

Даний винахід широко пов'язаний з низькопатогенними живими вірусними вакцинами для уведення свиням з метою вироблення ефективного імунітету у свиней проти інфекцій вірусом репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (PRRS). Більш конкретно, винахід стосується таких живих вакцин спільно зі способами імунізації свиней проти вірусу PRRS і способами отримання таких вакцин. Новий, по суті виділений і очищений вірус PRRS із низькою патогенністю, під №VR2509 доступу у базу даних ATCC, також становить частину винаходу. PRRS виникнув в останні декілька років як важливе вірусне захворювання свиней. PRRS викликає важку репродуктивну недостатність у вагітних свиноматок, яка виявляється у формі передчасних опоросів, збільшення кількості мертвонароджених, муміфікованих та слабких поросят, зниженої частоти опоросів та затримки відновлення тічки. На уражених фермах гострі ознаки репродуктивних розладів при PRRS у цілому продовжуються 2-4 місяця, але респіраторні симптоми захворювання можуть продовжуватися протягом багатьох років, спричиняючи значні продуктивні втрати. Були опубліковані декілька досліджень патогенезу інфекції вірусом PRRS у вагітних свиноматок/підсвинків на пізніх термінах вагітності (77-95 днів вагітності). У кожному з цих досліджень була продемонстрована спроможність вірусу PRRS викликати трансплацентарну інфекцію та патологічний стан плоду. Проте у свиноматок у середні терміни вагітності патологічний стан плоду не розвивався, і плоди, інфіковані внутрішньоутробно у середні терміни вагітності, залишалися у цілому нормальними.

У польових умовах є декілька ферм, на яких не було виявлено ні гострих репродуктивних розладів, ні хронічної респіраторної форми захворювання, але які є серологічно позитивними на PRRS. Причини відсутності клінічних симптомів захворювання у таких випадках недостатньо зрозумілі. Було висловлене припущення, що можуть існувати штами вірусу PRRS з низькою патогенністю, і що вони відповідають за інфекції у популяції свиней, які не виявляють клінічних симптомів PRRS. Різні дослідники повідомляли про ряд ізолятів вірусу PRRS. Було показано, що усі вони мають РНК та оболонки, які містять ліпіди, але не мають спроможності до агрегації еритроцитів різноманітних видів тварин.

Даний винахід долає вказані вище проблеми і надає удосконалені живі або модифіковані живі вакцини проти PRRS для уведення свиням. Вакцини винаходу включають достатню кількість живого або модифікованого живого вірусу для вироблення ефективного імунітету у свиней проти інфекції вірусом репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (PRRS) дикого типу. Використовуваний тут термін "ефективний імунітет" належить до спроможності вакцини запобігти у свиней інфекції PRRS, які викликають розвиток істотних клінічних ознак захворювання. Тобто, імунована свиня може бути або може не бути серологічно позитивною за PRRS, але у неї немає прояви будь-яких істотних клінічних симптомів.

У кращі форми вакцин винаходу включають новий живий вірус, позначений як MN-Hs, який був депонований в Американській колекції типових культур (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, і йому був привласнений №VR2509 доступу у базу даних ATCC. Було показано, що цей вірус є по суті авірулентним і викликає ефективний імунітет. Його вакцини можна вводити свиноматкам-плідникам, підсвинкам, кабанам або відлученим поросят, і таке уведення може здійснюватися будь-яким зручним способом, таким як внутрішньом'язова ін'єкція або перорально-інтраназальне уведення. У цілому, дози вакцин повинні містити від приблизно  $10^4$  до приблизно  $10^8$  одиниць вірусу, які утворюють бляшки.

Більш узагальнено, винахід також стосується способу отримання свинячих вакцин проти PRRS, який включає спочатку отримання за допомогою методу клонування бляшок штаму або ізоляту вірусу PRRS, який має середній діаметр бляшки не менше приблизно 2мм на конфлюентному газоні клітин MARC-145, та отримання живої вакцини з такого штаму. Лінія клітин MARC-145 була депонована в ATCC, і їй був привласнений № доступу у базу даних ATCC. Переважно, вакцини винаходу мають по суті такий вірус з маленьким діаметром бляшки, який отриманий в очищеній формі. Кращий вірус №VR2509 доступу у базу даних ATCC має такий маленький діаметр бляшки і, як вказано, є по суті цілком авірулентним, у той же час викликаючи вироблення імунітету.

Стислий опис креслень

Фіг.1 являє собою фотографію, яка ілюструє морфологію та розмір бляшки ізоляту

MN-Hs вірусу PRRS (< 2мм) на лінії клітин MARC-145; Фіг.2 являє собою фотографію, яка ілюструє морфологію, та розмір бляшки ізоляту MN-HL вірусу PRRS (3-5мм) на лінії клітин MARC-145; та Фіг.3 являє собою фотографію, яка ілюструє морфологію, і розмір бляшки ізоляту MN-W вірусу PRRS (2-3мм) на лінії клітин MARC-145.

Докладний опис кращого варіанта реалізації

Наведені приклади подають кращі методику виділення, ідентифікації та клонування низькопатогенного штаму вірусу PRRS, а також кращу методику виробництва вакцин із нього; варто розуміти, що ця інформація надана тільки як ілюстрація, і ніщо в ній не варто розцінювати як обмеження загального обсягу домагань винаходу. Згадані літературні джерела включені в опис як посилання.

Приклад 1

Реферат

У цьому прикладі був досліджений патогенез утворюючого дрібні бляшки варіанта (MN-Hs) вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (PRRS) у вагітних свиноматок. Штам MN-Hs спочатку клонували з вірусу MN-H, який являє собою суміш вірусів, які утворюють дрібні та великі бляшки (MN-H). У першому експерименті для порівняння патогенності для плоду по 2 вагітні свиноматки, кожну на 86 день вагітності, інтраназально інокулювали відповідно MN-Hs, MN-HL, польовим ізолятом (MN-W) або вводили середовище для культури клітин (контрольні). Усім свиноматкам давали можливість опороситися по закінченні їхньої вагітності, за винятком контрольних свиноматок. На 7 день після інокуляції (ПІ) у інфікованих свиноматок спостерігали вірусемію, і на 14 день ПІ за допомогою реакції непрямой імунофлюоресценції (HIF) виявляли сероконверсію. Дві свиноматки, інфіковані вірусом MN-Hs, народили 14 живих та 5 мертвих поросят, тоді як 2 свиноматки, інфіковані вірусом MN-HL, опоросилися 25 мертвими поросятами при відсутності живих поросят. Дві свиноматки, інфіковані MN-W, опоросилися 10 живими та 20 мертвими поросятами. У двох контрольних свиноматок при забої на 107 день вагітності було 16 нормальних

плодів. Вірус був виділений у 16 (66,7%) із 24 живонароджених, 9 (64,3%) із 14 мертвонароджених і 3 (12,0%) із 25 муміфікованих поросят від 6 інфікованих свиноматок. У сироватці в шести з 13 мертвонароджених поросят від 4 свиноматок, інфікованих MN-HL або MN-W, титри антитіл проти вірусу PRRS були, за даними визначення за допомогою НІФ, у діапазоні від 1:16 до 1:1,024. У наступному експерименті для повторення результатів, отриманих з вірусом MN-Hs, 2 вагітних свиноматки, кожну на 86 день вагітності, інфікували відповідно інтраназально MN-Hs, внутрішньом'язово MN-Hs та інтраназально другим польовим ізолятом (OVL-173), і усім свиноматкам давали можливість опороситися по закінченні їхньої вагітності. Дві свиноматки, інфіковані інтраназально та внутрішньом'язово вірусом MN-Hs, опоросилися відповідно 15 живими і 6 мертвими та 25 живими і 5 мертвими поросятами, тоді як 2 свиноматки, інфіковані OVL-173, народили 6 живих і 24 мертвих поросят. Ці результати свідчать про те, що серед виділених вірусів патогенність вірусу PRRS різна для плодів свиней, і штам MN-Hs вірусу PRRS являє собою слабо патогенний вірус. Було встановлено, що виявлення антитіла проти вірусу PRRS у сироватці мертвонароджених поросят є способом діагностики інфекції плоду, який можна застосовувати.

#### Матеріали та методи

Вірус та клітинна культура.. У цьому дослідженні використовувалися три різні ізоляти вірусу PRRS. Ізолят MN-H був отриманий із сироватки здорового поросяти, який утримується в розпліднику, на фермі із субклінічною ознакою інфекції вірусом PRRS. Спочатку вірус MN-H являв собою суміш популяцій вірусів із розмірами бляшок, які варіюють. Віруси, які утворюють дрібні (MN-Hs) та великі (MN-HL) бляшки, клонувалися окремо від вірусу MN-H, і кожний вірус чотири рази виділяли з бляшки для нового експерименту і шість додаткових разів для наступного експерименту за допомогою методу клонування бляшок відповідно до Him et al., *Am. J. Vet. Res.*, 52:1649-1652 (1991). При кожному такому пасажі бляшок конфлюентні моношари клітин MARC-145 (пермісивний клон, отриманий із клітинної лінії нирок зеленої африканської мартини (MA-104)) вирощували у чашках Петрі розміром 60мм x 15мм (клітини підтримували у мінімальному головному середовищі Ігла (МГС) із додаванням 3% плодової баранячої сироватки (ПБС), 0,15% карбонату натрію та антибіотиків (Kit et al., *Arch. Virol.*, 133:477-483 (1993)) та інфікували відповідним вірусом. Культури інкубували протягом 60 хвилин при 37°C, після чого інокулят видаляли і культури одноразово промивали МГС. Після цього у кожну чашку додавали 5мл аліквоту рідкого культурального середовища, яке складається з рівного об'єму 2X МГС і 1,6% кип'яченого агара Noble (Disco Laboratories) з добавкою 50мкг діетіламіноетіл (DEAE)-декстрану/мл. Чашки продовжували інкубувати протягом 5 днів при 37°C у CO<sub>2</sub> інкубаторі. Наприкінці періоду інкубації бляшечні культури візуалізували за допомогою додавання в них 3мл фізіологічного розчину з фосфатним буфером із додаванням 1% нейтрального червоного. Відібрані бляшки клонували за допомогою взяття стерильною пастерівською піпеткою та переносу шляхом інокуляції на неінфіковані моношари клітин MARC-145. Для постійного забарвлення агар обережно видаляли і клітинні моношари забарвлювали 2мл 1% кристалічним фіолетовим в 20% етанолі протягом 10 хв. Чашки обполіскували водопровідною водою для полегшення дослідження бляшок.

Штам MN-W вірусу PRRS виділяли із сироватки хворих свиноматок ферми з типовими ознаками гострого PRRS, а OVL-173 одержували з Oxford Veterinary Laboratories, Worthington, MM.

Тварини і структура експерименту. Вагітних свиноматок приблизно на 80 день вагітності одержували на фермі, де в минулому не було клінічних або серологічних даних за інфекцію вірусом PRRS. Свиноматок двічі на рік вакцинували проти свинячого парвовірусу (PPV) і видів *Leptospira* на фермі. Одержували точні дані про дати виведення кожної свиноматки. Після закупівлі кожну свиноматку тримали окремо в ізольованому помешканні в університеті Міннесоти. На 86 день вагітності, кожну з двох свиноматок інтраназально інокулювали відповідно вірусом MN-Hs, MN-HL та MN-W (2мл, 10<sup>5-5,5</sup> TCID<sub>50</sub>/мл). Двох свиноматок, які залишилися, інокулювали середовищем для культури клітин і вони слугували контролем. Зразки сироватки від кожної свиноматки брали через інтервали часу для виділення вірусу та серологічного дослідження. Шести інфікованим свиноматкам дали можливість опороситися природним шляхом, а двох контрольних свиноматок забивали на 107 день вагітності для дослідження плодів. Після опоросу для виділення вірусу та серологічного дослідження брали зразки крові та легенів живих та мертвонароджених поросят та рідини із грудної порожнини в муміфікованих плодів. У другому експерименті перед інокуляцією вірус MN-Hs шість додаткових разів виділяли з бляшок. Двох вагітних свиноматок, на 86 день вагітності кожну, інтраназально інокулювали MN-Hs та інтраназально іншим польовим ізолятом (OVL-173), і усім свиноматкам давали можливість опороситися по закінченні термінів їх вагітності. Після опоросу в муміфікованих або мертвонароджених плодів вимірювали вінцеву-крижову довжину для оцінки часу смерті (Magable et al., *J. Agric. Sci.*, 69:443-447 (1967)). Зразки крові та легенів брали та аналізували, як описано у першому експерименті.

Виділення та серологія вірусу. Для виділення вірусу кожний зразок сироватки або надосадової рідини легеневого гомогенату розміщали у лунках 24-лункової пластини і додавали клітини MARC-145 (1-2x10<sup>5</sup> клітин/мл), суспендовані в МГС із додаванням 3% ПБС. Культури спостерігали протягом 5-7 днів для виявлення цитопатичних ефектів (ЦПЕ), типових для вірусу PRRS. Планшети двічі заморожували і відтавали, і зразки надосадової рідини інокулювали у лунках 96-лункових пластин свіжою суспензією клітин MARC-145 і інкубували протягом 3-4 днів. Дані за вірусну інфекцію досліджували за допомогою спостережень як за СПЕ, так і специфічною флюоресценцією з використанням еталонної свинячої сироватки, яка містить вірус PRRS.

Сироватку від свиноматок та поросят випробували на наявність антитіл за допомогою реакції непрямої імуофлюоресценції (НІФ) (Yoon et al., *J. Vet. Diag. Invest.*, 4:144-147 (1992)), 96-лункові пластини, які тестують, готували з використанням ліній клітин MARC-145. Деякі зразки сироватки випробували на наявність антитіл проти PPV (вірусу прогресуючої пневмонії овець) за допомогою тесту придушення гемаглютинації (HL), як описано раніше (Joo et al., *Aust. Vet. J.*, 52:422-424 (1976)).

#### Результати

При початковому виділенні ізоляти вірусу PRRS давали різні розміри бляшки. Ізолят MN-H по розміру

їхньої бляшки клонували на дві різні популяції MN-Hs та MN-HL. Після клонування відповідні розміри MN-Hs і MN-HL, стійко знаходилися в діапазоні від < 2мм до 3-5мм у діаметрі, тоді як ці розміри в MN-W складали 2-3мм (див. фігури).

Крім незначної анорексії, виявленої у свиноматок 112 і 153 протягом 5 днів після інокуляції (ПІ), у свиноматок після інфекції ізолятами вірусу PRRS не спостерігалися виражені клінічні ознаки. Вірус виділяли зі зразків сироватки у шести із шести свиноматок через сім днів ПІ та в одній із шести свиноматок через 14 днів ПІ. Як наведено у таблиці 1, у всіх інфікованих свиноматок через 14 днів ПІ були виявлені високі титри антитіл.

Таблиця 1

Віремія та імунна реакція у вагітних свиноматок при 86-денній вагітності після експериментальної інфекції ізолятами вірусу PRRS

Свиноматка №	Інфекція вірусом	Дні після інокуляції				
		0	7	14	21	28
17	MN-Hs	-/- <sup>a</sup>	+/-	-/1,024	-/1,024	-/256
53	MN-Hs	-/-	-/-	-/1,024	-/1,024	-/1,024

Вірус виділяли у одного або більше плодів у кожного приплоду інфікованих свиноматок. Результати виділення вірусу в окремих поросят від шести інфікованих свиноматок в експерименті 1 показали, що приблизно половина досліджуваних плодів (28 із 63 поросят) була позитивною по виділенню вірусу. Серед поросят, досліджуваних на присутність вірусу, 16 (66,7%) із 24 живонароджених поросят, 9 (64,3%) із 14 мертвонароджених поросят та 3 (12,0%) із 25 муміфікованих поросят були вірус-позитивними. З 28 поросят, вірус-позитивних по зразках їхньої сироватки, 10 поросят були негативними по вірусу, коли на виділення вірусу досліджували зразки їхніх легенів.

Зразки сироватки від мертвонароджених поросят свиноматок 153, 147, 68 та 112 досліджували на наявність антитіл до вірусу PRRS за допомогою HIF та PPV за допомогою HL, і результати наведені у таблиці 3. У шести з 13 зразків від мертвонароджених поросят і в 2 із 25 зразків рідини від муміфікованих поросят було антитіло до вірусу PRRS. Титри HIF варіювали від 1:16 до 1:1,024, тоді як у жодному зі зразків сироватки не було антитіла до PPV. У тринадцятих із 14 живонароджених поросят від свиноматок 17 і 53 було антитіла і до вірусу PRRS (титри HIF 1:64 до 1:1,024), та PPV (титри HL 1:512 1:16,384).

Таблиця 2

Результати опороосу та виділення вірусу у свиноматок із вагітністю терміном 86 днів, інфікованих різними ізолятами вірусу PRRS

свиноматки			плоди					
№.	Дні <sup>3</sup>	вірус/шлях	усього	L3	S3	М	Діапазон Сг довж. <sup>b</sup>	виділення вірус <sup>c</sup>
експеримент I								
17	115	MN-Hs/IN	g	6	0	3	27-32	6/9
53	113	MN-Hs/IN	10	8	1	1	25-35	5/10
153	114	MN-H <sub>L</sub> /IN	13	0	2	11	24-32	2/11
147	112	MN-H <sub>L</sub> /IN	12	0	4	8	15-3G	3/7
55	112	MN-W/IN	15	8	3	4	25-23	5/15
112	113	MN-W/IN	15	2	4	9	24-31	5/11
124	107 <sup>c</sup>	контроль	14	14	-	-	ND	0/14
95	107 <sup>c</sup>	контроль	12	12	-	-	ND	0/12
експеримент II								
155	115	MN-Hs/IN	11	7	3	1	28-35	8/11
49	114	MN-Hs/IN	10	8	2	0	34-37	9/10
175	112	MN-Hs/IM	15	12	2	1	15-35	3/15
110	113	MN-Hs/IM	15	13	2	0	32-34	2/15
800	108	OVL-173/IN	12	1	0	2	27-26	1/12

44	108	OVL-173/IN	13	5	10	3	25-25	10/13
----	-----	------------	----	---	----	---	-------	-------

<sup>3</sup>День вагітності при опоросі або забої

<sup>b</sup>Вінцево-крижова довжина (см) муміфікованих або мертвонароджених плодів

<sup>c</sup>Кількість виділених зразків вірусу/кількість випробуваних зразків

<sup>d</sup>Свиноматок забивали на 107 день вагітності дослідження плодів

LB - живонароджені;

SB - мертвонароджені;

M - муміфіковані;

IN - інтраназально;

IM - внутрішньом'язово;

ND - не визначалася

Таблиця 3

Виявлення антитіл до вірусу PRRS та PPV у сироватці мертвонароджених поросят свиноматок, інфікованих вірусом PRRS

№ свиноматки	вірус, який інфікує	Історія приплоду	досліджені плоди	НІФ	PPV HL
153	MN-HL	OLB.2SB, 11M	SB(32) <sup>a</sup>	<4 <sup>b</sup>	<8 <sup>b</sup>
			SB (27)	255	<8
147	MN-HL	OLB.4SB, 8M	SB (30)	<4	<8
			SB (30)	1,024	<8
			SB (29)	<4	<8
			SB (23)	<4	<3
63	MN-W	8LB, 3SB, 4M	SB (27)	<4	<3
			SB (25)	16	<8
			SB (28)	<4	<8
112	MN-W	2LB.4SB, 9M	SB (31)	>4	<8
			SB (29)	255	<8
			SB (25)	256	<8
			SB (24)	16	NT

<sup>a</sup>Вінцево-крижова довжина (см)

<sup>b</sup>Обернені величини НІФ або титру HL

<sup>c</sup>LB - живонароджені;

SB - мертвонароджені;

M - муміфікація

Обговорення

Дане дослідження підтвердило спроможність різних ізолятів вірусу PRRS викликати трансплацентарну інфекцію і справляти патогенний вплив на плоди свиноматок на пізніх термінах вагітності. Проте між ізолятами вірусу PRRS спостерігалось очевидне розходження патогенності. Коли провадили інтраназальну інюкуляцію свиноматок, які багаторазово народжували, вірусом PRRS ATCC-VR2332 на 93 день вагітності (Christianson, W. T. et al., Can. J. Vet. Res., 57:262-268 (1993)), вони у середньому народжували 5,8 живих поросят та 6,0 мертвих плодів на приплід. У даному дослідженні 6 свиноматок, інфікованих MN-HL або 2 польовими вірусами, опоросилися у середньому 2,7 живими та 11,5 мертвими поросятами на приплід, і, таким чином, ці віруси розцінюються як високо вірулентні. Патогенність ATCC-VR2332 та вірулентних вірусів, використаних у цьому дослідженні, була різною. Це може бути внаслідок термінів вагітності під час інфекції, оскільки вірусом ATCC-VR2332 інфікували на 7 днів пізніше. Тим часом, 6 свиноматок, інфікованих MN-Hs, народжували у середньому 9,0 живонароджених та 2,7 мертвих поросят на опорос. Ці результати значно відрізняються від результатів для вірулентних вірусів, показуючи, що вірус MN-Hs являє собою слабо патогенний штам.

Цікаво, що спостерігалось очевидне розходження опоросу свиноматок, інфікованих вірусами MN-Hs та MN-HL, які були однакового походження. У однакових умовах віруси MN-Hs та MN-HL викликали народження відповідно 5 і 25 мертвих поросят ( $p < 0,005$ ). За результатами даного дослідження можна прийти до висновку, що патогенність MN-Hs та MN-HL по суті різні, причому один являє собою слабopatогенний штам, а другий - високопатогенний вірус.

Виділення вірусу у приплодів, інфікованих вірусом PRRS, було відносно легким, і вірус виділявся з

однаковою частотою в живих та мертвонароджених поросят. Через те, що вірус не можна було виділити в усіх поросят в інфікованому приплоді, спробу виділення вірусу з діагностичною ціллю варто починати щонайменше у 2 або більш поросят на приплід. Було також виявлено, що виділення вірусу більш зручно проводити зі зразків сироватки, ніж зі зразків легеневої тканини.

У приплодів свиноматок, інфікованих вірулентним вірусом, у одного або більш мертвонароджених поросят було виявляємо антитіло, специфічне для вірусу PRRS. Ці результати свідчать про те, що виявлення антитіла у мертвонароджених поросят або у поросят, які ще не ссали матір, може бути придатним способом для діагностики інфекції вірусом PRRS у патологічних приплодів. Цей спосіб варто було б застосовувати у лабораторіях, де немає методик і засобів для виділення вірусу. У даному дослідженні у 6 із 13 мертвонароджених поросят були позитивні титри антитіл до вірусу PRRS, але не до PPV, переконуючи в тому, що виявлені антитіла мають плодове походження і утворюються внаслідок наявності вірусу PRRS.

Відомо, чому у деяких чередах, інфікованих вірусом PRRS, не розвиваються клінічні ознаки. Спостерігалось, що в чередах із гарним станом здоров'я перед інфекцією вірусом PRRS виявлялася більш слабка клінічна реакція, у порівнянні з чередами з більш низьким рівнем здоров'я. Переважний стан здоров'я, поряд із розходженнями штамів, показані у цьому дослідженні, є можливими поясненнями очевидних розходжень клінічного прояву. Крім того, можна підтверджувати, що взаємодія між вірусами, які утворюють дрібні та великі бляшки може відбуватися в організмі тварини і змінювати патогенність. Це може бути істиною, якщо ми врахуємо, що на фермі, де був виділений вірус MN-HL PRRS, не було репродуктивних проблем, незважаючи на присутність на фермі патогенного вірусу MN-HL PRRS.

#### Приклад 2

Кращі вакцини згідно з винаходом можуть уводитися селекційним підсвинкам, свиноматкам, кабанам або відлученим поросят. Уведення може провадитися внутрішньом'язово або перорально-інтраназально і проводитися в будь-який час. Проте для захисту на весь період вагітності кращі вакцинації свиноматок-виробників перед спарюванням і невдовзі після відібрання маленьких поросят для їхнього захисту у пізні терміни вигодовування, росту та на завершальних стадіях.

У цілому, вакцини винаходу уводяться в дозах 2мл, які містять від приблизно  $10^4$  до приблизно  $10^8$  бляшкоутворюючих одиниць (БУО), і ще краще приблизно 10 БУО. У випадку свиноматок-виробників імунітет буде продовжуватися щонайменше один період вагітності, тоді як вакцинація маленьких поросят після відібрання викликає вироблення імунітету для захисту протягом усього заключного періоду відгодівлі. Кращі вакцини згідно з винаходом можуть дати широкий діапазон перехресного захисту.

Вакцини згідно з винаходом можуть включати живий або модифікований живий (ослаблений) вірус, а також звичайні носії, стабілізатори та/або ад'юванти.

#### Приклад 3

##### Введення

У цьому прикладі досліджувалася спроможність вакцини, складеної зі штаму MN-Hs Північно-американського вірусу PRRS, захистити поросят 3-тижневого віку від віремії, яка була викликана інфекцією вірулентним штамом MN-HL Північно-американського вірусу PRRS. Респіраторне захворювання, пов'язане з інфекцією Північно-американського вірусу, у першу чергу викликано інфекцією вторинними патогенами, присутніми на свинофермах. Проте у експериментальних умовах респіраторні клінічні ознаки у свиней, інфікованих Північно-американським вірусом PRRS, не відтворюються зі сталістю внаслідок відсутності цих вторинних патогенів. Тому виявлення віремії є кращим показником інфекції Північно-американським вірусом PRRS. Відсутність віремії після контрольного зараження штамом MN-HL вказує, що поросята, вакциновані штамом MN-Hs, мають імунітет до інфекції штамом MN-HL.

##### Матеріали і методи

Двадцять поросят 3-тижневого віку були придбані на фермі, де не було PRRS. Дванадцять поросят були інтраназально вакциновані штамом MN-Hs (2мл,  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/мл), а 8 поросят, які залишилися були контрольними. Вакциновані та контрольні поросята утримувалися в окремих помешканнях блоку-ізолятора. Через 2 тижні після вакцинації проводили контрольні зараження шести вакцинованих поросят (поросята №№ з 81 по 86) та 4 контрольних поросят (поросята №№ з 93 по 96) інтраназальним введенням штаму MN-HL (2мл,  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/мл) (група I). Аналогічним чином через 6 тижнів після вакцинації проводили контрольні зараження залишившихся 6 вакцинованих поросят (поросята №№ з 87 по 92) та 4 контрольних поросят (поросята №№ з 97 по 100) (група II). Усіх поросят щодня спостерігали для виявлення клінічних ознак. Крім того, у кожного поросяти щотижня брали зразки крові для (1) виділення вірусу з використанням культури клітин MARC-145 (Yoon et al., J. Vet. Diag. Invest, 6:289-292 (1994)) і (2) визначення титрів антитіла нейтралізації сироватки (HC) (Park et al., Am. J. Vet. Res., 57:320-323 (1996)); виявлення антитіла HC у вакцинованих поросят вказує на захисний імунітет до вірулентного Північно-американського вірусу PRRS.

##### Результати

Після вакцинації у поросят груп I та II вірус вакцини виділяли до 3 тижнів після вакцинації. Після контрольного зараження клінічні ознаки не спостерігали в жодного з контрольних та вакцинованих поросят груп I та II.

Група I. Під час контрольного зараження антитіло HC не було виявлено в жодного поросяти. Після контрольного зараження вірус контрольного зараження був виділений як у вакцинованих, так і в контрольних поросят. Крім того, як у вакцинованих, так і в контрольних поросят розвилася віремія (таблиця 1).

Група II. Вакциновані поросята виробляли антитіло HC, починаючи з 3 тижнів після вакцинації, і під час контрольного зараження в них були титри від 1:2 до 1:8. Після контрольного зараження вірус контрольного зараження не був виділений у вакцинованих поросят, тоді як у контрольних поросят розвилася віремія (таблиця 4). Ці результати показують, що у вакцинованих поросят був набутий захисний імунітет до вірулентного Північно-американського вірусу PRRS.

Виявлення віремії та антитіла НС у поросят 3-тижневого віку, вакцинованих та контрольно заражених через 2 або 6 тижнів після вакцинації

і№ свині	Тиждень після вакцинації								
	0	1	2 <sup>a</sup>	3	4	5	6 <sup>a</sup>	7	8
Група I									
81 V.	-/- <sup>b</sup>	-/-	-/-	-/-	-/2				
82 V	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-				
83 V	-/-	-/-	+/-	+/-	-/2				
84 V	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-				
85 V	-/-	-/-	+/-	+/-	+/4				
86 V	-/-	-/-	-/-	+1-	-/4				
93 C	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-				
94 C	-/-	-/-	-/-	+/-	+/8				
95 C	-/-	-/-	-/-	+/-	+/4				
95 C	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-				
Група II									
87 V			-/-	+/+	-/-	-/2	-/2	-/3	-/8
88 V	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/4	-/4	-/64	-/128
89 V	-/-	-/-	+/-	-/-	-/2	-/8	-/8	-/8	-/32
90 V	-/-	-/-	+/-	+/-	-/4	-/8	-/8	-/128	-/64
91 V	-/-	-/-	+/-	-/2	-/2	-/8	-/4	-/32	-/64
92 V	-/-	-/-	-/-	-/-	-/4	-/2	-/4	-/4	-/128
97 C	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-
98 C	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-
99 C	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-
100C	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-7-	+/-	-/2

V = Вакциновані; C = контроль

<sup>a</sup> = контрольно заражені вірусом MN-HL

<sup>b</sup> = виділення вірусу/титру антитіла НС

Поросят у групах I та II забивали відповідно через 4 та 8 тижнів після вакцинації



ФІГ. 1



ФІГ. 2



ФІГ. 3