

УДК 619:616.98:578.823.2:636.5

Радюш И.С., младший научный сотрудник
Насонов И.В., доктор ветеринарных наук, доцент
Лазовская Н.О., ассистент*

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск
*УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИНЫ ЖИВОЙ ПРОТИВ РЕОВИРУСНОГО ТЕНОСИНОВИТА ЦЫПЛЯТ ИЗ ШТАММА «КМИЭВ-V118» И ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЕЁ ПРИМЕНЕНИЯ

Резюме

В статье предоставлены данные исследований по конструированию вакцины живой против реовирусного теносиновита цыплят из штамма «КМИЭВ-V118». Установлено, что наибольшей иммуногенностью и профилактической эффективностью обладает вакцина, в состав которой входит вирусная суспензия штамма «КМИЭВ-V118» и защитная среда в соотношении 3:2, где защитная среда включает (по сухому веществу) 12,5% сахарозы, 12,5% ГЛА, 1,25% желатозы. Экономический эффект от импортозамещения при иммунизации ремонтного молодняка кур-бройлеров против реовирусной инфекции вакциной из штамма «КМИЭВ-V118» по сравнению с импортной вакциной аналогом Nobilis REO из штамма «1133» (Intervet) составляет 374 000 рублей на 1 000 голов. Окупаемость ветеринарных мероприятий при использовании разработанной вакцины составляет 4,62 рубля на рубль затрат.

Summary

The article presents the results of researches on the design of a live vaccine for prevention the reovirus tenosynovitis of chickens from "KMIEV-V118" strain. The results prove that the greatest immunogenicity and preventive efficiency the vaccine possesses which structure includes virus suspension of strain "KMIEV-V118" and the protective medium in the ratio 3:2, at following structure of the protective medium (of a dry substance) 12.5% of sucrose, 12.5% of LAH, 1.25% of gelatose. The economic effect from import substitution at immunization of broiler breeders against reovirus infection a vaccine of strain "KMIEV-V118" in comparison with an import analogue vaccine Nobilis REO of strain "1133" (Intervet) makes 374 000 roubles on 1 000 heads. The recoupment of veterinary measures at use of the created vaccine makes 4,62 roubles on rouble of costs.

Поступила в редакцию 25.02.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях ведения промышленного птицеводства всё чаще выявляются новые, ранее неизвестные и малоизученные инфекционные заболевания вирусной этиологии. Одним из таких заболеваний является реовирусная инфекция птиц.

Реовирусная инфекция птиц широко распространена во всех странах с развитым птицеводством и наносит значительный экономический ущерб [2, 5, 6], который складывается из потерь в результате заболевания: повышение смертности в стаде (5–30%), повышение выбраковки из-за хромоты на

2–15%, задержка роста и развития цыплят до 40% [4, 6, 8], уменьшение яйценоскости на 6–20%, снижение оплодотворяемости и выводимости инкубационных яиц [2, 4, 5, 6, 9], а также из затрат, направленных на снижение и ликвидацию последствий первичных потерь [2, 4, 5]. Иммунодепрессивное действие реовируса обуславливает частую ассоциацию реовирусной инфекции с различными инфекциями вирусной и бактериальной этиологии, что препятствует формированию поствакцинального иммунитета против вирусных болезней, снижает резистентность птицеполовья к неблагоприятным факторам окружающей среды [5, 6].

Общие ветеринарно-санитарные мероприятия не способны в полной мере обеспечить оздоровление птицеводческих хозяйств от реовирусной инфекции [3].

Основной формой контроля эпизоотического процесса остаётся вакцинопрофилактика. Профилактика вирусных болезней с применением вакцин достигла исключительно широких масштабов и занимает ведущее место в борьбе со многими вирусными заболеваниями человека, животных и птиц. Предотвращённый экономический ущерб, благодаря применению вакцин, достигает огромных размеров. Вместе с тем следует отметить, что производство и методы контроля вакцинных препаратов стали достаточно сложными и трудоёмкими при постоянном требовании улучшения их качества и безопасности применения [7].

Для специфической профилактики реовирусной инфекции птиц применяют как живые, так и инактивированные вакцины [8].

В Республике Беларусь реовирусная инфекция официально не зарегистрирована, однако существует угроза заноса возбудителя на территорию нашей страны из сопредельных государств. Поэтому проводится постоянный мониторинг птицефабрик Республики Беларусь на отсутствие инфекций, а также профилактическая вакцинация на некоторых из них.

В Республике Беларусь вакцина против реовирусной инфекции птиц не выпускается, поэтому специфическая профилактика проводится за счёт использования импортных вакцинных препаратов, что требует больших финансовых затрат. В связи с этим создание и внедрение в производство отечественной живой вакцины против реовирусной инфекции птиц является актуальной задачей.

Цель работы – конструирование вакцины живой против вирусного теносиновита цыплят – определение оптимального соотношения компонентов в ней и экономической эффективности её применения в условиях производства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При конструировании вакцины живой против реовирусного теносиновита цыплят из штамма «КМИЭВ-V118» проводили подбор оптимальной защитной среды для лиофильной сушки и оптимального соотношения компонентов вакцины.

К вирусной суспензии штамма «КМИЭВ-V118» добавляли защитную среду в соотношении 3:2 по объёму соответственно, при этом использовали 3 варианта состава защитной среды (по сухому веществу): а) сахара – 12,5%, ГЛА – 12,5%, желатоза – 1,25%; б) сахара – 22,5%, ГЛА – 10%, желатоза – 0,5%; в) сахара – 30%, ГЛА – 6%, желатоза – 1%.

Криопротективную эффективность защитных сред и веществ определяли, исходя из изменения биологической активности вируса после лиофильного высушивания вакцины.

Для определения биологической активности реовируса использовали суспензию перевиваемой культуры клеток Vero в концентрации $2,5-3 \times 10^5$ кл/см³, которую вносили по 100 мм³ в каждую лунку 96-луночного культурального планшета с плоским дном.

Лиофильно высушенные образцы восстанавливали до первоначального объёма (4 см³) питательной средой DMEM и DMEM-NEPES (1:1) с добавлением 2% ЭТС, затем готовили 10-кратные разведения исследуемых образцов жидких полуфабрикатов вакцины и соответствующих образцов после лиофилизации (10^{-1} – 10^{-8}) на той же питательной среде.

Подготовленные разведения реовируса переносили в культуральный планшет по 100 мм³ в лунку с перевиваемой культурой клеток Vero. На каждое разведение использовали по 8 лунок. Реакцию сопровождали контролем клеток – лунки с культурой клеток этой же партии, в которые вносили поддерживающую питательную среду в объёме 100 мм³. После этого планшеты помещали в CO₂-инкубатор (CO₂ 5%) при температуре плюс 37°C.

Результаты учитывали через 144–168 ч

по проявлению специфической деструкции в заражённой культуре клеток Vero при отсутствии таковой в контроле.

Титр вируса рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Опыт проводили в 3 повторностях.

Для определения оптимального соотношения вирусной суспензии штамма «КМИЭВ-V118» с биологической активностью не менее $6,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и защитной среды для лиофильной сушки вакцины к вирусной суспензии штамма «КМИЭВ-V118» добавляли защитную среду в соотношении 7:3, 3:2 и 1:1 по объёму соответственно, при следующем составе защитной среды (по сухому веществу): 12,5% сахаразы, 12,5% ГЛА, 1,25% желатозы, после чего данные образцы полуфабриката вакцины подвергали лиофилизации. Иммуногенность исследуемых образцов вакцины определяли на SPF-цыплятах. Для этого образцы вакцины восстанавливали раствором натрия хлорида с массовой долей 0,9% до объёма, равного объёму препарата до высушивания, затем готовили разведение 10^{-3} каждого исследуемого образца вакцины и иммунизировали по 25 SPF-цыплят внутримышечно в область бедра в объёме $0,2 \text{ см}^3$. 10 SPF-цыплят контрольной группы не подвергали вакцинации. Иммуногенную активность исследуемых образцов вакцины оценивали через 21 сутки после иммунизации методом ИФА (IDEXX, Нидерланды).

В условиях ОАО «Агрокомбинат «Дзержинский» нами проведен опыт по изучению иммуногенной активности отечественной вакцины живой против реовирусного теносиновита цыплят из штамма «КМИЭВ-V118» и вакцины Nobilis REO 1133 (Intervet, Нидерланды) из штамма «1133» на ремонтном молодняке цыплят-бройлеров (красса Росс 308). Для проведения испытания было сформировано 2 группы птиц: опытная и контрольная по 5 000 голов, которых вакцинировали в возрасте 7 суток внутримышечно в область бедра в объёме $0,2 \text{ см}^3$, ревакцинацию осуществля-

ли в возрасте 35 суток в грудную мышцу. Птице опытной группы применяли вакцину живую против реовирусного теносиновита цыплят из штамма «КМИЭВ-V118» в дозе $2,8 \lg \text{ТЦД}_{50}$, а в контроле – вакцину Nobilis REO 1133 в дозе $3,1 \lg \text{ТЦД}_{50}$. Через 21 сутки после иммунизации от 25 цыплят опытной и контрольной групп были отобраны образцы крови для проведения серологических исследований в ИФА набором ProFLOK® REO ELISA производства фирмы «Zoetis-Synbiotics», США, на базе РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Экономическая эффективность была рассчитана на 5 000 поголовья птицы для опытного (вакцина живая против реовирусного теносиновита цыплят из штамма «КМИЭВ-V118») и контрольного (Nobilis REO 1133 из штамма «1133») птичника.

В основу расчёта экономического эффекта от внедрения вакцины положены затраты на разработку, освоение технологии и выпуск данной вакцины. Расчёты проведены в соответствии с учебно-методическим пособием «Определение экономической эффективности мероприятий в ветеринарной медицине» [1], исходя из специфики промышленного птицеводства и течения болезни.

Затраты на ветеринарные мероприятия складывались из стоимости израсходованной вакцины, оплаты труда ветеринарных специалистов и обслуживающего персонала, амортизации оборудования, стоимости расходных материалов.

Расчёт ветеринарных затрат (Z_v) проводили по формуле 1:

$$Z_v = Z_t + Z_m + Z_a, \text{ где} \quad (1)$$

Z_t – затраты труда;

Z_m – стоимость вакцины;

Z_a – амортизация оборудования, стоимость расходных материалов.

На проведение 1-кратной вакцинации 5 000 голов цыплят ветеринарный врач затрачивает 8 ч. Для того, чтобы определить величину зарплаты ветеринарного специа-

листа за короткий промежуток времени (день, ч, мин), необходимо месячный должностной оклад разделить на 25,6. Часовая ставка определяется делением дневной ставки на 8 ч.

Различие затрат на проведение ветеринарных мероприятий в опытном и контрольном птичнике заключается в отличии стоимости соответствующих вакцин. Стоимость отечественной вакцины была рассчитана экономистами РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» с учётом затрат на произ-

водство, стоимости материалов и прибыли и составила 26,0 рублей за 1 дозу, стоимость вакцины Nobilis REO 1133 (Нидерланды) составляла 400,0 рублей за 1 дозу.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты испытаний по определению оптимального состава защитной среды для лиофилизации отражены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительная эффективность защитных сред для лиофилизации вакцины живой против реовирусного теносиновита цыплят из штамма «КМИЭВ-V118»

Состав защитной среды, % (по сухому веществу)	Биологическая активность (титр вируса), lg ТЦД ₅₀ /см ³	
	до лиофилизации	после лиофилизации
сахароза – 12,5 ГЛА – 12,5 желатоза – 1,25	6,46±0,04	6,29±0,04*
сахароза – 22,5 ГЛА – 10 желатоза – 0,5	6,42±0,08	6,0±0,07*
сахароза – 30 ГЛА – 6 желатоза – 1	6,42±0,04	6,21±0,04*

Примечание – *при P<0,05 по сравнению с титром реовируса до лиофилизации

Из данных, представленных в таблице 1, следует, что для лиофилизации вакцины живой против реовирусного теносиновита цыплят из штамма «КМИЭВ-V118» защитная среда, в состав которой (по сухому веществу) входит 12,5% сахарозы, 12,5% ГЛА и 1,25% желатозы, а также защитная среда, в состав которой входит 30% сахарозы, 6% ГЛА и 1% желатозы обеспечивают максимальное сохранение биологической активности реовируса. Потери биологической активности реовируса после лиофильной сушки составили

0,17±0,001 lg ТЦД₅₀/см³ и 0,21±0,001 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. Использование защитной среды с содержанием (по сухому веществу) 22,5% сахарозы, 10% ГЛА и 0,5% желатозы приводило к большим потерям биологической активности – 0,42±0,005 lg ТЦД₅₀/см³.

Результаты испытаний по определению оптимального соотношения вирусосодержащей жидкости и защитной среды при изготовлении вакцины представлены в таблице 2 в виде величин, обратных разведениям.

Таблица 2 – Иммуногенность образцов вакцины против реовирусного теносиновита цып - лят из штамма «КМИЭВ-V118» с различной концентрацией защитной среды

Соотношение вирусной суспензии штамма «КМИЭВ-V118» и защитной среды, по объёму	Титр антител в ИФА	Цыплята с титром антител не менее 1:800, %
1:1	2018,48±148,59*	92
3:2	2906,88±165,28	100
7:3	2873,8±192,39	96
контроль	0	0

Примечание – *при $P < 0,001$ по сравнению с образцом вакцины, содержащей вирусную суспензию штамма «КМИЭВ-V118» и защитную среду в соотношении 3:2 по объёму

Данные, представленные в таблице 2, показывают, что наибольшей иммуногенностью и профилактической эффективностью обладает вакцина, в состав которой входит вирусная суспензия штамма «КМИЭВ-V118» и защитная среда в соотношении по объёму 3:2 соответственно.

При экспериментальных исследованиях было выявлено, что профилактическая эффективность при использовании вакцины из штамма реовируса «КМИЭВ-V118» в дозе 2,8 lg ТЦД₅₀ производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» (опытная группа) составляет 96%, а при использовании вакцины Nobilis REO 1133 из штамма «1133» производства «Intervet» (Нидерланды) в дозе 3,1 lg ТЦД₅₀ (контрольная группа), профилактическая эффективность составляет 92%.

В течение периода наблюдения (30 суток) осложнений, связанных с вакцинацией птицы, в опытной и контрольной группах отмечено не было. Также не отмечено клинических признаков заболевания реовирусным теносиновитом у всех вакцинированных цыплят. При исследовании сывороток крови в ИФА набором ProF-LOK® REO ELISA (Zoetis-Synbiotics, США) достоверных отличий титра антител опытной (2418,2±83,8) и контрольной (2089,3±103,7) групп цыплят не выявлено. Таким образом, вакцина против реовирусного теносиновита цыплят из штамма «КМИЭВ-V118» и аналогичная вакцина

Nobilis REO 1133 (Нидерланды) в равной степени способны предупреждать реовирусную инфекцию птиц.

Величина зарплаты ветеринарного специалиста за короткий промежуток времени (ч) составила:

$$1789200 : 25,6 : 8 = 8736 \text{ рублей/ч}$$

Стоимость труда ветеринарного специалиста, затраченного на проведение 2-кратной вакцинации составляет:

$$Z_T = 8736 \times 8 \times 2 = 139776 \text{ рублей.}$$

Так как вакцинация проводилась 2-кратно и было использовано по 5 000 доз каждой вакцины, затраты на вакцину составили:

26,0 × 5000 × 2 = 260000 рублей в опытном птичнике;

400,0 × 5000 × 2 = 4000000 рублей в контрольном птичнике;

$$Z_A = 410000 \text{ рублей.}$$

Затраты на проведение ветеринарных мероприятий в опытном птичнике составили:

$$Z_{BO} = 139776 + 260000 + 410000 = 809776 \text{ рублей.}$$

Затраты на проведение ветеринарных мероприятий в контрольном птичнике составили:

$$Z_{BK} = 139776 + 4000000 + 410000 = 4549776 \text{ рублей.}$$

Чистый экономический эффект ветеринарных мероприятий (\mathcal{E}_B) составил:

$$\mathcal{E}_B = 4549776 - 809776 = 3740000 \text{ рублей.}$$

Экономическая эффективность вете-

теринарных мероприятий на рубль затрат для опытного птичника составила:

$$\mathcal{E}_{po} = 3740\ 000 : 809776 = 4,62 \text{ рубля.}$$

Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на рубль затрат для контрольного птичника составила:

$$\mathcal{E}_{pk} = 3740000 : 4549776 = 0,82 \text{ рубля.}$$

3 Экономический эффект за счёт импортозамещения составил:

$$\mathcal{E}_и = (400,0 - 26,0) \times 5000 = 1870000 \text{ рублей.}$$

Соответственно, экономический эффект от импортозамещения при иммунизации ремонтного молодняка кур против реовирусной инфекции вакциной живой против реовирусного теносиновита цыплят из штамма «КМИЭВ-V118», разработанной РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», по сравнению с использованием сухой живой вакцины Nobilis REO из штамма «1133» (Intervet, Нидерланды) составляет 374 000 рублей на 1000 голов. Окупаемость ветеринарных мероприятий при ис-

пользовании разработанной вакцины составляет 4,62 рубля на 1 рубль затрат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования показали, что защитная среда, в состав которой входит (по сухому веществу) 12,5% сахарозы, 12,5% ГЛА и 1,25% желатозы, обладает наиболее выраженными протективными свойствами в сравнении с другими стабилизаторами при соотношении вирусной суспензии штамма «КМИЭВ-V118» и защитной среды для лиофилизации 3:2 по объёму.

Использование для профилактики реовирусной инфекции на неблагополучных и угрожаемых по заносу реовируса птицефабриках вакцины живой против реовирусного теносиновита цыплят из штамма «КМИЭВ-V118» является экономически выгодным, так как окупаемость ветеринарных мероприятий при использовании разработанной вакцины составляет 4,62 рубля на 1 рубль затрат.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Безбородкин, Н.С. *Определение экономической эффективности мероприятий в ветеринарной медицине : учеб.-метод. пособие / Н.С. Безбородкин, В.А. Машеро ; М-во сел. хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь, Учреждение образования "Витеб. гос. акад. ветеринар. медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2009. – 40 с.*
- 2 Бессарабов, Б.Ф. *Болезни птиц: учебное пособие / Б.Ф. Бессарабов, И.И. Мельникова, Н.К. Сушкова, С.Ю. Садчиков – СПб.: «Лань», 2007. – С. 138–144.*
- 3 Жбанова, С.Ю. *Эпизоотология инфекционной бурсальной болезни и реовирусного теносиновита кур на птицефабрике яичного направления : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / С.Ю. Жбанова ; Всерос. науч.-исслед. ветеринар. ин-т птицеводства. – СПб., 2003. – 17 с.*
- 4 Зелютков, Ю.Г. *Реовирусная инфекция кур / Ю.Г. Зелютков, В.А. Машеро, В.В. Петров // Малоизученные вирусные болезни птиц : учеб.-метод. пособие / Ю.Г. Зелютков, В.А. Машеро, В.В. Петров ; Витеб. гос. акад. ветеринар. медицины. – Витебск, 2002. – С. 15–18.*
- 5 Пругло, В.В. *Течение реовирусного теносиновита кур в ассоциации с кокковыми инфекциями : дис. ... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / В.В. Пругло ; С.-Петербур. гос. акад. ветеринар. медицины. – СПб., 2005. – 139 л.*
- 6 *Рекомендации по диагностике и профилактике реовирусной инфекции птиц / Рос. акад. с.-х. наук, Гос. науч. учреждение «Всерос. науч.-исслед. ветеринар. ин-т птицеводства»; сост. Б.Б. Трефилов [и др.]. – СПб., 2004. – 32 с.*
- 7 Сергеев, В.А. *Вирусы и вирусные вакцины / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер; под ред. В.А. Сергеева. – М.: Библионика, 2007. – 524 с.*
- 8 *Специфическая профилактика реовирусного теносиновита кур / Р.Н. Коровин, Б.Б. Трефилов, А.С. Дубовой, В.В. Картамышева; Всерос. науч.-исслед. ветеринар. ин-т птицеводства. – СПб. – С.303–305.*
- 9 Шкиря, В.И. *Технология изготовления инактивированной вакцины против реовирусного теносиновита птиц: дис. ...канд. ветеринар. наук: 16.00.03 / В.И. Шкиря. – Владимир, 2000.–125 с.*