

УДК 619:602.3:615.371:616.98:579.887.111:636.3(477)

**СТЕГНІЙ Б.Т.**, д-р вет. наук, професор, академік НААН України,  
nsc.iecvm.kharkov@gmail.com

**РУЛА О.М.**, канд. вет. н., ст. наук. сп., aleksrula75@gmail.com

**МУЗИКА Д.В.**, д-р вет. наук, ст. наук. сп., dmuzyka77@gmail.com

**БОГАЧ Д.М.**, аспірант, bogach\_nv@ukr.net

**МАЙБОРОДА О.В.**, мол. наук. сп., maiboroda.olga@gmail.com

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», НААН України*

## РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ВИГОТОВЛЕННЯ ВІТЧИЗНЯНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОЇ АГАЛАКТІЇ ОВЕЦЬ І КІЗ

*Розроблена технологія виготовлення препарату «Вакцина інактивована проти інфекційної агалактії овець і кіз», яка включає накопичення бактерійної маси культури *Mycoplasma agalactiae* S-11 у рідкому поживному середовищі, інактивацію її формальдегідом, регламент виготовлення емульсії. Експериментальний зразок вакцини складається на 60 % з суспензії інактивованих формаліном клітин виробничого штаму ( $6 \times 10^7$  КУО в одній дозі) на стерильному фосфатно-буферному розчині та на 40 % з гідроокису алюмінію. Встановлено, що при дворазовому підшкірному введенні вакцина інактивована проти інфекційної агалактії овець і кіз (ННЦ «ІЕКВМ») забезпечує 100 %-вий захист сприйнятливих тварин від клінічних проявів захворювання та є нешкідливою, ареактогенною. За імуногенними та протективними властивостями не поступається вакцині закордонного виробництва і може бути рекомендована для подальшого впровадження.*

**Ключові слова:** мікоплазма, агалактія, вівці, кози, інактивована вакцина.

**Вступ.** Інфекційна агалактія овець широко розповсюджена в країнах із розвиненим вівчарством (Турція, Іспанія, Італія та ін.). Збудник (*Mycoplasma agalactiae*) може циркулювати в групі сприйнятливих тварин декілька років, при цьому хвороба буде перебігати у субклінічній формі, але за умов ураження більш ніж 70 % поголів'я виникає спалах клінічних проявів хвороби (пік його припадає на сезон окотів). При цьому більш сприйнятливими є лактуючі тварини та молодняк [1–4].

В Україні на сьогодні інфекційну агалактію реєструють лише в окремих районах Одеської області, але зважаючи на активний розвиток галузі вівчарства, хвороба може поширитись і на інші регіони. Саме тому актуальними є напрями щодо вивчення розвитку епізоотії, здійснення епізоотичного картографування та розробки епізоотологічного прогнозу [5–7].

За даними МЕБ, комерційні, інактивовані формаліном вакцини проти інфекційної агалактії овець, викликані *M. agalactiae*, широко використовуються в південній Європі. Деякі дослідники вважають, що ці препарати є низько ефективними. В експериментальних умовах, вакцини *M. agalactiae*, інактивовані сапоніном або фенолом, володіють більшою захисною дією, ніж формалізовані препарати. Живі вакцини проти *M. agalactiae* використовуються в Туреччині, де вони, як повідомляють, є більш ефективними, ніж інактивовані вакцини [4].

**Мета роботи.** Розробка вітчизняної вакцини проти інфекційної агалактії овець і кіз та її випробування у виробничих умовах.

**Матеріали та методи досліджень.** Для накопичення бактеріальної маси було використано музейний штам *Mycoplasma agalactiae* S-11, який зберігався в лабораторії

мікоплазмозів та сальмонельозів тварин ННЦ «ІЕКВМ». Біохімічні властивості культури вивчали за стандартними методиками на диференційно-діагностичних поживних середовищах згідно міжнародних вимог. Інкубацію усіх середовищ проводили в наступних режимах: температура 37 °С, вологість 60 %, CO<sub>2</sub> близько 5 %.

У якості основи для поживних середовищ було використано триптичний гідролізат серцевих м'язів ВРХ з вмістом (180-220) мг% амінного азоту (за Зеренсен-Гавріловим) з додаванням 10 % гідролізату печінки ВРХ (з вмістом (125-150) мг% амінного азоту), 5 % дріжджового аутолізу (з вмістом загального білку (25-75) %), 0,5 % пептону, (15-20) % сироватки крові коня або альбуміну крові ВРХ, а також 0,025 % НАДФ-На. Також застосовували середовище Едварда, виготовлене за стандартною методикою. Реакцію методом ПРА виконували з використанням антигену для діагностики інфекційної агалакції овець і кіз (ННЦ «ІЕКВМ»).

Виготовлену експериментальну серію вакцини контролювали на відсутність сторонньої мікрофлори відповідно до ДСТУ 4483, відсутність мікоплазм – відповідно до ДСТУ 4613, повноту інактивації – за загальноприйнятими методиками, нешкідливість – за ГСТУ 46.024.

Імуногенність, протективність та реактогенність вакцини визначали в умовах вівцегосподарства «Родина» Саратського району Одеської області. Для цього було проведено щеплення 100 тварин: 1 група (50 тварин) – щеплена інактивованою вакциною проти інфекційної агалакції овець і кіз (ННЦ «ІЕКВМ»); 2 група (50 тварин) – щеплена інактивованою вакциною проти інфекційної агалакції овець і кіз «Агавак» (S.N. «Institutul Pasteur» S.A. Румунія). Вакцини використовували дворазово підшкірно у хвостову складку в дозі 1 см<sup>3</sup> з інтервалом 30 діб. 3 група (50 тварин) – контроль (інтактна група). Впродовж 150-ти діб від початку досліду за тваринами проводили спостереження.

Від тварин усіх груп до початку досліду відбирали проби біологічного матеріалу (змиви із ніздрів та кон'юнктиви, проби молока), які досліджували бактеріологічним методом на наявність мікоплазм. Для отриманих проб сироватки крові дослідної (№1) та контрольної груп (№3) визначали загальний білок, серомукоїди, циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) та лізоцим за стандартними методиками.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Для виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційної агалакції було використано музейний штам *Mycoplasma agalactiae S-11*. Музейний штам зберігався в лабораторії мікоплазмозів та сальмонельозів ННЦ «ІЕКВМ» у нативному стані (у рідких поживних середовищах) за температури (4-8) °С.

Вакцину виготовляли шляхом інактивації накопиченої бакмаси 1 % формальдегідом (режим інактивації 24 год за температури 37 °С). Після чого отриману сировину осаджували центрифугуванням та дворазово відмивали стерильним ФБФР (режим центрифугування 3 тис.об/хв. впродовж 20 хв). З осаду було виготовлено суспензію з концентрацією 1x10<sup>8</sup> КУО/см<sup>3</sup>. Потім до бакмаси додавали гідроокис алюмінію у наступному співвідношенні: 60 % суспензії інактивованих клітин виробничого штаму *Mycoplasma agalactiae S-11* (6x10<sup>7</sup> КУО в одній дозі) в стерильному фосфатно-буферному розчині та 40 % гідроокису алюмінію.

Перед використанням даної вакцини на тваринах були проведені ряд дослідів з перевірки на стерильність, нешкідливість, відсутність мікоплазм та повноти інактивації. У результаті було встановлено, що вакцина відповідає вищезазначеним вимогам – стерильна, вільна від мікоплазм, нешкідлива та інактивована.

При використанні вакцини ННЦ «ІЕКВМ» на дослідних тваринах не було встановлено появи місцевих реакцій на введення, також впродовж усього терміну спостереження у тварин

не було відмічено підвищення температури тіла, загального пригнічення, нервових явищ, сльозотечі, що вказує на її низьку реактогенність.

З метою вивчення впливу «Вакцини проти інфекційної агалакції овець і кіз», виробництва ННЦ «ІЕКВМ на загальний фізіологічний стан тварин нами були проведені біохімічні дослідження проб сироваток крові овець першої дослідної та третьої контрольної групи. При цьому досліджували рівень таких показників, як загальний білок, серомукоїди, циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) та лізоцим. Результати досліджень наведені у таблиці.

Як видно з таблиці, за період спостереження (60 діб) в сироватці крові дослідних тварин (група №1) рівень загального білка, циркулюючих імунних комплексів та лізоциму зростає. Потенційний імуносупресивний вплив вакцини на організм овець ми оцінювали за показниками рівня серомукоїдів. Препарат не спричиняв імуносупресивний вплив на організм овець – після введення вакцини рівень серомукоїдів у тварин дослідної та контрольної групи майже не змінився.

Таблиця

**Біохімічні показники сироваток крові овець першої дослідної та третьої контрольної групи, (M±m; n=20)**

Час відбору крові	№ групи овець	Загальний білок, г/л	ЦІК, мг/мл	Серомукоїди, мг/мл	Лізоцим, мкг/мл
до початку вакцинації	1	72,18±2,08	0,250±0,010	0,260±0,010	50,89±0,98
	3	71,98±2,07	0,253±0,012	0,265±0,009	51,04±0,75
30-та доба після ревакцинації	1	80,76±0,90 *	0,290±0,03 ***	0,27±0,01	58,22±1,85 *
	3	72,08±2,13	0,249±0,011	0,262±0,010	50,95±0,72

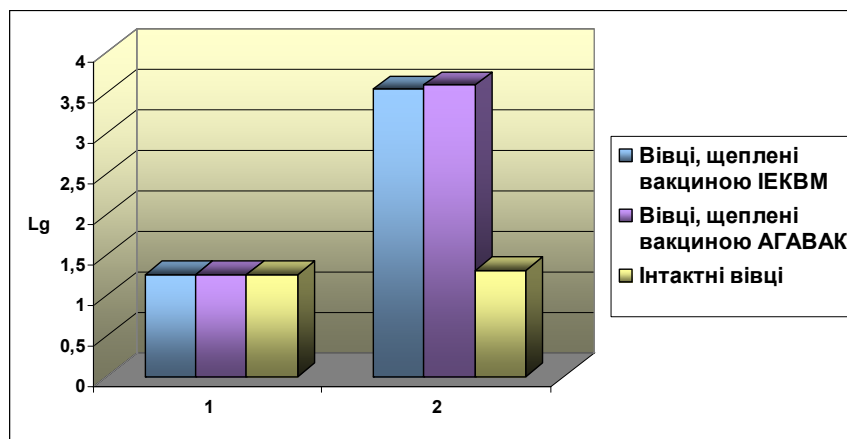
**Примітки:** \* – p<0,05; \*\*\* – p<0,001 порівняно з контролем

Введення вакцини ННЦ «ІЕКВМ» підвищує рівень загального білка та циркулюючих імунних комплексів в сироватці крові овець дослідної групи на 10 % та 13 % відповідно. Слід відмітити, що рівень лізоциму в сироватці крові овець характеризує рівень неспецифічної антибактеріальної резистентності організму і може не мати прямого зв'язку із дією імунізуючого препарату. Але, як свідчать отримані результати в дослідній групі (№1) щеплених тварин рівень лізоциму підвищується. Тоді як в контрольній групі (№3) тварин рівень лізоциму був нижче, ніж в дослідній групі. Ми пояснюємо цей факт тим, що сенсibilізація організму тварин мікоплазмозним антигеном активує інтенсивність функціонування не тільки специфічних, але й неспецифічних ланок імунної системи.

Імуногеність вакцини була доведена шляхом спільного утримання щеплених та клінічно хворих на агалакцію тварин (пригнічення, сльозотечі та опухання колінних суглобів). Так, через 60 діб після спільного утримання клінічно-хворих (група №3 – інтактні) та дослідних тварин (група №1 та №2 – щеплені) були проведені бактеріологічні дослідження овець. Для цього від тварин відбирали змиви із ніздрів та кон'юнктиви. Після проведення

п'яти сліпих пасажів від щеплених тварин обох груп збудника не було виділено, а від шести тварин інтактної групи був виділений збудник інфекційної агалактії.

Також паралельно з бактеріологічними дослідженнями були проведені серологічні, які були направлені на виявлення антитіл до збудника агалактії. Результати представлені на Рисунку 1.



**Примітка.** 1 – відбір крові перед початком дослідю; 2 – відбір крові на 30-ту добу після повторної імунізації.

**Рис.1.** Титри антитіл до збудника інфекційної агалактії овець та кіз в дослідних (група №1 та №2) і контрольній групі (група №3), (Me, %25 - %75, n=10).

Як видно з рисунку, серед тварин дослідних груп протективний рівень антитіл на 30-ту добу після ревакцинації становив 3,54 (3,47–3,61)  $Ig_2$  для вакцини ННЦ «ІЕКВМ» та 3,59 (3,52–3,64)  $Ig_2$  для вакцини «Агавак».

У контрольній групі овець (n=50) антитіла проти *Mycoplasma agalactiae* були зареєстровані у 14-ти голів і становили 1,31 (0,00–2,86)  $Ig_2$ . Інфікованість тварин на агалактію було підтверджено виділенням збудника.

#### Висновки та перспективи подальших досліджень.

1. Розроблена вітчизняна технологія виготовлення «Вакцини інактивованої проти інфекційної агалактії овець і кіз», яка включає в себе: накопичення бактерійної маси, її інактивація, осадження та відмивання; отримання емульсії вакцини з використанням гідроокису алюмінію.

2. «Вакцина інактивована проти інфекційної агалактії овець і кіз» пройшла офіційну реєстрацію (РП № ВВ-00771-02-15 від 05.10.2015) та отримано деклараційний патент на корисну модель «Спосіб виготовлення вакцини інактивованої проти інфекційної агалактії овець» (зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі №76995 від 25.01.2013).

3. При щепленні овець інактивованою вакциною проти агалактії овець та кіз ННЦ «ІЕКВМ» встановлено, що вона не спричиняє місцеві реакції організму на введення препарату та не чинить імуносупресивної дії на організм тварин, забезпечує 100 %-вий захист від клінічних проявів захворювання.

4. Встановлено, що розроблена вакцина ННЦ «ІЕКВМ» не поступається за своєю ефективністю вакцині виробленою в Румунії і може бути рекомендована для подальшого впровадження в схему профілактичних заходів проти інфекційної агалактії овець і кіз.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Madant A., Contagious agalactia of sheep and goats [text] / A.Madant, D.Zendulkova, Z.Pospisil – A review // Acta Vet Brno. – 2001.-7. – P.403-412.
2. Bergonier D., Contagious agalactia in France: epidemiological situation and control strategies. Mycoplasma of Ruminants: pathogenesis, diagnostics, epidemiology and molecular genetics [text] / D. Bergonier, G. Leori, E. Sautini [et al.] // J.Eds.Eur.- Brussels, European Commission. – 1998.- 2. –P.102-105.
3. Cokrevski S., Outbreaks of contagious agalactia in small ruminants in the Republic of Macedonia [text] / S. Cokrevski, D. Crcev, G.R. Loria [et al.] // Vet.Rec. – 2001.-5. –P.148.
4. Autu C.N., Sheep and goats diseases and breeding [text] / C.N. Autu, E. Alacan, B.C. Jalcin [et al.] // Instambul, Turkey. – 1990.-215 p.
5. Глушков А.А., Инфекционная агалактия овец и коз [текст] / А.А. Глушков, А.А. Сидорчук // Микоплазмы и микоплазмозы сельскохозяйственных животных. –Москва, 2004.-С.110-121.
6. Mare J., Contagious agalactia of sheep and goats [text] / J. Mare, C. Jhon // Foreign Animal Diseases. Richmond.VA: USA АНА. – 1998. – P.147-153.
7. Потоцький М.К., Інфекційна агалактия овець і кіз [текст] / М.К. Потоцький// Ветеринарна медицина України. – 2004.-№ 9. – С. 23-25.

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОЙ АГАЛАКТИЕЙ ОВЕЦ И КОЗ / Стегний Б.Т., Рула А.Н., Музыка Д.В., Майборода О.В.**

*Разработана технология изготовления препарата «Вакцина инактивированная против инфекционной агалактии овец и коз», которая включает накопления бактериальной массы культуры Mycoplasma agalactiae S-11 в жидкой питательной среде, инактивацию ее формальдегидом, регламент изготовления эмульсии. Экспериментальный образец вакцины состоит на 60% из суспензии инактивированных формалином клеток производственного штамма ( $6 \times 10^7$  КОЕ в одной дозе) в стерильном фосфатно-буферном растворе и на 40% из гидроокиси алюминия. Установлено, что при двукратном подкожном введении вакцина инактивированная против инфекционной агалактии овец и коз (ННЦ «ИЭКВМ») обеспечивает 100% -ную защиту восприимчивых животных от клинических проявлений заболевания и является безвредной, ареактогенной. По иммуногенным и протективным свойствам не уступает вакцине зарубежного производства и может быть рекомендована для дальнейшего внедрения.*

**Ключевые слова:** микоплазма, агалактия, овцы, козы, инактивированная вакцина.

**DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGY FOR MANUFACTURING DOMESTIC VACCINE AGAINST CONTAGIOUS AGALACTIA OF SHEEP AND GOATS / Stegny B., Rula O., Muzyka D., Bogach D., Maiboroda O.**

**Introduction.** Contagious agalactia of sheep is widespread in countries where sheep breeding are developed. The pathogen (*Mycoplasma agalactiae*) can circulate in a group of susceptible animals for several years, with the disease going through a subclinical form.

**The goal of the work.** Advanced technology for manufacturing of the medication «Inactivated vaccine against contagious agalactia of sheep and goats» has been identified, which includes the accumulation of epizootic culture *Mycoplasma agalactiae* S-11 bacterial mass in liquid media, its inactivation with formalin, standardization and addition of adjuvant.

**Materials and methods.** The museum strain *Mycoplasma agalactiae* S-11 was used to accumulate the bacterial mass. The vaccine was used twice as subcutaneously in the tail fold at a dose of 1 cm<sup>3</sup> at an interval of 30 days.

**Results of research and discussion.** The experimental vaccine sample composed of suspension (60 %) of *Mycoplasma agalactiae* S-11 cells inactivated with formalin ( $6 \times 10^7$  CFU per dose) in the sterile phosphate buffer saline and aluminum hydroxide (40 %).

**Conclusions and prospects for further research:**

*It has been established that in the case of double subcutaneous administration, the inactivated vaccine against contagious agalactia of sheep and goats (NSC "IECVM") provides 100% protection for susceptible animals from clinical manifestations of the disease and is harmless, areactogenic, characterized by immunogenic and protective properties equal to the vaccine, produced in Romania, and can be recommended for further implementation.*

**Key words:** *mycoplasma, contagious agalactia, sheep, goats, inactivated vaccine*

**REFERENCES**

1. Madant A., Zendulkova D. & Pospisil Z. (2001) Contagious agalactia of sheep and goats. Review. *Acta Vet Brno.*, 7., 403-412 [in English].
2. Bergonier D., Leori G., Sautini E. et al. (1998) Contagious agalactia in France: epidemiological situation and control strategies. *Mycoplasma of Ruminants: pathogenesis, diagnostics, epidemiology and molecular genetics. J.Eds.Eur.*, 2., 102-105 [in English].
3. Cokrevski S., Crcev D., Loria G.R. et al (2001) Outbreaks of contagious agalactia in small ruminants in the Republic of Macedonia. *Vet.Rec.*, 5, 148 [in English].
4. Autu C.N., Alacan E., Jalcin B.C. et al. (1990) *Sheep and goats diseases and breeding*. Instambul, Turkey [in English].
5. Glushkov A.A. & Sydorhuk A.A. (2004) Infekcionnaja agalaktija ovec i koz [Infectious agalactia of sheep and goats]. *Mikoplazmy i mikoplazmozy sel's'kohozjajstvennyh zhivotnyh.– Mycoplasma and mycoplasmosis of farm animals.*, S.110-121 [in Russian].
6. Mare J. & Jhon C. (1998) Contagious agalactia of sheep and goats. *Foreing Animal Diseases. Richmond.VA: USA AHA.*, 147-153 [in English].
7. Potoc'kij M.K. (2004) Infekcijna agalaktija ovec' i kiz [Infectious agalactia of sheep and goats]. *Veterinarna medicina Ukraїni.– Veterinary Medicine of Ukraine.*, 9., 23-25 [in Ukrainian].

**УДК 57.043;578.71**

**СТЕГНІЙ М.Ю.**, канд. біол. наук, доцент

**СТЕГНІЙ Б.Т.**, док. вет. наук, професор, академік НААН

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» м. Харків*

## **ВИКОРИСТАННЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ У БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ЛЕЙКОЗНОГО ДІАГНОСТИКУМУ**

*Розроблено спосіб кріоконсервування (FLK-SBBL), який включає поетапне заморожування, на першому етапі впродовж години за температури плюс чотири градуси за Цельсієм, на другому етапі: в парах рідкого азоту впродовж 18 годин з наступним занурюванням у рідкий азот; суміш поживних середовищ DMEM і 199 (1:1) (70 %), з сироваткою крові ВРХ (20 %) та діметиду (10 %). Розроблений спосіб кріоконсервування (FLK-SBBL) дозволяє зберігати на вихідному рівні антигенпродукуючу та віруспродукуючу активність штамів FLK-BLV за довготривалого зберігання в умовах кріобанку ННЦ «ІЕКВМ». За допомогою електронно-мікроскопічних досліджень встановлено, що максимальна кількість продукції вірусу лейкозу відбувалася з п'ятої по сьому доби культивування після розморожування (FLK-SBBL)*

**Ключові слова.** *лейкозний антиген, FLK-BLV, кріоконсервування.*