Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР

"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ

ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"

**СКРИПНИК ВАЛЕРІЙ ГРИГОРОВИЧ**

УДК 619:616.5–002.828:579:616–076

**ТРИХОФІТІЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

**(етіологічна структура, діагностика, селекція штамів**

**та розробка бівалентної вакцини)**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

доктора ветеринарних наук

Харків – 2007

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів.

**Науковий консультант**  доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент УААН **Головко Анатолій Миколайович**, Українська Академія Аграрних наук, віце-президент

**Офіційні опоненти:**

– доктор ветеринарних наук, професор **Завгородній Андрій Іванович**, ННЦ "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини", завідувач лабораторії вивчення туберкульозу;

– доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент УААН **Риженко Василь Петрович**, Інститут ветеринарної медицини УААН, завідувач лабораторії анаеробних інфекцій;

– доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент УААН **Мандигра Микола Станіславович**, Інститут епізоотології УААН, директор.

Захист відбудеться 5 грудня 2007 року о 9 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64 359 01 в Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» за адресою:  
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» за адресою: вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023.

Автореферат розісланий 3 листопада 2007 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,

доктор ветеринарних наук, професор А.Ф.Бабкін

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.**  Дослідження епізоотичного стану щодо трихофітії великої рогатої худоби в Україні, з'ясування етіологічної структури захворювання, визначення біологічних особливостей збудників та розробка нових засобів його специфічної профілактики є одним із сучасних напрямків досліджень у ветеринарній медицині. Відомо, що трихофітія (стригучий лишай) великої рогатої худоби має значне поширення у світі та завдає значних економічних збитків у галузі скотарства (Петрович С.В., 1989, Саркисов А.Х., 2000, Саркисов К.А., 2006). Незважаючи на велику кількість наявних методів лікування, включаючи вибракування, трихофітія великої рогатої худоби є невирішеною проблемою, яка знижує продуктивність тваринництва і якість продукції галузі (El Sayed M.T., 1976, Никифоров Л.И., 1984, Петрович С.В., 1989, Головина Н.П., 2003, Лабусова Н.И., 2004).

Трихофітія має епідеміологічне значення, тому що хворі тварини є джерелом ураження людей і, перш за все, працівників тваринництва та членів їхніх сімей (Спесивцева Н.А., 1964, Петрович С.В., 1989, Латыпов А.Б., 2005, Маноян М.Г. и соавт., 2006). Із часів першого повідомлення Ернста в 1820 році про зооантропонозний характер захворювання і до сьогодення є повідомлення про зараження дерматофітами людей від свійських і диких тварин (Маноян М.Г. и соавт., 2007, Латыпов А.Б., 2007).

Науковий пошук засобів специфічної профілактики трихофітії розпочався ще на початку 20 століття (Bloch B., Massini R., 1909). У подальшому з цією метою багато дослідників здійснили експерименти щодо розробки та використання інактивованих і живих вакцин з різних збудників дерматомікозів (De Lamater E.D., 1941, 1965, Кашкин П.Н., 1954, 1956, Левенберг И.Г., 1956, Ford E.J.H., 1956, Jesionek A., 1961, Ариевич А.М. и соавт., 1964, Носков А.И., 1965, Саркисов А.Х. и соавт., 1965, 1970, 1972, Петрович С.В., 1967, 1969, Расулев Ш.Т., 1971, Безнос Т.И., 1977,   
Головина Н.П и соавт., 1995, 2003 та інші дослідники).

У результаті здійснених досліджень була створена ефективна жива вакцина ТФ-130, яка широко вивчалась у багатьох країнах (Норвегії, Швеції, Бельгії, Югославії, Болгарії, Румунії, Німеччині, Англії, Угорщині), випробовувалася й застосовувалася з позитивним результатом (Саркисов А.Х., 1972, 1975, 1987, 2000, Петрович С.В., и соавт., 1972, 1977, 1987, Яблочник Л.М., 1972, Жарков И.И., 1976, Станкушев Х., 1979, Плауска В.А., 1975, 1986, Heinrichs B., 1977, Wernicke R., 1978, Gimeshi A., 1978, Rotermund H., 1980, Naess В., Sandvik О., 1981, Fischer J., 1985, Komarek J., 1985, Spanoghe L., 1985, Gudding R., 1987, 1988, Саркисов К.А., 2006, 2007).

Профілактика трихофітії великої рогатої худоби в Україні здійснюється, в основному, живими, сухими ліофілізованими вакцинами: ЛТФ-130 (Ставропольської біофабрики) та "Триховак" (Галещинської біофабрики), які містять антиген до одного збудника трихофітії – *Trichophyton verrucosum* (Вербицький П.І., Головко А.М. та ін., 2005). У той же час, значна кількість дослідників (Азимов И.М., 1963, Шарапов В.М., 1968, Gedek B., 1980,   
Carlisle D.H. et al., 1984, Петрович С.В., 1989, Sik M. et al., 1990,   
Саркисов К.А., 2002, 2006) та інші вчені вважають, що трихофітію у великої рогатої худоби й овець може викликати *Trіchophуton mentagrophytes*.

У науковій літературі відсутні дані щодо етіологічної структури трихофітії великої рогатої худоби в Україні. У той же час дослідження науковців гуманної медицини, здійснені останніми роками   
(Коляденко В.Г., Степаненко В.І., 2001, Волкославська В.Н., 2002) свідчать, що проблема дерматомікозів існує і серед населення України, і серед великої рогатої худоби та інших тварин. Через це розробка ефективних засобів специфічної профілактики трихофітії на підставі вивчення особливостей перебігу, етіологічної структури, біологічних властивостей збудників є сучасною й актуальною. Її розвиток вимагає здійснення комплексних досліджень щодо з'ясування клініко-епізоотологічних особливостей перебігу захворювання, його етіологічної структури та біологічних властивостей збудників, відкриває шлях до науково обґрунтованої розробки засобів специфічної профілактики трихофітії великої рогатої худоби.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота є складовою частиною досліджень, передбачених тематичними планами ДНКІБШМ: № державної реєстрації 0100U000260 – "Підтримання штамів мікроорганізмів у Національному центрі штамів мікроорганізмів України",   
№ 0101U000542 – "Розробити методи підтримання та збереження мікроорганізмів (бактерій, вірусів, грибів), що знаходяться в установах ветеринарної медицини України з подальшим впровадженням їх під час промислового виготовлення біологічних препаратів", № 0104U007530 – "Розроблення засобів діагностики та профілактики інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин та засобів їх стандартизації", № 0105U003218 – "Колекція штамів патогенних для тварин мікроорганізмів Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів", № 0105U005322 – "Розроблення біотехнології виготовлення концентрованої вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби (ВРХ) та інактивованої вакцини проти дерматомікозів м'ясоїдних".

**Мета і завдання досліджень.** Мета роботи – розробка бівалентної, живої, сухої, концентрованої вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби на підставі вивчення етіологічної структури, визначення біологічних властивостей та селекції збудників захворювання.

Основні завдання досліджень:

* здійснити ретроспективний аналіз епізоотичного стану щодо трихофітії великої рогатої худоби в Україні;
* вивчити етіологічну структуру захворювання та визначити культурально-морфологічні й біологічні властивості виділених збудників;
* здійснити селекцію та відібрати виробничі штами для виготовлення й контролю бівалентної, живої, сухої, концентрованої вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби;
* удосконалити метод довготривалого зберігання штамів дерматофітів;
* теоретично й експериментально обґрунтувати та розробити технологію промислового виробництва бівалентної, живої, сухої, концентрованої вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби;
* визначити профілактичну й терапевтичну дози та вивчити нешкідливість, профілактичну й терапевтичну ефективність лабораторних та промислових зразків бівалентної, живої, сухої, концентрованої вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби.

**Об'єкт дослідження:** захворювання великої рогатої худоби на трихофітію та засоби специфічної профілактики трихофітії.

**Предмет дослідження:** епізоотологічні особливості трихофітії великої рогатої худоби в Україні; етіологічні чинники трихофітії; хворі на трихофітію тварини; способи конструювання засобів специфічної профілактики дерматомікозів; показники факторів імунітету за умов спонтанної трихофітії та в поствакцинальний період.

**Методи дослідження:** ретроспективний епізоотологічний аналіз, епізоотологічний експеримент, біологічний експеримент, мікологічні, серологічні, біохімічні, статистичні методи.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Уперше в Україні обґрунтовано спосіб виготовлення та складові компоненти бівалентної, живої, сухої, концентрованої вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби, визначено її профілактичну та терапевтичну дози, доведено нешкідливість, профілактичну й терапевтичну ефективність цього препарату. Вивчено біологічні особливості виділених штамів, які полягають у різних термінах росту, морфології колоній, виді міцелію і особливостях його росту, структурі та кількості спор.

На підставі клініко-епізоотологічних і мікологічних досліджень установлено роль *T. mentagrophytes* та *T. verrucosum* у виникненні трихофітії великої рогатої худоби. Селекціоновано високоімуногенні та високовірулентні штами збудників трихофітії (патенти України №№ 23490–23493).

Уперше в Україні виділено й селекціоновано контрольні високовірулентні штами трихофітонів та запропоновано їх використання для контролювання якості вакцин проти дерматомікозів тварин.

Уперше в Україні теоретично й експериментально обгрунтувано та виготовлено бівалентну, живу, суху вакцину проти трихофітії великої рогатої худоби та розроблено технологію її промислового виробництва (патент України № 25296).

Удосконалено запропоновану А.Х. Саркісовим і співавт. (1971) методику лабораторної діагностики трихофітії тварин, яка дає змогу підвищити на 37 % ефективність виділення культур збудників захворювання і скоротити час виділення *T. verrucosum*  більше, ніж удвічі.

Розроблено спосіб довготривалого зберігання штамів збудників дерматомікозів, який дає змогу підвищити кількість життєздатних мікроконідій на 6–8 % та забезпечує життєздатність культур дерматофітів упродовж 2 років за кімнатної температури (патент України № 9617).

Розроблено модифіковане захисне середовище для ліофілізації дерматофітів, яке забезпечує збереженість мікроконідій до 90 % та дозволяє отримувати високоякісну вакцину (патент України № 9637).

**Практичне значення одержаних результатів.** Виділено, селекціоновано та задепоновано виробничі вакцинні (*T. mentagrophytes* "ТМЧ" та *T. verrucosum* "Кн-01") і контрольні вірулентні (*T. mentagrophytes* "ТМЧ-К" та *T. verrucosum* "С-102") штами збудника трихофітії великої рогатої худоби.

Розроблено та затверджено в установленому порядку технологію виготовлення "Вакцини "Триходерм" проти трихофітії великої рогатої худоби бівалентної, живої, сухої, концентрованої" – технічні умови, настанова щодо застосування, інструкція по виготовленню –  
 ТУУ 24.4-19024865 – 002:2005. На Державній Сумській біологічній фабриці освоєно промислове виробництво розробленого препарату.

За результатами досліджень розроблено методичні рекомендації "Лабораторна діагностика дерматомікозів тварин", які затверджені на НМК Державного департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України (протокол № 3 від 20 грудня 2006 року).

Розроблено спосіб довготривалого зберігання штамів збудників дерматомікозів та модифікованого захисного середовища для їх ліофілізації, впровадження яких у практику дасть змогу ефективно зберігати необхідні штами дерматофітів у наукових установах і виробничих умовах.

Отримані результати досліджень упроваджені в лабораторіях ветеринарної медицини, а також використовуються в навчальному процесі студентами напрямку «Ветеринарна медицина» аграрних ВНЗ України IV рівня акредитації в процесі вивчення дисциплін «Мікробіологія», «Вірусологія», «Біотехнологія», «Імунологія».

**Особистий внесок здобувача.** Автор особисто здійснив аналіз літературних даних за темою роботи; теоретично й експериментально обґрунтував наукову концепцію та напрямки роботи; здійснив клініко-епізоотологічні обстеження, мікологічні дослідження, виділив та селекціонував виробничі штами; розробив схеми та методики і здійснив експериментальні дослідження в лабораторних та виробничих умовах; проаналізував та узагальнив одержані результати; сформулював висновки та рекомендації для практики; розробив нормативну документацію на "Вакцину "Триходерм" проти трихофітії великої рогатої худоби бівалентну, живу, суху, концентровану".

Біохімічні дослідження здійснювали спільно із співробітником ННЦ "ІЕКВМ" к.б.н. Романько М.Є. Методичні рекомендації "Лабораторна діагностика дерматомікозів тварин" готували спільно з докторами вет. наук Головком А.М., Ушкаловим В.О., к.вет.н. Литвиновим О.М. Результати цих досліджень відображені в спільних публікаціях і патентах.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на звітних сесіях Вченої ради ДНКІБШМ упродовж 2001–2007 років, на НМК Державного департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України в 2005–2006 роках та на ІІ-му Міжнародному конгресі спеціалістів ветеринарної медицини (м. Київ, 2004 р), Міжнародній науково-практичній конференції "Сучасні аспекти розробки маркетингу і виробництва ветеринарних препаратів" (АР Крим, м. Феодосія, 2004 р.), Міжнародній науково-практичній конференції "Современное состояние и актуальные проблемы обеспечения ветеринарного благополучия животноводства" (АР Крим,   
м. Ялта, 2005 р.), Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальные проблемы ветеринарной медицины в условиях современного животноводства» (г. Минск, 2005 г.), Міжнародній науково-практичній конференції "Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування" (м. Львів, 2005 р.), Міжнародній науковій конференції «Мікробні біотехнології» (м. Одеса, 2006 р.), IV Міжнародному конгресі спеціалістів ветеринарної медицини (м. Київ, 2006 р), V Всеросійському конгресі з медичної мікології «Успехи медицинской микологии» (м. Москва, 2007 р.), Міжнародній конференції «Актуальні проблеми молекулярної діагностики у ветеринарній медицині та біології» (АР Крим, м. Феодосія, 2007 р.), II Міжнародній науково-практичній конференції "Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування" (м. Львів, 2007 р.).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 34 друковані праці, з них один посібник-довідник, одні методичні рекомендації, 8 патентів, 19 (16 одноосібних) статей у фахових виданнях, що затверджені ВАК України, 5 – матеріалів і тез конференцій.

**Структура дисертації.** Дисертація викладена на 272 сторінках друкованого тексту і складається з таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення одержаних результатів, висновки і пропозиції виробництву, список використаної літератури, додатки. Роботу ілюстровано 43 рисунками і 53 таблицями. Список використаних літературних джерел містить 479 найменувань, у тому числі 250 праць зарубіжних авторів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження здійснювали впродовж 2001–2007 років у Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів, лабораторії біохімії ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Сумській і Херсонській державних біологічних фабриках, тваринницьких господарствах різної форми власності Київської, Донецької, Чернігівської, Сумської, Луганської, Харківської, Черкаської, Хмельницької областей та АР Крим. При цьому використовували ретроспективний епізоотологічний аналіз, епізоотологічний експеримент, біологічний експеримент, клінічні, мікологічні, серологічні, біохімічні та статистичні методи досліджень.

Динаміку поширення трихофітії великої рогатої худоби у різних регіонах України вивчали за результатами аналізу й узагальнення звітних матеріалів за формою № 1-Вет, одержаних у Державному департаменті ветеринарної медицини України та Державній центральній лабораторії ветеринарної медицини.

Для з’ясування видового складу збудників трихофітії відбирали патологічний матеріал від тварин з ураженнями шкіри та волосяного покриву. Визначаючи вид дерматофіта, враховували швидкість росту, розмір, структуру колоній, форму ростучого краю колоній, колір, пігментацію зворотнього боку.

Виділення та ідентифікацію культур трихофітонів здійснювали згідно з «Практическим руководством по медицинской микологии» (Кашкин П.Н., Лисин В.В., 1983), «Лабораторной диагностикой грибковых заболеваний» (Лещенко В.М., 1982), «Диагностики грибных болезней (микозов и микотоксикозов) животных» (Саркисов А.Х. и др.,1971). Виділення, культивування та зберігання польових ізолятів і виробничих штамів трихофітонів здійснювали з використанням таких середовищ: бульйон Сабуро, агар Сабуро, модифікований агар Сабуро, сусло-агар, експериментальне середовище ДНКІБШМ, середовища з вуглеводами, а також комерційні сухі середовища для індикації дерматофітів виробництва фірми Hi-Media.

Вивчення культурально-морфологічних і біохімічних властивостей культур трихофітонів визначали за «Практическим руководством по медицинской микологии» (Кашкин П.Н., Лисин В.В., 1983)

Патогенність виділених культур трихофітонів визначали в дослідах на морських свинках масою 250–350 г і телятах віком 1–6 місяців нашкірним методом. Цей метод передбачає нанесення культури гриба на попередньо виголену та скарифіковану поверхню шкіри. Оцінку патогенності культур здійснюють за ступенем важкості клінічного перебігу захворювання.

Для довготривалого зберігання штамів трихофітонів використовували ліофілізовані культури. Підготовку культур до висушування здійснювали як за загальноприйнятими методиками (Зак А.Ф., Успенская А.П., 1960,   
Никитин Е.Е., Звягин И.В., 1971, Никифоров Л.И., 1981), так і за методом, розробленим нами. Культури дерматофітів вирощували на пробірках зі скошеним сусло-агаром упродовж 20–25 діб. Потім в пробірки додавали по   
3–5 см3 стерильного фізіологічного розчину кухонної солі та змивали спори. Доводили концентрацію мікроконідій до 400 х 106 в 1 см3.Суспензію спор трихофітонів асептично змішували в рівних об’ємах із захисним середовищем і фасували по 1 см3 в стерильні пеніцилінові флакони. Як захисні середовища використовували цукрозо-желатинові та цукрозо-желатинові з добавками мікро- і макроелементів.

У дослідах щодо ліофілізації ми використовували сублімаційний апарат LP3 фірми Jouan, у якому після глибокого заморожування за мінус 64 °С впродовж 24 годин здійснюється висушування мікроконідій дерматофітів. Залишкова вологість у висушеній масі становила 2–3 %. Наявність вакууму у флаконах перевіряли за допомогою апарату типу Д’арсанваль. Висушені мікроконідії штамів трихофітонів зберігали за температури 2–4 °С.

Вміст мікроконідій визначали кількісно – шляхом підрахунку в камері Горяєва за розробленою нами формулою. Життєздатність мікроконідій (колонієутворюючі властивості) підраховували шляхом послідовних розведень від 10-1 до 10-5. Із п’ятого розведення по 0,5–1 см3 висівали на чашки Петрі із сусло-агаром та інкубували за температури 26–28 °С. Через 5–7 діб здійснювали підрахунок вирослих колоній.

Визначення профілактичної й терапевтичної доз вакцини здійснювали на кролях з масою тіла 2,5–3 кг і телятах віком 1–6 місяців. Нешкідливість виготовлених зразків вакцини проводили на морських свинках з масою тіла 250–350 г і телятах віком 1–6 місяців загальноприйнятими у ветеринарії методами, використовуючи потрійну імунізуючу дозу (ОІЕ, 2004).

Імуногенну й терапевтичну ефективність виготовлених зразків вакцини вивчали на морських свинках з масою тіла 250–350 г, кролях з масою тіла   
2,5–3 кг, телятах віком 1–6 місяців і молодняку ВРХ від 7 до 18 місяців і старше. Імуногенну ефективність визначали шляхом прямого нашкірного зараження тварин з подальшими дослідженнями за допомогою клінічного та мікологічного методів. Терапевтичну ефективність визначали введенням терапевтичної дози вакцини та контролювали за допомогою клінічного та мікологічного методів досліджень.

Визначення імуногенної ефективності вакцини також здійснювали, використовуючи епізоотологічний експеримент. Для цього щеплене поголів’я великої рогатої худоби вводили у стадо з клінічно хворими тваринами. Прояви захворювання контролювали за допомогою клінічного і мікологічного методів досліджень.

Імунобіологічні зміни після щеплення вакцинами проти трихофітії вивчали в дослідах на кролях з масою тіла 2,5–3 кг і телятах віком 1–6 місяців і старших.

Визначення рівня аглютинінів у сироватці крові щеплених тварин визначали за допомогою реакції аглютинації з виготовленими нами антигенами. Реакцію ставили в планшетах за загальноприйнятою методикою. Антигени виготовляли з культур *T.verrucosum* і *T.mеntagrophytes* шляхом подрібнення грибниці в міксері. Суспензію інактивували формаліном. Отриману суспензію відфільтровували й використовували для постановки РА в кінцевій концентрації 10 МО за стандартом оптичним мікробіологічним ДНКІБШМ (ТУ У 24.4-19024865-660-2002).

Вміст білка в плазмі та сироватці крові визначали за методикою Лоурі в модифікації Міллера (1959), класів імуноглобулінів G та M **–** за методикою радіальної імунодифузії (Manchini G., 1965), активність лізоциму (КФ 3.2.1.17) – турбідиметричним методом за Перрі в модифікації Гранта зі співавторами (1978). Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові здійснювали за методом Ю.А. Гриневича. шляхом осадження білкових комплексів антиген-антитіло ПЕГ – 6000 (1981). Вміст серомукоїдіву пробах сироватки крові щеплених тварин установлювали за методом   
В.В. Меньшикова, (1987).

Комісійні випробування вакцини здійснювали на базі Державної Сумської біологічної фабрики та в господарствах Полтавської, Сумської і Харківської областей.

Одержані результатипіддавали статистичній обробці з використанням методів варіаційної статистики, вірогідність різниці обчислювали за критерієм Т. Стьюдента-Фішера (Урбах, 1964).

Усього в дослідах і випробуваннях ми використали 160 морських свинок, 244 кроля, 1345 голів великої рогатої худоби.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**Вивчення етіологічної структури трихофітії ВРХ та перебіг захворювання.** Згідно з даними ветеринарної статистики, захворювання на трихофітію серед великої рогатої худоби в нашій країні не реєструється, облік дерматомікозів дрібних свійських тварин здійснюється лише в місті Києві. Наші дослідження свідчать, що випадки стригучого лишаю у великої рогатої худоби України спостерігаються в господарствах багатьох областей.

Під час обстеження 24855 голів великої рогатої худоби всіх вікових груп у 29 господарствах 9 областей України ми виявили 903 голови клінічно хворих тварин, переважно молодняку, мікологічно дослідили зразки патологічного матеріалу (зіскрібки шкіри та уражене волосся) від 293 голів (табл. 1). Обстеженню піддавали господарства, в яких за даними анамнезу реєстрували захворювання, за клінічними ознаками схожі на трихофітію.

*Таблиця 1*

**Результати клінічного та мікологічного обстеження ВРХ**

**у господарствах України**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Область** | **Кількість госпо-**  **дарств** | **Обстеже-но**  **поголів'я**  **(голів)** | **Виявлено**  **клінічно**  **хворих (гол/%)** | **Кількість дослідже-них проб** | **Виявлено мікроскопічно**  **позитивних**  **проб** | **Виділено культур** | |
| ***T. verru-***  ***cosum*** | ***T.menta-***  ***grophytes*** |
| АР Крим | 4 | 1840 | 52/2,8 | 34 | 16 | 15 | - |
| Київська | 3 | 1725 | 54/3,1 | 30 | 17 | 15 | - |
| Донецька | 1 | 1640 | 160/9,8 | 15 | 12 | - | 10 |
| Луганська | 3 | 2120 | 79/3,7 | 30 | 13 | 5 | 8 |
| Сумська | 3 | 3170 | 145/4,6 | 33 | 17 | 18\* | 14\* |
| Харківська | 3 | 1485 | 104/7 | 33 | 12 | 13 | - |
| Хмельницька | 4 | 4935 | 92/1,8 | 46 | 14 | 17 | - |
| Черкаська | 4 | 3710 | 117/3,2 | 34 | 19 | 12\* | 8\* |
| Чернігівська | 4 | 4230 | 100/2,4 | 38 | 26 | 16 | - |
| Всього | 29 | 24855 | 903 | 293 | 143 | 107 | 40 |

Позначення: - = культура не виділена; \* = виділено два види збудників.

У кожній з 9 областей проводили обстеження 3–4 господарств з поголів’ям великої рогатої худоби від 80 до 2000 голів.

Під час мікологічного дослідження ми виділили і дослідили 147 культур трихофітонів. Установлено, що перебіг трихофітії великої рогатої худоби виявлявся як ензоотії на молочно-товарних фермах і фермах з відгодівлі тварин.

У обстежених господарствах клінічні ознаки трихофітії реєстрували протягом усього року, однак найбільше хворих тварин виявляли у зимово-весняний період, особливо в лютому – квітні. Захворювання спостерігали переважно в телят віком 2–6 місяців (84,0 %). Найменше тварин хворіло у віці до 2-х місяців і старше від 2-х років. Впливу статі або породи на рівень захворюваності великої рогатої худоби на трихофітію не встановлено.

Ми відзначили, що клінічні ознаки трихофітії великої рогатої худоби виникали навіть у тварин після щеплення живими вакцинами ЛТФ-130 і "Триховак" у рекомендованих дозах. Поширенню захворювання сприяли порушення санітарно-гігієнічних норм утримання тварин і порядку здійснення профілактичних заходів щодо даного захворювання: скупчене утримання тварин особливо в сирих, забруднених і погано вентильованих приміщеннях, несвоєчасне здійснення очищення, дезінфекції й дератизації приміщень, порушення термінів щеплення, утримання хворих і перехворілих тварин зі здоровими (щепленими), а також неповноцінна й однорідна годівля тварин.

Улітку, на вигульному утриманні телят, під впливом сонячного опромінення та гарного зеленого корму захворювання на трихофітію спонтанно припинялося.

У господарствах, де ураження поголів'я сягало 8–10 % і більше телята починали хворіти з 1,5–2 місячного віку, і самоодужання наставало у віці   
6–7 місяців у літній період. Профілактичні щеплення вакцинами ЛТФ-130 виробництва Ставропольської біофабрики, "Триховак" виробництва Новогалещинської біофабрики, "Триховак" виробництва Сумської біофабрики у рекомендованих дозах не були достатньо ефективними. Використання цих препаратів з терапевтичною метою також було неефективним.

Наведені дані свідчать, що захворювання на трихофітію великої рогатої худоби має місце в тваринницьких господарствах різних регіонів України і реєструється впродовж усього року, але частіше в зимово-весняний період, переважно в телят віком 2–6 місяців. Сприятливими факторами виникнення трихофітії були порушення санітарно-гігієнічних норм утримання тварин і ветеринарно-санітарних правил.

Клінічні ознаки захворювання були більш детально вивчені на 207 телятах до 9-місячного віку й 18 тваринах, старших за 2 роки. Інкубаційний період захворювання, за нашими спостереженнями, сягав 12–25 діб, що чітко виявлялося за спільного утримання хворих і здорових телят. Під час вивчення клінічних ознак хворої на трихофітію великої рогатої худоби виявлено десиміновану, плямисту й стерту (атипову) форми. Найбільше поширення мала плямиста форма хвороби – 69,6 % від обстежених тварин. При цьому на шкірі в різних ділянках тіла спостерігали плями діаметром   
1–3 см і більші, покриті сіро-білими лусочками зі скуйовдженим волоссям або азбестоподібними жовтими струпами. Плями збільшувалися повільно, нерідко спостерігалося спонтанне одужання, що починалося із центру осередку ураження. У більшості тварин у першій стадії хвороби й під час загоєння спостерігалася сверблячка. Волосся на уражених ділянках було обламане та легко висмикувалося.

Десимінована форма трихофітії реєструвалася в 17,7 % випадків. Захворювання характеризувалося тривалим перебігом з охопленням великих ділянок шкіри й різко вираженими запальними процесами. Часто на уражених ділянках шкіри формувалися товсті кірки із засохлого ексудату у вигляді сухого тіста. У разі натискання з-під кірок виділявся гнійний ексудат, а в разі їхнього видалення відкривалася поверхня шкіри, вкрита гнійними виразками. Десиміновану форму реєстрували тільки в молодняку, найчастіше за незадовільних умов утримання й годівлі.

У дорослих тварин (2,7 %), а також у значної кількості телят (10 %) захворювання характеризувалося появою великих плям, що лупляться, зі слабко вираженою запальною реакцією. Це характерно для стертої (атипової) форми хвороби. У разі видалення лусочок залишалася гладка поверхня шкіри.

##### *Здійснений аналіз ступеня ураженості свідчив, що найбільше тварин траплялося з 6–15 осередками ураження – 65,8 %. Тяжкий ступінь ураження (понад 15 вогнищ) спостерігався в 12,0 % хворих тварин. Слабкий (1–5 вогнищ) – у 22,2 % тварин.*

##### *Найчастіше місця ураження виявляли на голові – 42,8 %; шиї – 18,8 %; лопатках – 8,8 %; спині й грудях – 9,6 %; хрестці – 7,1 %; крупі та корені хвоста – 11,4 %; кінцівках – 1,5 %. У більшості тварин осередки ураження траплялися одночасно в різних ділянках тіла. У дорослої великої рогатої худоби осередки ураження здебільшого локалізувалися на тулубі з боків грудної клітини й на крупі.*

##### *Отже, перебіг трихофітії великої рогатої худоби в тваринницьких господарствах України мав різні клінічні прояви. Особливістю захворювання було охоплення до 10 % поголів'я тварин, частіше на окремих фермах клінічно хворіли від 6 до 20 тварин; збільшення кількості тварин з атиповою формою перебігу захворювання (до 10 %), а також те, що здійснення профілактичних щеплень вакцинами ЛТФ-130 і «Триховак» без інших оздоровчих заходів не завжди попереджувало захворювання тварин, а використання цих препаратів з терапевтичною метою без інших оздоровчих заходів не завжди було ефективним.*

**Удосконалення лабораторної діагностики дерматомікозів тварин.** Під час клініко-епізоотологічного обстеження поголів’я великої рогатої худоби в різних регіонах країни було виявлено 903 хворих на трихофітію тварини. Досліджуючи 293 зразки патологічного матеріалу, відібраного від цих тварин, ми виділили 147 культур трихофітонів.

З досліджених зразків матеріалу було виділено 107 культур *Trichophyton verrucosum* і40 культур *Trichophyton mentagrophytes.* Культуру *Trichophyton mentagrophytes* у чистому вигляді було виділено від хворих тварин у 4 господарствах, що становило 13,8 % від числа обстежених. Ще в трьох господарствах було виявлено змішаний перебіг захворювання на трихофітію, спричинений *Trichophyton verrucosum* і *Trichophyton mentagrophytes* одночасно (10,3 %). В інших господарствах від хворих тварин виділяли *Trichophyton verrucosum* (75,9 %). Під час проведення мікологічних досліджень виявилася низка проблем (постійна сильна контамінація бактеріальною мікрофлорою й пліснявими грибами, стерильність посівів після обробки матеріалу спиртом тощо), які не давали змоги в більшій кількості виділяти чисті культури трихофітонів та збільшували терміни дослідження матеріалу, що свідчило про недосконалість лабораторної діагностики дерматомікозів.

За первинного висіву матеріалу, як правило, не вдається виділити чисту культуру збудника. Висів патологічного матеріалу на середовище Сабуро з   
5 % дріжджового екстракту та 0,5 мг/дм3 циклогексиміду (актидіону) забезпечував виділення культури збудника трихофітії впродовж   
7–10 діб. Якщо первинний ріст дерматофітів був контамінований бактеріальною мікрофлорою, то матеріал висівали на середовища з антибактеріальними препаратами, зокрема гентаміцином (0,1 г/дм3) і хлорамфеніколом (0,5 г/дм3). Якщо виявляли змішану культуру дерматофітів – проводили висіви суміші, розведеної в рідкому середовищі Сабуро, дрібно на 2–3 чашки з агаром Сабуро з дріжджовим екстрактом. Після отримання чистої культури визначали вид збудника.

Результати здійснених досліджень свідчать, що традиційним методом (Саркисов А.Х и соавт., 1971) культури трихофітонів виділили у 21 % випадків, а удосконаленим нами методом – у 58 %. При цьому строк виділення культур *T. verrucosum* за модифікованою методикою скоротився вдвічі. Строк виділення *T. mentagrophytes* був однаковим під час роботи за обома методиками. Таким чином, модифікована методика має суттєві переваги й за простотою виконання не поступається традиційній.

**Вивчення біологічних властивостей та селекція епізоотичних штамів трихофітонів.** Для виділення та вивчення культур збудників трихофітії використовували агар Сабуро в зазначених вище модифікаціях, сусло-агар, експериментальне середовище ДНКІБШМ.

У процесі роботи з культурами й пересівів на поживних середовищах ми визначали швидкість росту, морфологію колоній, ступінь дисоціації культури, кількість мікроконідій та інших спор, характер росту міцелію. За висновками А.Х. Саркісова і співавт. (1972) головною ознакою для виробничих штамів є продукція мікроконідій (айлерій). Тому передусім ми звертали увагу на цей показник.

У виділених нами первинних ізолятах невелика кількість культур   
(10–15 %) активно продукували мікроконідії. Такі культури ми й залишали для подальшої роботи. Ми відхиляли від подальшого дослідження культури з великим відсотком дисоціації в популяції, з тенденцією до плеоморфного переродження й зменшення продукування мікроконідій при пересівах на поживних середовищах, або швидкого старіння культур (поява великої кількості хламідоспор, артроспор у молодих культурах після 5–7 пасажів). Після такої первинної селекції виділених культур у нашій колекції залишилося 10 перспективних культур для селекції виробничих штамів, з якими в подальшому й здійснювалася робота.

Вивчення біологічних властивостей відібраних нами культур засвідчило, що штами *Trichophyton verrucosum* за культурально-морфологічними ознаками можна поділити на декілька груп. Слід зазначити, що лише штам С-102 відповідав класичним ознакам *Trichophyton verrucosum,* тобто характеризувався повільним ростом (7–15 діб), був бугристим, з гладким і рівним краєм, субстратним міцелієм. Інші культури трихофітонів росли більш швидко, давали ріст на 5–7 доби та відрізнялись одна від однієї за морфологією й кольором колоній. У той же час усі вони мали характерний для виду міцелій і продукували велику кількість овальних, грушовидних, округлих мікроконідій. Виділені культури *Trichophyton mentagrophytes* утворювали колонії, які можна було поділити на два типи. Колонії першого типу мали жовто-коричневий колір, зернисто-гранулярну поверхню, зірчастий ростучий край, давали інтенсивний жовто-коричневий пігмент на зворотному боці. Колонії другого типу мали гіпсовидно-мучнисту поверхню біло-бежевого кольору з рівним ростучим краєм. Культури обох типів утворювали велику кількість округлих мікроконідій, окремі сигароподібні макроконідії та мали спіралевидні закінчення гіф.Ці якості зберігалисьупродовж 7 і більше послідовних пасажів.

Вважається, що гриби не досить активні до асиміляції вуглеводів (Кашкин П.Н., Лисин В.В, 1983, Лещенко В.М., 1982). Вивчення біохімічних властивостей виділених нами культур засвідчило, що прояв біохімічних реакцій наставав через 8–12 діб інкубування, а інколи – через 14–16 діб. Усі виділені культури асимілювали глюкозу з утворенням кислоти, майже всі (за винятком 333/1) асимілювали дульцит. Деякі культури були активними відносно манніту та мальтози. Всі виділені культури асимілювали глюкозу з утворенням кислоти, майже всі (за винятком 333/1 і 49) асимілювали дульцит. Культури Кн-01, 703, 49, Х-03, 333/1 були активними по відношенню до манніту, а 703, СБ, 49 – мальтози. Культури *T. mentagrophytes* ТМЧ, 333/1 давали позитивну реакцію на фосфатазу, аргініндегідрогеназу, розщеплювали сечовину. Культури С-102 і С-202 були найбільш інертними і розщеплювали лише два вуглеводи (глюкозу і дульцит). В окрему групу також можна виділити культури КН-01, 703 та ТМЧ, які були біохімічно активнішими від інших культур і асимілювали одні і ті ж вуглеводи – глюкозу, лактозу, дульцит, манніт.

Для вивчення здатності відібраних культур продукувати мікроконідії та з метою підвищення її активності на поживних середовищах ми використовували методику, запропоновану Н.П. Головіною (1984) з нашою модифікацією. У попередніх дослідах ми встановили, що використання модифікованого сусло-агару (Головко А. і співавт., 2004) для вирощування й селекції трихофітонів за показником «спороутворення» є більш перспективним, ніж загальноприйнятий сусло-агар. Тому в селекційній роботі ми використали модифікований сусло-агар. Результати селекції культур трихофітонів подані в таблиці 2.

Дані, наведені в таблиці 2, свідчать, що в процесі адаптації до модифікованого поживного середовища продуктивність селекціонованих штамів збільшилася майже вдвічі. Отримані результати дали підставу відібрати як виробничі культури *T. verrucosum*Кн-01 та 703,   
*T. mentagrophytes* ТМЧ та 333/1. Культури, які дають накопичення мікроконідій 8 х 106 /см3 і більше за використання даного методу, мають промислову перспективу (Головина Н.П., 1984).

*Таблиця 2*

**Результати селекції штамів трихофітонів за показником**

**спороутворення (M±m; n=6)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ступінь селекції** | **Накопичення мікроконідій у штамів (млн/см3)** | | | | | | | |
| **С-102** | **С-202** | **703** | **СБ** | **СВ** | **49** | **ТМЧ** | **333/1** |
| Неселекці-онована  культура | **3,2±0,54\*** | **3,3±0,21** | **4,6±0,35** | **4,2±0,15** | **5.1±0,34** | **3,8±0,33** | **4.8±0,29** | **4,5±0,36** |
| 1-й ступінь відбору | **3,6±0,33** | **3,6±0,85\*** | **5,5±0,39** | **5,0±0,77** | **7,6±0,13** | **4,4±0,7\*** | **6,0±0,25** | **5,3±0,33** |
| 2-й ступінь відбору | **4,0±0,72** | **4,0±0,51** | **6,4±0,75** | **6,2±1,45\*** | **8,4±0,6** | **5,3±0,56** | **6,9±0,75** | **6,4±1,02\*** |
| 3-й ступінь відбору | **4,2±0,34** | **4,4±1.02** | **7,4±0,62** | **7,0±0,33** | **8,9±0,25** | **6,0±025** | **7,7±0,63** | **7,2±0,42** |
| 4-й ступінь відбору | **4,4±0,9\*** | **4,6±o,54** | **8,2±1,12** | **7,7±0,29** | **9,8±1,64\*** | **6,6±0,5** | **8,6±0,27** | **8,0±0,46** |

Примітка: Р < 0,001; \* = 0,01 < Р < 0,001

За основним показником – кількістю продукції мікроконідій – названі культури нас задовольняли. Ураховуючи їхні позитивні культурально-морфологічні показники, стійкість до плеоморфного переродження, ми залишили їх як основні (Кн-01, ТМЧ) та резервні (703, 333/1) виробничі штами збудника трихофітії великої рогатої худоби.

Під час постійної роботи з культурами було відзначено, що штам ТМЧ мав колонії, що різнилися між собою за кольором і структурою. Невелика кількість колоній (приблизно 10–15 %) мала більш темний кремовий відтінок і більш щільну структуру з невеликою кількістю повітряного міцелію. До того ж ці колонії мали борошнистість. Ми маркували ці колонії як «ТМЧ-К» і в подальшому досліджували їх як окремі клони штаму ТМЧ. У дослідах на лабораторних тваринах клон ТМЧ-К виявився патогенним. Ми здійснили цілеспрямоване підвищення його вірулентності для тварин шляхом проведення 10 пасажів на морських свинках. Клінічно здорових тварин послідовно заражали патологічним матеріалом від хворої тварини, втираючи струп у скарифіковану поверхню її шкіри. Так нам вдалося отримати стабільний результат з характерними клінічними проявами трихофітії тяжкого ступеня ураження у морських свинок. Отриманий результат нас задовольнив і в подальшому штам ТМЧ-К ми використовували як контрольний вірулентний для експериментального зараження щеплених тварин.

У такий же спосіб ми підвищили патогенність культур С-102 та С-202, які в подальшому ми використали для контрольного зараження щеплених тварин. Імуногенність вакцин проти дерматомікозів тварин визначають шляхом прямого зараження. Для цього необхідно мати штами із стабільними патогенними властивостями, які після нашкірного зараження призводять до клінічно вираженого перебігу захворювання в тварин.

**Визначення оптимальної заражаючої дози** ми здійснювали на кролях і телятах. Для цього використовували нашкірний метод зараження. 18–20 добові культури трихофітонів у дозах від 102 до 2,5 х 106 мікроконідій на   
1 см2 шкіри наносили на скарифіковані ділянки. У досліді використовували відібрані нами виробничі (Кн-01, ТМЧ) та контрольні (С-102, ТМЧ-К) штами трихофітонів, а також вакцинний штам ЛТФ-130.

Отримані результати свідчать, що заражаюча доза 102 мікроконідій на   
1 см2 шкіри виражених клінічних проявів захворювання у кролів не спричиняла. Зараження в дозі 104 мікроконідій на 1 см2 шкіри викликало незначне утворення лупи на 13–16 доби в тварин, заражених штамами С-102 та ТМЧ-К, яка до кінця спостереження (30 діб) зникала. Під час мікроскопічного і культурального досліджень патологічного матеріалу збудника трихофітії не було виявлено. Зараження кролів у дозі 106 мікроконідій на 1 см2 шкіри викликало утворення лупи в тварин, заражених штамами ЛТФ-130, Кн-01 та ТМЧ, яка до кінця спостереження зникала. Під час мікроскопічного і культурального досліджень зіскрібків шкіри збудника трихофітії також не було виявлено. У тварин, заражених штамами С-102 та ТМЧ-К, захворювання починалося з утворення лупи на 10 добу та появи кірочок і струпів на 13–22 доби. До кінця досліду спостерігали лупу й почервоніння шкіри в місцях зараження. У період появи струпів і кірок діагноз на трихофітію вдавалося підтвердити мікроскопічно та культурально.

Зараження кролів у дозі 2,5 х 106 мікроконідій на 1 см2 шкіри викликало появу кірочок і струпів різного ступеня тяжкості за використання всіх штамів. Різниця в клінічних проявах полягала в тому, що кірочки та струпи в кролів, заражених вакцинними штамами ЛТФ-130,  
 Кн-01 та ТМЧ, були тонкими й «легкими», самі відпадали після 22 доби, і до кінця спостереження місця зараження загоювались і з’являлося нове волосся. Після зараження штамами С-102 та ТМЧ-К перебіг захворювання був тяжким: утворювалися масивні струпи й кірки, з-під яких виділявся гній. До кінця спостереження клінічна картина не змінювалася, тому тварин, заражених цими штамами, піддавали лікуванню за допомогою вакцини. Захворювання за цієї інфікуючої дози підтверджувалось мікроскопічними й культуральними дослідженнями.

Клінічні прояви трихофітії в телят були аналогічними. Лише зараження тварин у максимальній дозі 2,5 х 106 мікроконідій на 1 см2 шкіри викликало появу зливних мікотичних уражень у вигляді кірочок і струпів різного ступеня тяжкості за використання всіх штамів. Різниця в клінічних проявах була в тому, що кірочки й струпи в місцях інокуляції вакцинних штамів   
ЛТФ-130, Кн-01 та ТМЧ, були тонкими й «легкими», самі відпадали після 30–35 доби, і до кінця спостереження (40 діб) в місцях інокуляції запалення зникало. Після зараження контрольними штамами С-102 та ТМЧ-К перебіг захворювання був тяжким: утворювалися зливні мікотичні ураження, місце інокуляції повністю покривалося товстими струпами. До кінця спостереження клінічна картина не змінювалася, тому тварин, заражених цими штамами, лікували за допомогою вакцини. Захворювання за цієї дози зараження підтверджувалося мікроскопічними й культуральними дослідженнями.

Отже, для вищезазначених штамів оптимальною дозою, що давала яскраву клінічну картину захворювання на трихофітію більше 30 діб у лабораторних тварин і більше 40 діб у телят, була доза 2,5 х 106 мікроконідій на 1 см2 шкіри. Цю дозу ми й використовували в подальшому для визначення патогенності штамів та імуногенності вакцини.

Вивчення патогенних властивостей виділених нами штамів трихофітонів здійснювали на морських свинках і телятах, заражаючи їх у визначеній дозі 2,5 х 106 мікроконідій на 1 см2 шкіри. У результаті проведених досліджень установлено, що штами Кн-01, ТМЧ, ЛТФ 130 були слабко патогенними, хоча й викликали клінічні прояви захворювання. Штами С-102, С-202, ТМЧ-К спричиняли яскраву клінічну картину захворювання з тяжким перебігом. Штами СБ і Х-03 спричиняли захворювання середнього ступеня тяжкості. Від морських свинок, заражених культурами Кн-01, ТМЧ, ЛТФ–130, мікологічне підтвердження ефективності зараження спостерігали лише на піці (12–16 доба) захворювання. У той же час від морських свинок, заражених культурами С-102, С-202, ТМЧ-К, мікологічне підтвердження зараження реєстрували до кінця спостереження (33 доба), за винятком деяких тварин. Результати дослідження морських свинок, заражених культурами СБ і Х-03, наявні між названими групами культур.

Аналогічні результати ми отримали й на телятах. Вакцинні штами   
Кн-01, ТМЧ, ЛТФ-130 були слабко патогенними, хоча й викликали клінічні прояви захворювання. З 12–30 діб після інфікування утворювалися тонкі кірки й лупа, які спостерігалися до 24–70 діб, після чого самі відпадали, а місця зараження заростали волоссям. Контрольні штами С-102 і ТМЧ-К викликали клінічні прояви захворювання у вигляді кірочок і лупи з 12 доби. З 24–30 діб кірочки потовщувалися, утворювалися струпи завтовшки до   
0,5 см, що покрили зрештою все місце інокуляції. З 67–71 діб клінічна картина хвороби зникала, струпи відшаровувалися й починався ріст нового волосся. Мікологічними дослідженнями встановлено, що з місць інокуляції штамів С-102 і ТМЧ-К вихідну культуру ізолювали до 58–79 діб за позитивних даних мікроскопії, штаму ТМЧ – також до 23–79 діб, але мікроскопічне підтвердження було лише до 36 доби. Штам ЛТФ-130 виділяли до 14–79 діб, але не постійно. А штам Кн-01 виділити не вдалося.

Таким чином, на підставі отриманих результатів вивчення біологічних властивостей та враховуючи здатність до адаптації й продукування мікроконідій на поживних середовищах, ми вирішили використати культури Кн-01 і ТМЧ як виробничі вакцинні штами, а культури С-102, С-202 і ТМЧ-К як контрольні вірулентні.

**Удосконалення системи збереження та підтримання виробничих вакцинних і контрольних вірулентних штамів трихофітонів.** Найпоширенішим способом збереження грибів є періодичні пересіви на свіжі поживні середовища. Однак використання цього методу часто спричиняє значні зміни культурально-морфологічних і біологічних властивостей грибів. Залежно від біологічних особливостей штамів, їхньої життєстійкості й стійкості до плеоморфної та фавіформної дегенерацій, пересіви здійснюють один раз на 2–4 місяці та зберігають культури в пробірках, що закриті гумовими корками за температури 4–8 °С. Такий спосіб дуже трудомісткий, крім того, після чотирьох–п'яти пасажів штами дисоціюють, знижують свою біологічну активність.

Одним з найсучасніших методів збереження мікроорганізмів є висушування. Якість висушеного біологічного матеріалу та термін його придатності значною мірою залежить від захисного середовища. Для висушування грибкових вакцин рекомендують використовувати сахарозо-желатинове захисне середовище з вмістом 10 % сахарози і 2 % желатини в кінцевому продукті (Никифоров Л.И., 1984). Методи довготривалого зберігання грибів дерматофітів **з** відповідними біологічними властивостями в науковій літературі не описані. Ми здійснили серію дослідів для підбору оптимального захисного середовища для довготривалого зберігання трихофітонів. У результаті проведених досліджень було підібрано захисне середовище з вмістом 20 % водного розчину сахарози, 4 % желатини, 1 % пептону та мікродозами мікро- і макроелементів, яке за змішування в рівних пропорціях (1:1) із суспензією мікроконідій забезпечувало в процесі ліофілізації високе їх збереження (до 90 %). За результатами проведеної роботи було отримано патент України № UA 9637 U.

З використанням даного середовища ми розробили систему довготривалого збереження дерматофітів. Основними моментами цієї системи є вирощування штамів у напіврідких поживних середовищах, збирання всього урожаю міцелію, що містить різні види спор (макроконідії, мікроконідії, артроспори, хламідоспори тощо), внесення міцелію в захисне середовище з подальшою ліофілізацією та відновлення штамів рідким середовищем Сабуро. На даний спосіб отримано патент України   
№ UA 9617 U. Порівняльна оцінка запропонованого й відомого способів збереження трихофітонів подана в таблиці 3.

*Таблиця 3*

**Порівняльна оцінка способів збереження трихофітонів (M±m; n=6)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Метод збереження** | **Позначення культури** | **Кількість мікроконідій в матеріалі до сушки (106/см3)** | **Кількість живих мікроконідій (%)** | |
| **До сушки** | **Після сушки** |
| Ліофілізація мікроконідій (відомий) | Кн-01 | 400±22,9 | 93±10,8 | 85±7,2 |
| ТМЧ | 390±17,08 | 92±7,3 | 82±4,5 |
| С-102 | 393±24,5 | 91±12,6 | 83±12,7 \* |
| ТМЧ-К | 397±16,9 | 91±5,9 | 84±6,3 |
| Х-03 | 388±20,3 | 90±3,6 | 80±11,9 \* |
| Ліофілізація грибниці (запропонований) | Кн-01 | 400±17,4 | 96±14,1 \* | 93±7,6 |
| ТМЧ | 390±26,8 | 95±6,3 | 94±5,4 |
| С-102 | 393±15,3 | 94±10,5 | 93±8,1 |
| ТМЧ-К | 397±27,6 | 94±16,2 \* | 93±14,5 \* |
| Х-03 | 388±18,7 | 95±9,8 | 91±7,5 |

Примітка: Р < 0,001; \* = 0,01 < P < 0,001

Отримані нами результати свідчать, що ліофілізація грибниці дерматофітів у цілому забезпечує підвищення кількості життєздатних мікроконідій на 6–8 % (різниця вірогідна за 0,01 < P < 0,001 порівняно із життєздатністю до сушки). Наші подальші спостереження засвідчили, що культури трихофітонів отримані після відновлення ліофілізованих культур запропонованим методом, давали більш щільну грибницю й більші за розміром колонії порівняно з культурами, отриманими після відновлення за відомою методикою.

Дослідження життєздатності культур дерматофітів здійснювали одразу після ліофілізації, через 6 місяців, 1 та 2 роки їхнього зберігання за температури 20±2 °С. Усі досліджені ліофілізовані препарати були життєздатними. У той же час простежується явна тенденція впливу умов відновлення життєздатності на швидкість проростання культур. Для всіх зразків проростання культур, розведених фізіологічним розчином, починалося на 7–10-у доби, а при розчиненні рідким середовищем Сабуро – на 3–4 доби раніше.

Отже, розроблений спосіб довготривалого зберігання культур грибів дерматофітів мав протективні властивості, і ліофілізовані штами зберігали свою життєздатність упродовж 2 років зберігання за температури 20±2 °С (термін спостереження).

Таким чином, система довготривалого зберігання культур дерматофітів з максимальним збереженням їхніх біологічних властивостей містить пасажування культури гриба на збагаченому поживному середовищі, вирощування гриба в НРА, знімання всієї грибниці з НРА, її просочування якісним захисним середовищем упродовж 24 годин, ліофілізацію підготовленої культури, відновлення культури перед використанням за допомогою рідкого середовища Сабуро.

**Визначення оптимальних умов та термінів культивування штамів трихофітонів для максимального накопичення мікроконідій.** В дослідахвикористали штами *Trichophyton verrucosum* „Кн-01” та *Trichophyton mentagrophytes* «ТМЧ». За основу взяли методику підрахунку, описану   
Л.І. Нікіфоровим (1984). Культури трихофітонів вирощували на чашках Петрі із сусло-агаром за загальноприйнятою методикою . Через кожні 5 діб, починаючи з 5-ї, готували зразки вакцини. Стандартизацію мікросерій вакцини здійснювали шляхом підрахунку мікроконідій в камері Горяєва. Ураховуючи неоднаковий ступінь утворення мікроконідій у різні фази росту, висушування здійснювали з однаковим вмістом мікроконідій   
185±4,9 х 106 /см3. Після висушування робили підрахунок живих мікроконідій шляхом висіву на сусло-агарове середовище десятиразових розведень вакцини.

Проведені досліди засвідчили, що починаючи з 2–3-ї діб для *Trichophyton mentagrophytes* і 5–7 діб для *Trichophyton verrucosum* спостерігали швидке формування міцелію й утворення мікроконідій. З 5 по 15 і з 10 по 20 доби відповідно спостерігали інтенсивне зростання спороношення, яке з 20 по 35 доби досягало найвищого рівня. Потім наставала стабілізація, і в подальшому кількість мікроконідій практично не збільшувалася. Зате помітні зміни спостерігали в їх життєздатності після ліофілізації. Вона значно різнилась у різні періоди розвитку культур вакцинних штамів. Життєздатність мікроконідій у фазі логарифмічного росту (5–10 доби) була нижчою – 36–78 %, ніж в період найбільшого спороутворення (15–25 доба), де вона досягала 91–96 %. Після 25 доби спостерігали її помітне зниження, і на 30 добу вона була в межах 87 %, на 35–79 %, на 40–73 % і на 50 добу – тільки 51 %. Різниця значень наведених показників вірогідна за Р < 0,001; \* = 0,01 < P < 0,001 відносно значень відповідних показників до висушування. Це пов’язано з тим, що, незважаючи на збільшення накопичення біомаси культури гриба, іде процес старіння культури, яке, зокрема, виявляється в більш інтенсивній зміні кольору грибниці та появі на її поверхні ділянок росту вторинного міцелію, окремих хламідоспор. Отримані результати подані в таблиці 4.

*Таблиця 4*

**Життєздатність мікроконідій після ліофілізації**

**залежно від віку культури (%) (M±m; n=6)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Культура** | **Терміни вирощування (діб)** | | | | | | | | | |
| 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
| ***T.verruc.*** | **45,9±2,5** | **80±3,1** | **93±4,0** | **94±8,5** | **96±10,4\*** | **90±13,8** | **85±7,5** | **78±5,3** | **67±2,5** | **55±4,2** |
| ***T.ment.*** | **45±2,8** | **78±2,9** | **91±5,9** | **92±4,2** | **95±3,6** | **85±3,0** | **78±6,2** | **73±8,7** | **61±9,8\*** | **51±2,7** |

З’ясувавши, що мікроконідії 15–25 добових культур *Trichophyton verrucosum* Кн-01 та *Trichophyton mentagrophytes* ТМЧ найбільш стійкі до висушування, ми визначали їхню оптимальну концентрацію в суспензії для ліофілізації. Кількість живих мікроконідій після сушки визначали шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць у 1 см3 суспензії (табл. 5).

Наведені дані свідчать, що під час висушування краще зберігалися мікроконідії в концентрації 200–600 х 106 в одному мілілітрі. За цих умов збереженість мікроконідій сягала 84–95 %. Зменшення вмісту мікроконідій у суспензії до 100 клітин знижувало їхню життєздатність (75–80 %). Збільшення концентрації до 700 – 800 х 106 /см3 мікроконідій призводило до часткової загибелі спор. Їхня кількість сягала відповідно 72–75 % і   
57–60 %. Подальше збільшення концентрації спор у суспензії призводило до загибелі значної кількості спор – 50 % і більше. Різниця значень наведених показників вірогідна за Р < 0,001; \* = 0,01 < P < 0,001 відносно значень відповідних показників до висушування.

*Таблиця 5*

**Вплив концентрації мікроконідій в суспензії на їх**

**життєздатність після ліофілізації (M±m; n=6)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Штами** | **Життєздатність мікроконідій (%) при різній концентрації (106/см3)** | | | | | | | | |
| **100** | **200** | **300** | **400** | **500** | **600** | **700** | **800** | **1000** |
| ***T.mentagr.*** | **80±5,6** | **84±6,9\*** | **88±12,8** | **93±7,5** | **94±5,3** | **94±7,9** | **80±6,3** | **55±4,2** | **50±7,8** |
| ***T.verrucos.*** | **84±7,3** | **86±3,2** | **90±9,3** | **95±7,8** | **95±8,4** | **95±4,8\*** | **80±7,5** | **60±3,6** | **56±4,2** |

На підставі одержаних даних визначено, що для виготовлення сухої, живої, бівалентної вакцини оптимальна концентрація мікроконідій у суспензії для сушки повинна бути в межах 200–600 х 106 /см3. У цих межах життєздатність після висушування зберігали 84–95 % мікроконідій.

**Розробка технології виготовлення живої концентрованої ліофілізованої вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби.**

Принципова схема виготовлення лабораторних зразків вакцини має такі етапи:

1. Підготовка поживного середовища й лабораторного посуду.

2. Роздільний висів вакцинних штамів та їх інкубація.

3. Роздільне знімання грибниці.

4. Роздільна гомогенізація грибної маси та її стандартизація.

5. Підготовка захисного середовища

6. Об’єднання гомогенатів культур між собою та захисним середовищем.

7. Фасування вакцини.

8. Ліофілізація вакцини.

9. Укупорка та маркування.

10. Контролювання вакцини згідно з показниками ТУ У.

Використовуючи таку схему, ми виготовили 3 експериментальні серії вакцини для досліджень.

З цією метою, після перевірки біологічних властивостей, використовували селекціоновані високоспороносні штами Кн-01 і ТМЧ. Для цього культури трихофітонів засівали на матраци з твердим поживним середовищем ДНКІБШМ або сусло-агаром, використовуючи по 2 матраци на штам. Культури інкубували за 26±1 °С впродовж 18–21 доби за обов’язкового періодичного контролювання росту культур кожні 3–5 діб. На 21 добу, якщо ріст на матрацах був характерним для культур і контамінації бактеріальною чи грибковою мікрофлорою не спостерігали, асептично знімали верхній шар культури та переносили його в стерильну скляну банку. Кожну культуру знімали в окремий посуд. Потім зняту культуру переносили в стерильний міксер, додавали 300 см3 стерильного розчину гіпохлориту натрію або фізіологічного розчину та гомогенізували. Гомогенізацію кожного штаму здійснювали окремо. Отриману суспензію фільтрували через ватно-марлевий фільтр у окрему тару. Отриманий гомогенат перевіряли на відсутність бактеріальної й грибкової контамінацій за загальноприйнятими методиками, а також визначали концентрацію мікроконідій у камері Горяєва. Впродовж 5 діб контамінації сторонньою мікрофлорою не було виявлено, спостерігався типовий ріст трихофітонів. Під час підрахунку концентрації мікроконідій у камері Горяєва встановлено, що вона сягала 188±20,3 х 106/см3.. Далі гомогенати асептично об’єднували в одну ємкість і розводили гіпохлоритом натрію з таким розрахунком, щоб після додавання захисного середовища концентрація мікроконідій у 1 см3 була в межах 30–60 х 106.. Отриманий гомогенат за постійного перемішування фасували в стерильні флакони по 2 см3 і висушували.

Отриману вакцину перевіряли на відсутність бактеріальної й грибкової контамінацій, нешкідливість і концентрацію мікроконідій і живих мікроконідій та за іншими показниками згідно з вимогами НД. У результаті досліджень було встановлено, що вакцина була нешкідливою, не мала сторонньої контамінації, концентрація мікроконідій була 55,6±3,2 х 106, а концентрація живих мікроконідій була 45,0±2,9 х 106, розчинялась за   
1,5±0,12 хвилин, масова частка вологи складала 2,7±0,19 %, концентрація водневих іонів – 6,9±0,33. Після отримання позитивних результатів контролю вакцину маркували й пакували. Вакцину зберігали за температури 4–8 °С до використання. За цією технологією виготовили 3 мікросерії вакцини. Препарат було названо «Триходерм».

З метою вивчення стабільності вакцини під час зберігання та впливу температури на життєздатність мікроконідій ми провели 6 дослідів. Упродовж 18 місяців вакцину зберігали за температури 6±2 °С та за 20±2 °С. У дослід узяли флакони трьох серій вакцини із залишковою вологою в середньому 2,6±0,1 %, укупорених під вакуумом. Вихідна життєздатність мікроконідій сягала в середньому 87,7±0,46 %.

У результаті здійснених досліджень установлено, що під час зберігання флаконів з вакциною за температури 6±2 °С відсоток живих мікроконідій у середньому по трьох серіях через 12 місяців становив 82±3,6 %, а через 18 місяців – 81±3,6 %. Зберігання вакцини за температури 20±2 °С призводило до зниження кількості живих мікроконідій через 12 місяців до 42±5,8 %, а через 18 місяців – до 37,5±5,9 %.

**Визначення оптимальної імунізуючої дози вакцини для профілактики трихофітії.** Досліди щодо визначення оптимальних профілактичних доз вакцини здійснювали на 42 кролях і 20 телятах. З кролів було сформовано 7 груп по 6 голів у кожній. Тварин шести перших груп щепили вакциною «Триходерм» у дозах від 1 до 60 х 106 мікроконідій у 1 см3. Сьома група кролів відігравала роль інтактного контролю. Через 30 діб після другого щеплення провели визначення імуногенності шляхом нашкірного зараження всіх тварин контрольними штамами трихофітонів – С-102 і   
ТМЧ-К в дозі 2,5 х 106 мікроконідій на 1 см2 шкіри.

Установлено, що в тварин, щеплених у дозах 1, і 5 х 106  мікроконідій у 1 см3, починаючи з 15 доби після контрольного зараження, з’явились ознаки захворювання на трихофітію. Кролі інших груп витримали контрольне зараження й не захворіли. У 2-й групі (доза 5 х 106  мікроконідій у 1 см3) з клінічними проявами не захворів один кріль із шести, але під час культурального дослідження від нього була виділена культура контрольного штаму *T. mentagrophytes.* Культуру *T. verrucosum* від цієї тварини не виділили. Під час мікроскопічного дослідження захворювання також не підтвердилося. Контрольні кролі захворіли з проявами типової трихофітії після зараження обома контрольними штамами. Захворювання контрольних тварин, а також тварин 1-ї та 2-ї груп було підтверджене позитивними результатами мікроскопічного й культурального досліджень. Тривалість клінічного захворювання спостерігалась упродовж 38–50 діб.

У досліді на 24 телятах віком 1–3 місяці сформували 4 групи по 6 голів у кожній. Телят трьох груп імунізували експериментальною вакциною з концентрацією 5, 10 і 20 х 106  мікроконідій у 1см3. Телятам четвертої групи вводили по 1 см3 фізіологічного розчину натрію хлориду. Щеплення робили двічі з інтервалом 12 діб. Через 30 діб після другого щеплення здійснювали нашкірне зараження телят контрольними штамами С-102 і ТМЧ-К. Спостереження проводили впродовж 60 діб після зараження. Результати досліджень наведені в таблиці 6.

*Таблиця 6*

**Визначення профілактичної дози вакцини на телятах**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **№ групи** | **Концентрація мікроконідій**  **(106 х см3)** | **Кількість тварин** | **Результати зараження** | | |
| **Клінічні прояви** | **Мікроскопічно** | **Культурально** |
| 1 | 5 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| 2 | 10 | 6 | 1 | - | - |
| 3 | 20 | 6 | - | - | - |
| 4 | Контроль | 6 | 6 | 6 | 6 |

Здійсненими дослідженнями встановлено, що на 15 добу після інфікування у трьох вакцинованих тварин першої групи з'явилися зміни шкіри, викликані *T. mentagrophytes.* Ще у трьох тварин на 17 день з'явилися зміни шкіри, спричинені *T. verrucosum* і *T. mentagrophytes.* Починаючи з 18 доби, ураження шкіри, спричинені *T. verrucosum,* виявили в двох раніше захворілих тварин. На місці аплікації контрольного штаму *T. verrucosum* спостерігали переважно одиничні мікотичні вогнища. На місці аплікації контрольного штаму *T. mentagrophytes*,навпаки – зливні мікотичні ураження. Одужання тварин спостерігали з 50 доби після зараження. У телят другої групи впродовж 16 діб після інокуляції контрольних штамів клінічних проявів захворювання не спостерігали. На 17 добу в одного теляти зареєстрували утворення лупи в місцях інокуляції. Розвитку патологічного процесу в подальшому не відбувалось і з 27 доби теля почало одужувати – лупіння шкіри припинилось, запалення шкіри зникло, вона набула фізіологічного кольору і ділянка ураження почала заростати волоссям. Телята третьої щепленої групи не захворіли. Усі контрольні тварини хворіли з клінічними ознаками трихофітії. Захворювання тварин підтверджували мікологічними дослідженнями. У клінічно хворих тварин діагноз підтвердився мікроскопічними дослідженнями та виділенням заражаючої культури.

Отже, як у досліді на лабораторних тваринах, так і в досліді на телятах, установлено, що доза вакцини, яка здатна утворювати необхідний імунний захист у тварин, не може бути меншою, ніж 10 х 106 мікроконідій (тобто не менше, ніж 5х106 мікроконідій кожного вакцинного штаму).

**Визначення нешкідливості вакцини «Триходерм».** Нешкідливість вакцини визначали в дослідах на морських свинках і телятах. Для визначення загальної та місцевої нешкідливості було відібрано 30 морських свинок, які були поділені на три групи по 10 тварин у кожній.

Тварин 1-ї групи було щеплено підшкірно, 2-ї групи – в м'язи стегна. Тваринам 3-ї групи замість вакцини вводили внутрішньом'язово такий же об'єм фізіологічного розчину натрію хлориду в м'язи стегна. Щеплення робили двічі з інтервалом 14 діб, для кожної ін'єкції використали по 0,5 см3 вакцини й фізіологічного розчину відповідно. Згідно з даними щодо контролю вакцини в 0,5 см3 розчину було 18 х 106 мікроконідій вакцинних штамів *T. verrucosum* Кн-01 і *T.mentagrophytes* ТМЧ, що становило потрійну профілактичну дозу.

Під час щеплення, упродовж 3 діб після нього та на 7-й день після щеплення оглядали місця ін'єкції вакцини та візуально оцінювали загальний стан тварин. Отримані результати засвідчили, що в деяких морських свинок, як після підшкірної й внутрішньом'язової ін'єкції вакцини, так і після внутрішньом'язової ін'єкції фізіологічного розчину, виникали незначні локальні реакції в місці ін'єкції (припухлість, почервоніння), які зникали впродовж 5–7 діб.

Нешкідливість вакцини досліджували також на 25 головах великої рогатої худоби. Було створено дві групи по 10 голів кожна для щеплення та контрольну групу з 5 голів. Усім тваринам вакцину вводили внутрішньом'язово в ділянку правої або лівої сторони шиї дворазово по 3 см3 (потрійна імунізуюча доза) з інтервалом 14 діб. Контрольним телятам вводили внутрішньом'язово в ділянку правої або лівої сторони шиї фізіологічний розчин кухонної солі по 3 см3.

Тварин усіх груп досліджували під час щеплення, упродовж 3 діб після нього та на 7-й день після щеплення –оглядали місця ін'єкції вакцини та візуально оцінювали загальний стан тварин. Два заключних дослідження здійснювали відповідно через 14 діб після щеплення.

Упродовж 30 діб (час досліду) за результатами клінічного огляду щеплених тварин не було встановлено змін загального стану. У більшості тварин змін у місці інокуляції вакцини також не відзначено, хоч у восьми тварин були виявлені зміни в місці ін'єкції, що виявлялося підвищенням місцевої температури. У двох з них виявили набряк у місці ін'єкції з м'якою консистенцією. Ці зміни виникли винятково після другого щеплення й зберігалися максимум три дні. Болю або сверблячки під час пальпації не виявляли. На заключному огляді (16 діб після другого щеплення) місця ін'єкції вакцини були непомітними. У контролі ні змін загального стану, ні змін в місці інокуляції фізіологічного розчину не спостерігали.

Отже, введення потрійної дози вакцини лабораторним тваринам і телятам не спричиняли патологічних змін в місці введення чи розладу загального стану, що свідчить про нешкідливість препарату для тварин.

**Визначення профілактичної ефективності вакцини.** Профілактичну ефективність щепленнядосліджували шляхом прямого експериментального зараження вірулентними штамами *T. verrucosum* С-102 і *T. mentagrophytes* ТМЧ-К. З цією метою використали 27 морських свинок. Інфікуюча доза становила 2,5 х 106 мікроконідій/см2 шкіри. Зараження здійснювали нашкірним способом через 65 діб після другого щеплення. Спостерігали за тваринами впродовж 33 діб.

Після контрольного зараження 10 морських свинок щеплених внутрішньом'язово, спостерігали такий перебіг. Від 6 до 21 доби у восьми тварин зафіксовано тільки почервоніння й припухлість на місці інокуляції контрольних штамів. Дві морські свинки прореагували утворенням кірок і лупи та легких струпів на місці інфікування. Найвища стадія вияву клінічних ознак хвороби спостерігалася між 18 та 21 добою після інфікування. Через 5 діб струпи зникли в однієї тварини, а кірки й лупа відокремилися та зникли в неї до кінця спостереження. До кінця досліду тільки в однієї морської свинки були кірки й лупа, шкіра інших тварин у місцях інокуляції контрольних штамів заростала волоссям. Зміни шкіри в інших місцях, крім місця інокуляції ("сателітні" ураження), не були встановлені в жодної тварини.

Таким чином, у 8 морських свинок до 26 доби після інфікування спостерігали тільки ледь помітне почервоніння й припухлість місця інокуляції. Через 33 доби (кінець спостереження) у 9 морських свинок не виявили ніяких змін шкіри в місці зараження. Під час мікологічного дослідження культури контрольних штамів були виділені від двох клінічно хворих тварин на 18 добу після зараження.

Із 7 морських свинок, щеплених підшкірно, захворіли із клінічними ознаками трихофітії й утворенням струпів 6 тварин. У однієї тварини на місці інокуляції культури утворилися лупа й кірки. Зміни шкіри з'явилися через   
7–11 діб після зараження та досягли максимуму впродовж 11–18 діб. У 5 тварин струпи зникли вже до 21 доби, а на місці інокуляції були лупа й кірки або припухлість і почервоніння. Тільки в однієї морської свинки трихофітійні струпи зберігалися до 21 доби після інфікування. До кінця досліду (33 доба) на місці експериментального інфікування шкіра в двох тварин ще була почервонілою й припухлою. Шкіра інших тварин не мала ознак захворювання. Під час мікологічного дослідження підтверджено захворювання всіх морських свинок, щеплених підшкірно. Наприкінці спостереження (26 день) у трьох морських свинок ще виділялися культури трихофітонів. Усі 10 контрольних морських свинок, яким внутрішньом'язово ввели фізіологічний розчин, після зараження захворіли з утворенням лупи, кірок або трихофітійних струпів на місці інокуляції.

Отже, після контрольного зараження з 10 морських свинок, щеплених внутрішньом'язово, 8 голів не виявили ознак захворювання, а дві легко захворіли та одужали впродовж 33 діб. Із 7 морських свинок, щеплених підшкірно, легко перехворіли всі тварини. Контрольні морські свинки після зараження захворіли всі з тяжким перебігом хвороби, і в 7 тварин до кінця спостереження реєстрували трихофітійні струпи та кірки.

Визначення профілактичної ефективності вакцини здійснювали також у дослідах на великій рогатій худобі. У першому досліді використали 10 телят віком 10 місяців, у другому – 21 телицю віком від 2-х до 8 міс., з яких формували по 2 групи. Дослідних тварин щепили двічі вакциною «Триходерм», контрольні отримали таку ж дозу фізіологічного розчину натрію хлориду.

У першому досліді після зараження щеплених і контрольних тварин відзначали, що в щеплених тварини місця інокуляції контрольних культур залишались без видимих змін і після 20 доби заростали волоссям. Лише в двох тварин спостерігали почервоніння й незначне запалення шкіри, яке зникло до 30 доби після зараження. Контрольні тварини захворіли з яскраво вираженою клінічною картиною трихофітії після зараження обома штамами. При цьому штам ТМЧ-К був агресивнішим, викликав більш глибокі зміни шкіри та мав тенденцію до поширення на інші ділянки тіла. До 70 доби (термін спостереження) контрольні тварини не одужали, ураження шкіри з’явилося на інших ділянках тіла. Під час мікологічного дослідження місць інокуляції в щеплених тварин виявити наявність трихофітонів не вдалося ні мікроскопічно, ні культурально. Від контрольних тварин були виділені вихідні культури і мікроскопічними дослідженнями підтверджено захворювання на трихофітію.

У другому досліді жодна з імунізованих тварин після контрольного зараження не захворіла на трихофітію. У чотирьох тварин спостерігали почервоніння та легке запалення шкіри після інокуляції культури *T.mentagrophytes,* у двох тварин – після інокуляції *T. verrucosum.*

Контрольні (нещеплені) тварини всі захворіли на трихофітію. Серед них у однієї тварини спостерігали зливні мікотичні ураження, ще в однієї – місце інокуляції було повністю покрито струпами. У семи тварин спостерігали тенденцію до поширення зони інокуляції, а ще в двох – ураження на інших ділянках тіла. Під час мікологічних досліджень установлено, що в жодної дослідної тварини захворювання не підтвердилося. У той же час у контрольних тварин, починаючи з 12 доби, 8 голів були культурально позитивні, а на кінець досліджень у всіх тварин захворювання на трихофітію було підтверджено мікроскопічним дослідженням і виділено культури контрольних штамів збудників. До 38 доби (термін спостереження) контрольні тварини не одужали.

Отже, всі щеплені тварини (15 голів) витримали експериментальне зараження, а всі контрольні, нещеплені (16 голів) захворіли на трихофітію з тяжким клінічним перебігом.

**Порівняльні випробування вакцин "Триходерм" і ЛТФ-130. Д**осліди здійснювали на морських свинках і телятах. З 30 морських свинок сформували 6 дослідних груп. Із них по 2 групи дворазово щеплювали вакциною «Триходерм» і ЛТФ-130, а дві залишали для контролю. Контрольне зараження проводили нашкірним методом у попередньо вистрижені й скарифіковані ділянки шкіри розміром 4х4 см за лопатками. Для зараження використовували вірулентні штами *T. verrucosum* С-102і *T. mentagrophytes* ТМЧ-К. Тварин перших чотирьох груп щепили з розрахунку 1 профілактична доза в 0,5 см3 розчину. Повторне щеплення зробили через 15 діб. Через 27 діб після другого щеплення здійснили контрольне зараження тварин. Морських свинок першої, третьої та п’ятої груп заражали штамом *T. verrucosum* С-102, твариндругої, четвертої та шостої груп – *T. mentagrophytes* ТМЧ-К.

Проведеними дослідженнями встановлено, що контрольні морські свинки тяжко хворіли з типовою клінічною картиною трихофітії. Мікологічними дослідженнями від них виділяли культури трихофітонів. Морські свинки щеплені вакциною «Триходерм», після зараження штамами *T. verrucosum і T. mentagrophytes* на трихофітію не хворіли. Діагноз на трихофітію у них не був підтверджений ні мікроскопічними, ні культуральними дослідженнями. Морські свинки щеплені вакциною   
ЛТФ-130, хворіли з клінічними проявами трихофітії тільки після зараження штамом *T. mentagrophytes.* Від них виділяли вихідну культуру.

Порівняльні випробування вакцин "Триходерм" і ЛТФ-130 також здійснили на 10 головах клінічно здорових телят віком 3–4 місяці. Було сформовано 3 експериментальні групи. Перша група (4 голови) була щеплена вакциною "Триходерм", друга група (4 голови) була щеплена вакциною ЛТФ-130, третю групу (2 голови) не щепили та використовували як контрольну. Щеплення телят перших двох груп здійснювали згідно з настановою щодо застосування вакцин (1 і 5 см3 відповідно). Друге щеплення зробили через 16 діб. Через 27 діб після другого щеплення здійснили контрольне зараження тварин. Контрольне зараження здійснювали нашкірним методом у попередньо вистрижені й скарифіковані ділянки шкіри розміром 5х5 см у середній третині шиї. Для зараження використовували вірулентні штами *T. verrucosum* С-102 *і T. mentagrophytes* ТМЧ-К у дозі   
2,5 х 106 мікроконідій на 1 см2 шкіри. Термін спостереження за телятами становив 70 діб.

Після контрольного зараження встановлено, що в телят, щеплених вакциною «Триходерм», спостерігали гіперемію шкіри й утворення лупи з обох боків зараження. Ці зміни спостерігалися з 7 до 21 доби, після чого почалося відновлення волосяного покриву на ділянках інокуляції вірулентних культур. У телят, щеплених вакциною ЛТФ-130, у місці інокуляції штаму *T. verrucosum* С-102 спостерігали гіперемію шкіри і утворення лупи. На місці інокуляції штаму *T. mentagrophytes* ТМЧ-К спостерігали прогресуюче захворювання з розширенням зони ураження, появою трихофітійних струпів і нових осередків ураження. Контрольні тварини хворіли після зараження обома штамами з вираженою клінічною картиною трихофітії. Під час мікологічного дослідження матеріалу з осередків ураження контрольних телят мікроскопічно було підтверджено захворювання на трихофітію й виділено культури контрольних штамів. Від телят першої групи культури трихофітонів після інокуляції виділити не вдалося, мікроскопічні дослідження захворювання теж не підтвердили. У той же час від телят другої групи після зараження було виділено лише культуру *T. mentagrophytes.* Від контрольних тварин виділяли обидва збудники трихофітії.

Отже, на відміну від вакцини ЛТФ-130, вакцина «Триходерм» захищала тварин від захворювання на трихофітію в разі зараження як культурою *Trichophyton verrucosum,* так і *Trichophyton mentagrophytes.*

**Вивчення профілактичної ефективності вакцини у виробничих умовах.** У досліді використали 228 голів великої рогатої худоби, що були розміщені на фермі. У 31 тварини спостерігали всі ступені захворювання на трихофітію – від одиничних мікотичних змін, особливо в ділянці голови, шиї й хвоста, до генералізованої трихофітії. Клінічно хворих тварин утримували окремою групою впродовж двох місяців. Для профілактики 93 клінічно здорових тварини віком від 2 до 6 місяців щепили вакциною "Триходерм". Як контрольну групу залишили 104 нещеплених тварини віком від 5 до 10 місяців.

Через 4 тижні після другого щеплення тварин з карантину переставили в загальне приміщення. Щеплених і контрольних тварин клінічно досліджували з інтервалом 7 діб на предмет клінічного прояву захворювання на трихофітію. У разі підозри виникнення осередку трихофітії здійснювали мікологічні дослідження зіскрібків шкіри.

Серед 93 щеплених тварин впродовж 3–8 тижнів захворіли 5 (5,37 %) голів з клінічними ознаками трихофітії. Діагноз був підтверджений мікологічними дослідженнями зіскрібків шкіри. З 5 захворілих тварин у 4 з'явилися одиничні трихофітійні ураження, обмежені однією ділянкою тіла (легкий ступінь ураження). За такого перебігу хвороби тварини видужують без додаткового втручання – через 15–20 діб кірочки відпадають, і до 30 доби місце ураження покривається новим волоссям. У нашому випадку вже на   
20–25 добу ознаки захворювання зникали, і в місцях ураження виросло нове волосся. При цьому одна щеплена тварина захворіла на трихофітію вже через три тижні після другої імунізації, а ще одна – через 4. Зважаючи на те, що інкубаційний період при трихофітії триває від 3 до 5 тижнів, можна припустити, що ці тварини були інфіковані ще перед щепленням, або щеплення здійснювалася вже в інкубаційному періоді. І лише в однієї щепленої тварини (1 %) були ознаки трихофітії середнього ступеня ураження з 10 осередками на різних ділянках тіла.

З 22 (23 %) захворілих контрольних, нещеплених тварин у 6 з'явилися незначні зміни на шкірі, у 8 тварин – ураження середнього ступеня й у 3 тварин реєстрували тяжкі ураження з більше, ніж 20 трихофітійними осередками в різних ділянках тіла. У 5 тварин реєстрували генералізовану форму трихофітії з численними осередками ураження, розташованими по всьому тілу. 82 теляти не захворіли на трихофітію впродовж 60 діб спостереження.

Таким чином, здійснені дослідження свідчать про високу імуногенну активність вакцини «Триходерм» як в експериментах (80–100 %), так і під час застосування вакцини в польових умовах, де вона показала високий рівень захисту тварин (95 %).

**Вивчення терапевтичної ефективності вакцини.** Для вивчення терапевтичної ефективності вакцини використали 33 теляти з різним клінічним перебігом захворювання. Телятам вводили дві або три профілактичні дози вакцини з інтервалом 14 діб. У першому досліді, коли застосували вакцину «Триходерм» на 27 телятах віком до 9 місяців, клінічно хворих на трихофітію, встановлено, що три голови повністю вилікувалися через три тижні, сім – через чотири, шість – через п'ять тижнів. Дві тварини одужали через 6 тижнів після другого щеплення, а одна – через 7 тижнів. П'ять тварин упродовж терміну спостереження (10 тижнів) після другого щеплення не одужали. З п'яти тварин з генералізованою формою захворювання, які через 14 діб після другого щеплення були додатково імунізовані втретє, дві не одужали за час спостереження.

Позитивні результати ми отримали і в другому досліді щодо терапевтичного застосування вакцини «Триходерм». Із 6 хворих після експериментального зараження телят упродовж 3-х тижнів вилікувалось 4 голови. Дві тварини за 3 тижні (термін спостереження) одужати не встигли, але мали позитивну динаміку одужання. При цьому тварини, що були раніше щеплені, вилікувалися швидше.

Таким чином, вакцина «Триходерм» мала виражену терапевтичну дію й під час застосування в рекомендованій дозі (дві профілактичні) забезпечувала клінічне одужання тварин у термін від 3 до 6 тижнів залежно від тяжкості патологічного процесу. За генералізованої форми захворювання рекомендується й третє щеплення тварин.

**Показники гуморального імунітету в щеплених тварин.** З метою вивчення імунобіологічної перебудови організму та формування специфічного імунітету в щеплених тварин ми застосували реакцію аглютинації (РА). Для реакції використовували антигени, виготовлені нами з гомологічних штамів трихофітонів. Для першого досліду було використано 10 кролів масою тіла 2,5–3 кг, нещеплених проти трихофітії. Першу групу кролів щепили експериментальною вакциною "Триходерм" серії № 2, другу групу – вакциною ЛТФ-130. До щеплення титр аглютинінів становив 4,12±0,42–4,52±0,54 lоg2. Найвищий титр аглютинінів у щеплених кролів спостерігали на 20–30 день після другого щеплення – у середньому, для першої групи 6,72±0,63–7,52±0,65 lоg2  (1:112–1:176) для *T. verrucosum* і 6,72±0,63–7,92±0.85 lоg2  (1:112–1:224) для *T. mentagrophytes.* У кролів другої групи – 6,32±0,59–7,52±0,65 lоg2  (1:88–1:176) для *T. verrucosum.* У тварин цієї групи до антигена з *T. mentagrophytes* аглютинінів не виявили.

Для другого досліду використали 24 теляти віком 3‑6 місяців. І-у групу тварин щепили вакциною ЛТФ-130, ІІ-у – експериментальною вакциною «Триходерм». Отримані результати свідчать, що після дворазового щеплення через 28 діб різко збільшувався титр аглютинінів, з максимальним підйомом у період 45–60 діб і поступовим зниженням. До 180 доби титр аглютинінів наближався до рівня, зафіксованого після першого щеплення. При цьому в тварин, щеплених вакциною ЛТФ-130, титри аглютинінів до антигена з   
*T. mentagrophytes* не зростали й були на рівні фону 4,24±0,27 lоg2 (1:23), а до антигена з *T. verrucosum* сягали 8,4±1,15 lоg2  (1:360). Титри аглютинінів у тварин другої групи до антигенів з обох збудників були приблизно рівними і знаходилися у межах 8,4±1,07–8,49±0,97 lоg2  (1:373–1: 386).

Таким чином, вакцина «Триходерм» викликає імунну перебудову організму тварин та індукує появу гуморального імунітету до двох видів збудників трихофітії. Титри аглютинінів у сироватці крові тварин після щеплення вакциною «Триходерм» були на рівні титрів аглютинінів у сироватці крові тварин, щеплених комерційною вакциною ЛТФ-130 (8,4±1,07–8,4±1,15 lоg2). Рівень аглютинінів сягав максимальних показників через 2 місяці після другого щеплення та поступово знижувався до фонового рівня через 6 місяців.

**Вивчення факторів імунітету в тварин, щеплених вакциною «Триходерм**». Вивчення імунологічної перебудови організму тварин після щеплення грибковими вакцинами вивчали в дослідах на 20 кролях і 36 телятах. Як контрольних використовували нещеплених та щеплених вакциною „ЛТФ-130” тварин. Здійснені дослідження засвідчили, що в щеплених тварин реєстрували вірогідне зростання рівня циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси на 0,04±0,02 мг/см3 (17 %) та активності лізоциму на 26,5±2,8 мкг/см3 (34 %) у сироватці крові щеплених тварин відносно значень цих показників у контролі. При цьому концентрація серомукоїдів (Sm) у сироватці крові тварин, щеплених вакциною «Триходерм», була вірогідно нижчою від значень цього показника в телят, щеплених вакциною „ЛТФ-130”, що свідчить про відсутність шкідливих імуносупресивних ефектів під час застосування препарату „Триходерм” на організм тварин. Виявлено поступове зростання рівня загального білка в сироватці крові тварин, щеплених вакциною «Триходерм», за рахунок підвищення кількості г-глобулінів, що впливало відповідно й на загальну кількість глобулінів відносно значень цих показників у контрольній групі. Зростання рівня загального білка відносно контрольних значень протягом експерименту в середньому становило – 15,5 %, кількості   
*г*-глобулінів – 40,1 %, загальних глобулінів – 21,0 % відповідно. У сироватці крові телят, щеплених вакциною ЛТФ-130, було зафіксовано лише вірогідне зростання кількості *г-*глобулінів та відповідно загальних глобулінів у середньому на 31,5 і 20,3 % через 4 тижні після щеплення на фоні тенденції до підвищення значень рівня загального білка. Слід відзначити, що виявлене зростання показників білкового профілю крові щеплених телят упродовж експерименту було в межах прийнятих референтних значень (норма) відповідних показників для великої рогатої худоби. Разом з тим необхідно підкреслити, що в сироватці крові контрольних телят рівень загальних протеїнів поступово знижувався впродовж експерименту. Виходячи з того, що імунні комплекси середньої молекулярної маси є активаторами системи комплементу та В-лімфоцитів, визначені нами посилення утворення ЦІК та активацію лізоциму можна розглядати в даному випадку як індукцію гуморальної ланки імунітету внаслідок щеплення.

Про відтворення імунної відповіді внаслідок дії запропонованої вакцини свідчить також визначене посилення синтезу імуноглобулінів класів G і М у сироватці крові дослідних телят. Більш ранню відповідь імунної системи реєстрували в тварин, щеплених препаратом «Триходерм», тенденцію якої спостерігали вже на початку досліду – після щеплення, що в подальшому набула вірогідності та залишалася до кінця експерименту. Так, через 10 тижнів після імунізації зростання кількості імуноглобулінів класів G і М у сироватці крові телят цієї дослідної групи становило відповідно 18,4 і 30,4 % відносно контрольних значень.

Застосування вакцини «ЛТФ-130» відрізнялося за впливом на організм телят. Вірогідне зростання кількості імуноглобулінів класів G і М фіксували лише наприкінці експерименту (70 доба), яке було менш виражене. На початку досліджень – після щеплення – кількість імуноглобулінів класів G і М була навіть нижчою за контрольні значення, але ці зміни були не вірогідні.

Отже, як комерційна жива, суха вакцина «ЛТФ-130» так і експериментальна вакцина „Триходерм” спричиняли імунну перебудову організму тварин, зокрема викликали збільшення вмісту імуноглобулінів у сироватці крові щеплених тварин порівняно з контрольними й не чинило імуносупресивної дії на організм тварин.

**Визначення тривалості імунітету після щеплення вакциною «Триходерм».** Для виконання поставленої мети було використано 10 телиць віком 8–12 місяців. Тварин щепили вакциною "Триходерм" двічі з інтервалом 12 діб у дозі 3 см3. Для контролю використовували не щеплених проти трихофітії телят віком 2–4 місяці, яких відбирали окремо для кожного дослідження по 1–2 голови. Упродовж 12 місяців здійснювали регулярні (з інтервалом 3 місяці) зараження щеплених телиць вірулентними штамами збудників трихофітії. За тваринами спостерігали впродовж 25–35 діб після зараження. Контрольне зараження здійснювали нашкірним методом у попередньо вистрижені й скарифіковані ділянки шкіри розміром 5х5 см за лопатками в дозі 2,5 х 106 мікроконідій на 1 см2 шкіри.

Установлено, що з 10 щеплених тварин у однієї телиці спостерігали незначні зміни шкіри, викликані дерматофітами, через 9 і 12 місяців після щеплення. Ще в однієї такі ж зміни спостерігали через 12 місяців після щеплення. Ураження шкіри в цих тварин не мало поширення та зникало через 20–25 діб без лікування. У інших тварин видимих змін шкіри в місці інфікування не реєстрували.

Усі нещеплені контрольні тварини хворіли з клінічним проявом трихофітії в місці інфікування. При цьому захворювання на зараження штамом *T. mentagrophytes* розвивалося більш інтенсивно, ніж на зараження штамом *T. verrucosum.* Клінічні прояви захворювання підтверджувалися мікроскопічними та культуральними дослідженнями.

Підсумовуючи отримані нами наукові результати, необхідно зазначити, що наші дослідження були спрямовані на створення нового вітчизняного препарату для специфічної профілактики й терапії трихофітії великої рогатої худоби. У результаті ми удосконалили лабораторну діагностику дерматомікозів тварин, виділили й селекціонували вітчизняні виробничі вакцинні й контрольні вірулентні штами збудників трихофітії великої рогатої худоби, розробили ефективний спосіб довготривалого збереження виробничих штамів дерматофітів, розробили технологію виготовлення високоефективної бівалентної вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби з урахуванням циркуляції збудників захворювання в Україні. Порівняльні дослідження комерційної вакцини «ЛТФ-130» та бівалентної вакцини «Триходерм» дають підставу стверджувати, що вакцина «Триходерм» забезпечує надійний захист і лікування від двох збудників трихофітії великої рогатої худоби – *Trichophyton verrucosum* і *Trichophyton mentagrophytes*, а вакцина «ЛТФ-130» лише від одного – *Trichophyton verrucosum.* За показниками "нешкідливість" та "протективна активність" вакцина «Триходерм» не поступається комерційній вакцині «ЛТФ-130».

**В И С Н О В К И**

1. Теоретично та експериментально обґрунтовано розробку й застосування бівалентної, живої, сухої, концентрованої вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби на підставі вивчення особливостей перебігу захворювання, етіологічної структури, вивчення біологічних властивостей збудників, селекції виробничих штамів. На Державній Сумській біологічній фабриці впроваджено технологію виготовлення вакцини «Триходерм». Розроблено систему довготривалого зберігання культур трихофітонів та вдосконалено лабораторну діагностику трихофітії.
2. Уперше в Україні встановлено, що захворювання великої рогатої худоби на трихофітію спричиняють два види збудників – *Trichophyton verrucosum* i *Trichophyton mentagrophytes*. Клінічні прояви захворювання в тварин, спричинені *T. verrucosum,* установлено в 75,9 % обстежених господарств, *Trichophyton mentagrophytes –* у 13,8 %, асоціацією обох збудників – у тварин 10,3 % обстежених господарств.
3. Установлено сезонні, вікові та клінічні особливості перебігу трихофітії. Захворювання реєструвалося незалежно від пори року з тенденцією поширення в зимово-весняний період (з лютого по квітень); хворіли переважно телята у віці 2–6 місяців (84,0 % клінічно хворих тварин). Найменше тварин хворіло у віці молодше від двох місяців (4 %) і старше від 2-х років (2 %). Впливу статевої або породної належності на рівень захворюваності великої рогатої худоби на трихофітію не виявлено. Інкубаційний період захворювання сягав 12–25 діб. Виявлено десиміновану, плямисту та стерту (атипову) форми захворювання. Найбільше поширення мала плямиста форма хвороби – 69,6 % хворих тварин.
4. Ізольовано 147 епізоотичних культур трихофітонів. Після селекції відібрано для досліджень 10 штамів, які різнилися між собою за культурально-морфологічними ознаками й патогенністю для тварин. Класичним ознакам *T. verrucosum*  відповідав один штам – "С-102", а з виділених культур *T. mentagrophytes* – штами "ТМЧ" і "ТМЧ-К". Отримані дані зумовили їх використання під час виробництва та контролювання вакцини.
5. Удосконалено методику лабораторної діагностики дерматомікозів тварин. Використання селективних поживних середовищ з циклогексемідом та антибактеріальними препаратами під час первинних висівів матеріалу, зумовлюють підвищення ефективності ізоляції культур на 37 % і скорочують час виділення *T. verrucosum*  вдвічі.
6. Розроблено спосіб довготривалого зберігання дерматофітів на основі вирощування культур у напіврідкому агаровому середовищі, ліофілізації всієї грибниці та відновлення штамів рідким середовищем Сабуро, що дозволяє підвищити кількість життєздатних мікроконідій на   
   6–8 % та забезпечує життєздатність культур дерматофітів упродовж 2 років за кімнатної температури (20±2 °С).
7. Виділено та селекціоновано штами *Trichophyton verrucosum*   
   «Кн-01» та *Trichophyton mentagrophytes* «ТМЧ», які характеризуються значним продукуванням мікроконідій, високою імуногенною активністю, низькою патогенністю для тварин. Ці якості були підставою для їх використання під час виготовлення бівалентної, живої, сухої, концентрованої вакцини «Триходерм».
8. Обґрунтовано використання селекціонованих вірулентних для лабораторних і сільськогосподарських тварин штамів *T. verrucosum* «С-102» та *T. mentagrophytes* «ТМЧ-К» з метою контролювання імуногенності вакцин проти трихофітії тварин.
9. Розроблено технологічні параметри виготовлення імуногенної вакцини проти трихофітії. Оптимальним для накопичення біомаси й ліофілізації є культивування вакцинних штамів трихофітонів упродовж 15–25 діб за 26±1 °С і концентрація 400–600 х 106 /см3  мікроконідій у суспензії для висушування. Ці параметри дають змогу одержати 85–90 % життєздатних мікроконідій у дозі вакцини, що забезпечує напружений імунітет щеплених тварин.
10. Розроблено захисне середовище для ліофілізації штамів збудників трихофітії, що створює оптимальні умови життєдіяльності за рахунок макро- (солі калію) і мікроелементів (солі заліза, міді, цинку, марганцю), пептону (1 %); містить сахарозу (20 %) і желатину (4 %); забезпечує життєздатність мікроконідій після висушування до 90 % і дозволяє отримувати високоякісну бівалентну, живу, суху вакцину проти трихофітії великої рогатої худоби.
11. Створене на основі солодового цукру зі збагаченням його амінокислотами та факторами росту (вітаміни групи Б) середовище для культивування трихофітонів прискорює появу росту колоній збудників трихофітії на 2–3 доби, появу росту мікроконідій на 3–4 доби, забезпечує збільшення кількості мікроконідій на 15–22 % порівняно із загальноприйнятим сусло-агаром і може ефективно використовуватися для селекції та накопичення біомаси збудників трихофітії.
12. Бівалентна, жива, суха, концентрована вакцина проти трихофітії великої рогатої худоби після дворазового внутрішньом’язового введення в дозі 10 х 106 мікроконідій і більше забезпечує надійний захист як проти *Trichophyton verrucosum,* так і *Trichophyton mentagrophytes* у 80–100 % лабораторних тварин і 95–100 % великої рогатої худоби. Щеплення вакциною не спричиняє ускладнень та імуносупресивної дії.
13. Серологічними дослідженнями встановлено вірогідну різницю в титрах аглютинінів до 8,4±1,07–8,49±0,97 lоg2 з виготовленими нами антигенами, збільшення концентрації імуноглобулінів на 2,1±0,06 мг/см3   
    (16 %), зростання циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) на   
    0,04±0,02 мг/см3 (17 %) та активності лізоциму на 26,5±2,8 мкг/см3 (34 %) у сироватці крові щеплених тварин порівняно з інтактним контролем.
14. Установлено виражену терапевтичну ефективність вакцини «Триходерм» при трихофітії великої рогатої худоби, зумовленій двома збудниками (*T. verrucosum* і *T. mentagrophytes*). Після дворазового щеплення в терапевтичній дозі (для телят віком до 4-х місяців – 2 см3, 4–8 місяців –  
    4 см3, старші за 8 місяців – 6 см3) у 78–100 % випадків тварини одужують упродовж 3–6 тижнів.
15. Клініко-епізоотологічні спостереження та порівняльні дослідження комерційної вакцини «ЛТФ-130» та бівалентної вакцини «Триходерм» свідчать, що вакцина «Триходерм» забезпечує надійний захист (80–100 %) і лікування (78–100 %) від двох збудників трихофітії великої рогатої худоби – *T.verrucosum* і *T. mentagrophytes*, а вакцина «ЛТФ-130» лише від одного – *T. verrucosum.*

**ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

Розроблено й запропоновано для ветеринарної медицини:

1. Вакцина «Триходерм» проти трихофітії великої рогатої худоби бівалентна, жива, суха, концентрована, на яку отримано патент України за   
№ 25296, ТУ У 24.1-19024865-002:2005, РП № 2503-04-0284-07.

2. Настанова щодо застосування вакцини «Триходерм» проти трихофітії великої рогатої худоби бівалентної, живої, сухої, концентрованої. Затверджена Головним державним інспектором ветеринарної медицини України 19 грудня 2005 року.

3. Інструкція з виготовлення та контролювання вакцини «Триходерм» проти трихофітії великої рогатої худоби бівалентної, живої, сухої, концентрованої. Затверджена директором ДНКІБШМ 6 грудня 2005 року.

4. Методичні рекомендації "Лабораторна діагностика дерматомікозів тварин". Розглянуті й затверджені на засіданні НМК Державного Департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України, протокол № 3 від 20 грудня 2006 року.

5. Виробничі вакцинні штами трихофітонів. Патенти України   
№№ 23490, 23492.

6. Контрольні вірулентні штами трихофітонів. Патенти України   
№№ 23491, 23493.

7. Система довготривалого зберігання культур дерматофітів. Патент України № 9617.

8. Захисне середовище для ліофілізації трихофітонів. Патент України № 9637.

9. Основні положення дисертації можуть бути використані в процесі вивчення дисциплін «Мікробіологія», «Вірусологія», «Імунологія», «Біотехнологія» та інших, які є в навчальному плані підготовки фахівців ветеринарної медицини.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Ветеринарні імунобіологічні препарати: Довідник / Під загальною ред. П.І. Вербицького та А.М. Головка. – К.: Реферат, 2004. – С. 92–93, 101–102.
2. Лабораторна діагностика дерматомікозів тварин **/ В.Г. Скрипник**, А.М. Головко, В.О. Ушкалов, Н.В. Кокоріна, О.М. Литвинов // Методичні рекомендації. – К., 2006.– 25 с.
3. Створення комплексного середовища для культивування збудників мікозів/ А.М. Головко, **В.Г. Скрипник**, В.В. Чумаченко, В.С. Тиндик, О.І. Гордієнко, Л. Г. Стецюра // Ветеринарна медицина України. – К., 2004. –   
   № 3. – C. 15–16 (дисертант накопичив фактичний матеріал, зробив аналіз. Брав участь у написанні статті).
4. **Скрипник В.Г.** Деякі аспекти стандартизації вакцин проти дерматомікозів тварин // Ветеринарна медицина: Міжвідом. темат. наук. зб. – Х., 2004. – Вип.84. – С. 630–632.
5. Головко А.М., Лемещенко Г.П., **Скрипник В.Г**., Волков М.В. Використання мікроміцетів для одержання біологічних препаратів з фунгіцидними властивостями // Вісник аграрної науки. – 2004. – № 3. –   
   С. 43–45 (дисертант розробив методику постановки досліду, брав участь у постановці досліду та написанні статті).
6. **Скрипник В.Г.** Селекція дерматофітів за показником спороутворення // Ветеринарна біотехнологія. – К. “Аграрна наука”, – 2004. – №5.– С.   
   136–139.
7. **Скрипник В.Г.** Випадок захворювання кролів на трихофітію // Ветеринарна медицина України. – 2005. – № 2. – С. 7 – 8
8. **Скрипник В.Г.** Вплив захисного середовища на зберігання грибів дерматофітів // Ветеринарна біотехнологія. – К.: “Аграрна наука”, 2005.–   
   № 6. – С.183 – 188.
9. **Скрипник В.Г.** Визначення оптимальних строків вирощування вакцинних штамів трихофітонів // Ветеринарна медицина: Міжвідом. темат. наук. зб. – Х., 2005. – Вип.85. –Т.2. – С. 994 – 996.
10. **Скрипник** **В.** Роль гіпсовидного трихофітона (*Trichophyton mentagrophytes*) в епізоотології трихофітії тварин // Науково-технічний бюлетень інституту біології тварин і державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – Вип. 6.   
    – № 3,4. – С. 356 – 360. – Львів, 2005.
11. **Скрипник В.Г.** Деякі аспекти епізоотології та епідеміології трихофітії в Україні // Ветеринарна медицина: Міжвідом. темат. наук. зб. – Х., 2006. – Вип.86. – С. 297–302.
12. **В.Г. Скрипник.** Патогенність дерматофітів *Trichophyton verrucosum*, виділених в Україні, для лабораторних тварин // Ветеринарна біотехнологія. – К.: “Аграрна наука”, 2006.-– № 8. – С. 246–251.
13. **Валерій Скрипник.** Випробування експериментальної вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби на лабораторних тваринах // Ветеринарна медицина України. – 2006. – № 11. – С. 32–34.
14. Прудніков В.С., Лабусова Н.І., Алешкевич В.М., Красочко П.А., **Скрипник В.Г.** Вплив «Апістимуліну-А» на морфологічні показники органів імунітету телят, вакцинованих проти трихофітії // Вісник Сумського національного аграрного університету. – Суми, 2006. – Випуск 1–2 (15–16), –   
    С. 161–164 (*дисертант приймав участь у розробці методики постановки досліджень, проведенні клінічного досліду, відборі патологічного матеріалу та написанні статті*).
15. **В.Г. Скрипник.** Динаміка біохімічних показників крові у телят, вакцинованих протигрибковими вакцинами // Збірник наук. праць "Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини". – Харків, 2007. – Вип. 14 (39). –   
    Ч. 2. – Т. 2. – С. 73–77.
16. **Скрипник В.Г.** Вивчення дії експериментальної вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби на телятах // Ветеринарна біотехнологія. –К.: “Аграрна наука”, 2007. – № 10. – С. 208–213.
17. **Валерій Скрипник.** Визначення якості протигрибкових вакцин за біохімічними показниками крові // Ветеринарна медицина України. – 2007. – № 5. – С. 34–36.
18. **Скрипник В.Г.** Оцінка якості протигрибкових вакцин за показниками неспецифічної резистентності сироватки крові кролів // Ветеринарна медицина: Міжвідом. темат. наук. зб. – Х., 2007. – Вип.88. – С. 203–207.
19. **Валерій Скрипник.** Епізоотологія та етіологія трихофітії великої рогатої худоби (огляд літератури) // Ветеринарна медицина України. – 2007. – № 6. – С. 17 – 19.
20. **Скрипник В.Г.** Динаміка показників білкових фракцій сироватки крові кролів, щеплених протигрибковими вакцинами // Вісник Білоцерківського ДАУ. – Біла Церква, 2007. – Вип. 44. –С. 152–155.
21. **Скрипник** **В.** Вивчення вірулентних властивостей культур трихофітонів // Науково-технічний бюлетень інституту біології тварин і державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів, 2007. – Вип. 8. – № 3,4. – С. 303–309.
22. Лемещенко Г.П., Головко А.М., **Скрипник В.Г.** // Мінеральне живильне середовище для культивування *Trichophyton verrucosum* / Деклараційний патент на винахід. № 20020866543; заявлено 06.08.2002; опубл. 15.05.03, Бюл. №5. – 2 с. *(дисертант брав участь у постановці дослідів, оформленні заявки на патент).*
23. **Скрипник В.Г.**, Головко А.М., Ушкалов В.О. Процес довготермінового зберігання штамів дерматофітів // Деклараційний патент на корисну модель № u 2005 00688; заявлено 26.01.2005; опубл. 17.10.2005. – Бюл. № 10. – 2 с. *(дисертант провів експериментальні дослідження і оформив заявку на патент).*
24. **Скрипник В.Г**., Головко А.М., Ушкалов В.О., Яненко В.М. Захисне середовище для довготермінового зберігання штамів дерматофітів // Деклараційний патент на корисну модель № u 2005 01106; заявлено 07.02.2005; опубл. 17.10.2005. – Бюл. № 10. – 2 с. *(дисертант здійснив експериментальні дослідження і оформив заявку на патент).*
25. **Скрипник В.Г**., Головко А.М., Ушкалов В.О., Скрипник А.В. Застосування штаму гриба *Trichophyton verrucosum* для виготовлення вакцин проти дерматомікозів тварин // Патент на корисну модель № 23490; заявлено 18.01.2007; опубл. 25.05.2007. – Бюл. № 7. – 6 с. *(дисертант здійснив експериментальні дослідження і оформив заявку на патент).*
26. **Скрипник В.Г.**, Головко А.М., Ушкалов В.О., Скрипник А.В. Застосування штаму гриба *Trichophyton verrucosum* для контролювання імуногенності вакцин проти дерматомікозів тварин // Патент на корисну модель № 23493; заявлено 18.01.2007; опубл. 25.05.2007. – Бюл. № 7. – 4 с. – (дисертант провів експериментальні дослідження і оформив заявку на патент).
27. **Скрипник В.Г.**, Головко А.М., Ушкалов В.О., Скрипник А.В. Застосування штаму гриба *Trichophyton mentagrophytes* для виготовлення вакцин проти дерматомікозів тварин // Патент на корисну модель № 23491; заявлено 18.01.2007; опубл. 25.05.2007. – Бюл. № 7. – 4 с. *(дисертант здійснив експериментальні дослідження і оформив заявку на патент).*
28. **Скрипник В.Г.**, Головко А.М., Ушкалов В.О., Скрипник А.В. Застосування штаму гриба *Trichophyton mentagrophytes* для контролювання імуногенності вакцин проти дерматомікозів тварин // Патент на корисну модель № 23492; заявлено 18.01.2007; опубл. 25.05.2007. – Бюл. № 7. – 6 с. – *(дисертант здійснив експериментальні дослідження і оформив заявку на патент).*
29. **Скрипник В.Г.**, Головко А.М., Ушкалов В.О., Скрипник А.В. Спосіб виготовлення вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби бівалентної, живої, сухої, концентрованої // Патент України № 25296; заявлено 27.12.2006; опубл. 10.08.2007. – Бюл. № 12. – 6 с. *(дисертант здійснив експериментальні дослідження і оформив заявку на патент).*
30. Актуальні питання діагностики дерматомікозів / **В.Г. Скрипник**,   
    А.М. Головко, М.В. Волков, В.М. Яненко // Матеріали ІІ Міжнародного конгресу спеціалістів ветеринарної медицини (3 – 4 серпня 2004 р., м. Київ, Україна). – К., 2004. – C. 36–37.
31. **Скрыпник В.Г.** Способ длительного хранения коллекций штаммов дерматофитов // Матер. Международной науч.-практ. конфер. «Актуальные проблемы ветеринарной медицины в условиях современного животноводства». – Минск, 2005.– Науч. труды. – Вып. 38. – С. 478–482.
32. **Скрипник В.Г.** Стабільність вакцини проти дерматомікозів при зберіганні // Міжнародна наукова конференція «Мікробні біотехнології». Тези доповідей. – Одеса: «Астропринт», 2006. – С. 154.
33. **Скрипник В.Г.** Вдосконалення засобів захисту тварин – вимога часу // IV Міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини 3–6 жовтня 2006 р. – Київ, Україна. – С. 92–93.
34. **Скрыпник В.Г.**, Ушкалов В.А., Романько М.Е. Некоторые аспекты стандартизации противогрибковых вакцин // Материалы Пятого всероссийского конгресса по мед. микологии "Успехи медицинской микологии". – Москва, 2007.– Т. IX. – С. 326–328.

**Скрипник В.Г. Трихофітія великої рогатої худоби (етіологічна структура, діагностика, селекція штамів та розробка бівалентної вакцини). – Рукопис.**

*Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, 2007.*

Дисертацію присвячено вивченню етіологічної структури, біологічних особливостей збудників та розробці засобу профілактики й терапії трихофітії великої рогатої худоби. Здійснено вивчення епізоотичної ситуації щодо трихофітії ВРХ в Україні за 1996–2006 роки, визначено етіологічну структуру захворювання. Удосконалено лабораторну діагностику дерматомікозів тварин, що дало змогу на 37 % підвищити ефективність виділення культур трихофітонів і скоротити час виділення *T. verrucosum*  удвічі. Запропоновано спосіб довготривалого зберігання культур грибів дерматофітів, який дає змогу підвищити кількість життєздатних мікроконідій на 6–8 %, збільшити енергію росту та забезпечує життєздатність культур дерматофітів протягом 2 років в умовах зберігання за кімнатної температури.

Вивчено культурально-морфологічні та біологічні властивості виділених збудників трихофітії та шляхом цілеспрямованої селекції підібрані виробничі вакцинні й контрольні вірулентні штами трихофітонів, розроблено середовища для їх культивування та ліофілізації. Розроблене захисне середовище, що містить макро- і мікроелементи, пептон, сахарозу і желатину забезпечує збереженість мікроконідій до 90 % і дозволяє отримувати високоякісну вакцину. Розроблено спосіб виготовлення вакцини проти трихофітії великої рогатої худоби бівалентної, живої, сухої, концентрованої та вивчено нешкідливість, імуногенну й терапевтичну активність даного препарату в експериментах на лабораторних і продуктивних тваринах, а також в умовах виробництва на продуктивних тваринах. Застосування препарату індукує формування напруженого імунітету у 80–100 % тварин за 100 % захворювання контрольних тварин і не спричиняє ускладнень та імуносупресивної дії. Вакцина має лікувальні властивості за трихофітії великої рогатої худоби, що дозволяє у 78–100 % випадків упродовж 3–6 тижнів (залежно від тяжкості перебігу) виліковувати тварин.

**Ключові слова**: трихофітія, трихофітони, гриби дерматофіти, штами, вакцина, специфічна профілактика, терапевтична дія, імунітет.

**Скрыпник В.Г. Трихофития крупного рогатого скота (этиологическая структура, диагностика, селекция штаммов и разработка бивалентной вакцины). – Рукопись.**

*Диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология. ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», Харьков, 2007.*

Диссертация посвящена изучению этиологической структуры, биологических особенностей возбудителя и разработке средств профилактики и терапии трихофитии крупного рогатого скота. Проведено изучение эпизоотической ситуации по трихофитии КРС в Украине за   
1996–2006 годы, изучена этиологическая структура этого заболевания. Установлено, что трихофития крупного рогатого скота в Украине вызывается двумя возбудителями – *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes*. При этом *T. verrucosum* вызывал заболевание в 75,9 % случаев, *T. mentagrophytes –* в 13,8 %, и их ассоциация – в 10,3 % случаев.

Определено, что заболевание проявляется как энзоотия на молочно-товарных фермах и фермах по откорму животных всех форм собственности.

В обследованных хозяйствах клинические признаки заболевания регистрировались практически круглый год, но наиболее интенсивно заболевание регистрировалось у животных в зимне-весенний период, особенно в феврале–апреле. Заболевание регистрировали преимущественно у телят возрастом 2–6 месяцев (84,0 %). Наименьшее количество животных заболевало в возрасте до двух месяцев и старше 2-х лет. Обнаружено, что клинические признаки заболевания трихофитией у крупного рогатого скота возникали и у животных, привитых живыми вакцинами ЛТФ-130 и "Триховак" в рекомендованных дозах.

При изучении клинических признаков заболевания трихофитией крупного рогатого скота выявлено дессиминированную, пятнистую и атипичную формы заболевания. Наиболее распространенной была пятнистая форма – 69,9 % от количества больных животных. Дессиминированная форма трихофитии регистрировалась в 17,7 % случаев. У взрослых животных (2,7 %), а также у значительного количества телят (10 %) выявляли признаки заболевания, характерные для атипичной формы течения заболевания.

Проведено усовершенствование лабораторной диагностики дерматомикозов животных, что позволило на 37 % повысить эффективность выделения культур трихофитонов и сократить время выделения *T. verrucosum*  в два раза. Разработан способ длительного сохранения культур грибов дерматофитов, который дает возможность повысить количество жизнеспособных микроконидий на 6–8 %, повышает энергию роста культур и обеспечивает жизнеспособность культур дерматофитов на протяжении 2 лет при хранении их в комнатных условиях.

Изучены культурально-морфологические и биологические свойства выделенных культур возбудителей трихофитии. Установлено, что большинство культур *T. verrucosum* отличались от классически описанных форм скоростью роста (прорастали на 5–7 сутки) и формой роста (имели воздушно-субстратный мицелий). И только незначительное количество культур отвечали классическому образцу, были длительно растущими (рост появлялся на 10 день и позже) и имели кожистые колонии, глубоко врастающие в агар. Путем целенаправленной селекции подобраны производственные вакцинные и контрольные вирулентные штаммы трихофитонов.

Использование для выращивания грибов модифицированной питательной среды позволило сократить сроки выращивания культур на 3–5 дней при более интенсивном спороношении. Так, рост колоний *T. verrucosum* появлялся на 2 дня раньше, чем на общепринятой среде сусло-агар. Образование микроконидий на культуре гриба зарегистрировано на 3 дня раньше, чем на сусло-агаре. Количество микроконидий через 2 недели культивирования на модифицированной среде было на 21,8 % больше, чем на сусло-агаре. Использование при лиофилизации защитной среды, имеющей в своем составе макро- и микроэлементы, пептон, сахарозу и желатин, обеспечивает сохранность микроконидий до 90 % и позволяет получать вакцину высокого качества. Разработан спрособ изготовления вакцины против трихофитии крупного рогатого скота бивалентной, живой, сухой, концентрированной. В опытах на лабораторных и продуктивных животных изучена ее безвредность, иммуногенная и терапевтическая активность. Использование данного препарата вызывает формирование напряженого иммунитета в 80–100 % лабораторных животных и 95–100 % у крупного рогатого скота при 100 % заболевании контрольных животных. Вакцина вызывает накопление агглютининов до 8,49±0,97 lоg2, увеличение количества иммуноглобулинов на 13–20 %, возрастание ЦИК на 17 % и активности лизоцима на 34 % по сравнению с контролем. При этом препарат не обладает иммуносупрессивным действием и не вызывает осложнений.

Лечебные свойства вакцины при трихофитии крупного рогатого скота, позволяют в 78–100 % случав на протяжении 3–6 недель (в зависимости от тяжести клинических проявлений) вылечивать животных.

**Ключевые слова**: трихофития, трихофитоны, грибы дерматофиты, штаммы, вакцина, специфическая профилактика, терапевтический эффект, иммунитет.

**Skrypnyk V.G. Bovine ringworm (etiological structure, diagnostics, strain selection, development of bivalent vaccine). – Manuscript.**

*Thesis for scientific degree of the Doctor of Veterinary Sciences, speciality 16.00.03 – Veterinary Microbiology and Virology. National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, 2007.*

The thesis is devoted to studying the etiology, biological characteristics of cattle ringworm infection agent and developing of the tool for its prophylaxis and therapy.

Epizootic situation on cattle ringworm in Ukraine in 1996–2006 was studied; the etiology of the disease was identified. The laboratory diagnostics of animal dermatomycosis was improved, which enabled the increase of the trychophyton culture isolation effectiveness on 37 % and the time of *T. verrucosum* isolation was also shortened in two times. The method for long-term storage of dermatophyte fungus culture was offered, which enabled the increase of the amount of viable microconidia on 6–8 %, the increase of the growth energy and assure the dermatophyte culture viability during 2–3 years at room temperature storage.

The cultural-morphological and biological properties of the isolated trychophytons were studied. By means of teleological selection the industrial and control strains of the trychophytons, media for their cultivation along with lyophilization were selected. Developed protective medium which contains macro- and microelements, peptone, saccharose and gelatin assures preservation of microconidia to 90 % and allows to derive the vaccine of high quality.

The method of production of the concentrated alive dry bivalent vaccine against cattle ringworm was developed. The harmlessness, immunogenic and therapeutical activity of this vaccine were studied not only in the experiments on laboratory and productive animals and also in the natural conditions on productive animals. Vaccine application induces forming of the expressed immunity in   
80–100 % vaccinated animals while 100 % control animals shown clinically manifested disease. In the same time vaccine causes neither complications nor immunosupression activity. The vaccine has therapeutical properties that allow to heal animals from cattle ringworm in 80–100 % cases during 3–6 weeks (depends on the severity of the clinical manifestations)

**Key words:** trichophytosis, trichophytons, dermatophyte fungi, strains, vaccine, specific prophylaxis, immunity, therapeutical activity.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>