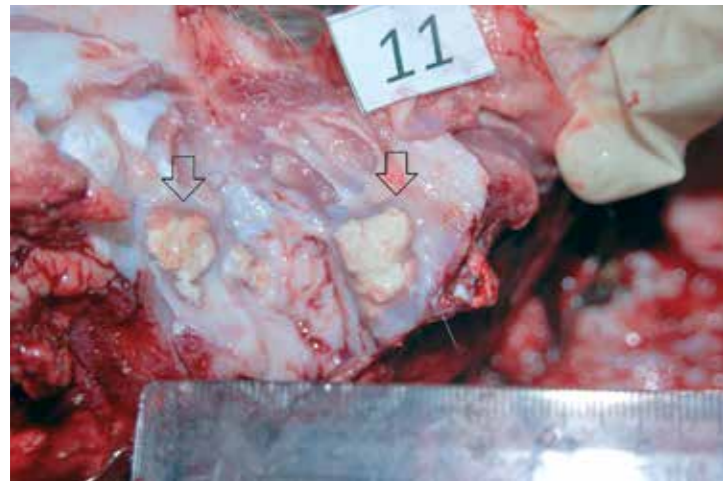


Fig. 3. Lesions at sample № 3 injection site in the experimental animal № 11

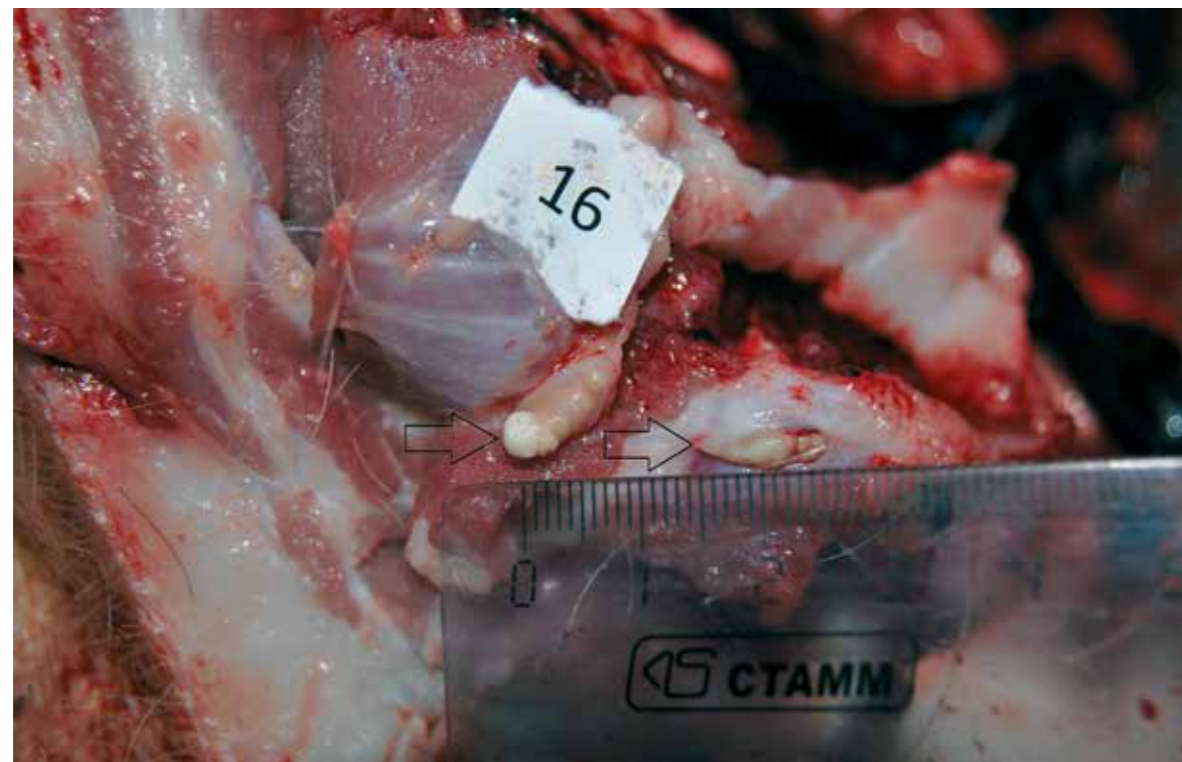
Blood samples were taken from animals prior to immunization, prior to revaccination (21 days), in 14 days post revaccination, on day 21 and upon completion of the experiment. Then blood sera were tested for antibodies to PRRS virus using ELISA and NT. The test results are demonstrated in the table below.

The data presented in the table show that prior to vaccination antibodies to PRRS were not detected in pig blood sera.

In 21 days post vaccination specific antibodies to PRRS virus were not detected by ELISA in blood sera of experimental animals vaccinated with vaccine samples № 1 and № 2. Mean optical density values (s/p) equaled 0,04 and 0,06 respectively. At the same time specific antibodies to PRRS virus were detected in animals vaccinated with samples № 3 and № 4; mean s/p values were 0,83 and 0,65, respectively.

In 14, 21 and 42 days post revaccination level of antigenicity to PRRS virus in blood sera of experimental animals vaccinated with samples № 1 and № 2 practically did not change. Positive dynamics of specific antibody accumulation was observed in groups vaccinated with samples № 3 and № 4: mean s/p values were 1,6–2,6 and 1,04–2,25 respectively.

Fig. 4. Lesions at sample № 4 injection site in a pig



Therefore, absence of specific antibodies in animals vaccinated with samples № 1 and № 2 may be indicative of the low Montanide ISA 206 VG adjuvanticity which could not be improved by chitosan addition.

At the same time the level of specific antibodies to PRRS virus in animals immunized with vaccine samples based on Montanide ISA 70 VG adjuvant with or without chitosan confirms high antigenicity of preparations and stable positive dynamics of antibody development in vaccinated pigs at all sampling stages.

CONCLUSIONS

1. Results of the performed tests demonstrated short temperature increase within the physiological range in all pigs after administration of the experimental vaccine samples which was not harmful for experimental animals.

2. Postmortem examination of pigs vaccinated with preparations based on Montanide ISA 206 VG adjuvant with or without chitosan revealed considerable proliferation of loose connective tissue at the vaccine injection site. Herewith, this group of animals did not demonstrate sufficient development of specific antibodies for animal protection. At the same time considerable increase in virus neutralizing antibody level accompanied with small vaccine depot formation at the vaccine administration site, capable to develop strong and lasting immunity, was observed in blood of animals immunized with Montanide ISA 70 VG-based vaccine with chitosan or without it in 1,5 months post revaccination.

3. Dynamics of specific antibody titer increase in group 3 under initially equal adjuvant use conditions considerably exceeds such in group 4 which may demonstrate positive role of water-soluble chitosan in improvement of inactivated vaccines against PRRS.

REFERENCES

1. Chitosan influence on immune and endocrine system of piglets / A.A. Buyanov, V.N. Videnin, A.N. Grechuhin, V.D. Nifantov // Veterinariya. – 2004. – № 2. – P. 47–51.
 2. Vorobyeva A.A., Medunitsin N.V. New principles and methods of immunobiological preparation development // Medicina. – 1999. – № 10. – P. 16–17.
 3. Genetic variability of PRRS virus. / A.V. Scherbakov, V.F. Kovaloshin, V.A. Pylnov [et al.] // Topical issues

Table
Study of antigenicity of inactivated, emulsion vaccines against PRRS using SEPPIC adjuvants and chitosan

No Experimental vaccine sample	No animal	Antigenicity by ELISA – s/p values*; By neutralization test – log ₂									
		Prior to vaccination		21 days post vaccination **		14 days post vaccination		21 days post vaccination		42 days post revaccination	
		ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT
№1 (ISA 206)	1	0,01	<2,0	0,08	<2,0	0,09	<2,0	0,09	2,0	0,09	2,0
	2	0,02	***	0,02	-	0,03	3,25	0,04	3,25	0,09	3,0
	3	0,02	-	0,02	-	0,03	<2,0	0,03	3,0	0,03	3,0
	4	0,02	-	0,03	-	0,03	3,0	0,03	3,0	0,04	2,75
		0,02±0,001	0,5±0,003	0,04±0,002	0,5±0,003	0,045±0,001	2,5±0,002	0,05±0,001	2,8±0,002	0,06±0,001	2,7±0,004
№2 (ISA 206+chitosan)	5	0,01	<2,0	0,04	-	0,06	3,25	0,08	3,25	0,2	3,25
	6	0,02	-	0,06	-	0,06	3,0	0,09	3,0	0,15	3,25
	7	0,02	-	0,05	-	0,08	<2,0	0,13	3,75	0,16	3,0
	8	0,05	-	0,1	<2,0	0,2	<2,0	0,4	3,0	0,5	3,0
		0,02±0,001	0,5±0,003	0,06±0,001	0,5±0,003	0,1±0,003	2,5±0,002	0,2±0,001	3,25±0,002	0,3±0,001	3,1±0,002
№3 (ISA 70 +chitosan)	9	0,03	-	0,8	5,25	0,7	7,5	1,8	7,75	2,71	8,5
	10	0,02	-	1,5	7,0	1,5	8,0	2,4	8,5	2,64	8,5
	11	0,01	-	0,3	7,0	2,2	8,5	1,9	9,0	2,0	8,75
	12	0,02	-	0,74	7,0	2,0	7,75	2,4	8,5	3,0	8,75
		0,02±0,001	-	0,83±0,003	6,56±0,002	1,6±0,001	8,0±0,004	2,1±0,002	8,4±0,005	2,6±0,001	8,6±0,002
№4 (ISA 70)	13	0,02	-	0,7	4,75	0,97	5,7	1,2	5,75	2,4	6,0
	14	0,02	-	0,4	5,0	1,1	6,0	1,9	6,0	2,1	6,25
	15	0,01	-	0,6	5,75	0,8	6,25	2,0	6,5	2,3	6,5
	16	0,06	-	0,9	5,5	1,3	6,0	1,4	6,0	2,2	7,25
		0,03±0,001	-	0,65±0,003	5,25±0,004	1,04±0,001	6,0±0,005	1,6±0,002	6,1±0,006	2,25±0,003	6,5±0,004
Control	17	0,03	-	0,01	<2,0	0,01	-	0,03	-	0,03	-
	18	0,02	-	0,02	-	0,02	-	0,02	-	0,02	-
	19	0,01	-	0,04	-	0,01	-	0,02	-	0,03	-
	20	0,03	-	0,05	-	0,02	-	0,01	-	0,04	-
		0,02±0,001	-	0,03±0,001	0,5±0,003	0,015±0,002	-	0,02±0,001	-	0,03±0,003	-

* value s/p < 0,4 –positive; ** revaccination; *** undetectable virus neutralizing antibody value in the reaction.

of animal infectious pathology: Proceedings of the International Scientific Conference devoted to the 45th Anniversary of the VGI «ARRIAH». – Vladimir, 2003. – P. 150–155.

4. Neutralization test method for retrospective PRRS diagnosis / T.Z. Baibikov, L.G. Zhuchkova, Sh.K. Kulyashbekova, V.L. Gavrilova; ARRIAH. – Vladimir, 1995. – 5 p.

5. Nudga L.A. Chitin and chitosan derivatives and their characteristics // Chitin and chitosan. Production, characteristics and usage. – M., 2002. – P. 141–142.

6. Porcine reproductive respiratory syndrome (“blue ear”) / V.A. Mischenko, V.M. Avilov, V.M. Zakharov [et. al.] // Veterinariya. – 1994. – № 9. – C. 22–24.

7. Chitosan – mediated stimulation of macrophage function / G. Peluso, O. Petillo, M. Ranieri [et al.] // Biomaterials. – 1994. – Vol. 15, № 15. – P. 1215–1220.

8. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody / E.M. Bautista, S.M. Goyal, I.J. Yoon [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 1993. – Vol. 5, № 2. – P. 163–165.

9. Morin M., Robinson Y. Causes of mystery swine disease // Can. Vet. J. – 1992. – Vol. 33, № 1. – P. 6.

10. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator / Y.-W. Cho, Y.-N. Cho, S.-H. Chung [et al.] // Biomaterials. – 1999. – Vol. 20, № 22. – P. 2139–2145.