

РОЗДІЛ 10. БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 619:616.594.1-002.828:615.371:636.71.8

ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ВАКЦИНИ ПРОТИ МІКРОСПОРІЇ КОТІВ І СОБАК

Волков А.М.*Національний університет біоресурсів і природокористування України,
м. Київ, України, e-mail: volkov142@gmail.com*

Наведено принципово нову схему розробки імунобіологічного вакцинного препарату «Дейтерофел F» для специфічної профілактики та лікування мікроспорії котів і собак, що може забезпечити ефективний захист тварин від спонтанного інфікування вірулентними дерматоміцетами родів *Microsporum* і *Trichophyton*.

Ключові слова: мікроспорія, профілактика, вакцина, коти, собаки

У сучасних умовах боротьба з мікроспорійними інфекціями є однією з актуальних проблем ветеринарної медицини у розробці нових засобів високоефективної специфічної профілактики мікотичних хвороб у великих та дрібних свійських тварин. Це пояснюється значним щорічним зростанням захворюваності мікроспорійної етіології серед людей та тварин, а також широким розповсюдженням патогенних дерматоміцетів (дерматофітів, кератоміцетів) – представників роду *Microsporum*, класу *Deuteromycetes*, що належать до недосконалих грибів (*Fungi imperfecti*), проти яких у даний час не розроблено достатньо ефективні засоби специфічної профілактики та лікування [1].

Уперше у СРСР проблему трихофітії (стригучого лишая) вирішено у великої рогатої худоби. Було розроблено, виготовлено та впроваджено у виробництво вакцини ТФ-130, ЛТФ-130, а також вакцину «Триховак» в основному на території України. Цей ефективний протитрихофітійний засіб дозволив покращити епізоотологічну ситуацію щодо трихофітії у тварин [2, 3].

На сьогоднішній день в Україні зареєстрована значна кількість вакцин для специфічної профілактики й лікування дерматомікозів великих і дрібних свійських тварин як із атенуйованих, так й інактивованих збудників. Виявлено, що використання дерматомікозних вакцин з атенуйованими штамами може приводити до вісцеральних мікозів і контамінації вірулентними дерматоміцетами довкілля, а також бути недостатньо ефективним. Для специфічної профілактики й лікування мікроспорії котів і собак, використовують інактивовані вакцини «Полівак-ТМ» виробництва Російської Федерації, що включає в себе 8 штамів дерматоміцетів, а також вакцину «Фунгіканіфел» виробництва ЗАТ НВАП «Новогалещинська біофабрика», що містить 2 штами (*Trichophyton mentagrophytes* і *Microsporum canis*) [4].

Захворюваність мікроспорією котів і собак реєструється із року в рік зі значним збільшенням їх випадків, що свідчать про невідповідність антигенної структури вакцинних та епізоотичних (польових) штамів дерматоміцетів. Суттєвим недоліком їх є те, що перебіг мікроспорії у котів і собак ускладнюється одночасним циркулюванням декількох умовно-патогенних мікроміцетів родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* тощо. У зв'язку з цим, проблема специфічної профілактики і терапії мікроспорії м'ясоїдних тварин залишається невирішеною. Тому, у практику ветеринарної медицини впроваджено нову концепцію ранньої діагностики та розробки профілактики та лікування мікроспорії котів, собак, коней і хутрових звірів, яка включає виготовлення вакцин з урахуванням мінливості та особливості збудників хвороб у певному регіоні України, використовуючи сучасні методи біотехнології та імунотерапії, що включають антигенні комплекси всіх структурних елементів дерматоміцетів та умовно-патогенних мікроміцетів, вилучених з епізоотичних осередків [5].

Усі перераховані вище недоліки існуючих вакцин проти мікроспорії свідчать про необхідність подальшого удосконалення засобів специфічної профілактики захворювання у котів і собак.

В Україні в Національному університеті біоресурсів і природокористування України створена експериментальна асоційована інактивована вакцина проти мікроспорії котів і собак. У якості виробничих дерматоміцетів використано епізоотичні штами: *Microsporum canis*, *M. gypseum* і *Trichophyton mentagrophytes*, отримані із польових ізолятів, які були вилучені із мікотичних осередків хворих котів і собак.

Мета дослідження – сконструювати високоефективну специфічну інактивовану вакцину для профілактики мікроспорії котів і собак.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання: а) розробка технології виготовлення вакцини; б) лабораторне контролювання якості вакцини.

Матеріали та методи. Попередньо клінічно обстежено та люмінесцентно досліджено 333 кошенят і котів і 286 цуценят і собак у м. Києві та Київській області експрес-методом за допомогою люмінесцентної лампи ОЛД-41 з фільтром Вуда. Досліди проводили в основному на безпритульних тваринах. Для виділення та ідентифікації дерматоміцетів використовували живильні

середовища: Сабуро, сусло-агар, диференційно-діагностичне середовище, отримане за власним прописом, методом прямого посіву або розведенням. Зразки біологічного матеріалу з мікотичних ділянок шкіри та її придатків (волосся, лусочки, скрібки шкіри тощо) від котів і собак відбирались з місць максимальної флуоресценції смарагдово-зеленуватого світіння [6]. Під час мікроспорійного моніторингу зразки біологічного матеріалу, якщо не флуоресціювали не відбирались.

Предметом дослідження були польові ізоляти дерматомицетів з родів *Microsporum* і *Trichophyton*, а також умовно-патогенні мікромицети родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, *Mucor*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Alternaria* та тощо, вилучені з патологічних ділянок шкіри та похідних тварин. Після вилучення чистих культур епізоотичних штамів дерматомицетів і мікромицетів та вивчення їх морфолого-культуральних та біологічних властивостей, було проведено цикл досліджень щодо розробки засобів специфічної профілактики проти мікроспорії котів і собак.

Відбір претендентів у виробничі вакцинні та контрольні штами за ступенем вірулентності збудників дерматомикозів тварин здійснювали за розробленою нами методикою, яка основана на використанні мацерованої шкіри молодих статевонезрілих тварин, що дає можливість оцінювати ступінь вірулентності дерматомицету після повторного рецидиву патологічної ділянки шкіри. За характером розвитку дерматомицету у шкірних покривах і терміном перебігу шкірну реакцію поділяють на чотири ступені вірулентності: високовірулентні, середньовірулентні, слабковірулентні, авірулентні [7].

Під час конструювання вакцинного препарату «Дейтерофел F» використані слабковірулентні, середньовірулентні та високовірулентні штами дерматомицетів виділених від хворих котів і собак.

Імуногенну активність імунобіологічного вакцинного препарату «Дейтерофел F» вивчали за удосконаленням нами методом прямого внутрішньошкірного зараження сприйнятливих тварин антигенним комплексом високовірулентних штамів *Microsporum canis*, *M. gypseum* і *Trichophyton mentagrophytes*. Поствакцинальний імунітет у котів і собак, оцінювали через 30 діб після останньої вакцинації. Алергічна стійкість котів і собак до зараження вірулентними штамми дерматомицетів була критерієм оцінювання напруженості імунітету вакцинованих і контрольних тварин. У залежності від алергічного стану шкіри, розрізняли у імунізованих і контрольних котів і собак різний прояв захворювання і термін перебігу. Реакцію на внутрішньошкірне введення антигенних комплексів дерматомицетів класифікували за розмірами папули як «різко позитивна», «позитивна», «слабо позитивна», «негативна», а також «сумнівна».

Антигенну активність вакцинного препарату «Дейтерофел F» вивчали використовуючи серологічну реакцію аглютинації (РА) [8]. Виготовлення антигенів з штамів *Microsporum canis*, *M. gypseum* і *Trichophyton mentagrophytes* проводили від кожного дерматомицету окремо за стандартним методом [9].

Результати досліджень. У результаті діагностичних мікологічних досліджень із зразків біологічного матеріалу від котів і кошенят було ізольовано такі види дерматомицетів: *Microsporum canis* (82 %) і *Microsporum gypseum* (18 %), від собак і цуценят – *Microsporum canis* (85,3 %) та *Trichophyton mentagrophytes* (14,7 %), а також умовно-патогенні мікромицети: *Aspergillus flavus* Link, *A. fumigatus* Fres., *A. nidulans* (Eida) Wint, *A. clavatus* Desm., *A. paraciticus* Speare, *Penicillium citrinum* Thom, *P. rubrum* Bain., *Candida albicans* (Robin) Borkh, *Botrytis cinerea* Rers., *Cladosporium Link ex Fr. spp.*, *Alternaria Nees ex Fr. spp.* тощо.

Враховуючи епізоотологічні дані нами були відібрані відповідні штами та сконструйована асоційована інактивована вакцина «Дейтерофел F» проти мікроспорії котів і собак. Технологія виготовлення вакцини проти мікроспорії котів і собак, складається з наступних регламентів: культивування, зняття культур із живильного середовища, гомогенізація, доведення до відповідного рівня концентрацію мікроконідій, додавання вторинного продукту метаболізму мікромицету та інактивації збудників.

Під час конструювання вакцинного імунобіологічного препарату «Дейтерофел F» використані антигенні комплекси всіх структурних елементів дерматомицетів, у тому числі враховувалась концентрація мікроконідій штамів *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, а також вторинні продукти метаболізму умовно-патогенного мікромицету (*Aspergillus flavus* Link), вилучених з епізоотичних вогнищ і осередків, які на даний час найбільш поширені на території України.

Виготовлений асоційований інактивований імунобіологічний препарат «Дейтерофел F» проти мікроспорії котів і собак перевірявся за наступними показниками: а) зовнішній вигляд; б) повнота інактивації; в) стерильність; г) концентрація водневих іонів (рН); д) нешкідливість; е) загальна кількість всіх структурних елементів дерматомицетів, у тому числі концентрація мікроконідій; є) імуногенна активність; ж) антигенна активність.

Визначення зовнішнього вигляду, кольору проводили візуально у пронизуючому світлі. Вакцина являє собою суспензію від світло-сірого до жовтувато-коричневого кольору з невеликим осадом, який легко розбивається при струшуванні.

Одним із показників безпечності вакцини є повнота інактивації виробничих штамів дерматомицетів. Виготовлену вакцину інактивують фізичним способом, який забезпечує інактивацію вірулентних штамів дерматомицетів за одночасним збереженням їх антигенних властивостей. Критерієм оцінки безпечності вакцини є відсутність росту дерматомицетів на сусло-агарі. Упродовж трьох послідовних посівах на живильне середовище, не спостерігали росту грибів, що свідчить про повну інактивацію виробничих штамів дерматомицетів і мікромицетів.

Стерильність (відсутність контамінації), зокрема відсутній ріст мікробіоти на живильних середовищах МПБ, МПА, Сабуро, сусло-агарі, агарі Чапека.

Концентрацію водневих іонів визначали за допомогою рН-метра. Концентрація водневих іонів (рН) становила 7,0–7,4.

Загальна кількість всіх структурних елементів дерматомицетів, у тому числі концентрація мікроконідій — доведення концентрації всіх структурних елементів (фрагментів), дерматомицетів до 50 ± 5 млн/см³, у тому числі до 22 ± 5 млн/см³ мікроконідій, підрахунок їх проводили в камері Горяєва.

Визначення нешкідливості вакцини контролювали шляхом її введення клінічно здоровим кролям. Кролів імунізували 3-разовою імунізуючою дозою внутрішньом'язово в ділянку стегна, одноразово. Усі тварини залишались живими і не мали виражених поствакцинальних ускладнень. Вакцина була нешкідлива.

Імуногенна активність є одним з найважливіших показників якості вакцини. Основним критерієм імуногенності є стійкість імунізованих тварин до прямого зараження високовірулентними дерматомицетами – *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, після ревакцинації через 30 діб. Вакцина витримала випробування на морських свинках і на сприйнятливих тваринах (котах і собаках). У контрольних тварин реєстрували захворювання, імунізовані тварини залишались здоровими. Імунітет у вакцинованих котів і собак проти мікроспорії триває не менше ніж 12 місяців.

Антигенна активність є важливим показником оцінювання напруженості імунітету у щеплених котів і собак асоційованою інактивованою вакциною «Дейтерофел F» проти мікроспорії. Встановлено, що через 30 діб після дворазово щеплених тварин, рівень гемаглютининів у сироватці крові котів і собак був найвищий до антигенного комплексу дерматомицету *Trichophyton mentagrophytes* та значно нижчий – до антигенних комплексів штамів *Microsporium canis* і *M. gypseum*.

Виготовлений експериментальний асоційований інактивований вакцинний препарат «Дейтерофел F» випробували на котах і кошенятах. Було сформовано 3 піддослідні групи по 10 голів тварин у кожній групі для проведення порівняльної ефективності інактивованих вакцин «Полівак-ТМ», «Фунгіканіфел» і асоційований інактивований вакцинний препарат «Дейтерофел F». За місяць, перед початком вакцинації тварин, які не мали виражених клінічних ознак мікроспорії, експериментально інфікували окремо кожну піддослідну групу котів високовірулентними дерматомицетами штамів *Microsporium canis*, *M. gypseum* і *Trichophyton mentagrophytes*, проводили за відпрацьованою схемою та в дозах зазначених у настановах по застосуванню вказаних вакцин з метою профілактики.

Враховуючи ареал циркуляції вірулентних польових ізолятів збудників мікроспорії на території м. Києва та Київської області нами сконструйовано асоційований інактивований вакцинний препарат «Дейтерофел F» проти мікроспорії котів, собак, який під час порівняльної ефективності на котах не поступається вакцині «Полівак-ТМ», а по імуногенності перевищує вакцину «Фунгіканіфел». Як було встановлено асоційований інактивований вакцинний препарат «Дейтерофел F» здатний конкурувати з аналогічними засобами на ринку ветеринарних препаратів.

Висновки. 1. Розроблена нова концепція конструювання асоційованої інактивованої вакцини «Дейтерофел F» проти мікроспорії котів і собак, з урахуванням етіологічної структури збудників мікроспорії, яка базується на включенні до її складу епізоотичних штамів дерматомицетів і вторинних продуктів метаболізму умовно-патогенних мікромицетів, що циркулюють на певному поголів'ї тварин у відповідних регіонах України.

2. Створена асоційована інактивована вакцина «Дейтерофел F» проти мікроспорії котів і собак, що включає антигенні комплекси дерматомицетів усіх структурних елементів штамів *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, яка показала високу ефективність в експериментальних дослідженнях.

3. Встановлено, що сконструйована асоційована інактивована вакцина «Дейтерофел F» проти мікроспорії котів і собак, забезпечує надійний захист від збудників *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, а також здатна конкурувати з аналогічними засобами специфічної профілактики та терапії на ринку ветеринарних препаратів.

Перспективи подальших досліджень полягають у розробці засобів специфічної профілактики та терапії проти мікроспорії у коней, хутрових звірів і кролів.

Список літератури

1. Харченко С.М. Специфічна профілактика та лікування дерматомікозів собак і котів / С.М. Харченко, А.М. Волков // Матеріали конференції професорсько-викладацького складу, наукових співробітників і аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва 11–12 березня 2008 р. – К.: НАУ, 2008. – С.145-146.
2. Саркисов А.Х. Иммуниетет и специфическая профилактика дерматомикозов животных / А.Х. Саркисов // Труды ВИЭВ. – 1987. – Т.65. – С.3-5.
3. Головина Н.П. Новое в биотехнологии живой грибной вакцины / Н.П. Головина // Ветеринарная иммунология и биотехнология. – М.: Труды ВИЭВ, 1988. –Том 66. – С.86-90.
4. Стецюра Л. Розробка засобів специфічної профілактики та терапії дерматомікозів собак і котів / Л. Стецюра, В. Кассіч // Ветеринарна медицина України. – К.: 2007. – №6. – С.44-46.
5. Скибіцький В.Г. Визначення вірулентності збудників дерматомікозів тварин: методичні рекомендації / В.Г. Скибіцький, А.М. Волков. – К.: ВЦ НУБіП України, 2013. – 11 с.
6. Волков А.М. Экспрес-метод виявлення збудників мікроспорії тварин / А.М. Волков // «Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Збірник наукових праць. «Ветеринарні науки». –Харків. ХДЗВА, 2014. –Вип.28. –Ч.2. – С.554-557.
7. Волков А.М. Спосіб визначення вірулентності збудників дерматомікозів тварин. Патент на корисну модель № 90118 України / А.М. Волков, В.Г. Скибіцький, заявл.23.12.2013, опубл.12.05.2014. – Бюл. № 9.
8. Петрович С.В. Экспериментальное изучение иммунитета при трихофитии / С.В. Петрович // Вестн. Дерматологии и венерологи. – 1976. – №5. – С.36-40.
9. Курасова В.В. Методы исследования в ветеринарной микологии / В.В. Курасова, В.В. Костин, Л.С. Малиновская. – М.: Колос, 1971. –119 с.

TECHNOLOGY OF VACCINE MICROSPORES CATS AND DOGS

Volkov A.M.

The National University of Bioresources and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

The purpose of research – design highly specific inactivated vaccine for the prevention of microsporia cats and dogs.

The study used the epizootic analysis, fluorescent, mycological, serological, biochemical, statistical methods studies.

Given a brand new scheme to develop a vaccine formulation immunobiological «Deyterofel F» for specific prevention and treatment microsporia cats and dogs, can provide effective protection of animals against infection with virulent dermatomisetami spontaneous birth Microsporium and Trichophyton. Found that the use of available vaccines can not fully profilaktirovat microsporia. New direction control and prevention microsporia cats and dogs is the creation and development of associated inactivated vaccine «Deyterofel F» with the etiological factors, based on the incorporation of epizootic (field) strains dermatomisetami circulating at a certain number of animals of the region. The technology provides breeding selection isolates as contenders in the production of vaccines and control strains dermatomisetami virulence, immunogenicity and antigenicity. An experimental vaccine sample microsporia cats and dogs on the newest technology, which includes the antigenic complex of all structural elements dermatomisetami, including the concentration of microconidia strains of Microsporium canis, M. gypseum, Trichophyton mentagrophytes, withdrawn from epizootic foci, which are currently the most common in the territory of Ukraine.

It was found that the inactivated vaccine is designed associated «Deyterofel F» microsporia against cats and dogs that during the comparative effectiveness of cats is not inferior to the vaccine «Polivak-TM» and on the immunogenicity of the vaccine exceeds «Fungikanifel» ability to compete with similar means of specific prophylaxis and therapy on the market of veterinary drugs.

Keywords: microsporia, prevention, vaccine, cats, dog.

УДК 619:615.331.014.4:579.864+579.873.13

ВИЗНАЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ПРОБІОТИКА У ПРОЦЕСІ ЗБЕРІГАННЯ

Гужвинська С.О.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: probiotic@vet.kharkov.ua

*Для профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань тварин виготовлено три дослідні серії пробіотика «Болмол». Ліофілізований пробіотик являє собою розсипчасту суху речовину та складається з бактеріальної маси штамів *Lactobacillus plantarum* № 7 та *Bifidobacterium adolescentis* № 17. Проведено визначення стабільності пробіотика під час зберігання через 6, 12 та 24 місяців.*

Ключові слова: пробіотик, лактобактерії, біфідобактерії, стабільність.

Пробіотичні препарати широко використовуються у ветеринарній медицині для стимуляції росту та розвитку молодняку, профілактики шлунково-кишкових захворювань при відновленні кишкового біоценозу та стресах, а також як альтернативний метод хіміотерапії. Актуальною проблемою є пошук способів тривалого зберігання пробіотиків, основним завданням якого є підтримка їх життєздатності та біотехнологічних ознак [1, 2, 3, 4].

Літературні дані свідчать, що ліофілізація біологічних препаратів швидко знайшла визнання в біотехнології, сухі препарати застосовуються у все більших масштабах. У той же час багато питань по кількості клітин мікроорганізмів для висушування, складу захисних середовищ, технологій заморозки та подальшого досушування препаратів різними авторами трактуються по різному. Це пов'язано з конкретними мікроорганізмами, з умовами ліофілізації та іншими технологічними процесами, які можуть впливати на якість препарату. Досить багато питань виникає також і під час ліофілізації нових пробіотиків, що містять молочнокислі бактерії [5, 6].

Метою роботи було визначення стабільності пробіотика у процесі зберігання.

Матеріали та методи. Для профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань тварин у ННЦ «ІЕКВМ» було виготовлено три дослідні серії пробіотика «Болмол» і проведено визначення стабільності його під час зберігання. Ліофілізований пробіотик являє собою розсипчасту суху речовину та складається з бактеріальної маси штамів *Lactobacillus plantarum* № 7 та *Bifidobacterium adolescentis* № 17.

З метою вивчення стабільності пробіотика під час зберігання ми здійснили низку дослідів. Термін придатності пробіотика визначали за показником якості пробіотика, а також за показниками нешкідливості, контамінації бактеріальною та грибовою мікрофлорою, біохімічною активністю. Контрольні показники визначали за різних термінів збереження біологічного препарату, а саме в день виготовлення та через 6, 12, 24 місяці зберігання. Для цього було сформовано архів зразків пробіотика у кількості