

**УДК: 636.598:619:616.34**

**В. В. НЕДОСЄКОВ**, доктор ветеринарних наук

**Л. Г. СТЕЦЮРА**, кандидат ветеринарних наук

**О. Г. МАРТИНЮК**, кандидат ветеринарних наук

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

**В. В. СЛИВКО**, кандидат ветеринарних наук

*НВП Нарвак ,м. Москва*

## **БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ ВАКЦИН ПРОТИ ДЕРМАТОМІКОЗІВ М'ЯСОЇДНИХ**

*Представлено алгоритм виготовлення вакцин проти дерматомікозів м'ясоїдних на основі дослідження етапів виготовлення вакцин. Показані біотехнологічні аспекти підбору ізолятів, вивчення імунологічних властивостей штамів дерматофітів, шляхи оптимізації умов культивування та способів напрацювання сировини.*

*На основі експериментального аналізу біотехнологічних аспектів виготовлення ефективних лікувально-профілактичних препаратів, показана принципова можливість отримання вакцин з використанням вітчизняної сировини, що має пріоритетне значення з позиції національної біобезпеки.*

*Ключові слова:* дерматомікози собак та котів, дерматофіти *Trichophyton mentagrophytes* та *Microsporium canis*, вакцина, імунопрофілактика, імунна відповідь.

Нині досить актуальним є питання профілактики, діагностики і терапії мікозів та мікотоксикозів знаходиться в центрі уваги ВООЗ та ФАО. Дерматомікози тварин зустрічаються в різних країнах, а пошук методів отримання високоімуногенних вакцин проти цих інфекцій є досить актуальним питанням [1].

Розробка А. Х. Саркісовим, та співав. (1967) першої живої вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби дозволила практично ліквідувати трихофітію тварин в багатьох регіонах. Дерматомікози різних видів тварин мають високий рівень інфікування тварин, що активізує, як пошук методів отримання вакцин, так і пошук підходів до розробки універсальних технологій виробництва вакцин проти дерматомікозів [4].

Обґрунтуванням актуальності розробки даних препаратів є те, що вакцини, як засіб етіотропної терапії дерматомікозів тварин, сприяють швидкій елімінації збудника з організму тварин та формуванню напруженого імунітету, а з профілактичною метою – попереджують виникнення інфекції та контамінацію грибами довкілля [3]. Профілактичне щеплення собак і котів проти дерматомікозів (трихофітії, мікроспорії) дає змогу контролювати рівень захворюваності серед цих тварин [8].

Виробництво біопрепаратів проти дерматомікозів тварин здійснюється в багатьох країнах за різними технологіями [1,3].

Однак для всіх вакцин повинен існувати певний технологічний регламент виробництва та оцінки готового препарату. Саме тому, виходячи з цього, необхідно було провести аналіз і узагальнення існуючих технологій, розробити власну схему та з урахуванням цього експериментально показати біотехнологічні аспекти, на які необхідно робити акцент під час виготовлення вакцин проти дерматофітів собак і котів.

**Мета роботи** – аналіз біотехнологічних аспектів розробки засобів специфічної профілактики дерматофітів собак і котів.

**Матеріали і методи досліджень.** Дослідження проводили за етапами:

1) обґрунтування, відбір і дослідження імунобіологічних властивостей виділених ізолятів дерматофітів для виготовлення вакцин проти дерматофітів собак і котів;

2) розробка регламенту виготовлення вакцини проти дерматофітів собак і котів;

3) проведення до- та клінічних випробувань розробленої вакцини проти дерматофітів собак і котів.

4) оцінка ефективності розробленого препарату на сприйнятливих тваринах.

Біотехнологічні аспекти розробки вакцин проти дерматофітів собак та котів були розглянуті на прикладі вакцини „Фунгіканіфел” - інактивованої асоційованої проти дерматофітів (трихофітії, мікроспорії) собак і котів (ТУ У 24.4-31112822-004:2005).

Ізоляцію дерматофітів проводили з патологічного матеріалу та культивували на агаризованому бульйоні Сабуро, сусло-агарі (в режимі  $27 \pm 1$  °C впродовж 10 – 14 діб). Моноклонії штамів дерматофітів отримували шляхом послідовних розведень суспензій грибів та пересіву уколом.

Ідентифікацію культур збудників трихофітії і мікроспорії проводили за морфологічно-культуральними ознаками, результатами мікроскопічного дослідження культур та за допомогою визначників грибів [5,7].

Критерієм відбору перспективних штамів дерматофітів було отримання однорідних культур без ознак дисоціації, з виділенням життєздатних, стабільних і спороутворюючих культур, які мають імуногенність (для вакцинних штамів) та вірулентність (для контрольних штамів).

В якості вакцинних були відібрані штами *Trichophyton (T.) mentagrophytes 15* і *Microsporum (M.) canis 22* (виділені від хворих на трихофітію і мікроспорію котів, відповідно), контрольних – *Trichophyton mentagrophytes TM-48 K* та *Microsporum canis 65 K* (ізольовані від хворих на трихофітію і мікроспорію собаки і kota, відповідно).

Визначення імуногенної активності вакцини проводили на лабораторних (кролях, морських свинках) та свійських (собаках, котах) тваринах згідно методики затвердженої ДНДКІБШМ

Напруженість імунітету у лабораторних та сприйнятливих тварин при застосуванні вакцини визначали через 30 діб, 6 та 12 місяців після щеплення.

З лікувально-профілактичною метою вакцину вводили 63 собакам і 129 котам різного віку, породи та з профілактичною – 7 і 18 відповідно [5].

**Результати власних досліджень.** Нами була запропонована схема виробництва вакцини, що включала наступні етапи:

1) відбір і дослідження імунобіологічних властивостей *T. mentagrophytes* і *M. canis*.

Даний етап в роботі є першочерговим і фундаментальним, оскільки від нього залежить ефективність препарату, що розробляється. Враховуючи це, особливе ставлення приділяється морфокультуральним властивостям збудника. Після посіву відібраних від тварин проб було встановлено, що штами *T. mentagrophytes* характеризувались швидким ростом на 2-3-тю добу культивування, борошністою консистенцією, рідше бархатистою, від світло-кремового до бежевого, жовтого, інколи білого кольору колоніями з червоно-коричневим реверсом. При мікроскопічному дослідженні культур, як вакцинних, так і епізоотичних штамів, спостерігали ряд особливостей, що були описані раніше [5].

Важливими біологічними властивостями епізоотичних штамів дерматофітів є виразна здатність обумовлювати захворювання, тому для оцінки патогенності дерматофітів лабораторних тварин інфікували нашкірним методом епізоотичними штамами *T. mentagrophytes* [2, 5].

За результатами вивчення морфолого-культуральних і біологічних властивостей дерматофітів для наступних досліджень були відібрані штами *T. mentagrophytes* (Co, Th, 15, ТМ-48 К) та *M. canis* (№№ 11, 22, 39, 50, 65 К).

*Відбір вакцинних штамів T. mentagrophytes і M. canis.* Доведено, що штами *Trichophyton mentagrophytes* 15 і *Microsporum canis* 22 мали стабільні морфолого-культуральні властивості, інтенсивніше накопичення мікроконідій та були технологічними. Використовуючи метод відбору швидко ростучих і спороносних моноколоній, вдалося підвищити утворення мікроконідій. В підсумку, штами *Trichophyton mentagrophytes* 15 та *Microsporum canis* 22 були визначені як такі, що придатні для виготовлення вакцини з наступним дослідженням їх імуногенності.

*Відбір контрольних штамів дерматофітів.* Для контролю імуногенності вакцини обов'язковою умовою є підбір та вивчення контрольних штамів. Для підвищення вірулентності штамів дерматофітів були проведені пасажування грибів через організм собак та котів з наступним виділенням чистих ретрокультур. У результаті, були відібрані високовірулентні штами *T. mentagrophytes* ТМ-48 К і *M. canis* № 65 К з заражаючою дозою –  $2,5 \times 10^6$  мікроконідій.

Враховуючи необхідність використання інактивованих компонентів нами проведено наступне:

*Оптимізація методу інактивації дерматофітів.* Для інактивації дерматофітів використовували універсальний термоспосіб (за температури  $58^{\circ}\text{C}$  - протягом 3 діб).

У результаті перевірки зразків вакцини на присутність живих агентів встановлено, що у всіх випадках ріст дерматофітів та будь-якої іншої мікрофлори не спостерігали. Це свідчило, що виготовлені зразки вакцини були інактивовані.

Тестування нешкідливості зразків вакцини, показало, що після внутрішньом'язевого введення ( $3,0 \text{ см}^3$  кролям і  $1,0 \text{ см}^3$  морським свинкам)

вакцини в ділянку стегна, протягом 10 – 14 діб поствакцинальних ускладнень в ділянці введення не відмічалось.

Таким чином, на даному етапі дослджень не тільки підібрані умови інактивації, але й показано нешкідливість для лабораторних тварин.

**2) розробка регламенту виготовлення вакцини проти дерматофітів собак та котів.** Біотехнологічний регламент виготовлення вакцини «Фунгіканіфел» складається з 8 етапів, але існують певні критичні контрольні точки, які мають ключове значення:

*А) Визначення нешкідливості та імунізуючої дози вакцини.* Після відбору вакцинних штамів дерматофітів визначали імунізуючу дозу штамів *T. mentagrophytes* 15 і *M. canis* 22 (співвідношення 1:2) на кролях і морських свинках шляхом введення зразків вакцини в дозі  $1,0 \text{ см}^3$  з вмістом мікроконідій  $3,0-24,0 \times 10^6/\text{см}^3$ , дворазово, внутрішньом'язово в ділянку стегна. Протективні властивості зразків вакцини визначали методом нашкірного зараження вірулентними штамми *T. mentagrophytes* ТМ-48 К та *M. canis* 65 К.

Встановлено, що імунізуюча доза ( $6,0 - 24,0 \times 10^6/\text{см}^3$  мікроконідій) забезпечує протективну активність вакцини для лабораторних тварин.

Випробування експериментальних серій вакцини ( $13,0 - 24,0 \times 10^6$  мікроконідій / $\text{см}^3$ ) на сприйнятливих тваринах (собаках, котах), показало, що застосування вакцини у дозі  $0,5$  та  $1,0 \text{ см}^3$  ( $13,4 - 16,8 \times 10^6$  мікроконідій) не викликало у собак і котів поствакцинальних ускладнень та місцевої реакції в ділянці введення. В більш високих дозуваннях спостерігали набряки, болючість та абсцеси.

Дворазове введення вакцини формувало напружений імунітет і захист собак та котів від контрольного зараження вірулентними культурами *T. mentagrophytes* ТМ-48 К, *M. canis* 65 К. Контрольні (нешцеплені) тварини захворіли з характерними клінічними ознаками трихофітії та мікроспорії.

Встановлено, що при застосуванні вакцини у дозі  $0,5$  та  $1,0 \text{ см}^3$  з кількістю мікроконідій  $13,4 - 16,8 \times 10^6/\text{см}^3$  собакам і котам відмічались нешкідливість та протективна активність вакцини.

*Б) Визначення тривалості та напруженості імунітету при застосуванні вакцини «Фунгіканіфел».* Критерієм наявності імунітету при щепленні тварин вакцинами проти дерматофітів є стійкість тварин до нашкірного зараження.

Для визначення тривалості імунітету при застосуванні вакцини «Фунгіканіфел» проводили зараження імунізованих кролів, морських свинок, собак і котів штамми *T. mentagrophytes* ТМ-48 К і *Microsporum canis* 65 К, через 30 діб, 6 і 12 місяців після щеплення. В подальшому не спостерігалось захворювання тварин, в той час як всі контрольні тварини при зараженні штамми *Trichophyton mentagrophytes* ТМ-48 К і *Microsporum canis* 65 К захворіли на трихофітію і мікроспорію, з наступним виділенням ретрокультур. Імунітет у собак і котів, щеплених вакциною „Фунгіканіфел”, триває не менше 12 місяців.

Дослідження гуморальної ланки імунітету показало, що титри антитіл в щеплених тварин вакциною „Фунгіканіфел” порівняно з титрами

експериментально заражених штамми *T. mentagrophytes* 15 і *M. canis* 22 до обох антигенів були вирогідними ( $p < 0,05$ ).

### **3) проведення до- та клінічних випробувань вакцини „Фунгіканіфел”.**

За результатами клінічних випробувань вакцини „Фунгіканіфел” за дерматомікозів собак і котів встановлено, що після першого щеплення одужало 27,0 % ( $n=17$ ) собак і 34,1 % ( $n=44$ ) котів, хворих на дерматомікози; через 7-14 днів після другого щеплення – 84,1 % ( $n=53$ ) і 93,0 % ( $n=120$ ),

Після дворазової вакцинотерапії одужали 96,8 % тварин, лише 3,2 % ( $n=6$ ) тварин, хворим на мікроспорію, застосовували вакцину тричі. Слід відмітити, що період одужання залежав від наявності як первинних, так і вторинних дерматологічних хвороб (інфекційні, паразитарні, незаразні) та природної резистентності організму. Впродовж періоду спостереження у тварин, щеплених з лікувальною метою, рецидиви дерматомікозів не реєструвались, а з профілактичною – захворювання не відмічались.

### **4) оцінка ефективності розробленого препарату на векторних тваринах.**

Завершальним етапом досліджень є незалежна оцінка препарату, яка полягає в комісійних міжвідомчих випробуваннях вакцини на собаках та котах. Встановлено, що препарат відповідає показникам і вимогам нормативної документації, а вакцина є нешкідливою та імуногенною для лабораторних та сприйнятливих тварин. Вакцина зареєстрована в Україні за № 1392-04-0197-05 від 23 листопада 2005 року, впроваджена в виробництво та практику ветеринарної медицини (виробником є ТОВ «Алтекс», ЗАТ НВАП «Новогалешинська біофабрика»).

**Висновки.** наведені основні аспекти біотехнології розробки інактивованих вакцин проти дерматомікозів собак і котів на прикладі вакцини „Фунгіканіфел” інактивована асоційована проти дерматомікозів (трихофітії, мікроспорії) собак і котів. Авторами розроблено технологічний регламент виготовлення вакцини проти дерматомікозів собак і котів, що дозволило забезпечити високі імуногенні властивості та нешкідливість за імунізації собак, котів та лабораторних тварин.

Автори вдячні керівництву і співробітникам ННЦ „ІЕКВМ”, ДНКІБіШМ, ТОВ „Алтекс” за технічний супровід, і підтримку.

### **Список використаної літератури**

1. *Маноян М. Г.* Развитие ветеринарной микологии / М. Г. Маноян, Р. С. Овчинников, А. Г. Гайнуллина, А. Н. Панин // Ветеринария.- 2011. - №1. – с. 39-41.
2. *Мартинюк О. Г.* Визначення ефективності лікування дерматомікозів у котів / О. Г. Мартинюк, Л. Г. Стецюра, В. В. Гусаков, Д. Л. Мартиненко // Науковий вісник НАУ. – 2005 – № 91. – с. 184 – 187.
3. *Панин А. Н.* Совершенствование биотехнологии производства вакцин против дерматофитозов животных / А. Н. Панин, М. Г. Маноян, Р. С. Овчинников// Актуальные проблемы с/х биотехнологии: Материалы научно-практической конференции. – Воронеж. – 2004. – с. 22.

4. *Скрипник В. Г.* Деякі аспекти стандартизації вакцин проти дерматомикозів тварин / Ветеринарна медицина: Міжвідом. темат. наук. зб. – Х., 2004. – Вип.84. – с. 630–632.

5. *Стецюра Л. Г.* Специфическая профилактика дерматомикозов собак и кошек // автореф. дис. на соиск. уч. степени к. вет. наук: спец. 16.00.03: “Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология и иммунология” / Л. Г. Стецюра. – Киев, 2008. – 34 с.

6. *Стецюра Л. Г.* Застосування вакцини Фунгіканіфел проти дерматомикозів собак і котів / Л. Г. Стецюра, О. Ю. Нестеренко, І. М. Мовенко [та ін.] // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий науковий тематичний збірник. – Харків. – 2005. – № 85. – Т. II – с. 1047 – 1050.

7. *Ханис А. Ю.* Метод определения вирулентности дерматофитов // Ветеринария. – 2003. – № 8. – с. 20 – 23.

8. *Lakshmiathy D. T., Kannabiran K.* Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment // Natural Science.- 2010.- Vol.2, No.7.- P 726-731.

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН ПРОТИВ ДЕРМАТОМИКОЗОВ ПЛОТОЯДНЫХ / В. В. Недосёков, Л. Г. Стецюра, О.Г. Мартинюк, В.В. Сливко**

*Представлен алгоритм создания вакцин против дерматомикозов плотоядных на основании исследования этапов изготовления вакцин. Показаны биотехнологические аспекты подбора изолятов, исследования иммунобиологических свойств штаммов дерматофитов, оптимизации условий культивирования и получения сырья.*

*На основании экспериментального анализа биотехнологических аспектов создания препарата с высокой эффективностью, показана принципиальная возможность получения вакцин с использованием отечественного сырья при отсутствии импортных технологий, что имеет приоритетное значение с позиции биобезопасности страны.*

*Ключевые слова:* дерматомикозы собак и кошек, дерматофиты *Trichopyton mentagrophytes* и *Microsporium canis*, вакцина, иммунопрофилактика, иммунный ответ.

**BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS DEVELOPMENT OF VACCINES AGAINST DERMATOMYCOSES OF CARNIVOROUS / V. Nedosekov, L Stetsyura, O Martyniuk, V Slyvko**

*Presented an algorithm for the development of vaccines against dermatomycoses of carnivores on the basis of research stages production vaccines. Showing the*

*biotechnological aspects of selection isolates, research immunological properties strains of dermatophytes, optimization of culture conditions and obtain raw materials.*

*Based on the experimental analysis biotechnological aspects of creating a of the drug with high efficiency, shows fundamental possibility of obtaining vaccines using domestic raw materials if there is no imports technology that is of primary importance from the standpoint of the country's biosafety.*

*Keywords: dermatomycosis, dogs, cats, dermatophyte Trichopyton mentagrophytes and Microsporium canis, vaccine, immunoprophylaxis, immune answer.*

**Рецензент – кандидат ветеринарних наук В. В. Мельник .**

Рукопис надійшов 02. 08. 2013р.