

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including the concentration of microconidia strains of Microsporium canis, M. gypseum, Trichophyton mentagrophytes, withdrawn from epizootic foci, which are currently the most common in the territory of Ukraine.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 трактується 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

18 флаконів. Пробиотик зберігали в умовах побутового холодильника за температури $4 \pm 0,5$ °С. Для оцінки якості архівних зразків пробиотика після закінчення певного терміну зберігання відбирали по три флакони препарату.

Згідно з ТУ У 24.4-00497087-057:2007 визначали зовнішній вигляд, який проводили візуально у пронизуючому світлі. Визначали наявність механічних домішок, плісняви, пластівців. Одночасно перевіряли відсутність тріщин флаконів і відповідність етикування.

Визначення контамінації бактеріальною та грибовою мікрофлорою проводили у відповідності до ДСТУ 4483.

Визначення біохімічної активності: з трьох флаконів робили висіви у пробірки із знежиреним молоком (доза висіву – $0,2 \text{ см}^3$ на 5 см^3 молока).

Для перевірки на нешкідливість розведений пробиотик вводили десяти білим мишам вагою (18–20) г підшкірно в дозі $0,5 \text{ см}^3$. Спостереження за тваринами проводили протягом 21 доби. При загибелі мишей дослід повторювали на подвійній кількості тварин. Якщо при повторному введенні пробиотика спостерігалась загибель хоч однієї миші, то пробиотик бракували.

Кількість живих мікробних клітин визначали методом серійних розведень. Уміст флакону розводили 0,9 % фізіологічним розчином із розрахунку 1 см^3 розчину на 1 дозу пробиотика. З одержаної суспензії робили послідовні десятикратні розведення від 10^1 до 10^9 та засівали по $1,0 \text{ см}^3$ на середовище МРС–2 (для культивування лактобактерій) і середовище Блаурока (для культивування біфідобактерій). Усі проби інкубували за температури 37 °С протягом 48 годин.

Результати досліджень. У ННЦ «ІЕКВМ» виготовлено та випробувано три дослідні серії пробиотика «Болмол». На зовнішній вигляд виготовлений нами препарат являє собою суху розсипчасту масу білого або кремового кольору, без механічних домішок, без запаху, до складу якої входять штами молочнокислих та біфідобактерій.

Дослідження стабільності ліофілізованого препарату «Болмол» проводили протягом 24 місяців. Результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Результати дослідження стабільності ліофілізованого пробиотика «Болмол»

Найменування показника	Вимоги згідно з ТУУ 24.4-00497087-057	Результати проведення контролю			
		На день виготовлення	Через 6 міс.	Через 12 міс.	Через 24 міс.
1	2	3	4	5	6
Зовнішній вигляд	Розсипчаста суха маса білого або кремового кольору	Розсипчаста суха маса білого або кремового кольору	Розсипчаста суха маса білого або кремового кольору	Розсипчаста суха маса білого або кремового кольору	Розсипчаста суха маса білого або кремового кольору
Контамінація бактеріальною та грибовою мікрофлорою	Не повинен бути контамінований бактеріальною та грибовою мікрофлорою	Не контамінований бактеріальною та грибовою мікрофлорою	Не контамінований бактеріальною та грибовою мікрофлорою	Не контамінований бактеріальною та грибовою мікрофлорою	Не контамінований бактеріальною та грибовою мікрофлорою
Біохімічна активність	Повинен згорти знежирене молоко в пробірках або флаконах у термін до 48-72 годин. Інкубація за температури $(37 \pm 0,5)$ °С	Згортає знежирене молоко в пробірках у термін за 48 годин. Інкубація за температури $(37 \pm 0,5)$ °С	Згортає знежирене молоко в пробірках у термін за 48 годин. Інкубація за температури $(37 \pm 0,5)$ °С	Згортає знежирене молоко в пробірках у термін за 48 годин. Інкубація за температури $(37 \pm 0,5)$ °С	Згортає знежирене молоко в пробірках у термін за 48 годин. Інкубація за температури $(37 \pm 0,5)$ °С
Нешкідливість	Десять білих мишей вагою (18-20) г повинні залишатися живими та здоровими протягом 21 доби після підшкірного введення розведеного пробиотика в дозі $0,5 \text{ см}^3$	Десять білих мишей вагою (18-20) г залишилися живими та здоровими протягом 21 доби після підшкірного введення розведеного пробиотика в дозі $0,5 \text{ см}^3$	Десять білих мишей вагою (18-20) г залишилися живими та здоровими протягом 21 доби після підшкірного введення розведеного пробиотика в дозі $0,5 \text{ см}^3$	Десять білих мишей вагою (18-20) г залишилися живими та здоровими протягом 21 доби після підшкірного введення розведеного пробиотика в дозі $0,5 \text{ см}^3$	Десять білих мишей вагою (18-20) г залишилися живими та здоровими протягом 21 доби після підшкірного введення розведеного пробиотика в дозі $0,5 \text{ см}^3$

Дослідження показали, що пробиотик «Болмол» відповідає ДСТУ 4483, тобто не контамінований бактеріальною та грибовою мікрофлорою. Нами було встановлено, що через 24–48 годин спостерігався ріст лактобактерій на середовищі МРС, а біфідобактерій – на середовищі Блаурока та при мікроскопії мазків було визначено наявність характерних клітин. За біохімічними властивостями всі серії препарату виявились стандартними. Пробиотик «Болмол» нешкідливий для білих мишей.

Наступним етапом нашої роботи було вивчення життєздатності пробиотика після 6, 12 та 24 місяців їх зберігання у ліофілізованому стані.

Таблиця 2 – Життєздатність пробіотика «Болмол» після ліофілізації

Серії пробіотика	Кількість мікробних клітин в 1 см ³				
	До ліофілізації	Одразу після ліофілізації	Через 6 міс.	Через 12 міс.	Через 24 міс.
I	1,7x10 ⁹	1,4x10 ⁹	7,7x10 ⁸	1,5x10 ⁸	5,7x10 ⁷
II	1,2x10 ⁹	1,0x10 ⁹	5,7x10 ⁸	3,2x10 ⁸	9,7x10 ⁷
III	1,6x10 ⁹	1,3x10 ⁹	1,8x10 ⁸	7,7x10 ⁷	5,0x10 ⁶

У таблиці 2 наведено результати досліджень щодо впливу ліофілізації на виживання мікробних клітин. Як видно з представлених даних, одразу після ліофілізації кількість життєздатних клітин змінилася незначно: частка бактерій, що вижила, становила від 82 до 93 %. Після 6 місяців зберігання для усіх досліджуваних серій пробіотика спостерігали однакову тенденцію: кількість життєздатних бактерій знизилася лише на порядок. Після 12 місяців зберігання пробіотика у ліофільному стані кількість життєздатних клітин зменшилась на один порядок, а через 24 місяці зберігання – на два порядки. Максимальну кількість життєздатних клітин після двох років зберігання у ліофілізованому стані (9,7x10⁷) було відзначено у II дослідній серії пробіотика. Таким чином, ліофілізація забезпечує тривале збереження життєздатності мікробних клітин, однак була відзначена деяка тенденція до зниження активності ліофілізованого пробіотика.

Основну увагу ми приділяли вивченню біохімічної активності властивостей ліофілізованого пробіотика, вивчено спроможність до кислотоутворення та досліджено швидкість згортання молока, що є важливим у технологічному процесі (табл. 3).

Таблиця 3 – Біохімічна активність пробіотика «Болмол» після 24 місяців зберігання

Серії пробіотика	Кислотоутворення, у градусах Тернера		Швидкість сквашування молока, год	
	День виготовлення	Через 24 міс. зберігання	День виготовлення	Через 24 міс. зберігання
I	150±3,1	140±5,0	12±0,5	24±0,3
II	160±2,7	140±4,9	24±0,7	24±0,4
III	180±6,7	160±8,1	12±1,5	24±1,7

Одержані результати свідчать про те, що дослідні серії пробіотика після 24 місяців зберігання не втрачає свою біохімічну активність. Так, встановлено, що через 24 місяці зберігання у ліофілізованому стані пробіотик I дослідної серії сквашував молоко при внесенні посівної дози 5 % за (24±0,3) годин і був спроможним утворювати кислоту до (140±5,0)°Т, пробіотик II дослідної серії сквашував молоко за (24±0,4) год, а кислотність становила (140±4,9)°Т і утворював щільний згусток без відділення сироватки. Пробіотик III дослідної серії сквашував знежирене молоко за (24±1,7) год, утворюючи при цьому однорідний згусток без відділення сироватки, а його кислотність у молоці становила (160±8,1)°Т.

Отже, було доведено, що дослідні серії пробіотика, які ми вивчали відрізняються за властивістю згортання молока та ступенем кислотоутворення, а також що між цими показниками існує пряма корелятивна залежність.

Аналіз отриманих даних свідчить про те, що пробіотик за весь термін зберігання за температурного режиму 4±0,5 °С не контамінований. Розроблений і виготовлений нами біопрепарат за весь термін спостереження залишався нешкідливим для білих мишей. Крім цього нами встановлено, що після зберігання пробіотика протягом 6, 12 та 24 місяців кількість живих мікробних клітин у 1 см³ пробіотика було не менше 10⁶.

Висновки. Одержані результати свідчать, що пробіотик «Болмол» на день виготовлення та через 6, 12 та 24 місяці зберігав біохімічну активність та був нешкідливим для білих мишей протягом усього періоду досліджень. При дотриманні стандартних умов зберігання пробіотик залишається придатним до застосування протягом 24 місяців після виготовлення.

Список літератури

- Банникова, Л. А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности [Текст] / Л. А. Банникова // М.: Пищевая промышленность, 1985. - 256 с.
- Гужвинська, С. О. Застосування пробіотиків у птахівництві [Текст] / С. О. Гужвинська // Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб. - Х. - 2003. - Вип. 53. - С. 552 - 556.
- Кігель Н. Ф. Технології бактеріальних препаратів для функціональних продуктів і біологічно активних добавок [Текст]: автореф. дис. ... д-ра техн. наук : 03.00.20 / Н. Ф. Кігель; [Укр. держ. ун-т харч. технологій]. Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования [Текст] / Квасников Е.И., Нестеренко О.А.- М., Наука, 1975.- 384 с.
- Ямборко, Г.В. Ефективність різних способів зберігання промислових штамів бактерій роду *Lactobacillus* [Текст] / Ямборко Г.В., Соловйова І.Л. // Мікробіологія і біотехнологія. - 2007. - № 1. - С. 53 - 59.
- Гужвинська, С. О. Удосконалення технології ліофілізації виробничих штамів молочнокислих бактерій [Текст] С.О. Гужвинська / Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб. - Х., 2010. - Вип.94. - С.113-115.

DETERMINATION OF STORAGE STABILITY OF THE PROBIOTICS

Gujvinska S.A.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

Probiotic preparations are widely used in veterinary medicine for stimulating the growth and development of young animals for prophylaxis of gastrointestinal disorders, to restore intestinal biocenosis under stress after chemotherapy. Stability of probiotics during storage is an urgent problem.

Materials and methods. For the prevention and treatment of gastrointestinal diseases in animals was made three experimental series probiotic «Bolmol» and studied the stability of the drug during storage. Lyophilized probiotic strains containing *Lactobacillus plantarum* № 7 and *Bifidobacterium adolescentis* № 17. The term use of the drug is determined by the quality, safety, contamination of bacterial and fungal microflora biochemical activity. Benchmarks determined during manufacture, after 6, 12 and 24 months.

Results of researches. These results indicate that the probiotic was kontaminovany bacterial and fungal microflora. When the crops grown on the medium MRS lactobacilli on Wednesday Blaurock - bifidobacteria. Study of the biochemical properties showed that the probiotic was standard speed clotting milk was 48 hours. Studies have shown that probiotic «Bolmol» was harmless. It was found that after storage for 6 probiotic, 12 and 24 months, the number of microbial cells per 1 cm³ was not less than 10⁶.

Conclusions. It has been found that probiotic stably retains its biochemical properties within 24 months after manufacture.

Keywords: probiotic, bifidobacteria, stability.

УДК 619:616.961.55.635.4

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО КОНСТРУЮВАННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ ВАКЦИН
НА ПРИКЛАДІ ІНАКТИВОВАНИХ ВАКЦИН ПРОТИ ЕМФІЗЕМАТОЗНОГО КАРБУНКУЛУ

Мандигра М.С., Бойко П.К., Бойко О.П.

Дослідна станція епізоотології Інституту ветеринарної медицини НААН України,
м. Рівне, Україна, e-mail: pkboyko@ukr.net

У статті дано комплексну оцінку основних чинників, що мають визначальний вплив на антигенність та імуногенність вітчизняних вакцин проти емфізематозного карбункулу, і на основі цього сформульовано головні методологічні підходи до конструювання бактеріальних вакцин. Встановлено, що на імуногенність вакцин проти емфізематозного карбункулу найбільший вплив мають якісний стан популяції культури в момент її інактивації (мікробна маса повинна бути представлена вегетативними рухливими формами, бо джгутики є головними носіями протективності), концентрування мікробної маси, використання мінеральних олій як ад'юванта.

Ключові слова: бактеріальні вакцини, емфізематозний карбункул.

Враховуючи досвід країн з ефективним веденням тваринництва, основний акцент у проведенні протиепізоотичних заходів необхідно робити на постійному моніторингу епізоотичної ситуації, своєчасній і точній діагностиці, локалізації та ліквідації вогнищ епізоотії (Концептуальні наукові підходи щодо нової стратегії протиепізоотичних заходів в Україні) [1].

Епізоотична ситуація в Україні характеризується різноманітністю нозологічних одиниць, що мають неоднаковий прояв як у часі, так і у просторі. Так, протягом останніх десятиріч у країні діагностували понад 40 заразних хвороб, що підлягають обов'язковому обліку за списком Міжнародного епізоотичного бюро [2].

Відомо, що специфічна профілактика є основним фактором контролю епізоотичного процесу за більшості інфекційних хвороб [3].

Тому активна імунізація сприйнятливих тварин у неблагополучних пунктах і зонах є найефективнішим заходом профілактики тієї чи іншої інфекції [4].

Аналіз ринку вітчизняних імунобіологічних засобів свідчить, що в Україні їх виробництвом займаються 36 підприємств різних форм власності та підпорядкування. З них майже половина (15 підприємств) випускають вакцини для тварин [5].

При цьому у вакцинах проти однієї і тієї ж хвороби, в основі яких лежить використання одного і того ж збудника, підходи до його інактивації, адсорбування розчинних антигенних детермінант (токсинів), концентрування мікробної маси та анатоксину, вибір ад'юванта тощо нерідко значно, а інколи й діаметрально різняться між собою.

Протективна активність ветеринарних імунобіологічних засобів, спрямованих на формування надійного імунного захисту в популяціях сприйнятливих тварин, є визначальним критерієм оцінки їх якості. Вона залежить від ряду чинників, зокрема