

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ САРАТОВСКИЙ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

На правах рукописи

**Богоутдинов Наиль Шамильевич**

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ  
ПРОТИВ АКТИНОМИКОЗА  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.02.03 – микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители: доктор ветеринарных наук,  
Ласкавый Владислав Николаевич  
доктор медицинских наук, профессор  
Федорова Валентина Анатольевна

Саратов – 2014

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |    |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ.....   | 5  |
| ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ  |    |
| ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ БИОТЕХНОЛОГИИ ВАКЦИН ДЛЯ<br>ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ.....   | 14 |
| ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ АКТИНОМИКОЗА<br>СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ.....  | 26 |
| СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  |    |
| ГЛАВА 3. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ..   | 40 |
| 3.1. Получение и характеристика штаммов-продуцентов для<br>приготовления экспериментальной серии терапевтической вакцины<br>против актиномикоза крупного рогатого скота.....    | 40 |
| 3.2. Методика приготовления экспериментальной серии вакцины<br>для лечения и профилактики актиномикоза крупного рогатого<br>скота.....  | 41 |
| 3.3. Лабораторные животные.....   | 41 |
| 3.4. Сельскохозяйственные животные.....   | 42 |
| 3.5. Реактивы и растворы.....   | 42 |
| 3.6. Оборудование и приборы.....  | 43 |
| 3.7. Биохимические и иммунологические методы исследования.....  | 44 |
| 3.8. Статистическая обработка.....  | 46 |
| ГЛАВА 4. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ<br>И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА<br>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СЕРИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ<br>АКТИНОМИКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА..... | 47 |
| 4.1. Выделение и идентификация штаммов <i>Actinomyces bovis</i> из<br>актиномикомы больных нетелей .....  | 48 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2. Изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств изолированных культур <i>Actinomyces bovis</i> NV-01, <i>Actinomyces bovis</i> 02 и <i>Actinomyces bovis</i> 03 и их дифференциация с другими видами рода <i>Actinomyces</i> ..... | 59 |
| ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕЖИМОВ ВЫРАЩИВАНИЯ ШТАММА – ПРОДУЦЕНТА А. <i>BOVIS</i> NV-01 И ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОЙ АНТИГЕННОЙ КОМПОЗИЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ АКТИНОМИКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА..... | 66 |
| 5.1. Разработка способа получения эффективной антигенной композиции экспериментальной серии терапевтической актиномикозной вакцины методом замораживания-оттаивания.....  | 68 |
| 5.2. Разработка способа получения эффективной антигенной композиции экспериментальной серии терапевтической актиномикозной вакцины методом ультразвуковой дезинтеграции.....  | 71 |
| 5.3. Изучение лечебного действия экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины на животных в производственных условиях.....  | 76 |
| 5.4. Изучение профилактического действия экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины на крупном рогатом скоте.....   | 83 |
| ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СЕРИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ (ЭС-42) НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТОК КРОВИ ЖИВОТНЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ.....  | 85 |
| 6.1. Изучение влияния ЭС-42 на биохимические показатели сывороток крови морских свинок.....   | 86 |
| 6.2. Изучение влияния ЭС-42 на биохимические показатели   |    |

|  |     |
|--|-----|
| сывороток крови крупного рогатого скота.....   | 89  |
| 6.3. Изучение влияния ЭС-42 на иммунологические показатели сывороток крови морских свинок.....               | 94  |
| 6.4. Изучение влияния ЭС-42 на иммунологические показатели сывороток крови крупного рогатого скота.....      | 96  |
| ГЛАВА 7. ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СЕРИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ (ЭС-42)..... | 101 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....  | 110 |
| ВЫВОДЫ.....  | 120 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....  | 122 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....   | 123 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ.....  | 152 |

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Одной из актуальных и приоритетных задач современной сельскохозяйственной науки является повышение продуктивности животных и увеличение количества и качества животноводческой продукции. Этому в значительной степени препятствует высокий уровень заболеваемости и гибели животных от инфекционных заболеваний.

В настоящее время в Российской Федерации ветеринарная служба добилась значительных успехов в ликвидации многих инфекционных заболеваний, однако некоторые из них продолжают причинять значительный ущерб животноводству. Одним из таких заболеваний является актиномикоз крупного рогатого скота (КРС).

Актиномикоз относится к хроническим инфекционным болезням, сопровождающимся образованием гранулематозных очагов - актиномиком, в различных тканях и органах, а также образованием абсцессов или свищей. Возбудителем актиномикоза считают бактерию *Actinomyces bovis* семейства *Actinomycetaceae* (Берджи, 1980, 1997; Сидоров и др., 1995; Васильев и др., 2000; Колычев, Ощепков, 2001; Зубков, 2005; Зыкин, Хапцев, 2006, 2011).

Широта распространения актиномикоза в различных странах мира, и, следовательно, необходимость сохранения поголовья животных от вынужденного убоя, определяет актуальность разработки эффективных методов лечения и профилактики этого заболевания (Спесивцева, 1964; Аскеров, 1977). За последние 5 лет заболеваемость КРС актиномикозом в Казахстане и Средней Азии официально определялась в пределах 3,57%. В среднем в хозяйствах Украины зарегистрировано от 0,9 до 2,9% случаев этого заболевания. По результатам информационно-аналитического центра Россельхознадзора при содействии ФГУ «Центр ветеринарии» и «Роспотребнадзора» в РФ заболеваемость актиномикозом КРС за 2010 год

составляла до 0,35 % от общего числа инфекционных заболеваний, за 2011 год - около 0,24 % (Дудников и др., 2010, 2012), а в отдельных регионах достигла 10,3 - 41,4% (Ильченко и др., 2009).

**Степень разработанности проблемы.** В связи с тем, что специфические средства профилактики актиномикоза у КРС не разработаны, основное место в ликвидации этого заболевания занимает лечение. Между тем применяемые для этого в настоящее время лекарственные препараты на основе йодсодержащих, растительных компонентов или антибиотики широкого спектра действия являются малоэффективными, зачастую дорогостоящими, требуют довольно продолжительного периода лечения и не всегда обеспечивают желаемый результат (Маминов, Алпатов, 1975; Аскеров, 1977; Колычев, Ощепков, 2001; Кузнецов, 2001, 2002). Это диктует необходимость качественно нового подхода к лечению и профилактике этого заболевания.

Одним из перспективных направлений в решении этих задач является создание нового, более доступного, экономически выгодного и высокоэффективного препарата, который может быть использован, как для лечения, так и для профилактики актиномикоза КРС. Наличие такого препарата у ветеринарных врачей, несомненно, позволило бы значительно снизить экономический ущерб в хозяйствах, складывающийся из снижения прироста и ухудшения качества получаемой продукции, а также высоких затрат на лечение больных актиномикозом животных.

Известно, что традиционные вакцины хорошо зарекомендовали себя и широко используются в животноводстве для профилактики ряда инфекционных заболеваний, но, однако, не обладают при этом лечебным эффектом. Вместе с тем в последние годы сообщается о появлении нового направления в биотехнологии – создании терапевтических вакцин, которые могут эффективно применяться как для лечения, так и для профилактики заболеваний. В первую очередь, это химические вакцины на основе компонентов, извлеченных из микробной клетки и обладающих

иммуногенной активностью (Глик, Пастернак, 2002; Crawford, Clark, 1986; Hunter et al., 1990; Ding et al., 1998; Nolte et al., 2001; Gröschel et al., 2014). Следует отметить, что разработка эффективных профилактических и терапевтических вакцинных препаратов для лечения и профилактики инфекционных заболеваний относится к приоритетным направлениям развития науки в РФ и входит в перечень критических технологий (Указ Президента Российской Федерации № 899). Показано, что эффективность терапевтических вакцин связана с активацией Т-клеточно-опосредованного иммунитета по типу Th1 (Tu et al., 2014; Wengerter et al., 2014). Однако малоизвестно о влиянии таких вакцин на основные показатели гомеостаза макроорганизма.

**Цель работы** - разработка основных биотехнологических этапов и апробация на лабораторных и сельскохозяйственных животных экспериментальной серии терапевтической вакцины для лечения и профилактики актиномикоза крупного рогатого скота и оценка ее экономической эффективности.

**Задачи исследования:**

1. Отобрать штамм-продуцент, пригодный для дальнейшего приготовления экспериментальной серии терапевтической вакцины, из клинических изолятов культур *A. bovis*, выделенных из патологического материала КРС, больных актиномикозом.
2. Разработать и оптимизировать основные биотехнологические этапы получения протективного антигена из биомассы штамма *A. bovis* – продуцента экспериментальной актиномикозной терапевтической вакцины.
3. Разработать оптимальные способы приготовления экспериментальной серии терапевтической вакцины из биомассы штамма-продуцента *A. bovis* с применением методов замораживания-оттаивания и дезинтеграции ультразвуком.

4. Определить биохимический состав экспериментальной серии терапевтической вакцины против актиномикоза КРС, в частности, количество белка и липидов (холестерина и триглицеридов).
5. Оценить лечебные и профилактические свойства разработанного препарата на биомоделях и сельскохозяйственных животных, а также обосновать перспективу его использования в качестве экспериментальной вакцины против актиномикоза КРС.
6. Исследовать биохимические и иммунологические показатели крови у лабораторных и сельскохозяйственных животных после введения экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины.
7. Оценить экономическую эффективность экспериментальной серии препарата в комплексе ветеринарно-санитарных мероприятий в производственных условиях.

**Научная новизна.** Впервые на основе протективных компонентов *A. bovis* нами разработан экспериментальный препарат, обладающий одновременно лечебным и профилактическим действием против актиномикоза КРС.

Оптимизированы условия выращивания штамма-продуцента *A. bovis* NV-01. Предложен способ приготовления экспериментальной серии терапевтической вакцины (ЭС-42) против актиномикоза крупного рогатого скота из биомассы указанного штамма методом замораживания-оттаивания и ультразвуковой дезинтеграции. В составе ЭС-42 вакцины обнаружено присутствие доминантного белка с молекулярной массой 20 кДа и несколько минорных белков с молекулярной массой от 60 до 90 кДа.

Введение ЭС-42 морским свинкам, инфицированным *A. bovis* NV-01 (в модельной актиномикозной инфекции), приводило к снижению в 1,5 и 2,2 раза основных биохимических параметров макроорганизма (соответственно, АЛТ и АСТ) в сторону физиологической нормы. При этом у животных наблюдалась тенденция к повышению количества В-лимфоцитов и общего



числа лимфоцитов с восстановлением их процентного соотношения до нормальных значений.

Установлено, что у больных актиномикозом КРС после обработки ЭС-42 вакцины в сыворотке крови достоверно ( $p < 0,05$ ) возрастали (в 1,5 раза) такие показатели, как активность АСТ, АЛТ, КК (креатинкиназа), а также концентрация глюкозы. Зарегистрировано также повышение относительного процентного соотношения и абсолютного количества  $L_0$  (нулевых лимфоцитов) у больных и интактных животных, иммунизированных для профилактики актиномикоза, и достоверное снижение их количества до уровня показателей, соответствующих контрольным животным ( $22 \pm 2,3$  % от общего числа лимфоцитов).

При изучении биохимических и иммунологических показателей сывороток крови выявлена способность ЭС-42 вакцины вызывать нормализацию обменных процессов у обработанных данным препаратом лабораторных и сельскохозяйственных животных.

**Практическая значимость работы.** Разработана биотехнология приготовления экспериментальной терапевтической вакцины против актиномикоза сельскохозяйственных животных, которая обладает терапевтическим и профилактическим эффектом в отношении телят и нетелей с актиномикозом не более 12 см, является удобной в применении, не требует длительных сроков лечения, не вызывает побочных эффектов и повышает резистентность животных к возбудителю актиномикоза. Экспериментальная серия вакцины была успешно испытана в колхозе «Победа» Красноармейского района и СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области, что подтверждается актом об эффективности ее применения от 10 ноября 2010 г. Получен патент на изобретение № 2378001 («Средство для лечения актиномикоза крупного рогатого скота»). Экспериментальная серия вакцины технологична (может быть приготовлена на биофабриках), предохраняет от заболевания актиномикозом в неблагополучных хозяйствах и не менее чем на 85%

снижает выбытие животных, находящихся на первой и в начале второй стадии развития болезни. В результате комплексного изучения безвредности, иммунологических и биохимических показателей крови лабораторных и сельскохозяйственных животных, обработанных ЭС-42 вакцины, и визуальных наблюдений за КРС обоснована перспектива использования штамма *A. bovis* NV-01 в качестве продуцента экспериментальной актиномикозной терапевтической вакцины.

По материалам диссертационной работы разработаны «Методические рекомендации по применению лечебно-профилактического препарата из культуры *Actinomyces bovis* против актиномикоза крупного рогатого скота» (в соавторстве с Ласкавым В.Н., Панферовым В.И., 2012), которые одобрены Ученым советом ГНУ Саратовский НИВИ Россельхозакадемии № 3 от 18.10.2011 г. и утверждены 18.11.2011 г.).

**Методология и методы исследования.** При проведении исследования и изложения материала автором были применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описания, измерения и сравнительно-сопоставительного анализа. Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволили обеспечить объективность полученных выводов и результатов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Разработаны основные этапы биотехнологии приготовления экспериментальной терапевтической вакцины против актиномикоза КРС.
2. Штамм-продуцент из клинических изолятов культур *A. bovis* NV-01, выделенный из патологического материала КРС, больных актиномикозом, является пригодным для приготовления экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины.
3. Разработаны оптимальные способы получения протективных компонентов из штамма-продуцента *A. bovis* NV-01 методом замораживания-оттаивания и ультразвуковой дезинтеграции.

4. Биохимический состав экспериментальной серии терапевтической актиномикозной вакцины представлен белками (1,1-1,3 мг/мл) и липидами (холестерин и триглицериды, 0,25-0,3 мМ/л и 0,9-1,0 мМ/л, соответственно).
5. Введение экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины с лечебной и профилактической целью приводит к гармонизации биохимических и иммунологических показателей в организме лабораторных и сельскохозяйственных животных.
6. Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий после введения экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины (ЭС-42) КРС в производственных условиях позволяет сохранить денежные средства на каждый рубль ветеринарных затрат в размере 5,7 рубля.

**Работа выполнена** на базе ГНУ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт Россельхозакадемии в рамках «Программы фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научному обеспечению развития агропромышленного комплекса Российской Федерации на 2006 - 2010 годы» по проблеме 08 отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии «Разработать новые и усовершенствовать существующие методы, средства, технику и технологии экспресс-диагностики, лечения и профилактики болезней животных, прогнозирования их возникновения и распространения, обеспечивающие сохранение ветеринарного благополучия, получение продуктов и сырья животного происхождения высокого санитарного качества и охрану окружающей среды» и в рамках «Плана фундаментальных и приоритетных прикладных исследований Россельхозакадемии по научному обеспечению развития АПК Российской Федерации на 2011 - 2015 годы».

**Апробация результатов исследования.** Материалы диссертации представлены на: Всероссийской научно-практической конференции «Современные проблемы и перспективы развития ветеринарной медицины» (Саратов, 2007); Всероссийской научно-практической конференции «Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы на

основе инновационных достижений» (Новочеркасск, 2009); Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарии и животноводства» (Самара, 2010); Международной научно-практической конференции «Современные проблемы диагностики, лечения и профилактики болезней животных и птиц» (Екатеринбург, 2010); Шестом Саратовском салоне изобретений, инноваций и инвестиций Министерства промышленности и энергетики Саратовской области в секции «Животноводство и ветеринария» на «Лучший молодежный проект» (Саратов, 2011); Региональной научно-практической межвузовской конференции «Достижения современной науки и практики в области охраны здоровья животных и человека» (Самара, 2011); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной ветеринарии» (Краснодар, 2011); Международной научно-практической конференции «Экологические проблемы использования природных и биологических ресурсов в сельском хозяйстве» (Екатеринбург, 2012); Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы интеграции ветеринарной науки и практики в современных условиях» (Махачкала, 2012).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 12 работ, в том числе, 2 в рецензируемых научных журналах и один патент.

**Личный вклад автора.** Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, получении и систематизации данных, в апробации результатов исследования. Соискателем лично проведен статистический анализ полученных данных, сформулированы основные положения диссертации, составляющие ее новизну и практическую значимость, подготовлены публикации.

**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из: введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих описание объектов, материалов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация

изложена на 158 страницах, содержит 17 таблиц и 17 рисунков. Список литературы включает 271 работ, в том числе 211 отечественных и 60 иностранных авторов.

**ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ БИОТЕХНОЛОГИИ ВАКЦИН ДЛЯ  
ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ**

Биопрепараты для профилактики заболеваний получают с использованием живых биологических систем, тканей организмов и их производных, с использованием средств биотехнологии. Биотехнология - это наука, изучающая возможности применения живых организмов, их систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач, направленных на улучшение качества жизни людей или на создание лекарств и товаров в различных отраслях сельского хозяйства, медицине и ветеринарии, а также возможности создания живых организмов с необходимыми свойствами методом геной инженерии (Емцев, 1986; Сассон, 1987; Блинов, 1996, 2003, 2004; Глик, Пастернак, 2002)

Корни биотехнологии уходят в далёкое прошлое и связаны с хлебопечением, виноделием и другими способами приготовления пищи, известными человеку еще в древности. Например, такой биотехнологический процесс, как брожение с участием микроорганизмов, был известен и широко применялся еще в древнем Вавилоне, о чем свидетельствует описание приготовления пива, дошедшее до нас в виде записи на дощечке, обнаруженной в 1981 г. при раскопках Вавилона (Канаев, 2000; Глик, Пастернак, 2002).

Термин «биотехнология» был предложен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эреки, биотехнология – это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты» (Bird, Walker, 1991; Глик, Пастернак, 2002). Такие выдающиеся

отечественные ученые как Ценковский Л.С., С.Н. Вышелесский, М.В. Лихачев, Н.Н. Гинзбург, С.Г. Колесов, Я.Р. Коляков, Р.В. Петров, В.В. Кафаров и др. внесли неоценимый вклад в развитие биотехнологии (Канаев, 2000).

В начале XX века активно развивалась бродильная и микробиологическая промышленность. В это же время были предприняты первые попытки наладить производство антибиотиков, пищевых концентратов, полученных из дрожжей, осуществить контроль ферментации продуктов растительного и животного происхождения (Егоров, Самуилов, 1987; Глик, Пастернак, 2002).

До 1971 года термин «биотехнология» использовался, большей частью, в пищевой промышленности и сельском хозяйстве. С 1970 года учёные используют термин в применении к лабораторным методам, таким, как использование рекомбинантной ДНК и культур клеток, выращиваемых *in vitro* (Chaudhary et al., 1988; Chamow, Ashkenazi, 1996; Блинов, 2007).

Современная биотехнология зародилась в 70-х годах прошлого столетия и дала толчок к развитию промышленных биотехнологических предприятий в начале 80-х прошлого столетия, которые сейчас выросли в успешные биотехнологические гиганты (Genentech, Biogen, Amgen, Chiron и др.). Современные биотехнологии изготовления биопрепаратов основаны главным образом на культивировании микроорганизмов (бактерий и микроскопических грибов), животных и растительных клеток, методах генной инженерии.

Целью биотехнологических исследований является поиск микроорганизмов, с помощью которых можно получить нужные вещества (вакцины и лекарственные препараты, диагностические средства, пищевые добавки и т.д.) (Bud, 1991). Так, биотехнология представляет индустрию, в которой можно выделить основную отрасль – это производство лечебно-профилактических и диагностических препаратов (вакцин, сывороток, антигенов, аллергенов, интерферонов, антибиотиков и др.) (Глик, Пастернак, 2002).

Широкое проникновение биотехнологий в экономику мирового хозяйства нашло свое отражение и в том, что сформировались даже новые термины для обозначения глобальности данного процесса. Биотехнология способна играть существенную роль в улучшении качества жизни и здоровья не только человека, но и животных, обеспечении экономического и социального роста государств (особенно в развивающихся странах) (Глик, Пастернак, 2002).

Следует заметить, что около 90% всех приложений биотехнологии относятся к медицине, ветеринарии и здравоохранению. Около 385 миллионов человек во всем мире получают лечение более чем 130 лекарственными препаратами, созданными на основе фундаментальных научных исследований в области биотехнологии. Следует заметить, что более 50% лекарственных препаратов, которые мы применяем в настоящее время, открыты за счет фундаментальных научных исследований в области биотехнологии. Несколько сотен лекарственных препаратов находятся в более ранних стадиях научных разработок. Проведение фундаментальных исследований позволяют разрабатывать сотни ветеринарных тестов, которые помогают в диагностике заболеваний, а также создавать профилактические средства против таких опасных болезней, как сибирская язва, чума крупного рогатого скота, бешенство, ящур (Глик, Пастернак, 2002) .

Законом Российской Федерации «О ветеринарии» определены основные задачи ветеринарной медицины «в области научных знаний и практической деятельности, направленные на предупреждение болезней животных и их лечение, выпуск полноценных и безопасных в ветеринарном отношении продуктов животноводства и защиту населения от болезней, общих для человека и животных». Решение целого ряда этих задач осуществляется методами биотехнологии (Козлов, 2011).

Ветеринарная биотехнология использует микроорганизмы и вирусы, которые в процессе своей жизнедеятельности вырабатывают естественным путем необходимые нам вещества - витамины, ферменты, аминокислоты,



органические кислоты, спирты, антибиотики и др. биологически активные соединения (Глик, Пастернак, 2002).

За последние 20 лет ветеринарная биотехнология, благодаря своим специфическим преимуществам перед другими науками, совершила решительный прорыв на промышленный уровень, что в немалой степени обязано также развитию новых методов исследований и интенсификации процессов, открывших ранее неизвестные возможности в получении биопрепаратов, способов выделения, идентификации и очистки биологически активных веществ.

Ветеринарная биотехнология начала развиваться в конце XIX века, когда в 1879 Луи Пастер разработал первую профилактическую вакцину для использования на животных – вакцину против куриной холеры (Joseph, 2011; Поль де К., 2012). Эта разработка стала важным шагом в использовании биотехнологических методов в ветеринарии, открывая новое прикладное направление в микробиологии, связанное с приготовлением специфических средств профилактики для животных (Борисов, 2005). Применение данных препаратов способствовало оздоровлению поголовья животных, повышению их продуктивности, а также позволило в определенной степени уменьшить риск заражения человека зооантропонозными инфекциями.

В 1859 г. Л. Пастер приготовил жидкую питательную среду, Р. Кох в 1881 г. предложил метод культивирования бактерий на стерильных ломтиках картофеля и на агаризованных питательных средах. И, как следствие этого, удалось доказать индивидуальность микробов и получить их чистые культуры (Поль де К., 2012).

Толчком к развитию ветеринарной биотехнологии в России стала необходимость создания профилактических и терапевтических средств против таких болезней как сибирская язва, чума крупного рогатого скота, бешенство, ящур, сап, которые вызывали повальные эпидемии и наносили значительный ущерб животноводству (Коляков, 1952; Коленько, 1963). В конце XIX в. ежегодно от сибирской язвы гибло более 50 тыс. животных и 20 тыс. людей. За 1881 -

1906 г. от чумы пало 3,5 млн. коров. Значительный ущерб наносил сап, от которого гибло конское поголовье и люди (Коляков, 1952).

Разработка и применение профилактических препаратов против указанных выше особо опасных инфекционных заболеваний позволило предупредить их распространение путем создания у здоровых животных и людей активного иммунитета к конкретным возбудителям инфекций. Более чем за вековую историю практического применения, данные вакцины хорошо зарекомендовали себя и до настоящего времени широко используются в животноводстве для профилактики опасных заразных заболеваний, как в нашей стране, так и за рубежом (Bud, 1991; Глик, Пастернак, 2002; Poland et al., 2002). Успехи отечественной ветеринарной науки и практики в проведении специфической профилактики инфекционных болезней связаны с крупными научными открытиями, сделанными в конце XIX и начале XX столетий. Это касалось разработки и внедрения в ветеринарную практику профилактических и диагностических препаратов при карантинных и особо опасных болезнях животных (вакцины против сибирской язвы, чумы, бешенства, аллергенов для диагностики туберкулеза, бруцеллеза, сапа и др.). Была научно доказана возможность приготовления лечебных и диагностических гипериммунных сывороток (Buddle et al., 2013).

Для решения поставленных задач ветеринарной службой во взаимодействии с органами власти различных уровней и хозяйствующими субъектами на территории Российской Федерации реализуется система мер по предупреждению сибирской язвы, бешенства, туберкулеза, бруцеллеза, классической и африканской чумы свиней, ящура и других карантинных, особо опасных и социально значимых заболеваний сельскохозяйственных животных (Козлов, 2011).

Так, например, для специфической профилактики бруцеллеза выпускаются живые сухие вакцины из штамма *B. abortus* 19, 82 и 75/79-AB; инактивированный адъювант – вакцину из штамма *B. abortus* KB 17/100. По данным К. В. Шумилова, до 1952 года борьба с бруцеллезом крупного

рогатого скота в нашей стране сводилась к проведению диагностических исследований и удалению из стад больных животных, без применения противобруцеллезных вакцин. В связи с осложнением эпизоотической ситуации в 1953 году в систему противобруцеллезных мероприятий была включена иммунизация животных вакциной из штамма *B. abortus* 19 ВА. Вакцину из штамма *B. abortus* 19 ВА применяли до 1970 года. За 20 лет применения вакцины многие хозяйства, даже области, были оздоровлены от болезни. В 1974 году стали применять вакцину со штаммом *B. abortus* 82. Эта вакцина по-прежнему остается наиболее широко и успешно используемой во многих регионах России (Haas, 1990; Treanor, 2010; Ivanov, 2011; Козлов, 2011).

В целях предупреждения сибирской язвы ветеринарной службой в Саратовской области ежегодно подвергается профилактической вакцинации (вакцина против сибирской язвы животных из штамма 55) и ревакцинации против данного заболевания около 2,0 миллионов голов сельскохозяйственных животных (Козлов, 2011).

Учитывая сохраняющийся высокий риск распространения бешенства, принимаются меры по защите животных и населения от данного заболевания. В этих целях проводится профилактическая вакцинация против бешенства сельскохозяйственных и домашних животных.

Также разработана вакцина против некробактериоза крупного и мелкого рогатого скота, которая успешно применяется в животноводческих хозяйствах Российской Федерации (Белов, 2000). Учитывая описанное выше, исследователи продолжают изыскание и совершенствование живых и убитых (инактивированных корпускулярных, химических) вакцин. Несмотря на обширные исследования в области разработки химических средств иммунопрофилактики против различных болезней человека и животных, они пока не увенчались практическим внедрением препаратов в ветеринарную и медицинскую практику, а лишь определили перспективы дальнейших работ в этом направлении. Таким образом, на современном этапе научные

исследования и ветеринарная практика показывают, что необходимо расширить круг по разработке более эффективных средств специфической профилактики по различным инфекционным заболеваниям.

Сегодня термином вакцина принято называть медицинский препарат, предназначенный для выработки иммунитета к инфекционным болезням. Вакцина изготавливается из ослабленных или убитых микроорганизмов, продуктов их жизнедеятельности, или из их антигенов, полученных генно-инженерным или химическим путем (Гинсбург, 1969).

Слово вакцина произошло от латинского «vassa», что в переводе на русский означает «корова». И это неслучайно, ведь первая вакцина получила свое название от слова vassinia (коровья оспа), поскольку именно эта вирусная болезнь крупного рогатого скота была широко распространена в Европе в XVIII в. В 1776 г английский врач Эдвард Дженнер впервые применил на мальчике Джеймсе Фиппсе вакцину против натуральной оспы, полученную из пузырьков на руке больного коровьей оспой. Спустя почти 100 лет, Луи Пастер сформулировал главный принцип вакцинации: «Применение ослабленных препаратов микроорганизмов для формирования иммунитета против вирулентных штаммов» (Глик, Пастернак, 2002). Согласно современным представлениям, вакцины – это специфические антигенные биопрепараты, полученные из микроорганизмов, их компонентов, продуктов жизнедеятельности и предназначенные для создания у здоровых животных и людей активного иммунитета к конкретным возбудителям инфекционных болезней (Белов, Ларионов, 2010).

На сегодняшний день различают следующие виды вакцин:

1. Живые вакцины изготавливают на основе живых ослабленных штаммов микроорганизмов со стойко закрепленной авирулентностью. Примером могут служить вакцины против полиомиелита, кори, свинки, краснухи или туберкулеза. Такие виды вакцин могут быть получены путем селекции (к примеру, БЦЖ и гриппозная вакцины). Они способны размножаться в организме и вызывать вакцинальный процесс, формируя невосприимчивость

к заболеванию (Гинсбург, 1969). В иммунологическом отношении живые вакцины считаются наиболее эффективными, и это позволяет использовать малые дозы препарата при однократной вакцинации. В то же время живые вакцины обладают относительно высокой пирогенностью и реактогенностью, которые выражаются в поствакцинальных осложнениях и реакциях у иммунизированных животных и людей (вакцины против сибирской язвы, бруцеллеза, чумы и рожи свиней, листериоза и др.). После введения живых вакцин непременным требованием является стойловое содержание животных с ежедневным клиническим осмотром после такой иммунизации, а также запрещается убой животных на мясо в течение 10-14 дней (Белов, Ларионов, 2010).

2. Инактивированные (убитые) вакцины в своем составе содержат умерщвленные компоненты микроорганизма (например, цельноклеточная вакцина против коклюша, инактивированная вакцина против бешенства, вакцина против вирусного гепатита А), их разрушают физическими (температура, радиация, ультрафиолетовый свет) или химическими (спирт, формальдегид) методами. Такие вакцины реактогенны и применяются редко (коклюшная в чистом виде, против гепатита А). Убитые вакцины вызывают в организме животных только иммунный процесс, ограничивающийся региональными органами иммунной системы, откуда генерализация этого процесса развивается медленно, неинтенсивно и вторично через клетки-посредники и цитокины лимфоидных клеток (Гинсбург, 1969; Белов, Ларионов, 2010).

3. Химические вакцины создаются из антигенных компонентов, извлеченных из микробной клетки. Эти вакцины в своем составе имеют компоненты клеточной стенки или других частей возбудителя. Выделяют те антигены, которые определяют иммуногенные характеристики микроорганизма. Например, в ацеллюлярной вакцине содержатся компоненты возбудителя коклюша; в конъюгированной вакцине – гемофильной инфекции и т.д. (Гинсбург, 1969).

4. Анатоксины – вакцины, содержащие инактивированный токсин или, иными словами, яд, продуцируемый бактериями. В результате такой обработки токсические свойства утрачиваются, но приобретаются иммуногенные качества. Примером могут служить вакцины против дифтерии и столбняка (Гинсбург, 1969).

5. Векторные (рекомбинантные) вакцины получают методами генной инженерии. При этом ген вирулентного микроорганизма, отвечающий за синтез протективных антигенов, встраивают в геном какого-либо безвредного микроорганизма, который при культивировании продуцирует и накапливает соответствующий антиген. Примером может служить рекомбинантная вакцина против вирусного гепатита В, вакцина против ротавирусной инфекции (Гинсбург, 1969).

6. Синтетические вакцины представляют собой искусственно созданные антигенные детерминанты микроорганизмов. Для получения хорошего иммунного ответа необходимо, чтобы синтетический антиген содержал не менее 8 аминокислотных остатков, хотя в структуру антигенной детерминанты могут входить 3 – 4 аминокислоты (Гинсбург, 1969).

7. Ассоциированные (поливалентные) – вакцины различных типов, содержащие несколько компонентов. Для приготовления ассоциированных вакцин обычно используют убитые микробы или их компоненты (Гинсбург, 1969). В ветеринарном законодательстве и в большинстве наставлений по применению вакцин, особенно реактогенных, настоятельно рекомендуется соблюдать перерыв между вакцинациями животных не менее месяца, а также не рекомендуется без обоснованных показаний использовать многокомпонентные (ассоциированные) вакцины (Белов, Ларионов, 2010).

8. Корпускулярные вакцины содержат ослабленные или убитые компоненты вириона (вирионы). Для умерщвления вириона обычно используют тепловую обработку или химические вещества (фенол, формалин, ацетон) (Гинсбург, 1969).

В связи с тем, что специфические средства профилактики для многих болезней животных не разработаны, то основное место в их ликвидации занимает лечение (Спесивцева, 1964). Между тем применяемые для этого в настоящее время лекарственные препараты зачастую являются малоэффективными. В условиях хозяйств такая терапия является дорогостоящей, не всегда дает желаемый результат и требует довольно продолжительного периода лечения (Липницкий и др., 1996; Кучерук, 1997, 1998; Лебедев, 2000; Кузнецов, 2001, 2002).

Как известно, традиционные вакцины хорошо зарекомендовали себя и широко используются в животноводстве для профилактики ряда инфекционных и вирусных заболеваний, однако не обладают при этом лечебным эффектом. Вместе с тем в последние годы сообщается о появлении нового направления в биотехнологии препаратов, связанного с разработкой терапевтических вакцин, которые могут эффективно применяться как для лечения, так и для профилактики заболеваний. В первую очередь, это химические вакцины на основе компонентов, извлеченных из микробной клетки, обладающих иммуногенной активностью (Глик, Пастернак, 2002; Ульянов, 2011; Crawford, Clark, 1986; Hunter, van der Lugt, Gouws, 1990; Ding, Lämmler, Vecht, 1998; Nolte et al., 2001). Основным преимуществом терапевтических вакцин является одновременная возможность индуцировать протективный иммунный ответ у больных животных, а также осуществлять лечебный эффект путем подавления или эрадикации уже существующего в организме инфекционного агента. Поэтому особую перспективу прогнозируют терапевтическим вакцинам при лечении хронических заболеваний, вызванных бактериями или вирусами (Глик, Пастернак, 2002; Ульянов, 2011). Обычные вакцины предназначены для предупреждения

болезни: прививку делают здоровому человеку, чтобы заранее «вооружить» организм средствами борьбы с инфекцией (исключение — разработанная Пастером вакцина против бешенства, которую применяют после укуса бешеным животным; ее эффективность объясняется длительным инкубационным периодом этого вирусного заболевания). Терапевтические вакцины нацелены на хронические заболевания, вызванные бактериями или вирусами (в частности, вирусами гепатитов В и С, вирусом папилломы, ВИЧ), опухоли (прежде всего меланому, рак молочной железы или прямой кишки), аллергические или аутоиммунные болезни (рассеянный склероз, диабет I типа, ревматоидный артрит) (Mandic, 2012; Anguille et al., 2012; Lazzeroni, Serrano, 2012; Buddle et al., 2013; Conrad, 2013; Palma et al., 2013; Barouch et al., 2013; Kan et al., 2013; Mukhopadhyay et al., 2013; Wang, Roden, 2013; Lim, 2014).

Активное применение и востребованность терапевтических вакцин для практического здравоохранения напрямую связано с их способностью вызывать как клеточный, так и гуморальный протективный иммунный ответ. Так, ведутся работы по созданию терапевтических вакцин против *Helicobacter pylori*, *Candida*, вирусов герпеса, папилломы человека и др. Наибольшие успехи достигнуты в разработке терапевтических вакцин против гепатита В. Исследователи работают над созданием терапевтических вакцин против меланомы, колоректального рака, лейкозов и других опухолей. Заболевания, связанные с патологической активацией иммунной системы, также можно предупреждать и лечить с помощью вакцин. Для развивающихся стран особенно актуальны проводящиеся исследования в области вакцинации против малярии, анкилостомоза, лихорадки Денге, шигеллеза, заболеваний, вызываемых энтеротоксигенными штаммами кишечной палочки (Poland et al., 2002).

Не вызывает сомнений, что в настоящее время появилась необходимость в создании терапевтических вакцин и для целей ветеринарной медицины. Очевидно, наличие в хозяйстве терапевтических вакцин будет



способствовать существенному снижению стоимости содержания животных, затрат на ветперсонал, а также повышению качества животноводческой продукции. Поэтому при наличии у ветеринарных специалистов соответствующих терапевтических вакцин будут созданы условия для своевременного проведения специфических лечебных мероприятий в животноводческом комплексе и недопущение массовой заболеваемости, так и падежа с/х животных и предотвращение экономического ущерба в результате снижения продуктивности животных. В XX веке успехи вакцинологии определялись, прежде всего, победами над очередной опасной инфекцией. С развитием все более новых инновационных подходов в биотехнологии производства вакцин постоянно расширяется и их разнообразие. Создание терапевтических вакцин, способных не только предотвратить потенциальное заболевание, но и защитить от уже развивающейся инфекции, благодаря своей уникальной способности, может привести к настоящей революции в биотехнологии вакцин. Есть надежда, что в XXI веке терапевтические вакцины помогут снизить заболеваемость многих инфекционных и неинфекционных болезней. Поэтому разработка препаратов для иммунотерапии заболеваний является на сегодняшний день перспективным направлением.

## ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ АКТИНОМИКОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Болезнь известна с конца 19 века, когда специалисты впервые обнаружили характерные для актиномикоза изменения в окаменелых челюстных костях носорога, жившего в третичном периоде. Как самостоятельная болезнь животных актиномикоз выделен более 100 лет назад и описан в различных ветеринарных руководствах. В 1877 немецкий ветеринар Otto Bollinger обнаружил, что хронические опухолеподобные поражения челюстей рогатого скота, о котором думали как своего рода саркоме, содержат маленькие, непрозрачные, желтоватые, зернистые частицы. Поскольку их структура походила на группу кристаллов, он назвал их "друзами". Друзы были образованы из похожих на нити, ветвящихся, грибоподобных структур, впоследствии охарактеризованных, как грамположительные. Ботаник Carl O Harz (1877) полагал, что это новый вид плесени и предложил родовое и видовое обозначение *A. bovis* (лучистые грибы, от греческого *aktis* - луч; *mykes* - гриб) в связи с поразительным лучевым расхождением нитей в гранулах. Он также впервые представил для этой болезни термин "актиномикоз".

Первое детальное описание подобных патологических состояний у человека было опубликовано берлинским хирургом Джеймсом Израэлом (Israel) в 1878. Приблизительно десятилетием позже было установлено, что *Actinomyces israelii* или *Actinomyces gerencseriae*, возбудители, вызывающие заболевание у человека, а *A. bovis* – у животных, являются анаэробами или, по крайней мере, факультативно анаэробными капнофилами – организмами, которые лучше растут при высоком содержании CO<sub>2</sub>. В отличие от грибов, актиномицеты не содержат в клеточной стенке хитина или целлюлозы, а сама она аналогична таковой у бактерий; не обладают способностью к фотосинтезу; образуемый ими мицелий достаточно примитивен (Васильев и др., 2000; Колычев, Ощепков, 2001). Они размножаются только бесполом

путем. С бактериями актиномицеты объединяют отсутствие четко выраженного ядра, чувствительность к бактериофагам и антибиотикам, а также способность к хорошему росту в слабощелочной (но не кислой) среде. Традиционно положение актиномицетов среди низших организмов обсуждалось в связи с их отношением к бактериям и грибам. В 20-х годах большинство авторов на основании изучения строения и развития актиномицетов отмечало их сходство с грибами (Красильников, 1941, 1952, 1965, 1970). Термин «лучистые грибки», предложенный за десятилетия до указанного периода, продолжал широко использоваться (Марков, 1956; Визнер, 1970; Орлов, 1974; Мари, 1980; Гарбуз, 1998). Начиная с 50-х годов, ни один исследователь не защищал мнения о том, что актиномицеты являются грибами. Ряд характерных признаков актиномицетов, таких как строение клетки и химический состав некоторых характерных ее компонентов, позволяют относить их к царству прокариот и считать одной из групп бактерий. Понятие «бактерия» здесь используется в широком смысле, как это делают Мюррей, Станиер и другие авторы (Берджи, 1980, 1997). В цитоплазме актиномицетной клетки, а иногда и в области нуклеоида часто наблюдаются мезосомы (внутрицитоплазматические мембранные системы); их рисунок и расположение в клетке сходны с таковыми у других грамположительных бактерий (Ryter, 1968). В гифах актиномицетов с различной частотой встречаются поперечные перегородки. По общему плану строения и путям формирования они аналогичны таковым у грамположительных бактерий (Ellar, 1967; Higgins, 1970). Таким образом, рассмотренные выше постоянные компоненты обычной клетки актиномицетов характеризуют их как грамположительные бактерии (Спесивцева, 1964; Georg et al., 1964; Берджи, 1980, 1997; Сидоров и др., 1995; Васильев и др., 2000; Колычев, Ощепков, 2001; Зубков, 2005; Зыкин, Хапцев, 2006, 2011), но все еще часто упоминающиеся просто как "актиномицеты". Только несколькими десятилетиями позже было установлено, что причинные агенты человеческого и "бычьего" актиномикоза

- отдельные разновидности, которые являются истинными, хотя и нитевидными, бактериями, а не грибами. Они были первыми представителями большой и гетерогенной группы бактерий, теперь принадлежащей к порядкам *Actinomycetales* и *Bifidobacteriales* подкласса *Actinobacteridae* в недавно определенном классе *Actinobacteria*. Так, Lignieres и Spitz еще в 1902 г. описали новую болезнь крупного рогатого скота в Аргентине, клинически и патологически напоминающую бычий актиномикоз. Организмы, культивированные из соответствующих повреждений, были крошечные, короткие грамотрецательные бактериальные палочки, которые заметно отличались от *A. bovis*. Из-за подобия между клиническими картинами из этих двух заболеваний возбудитель был сперва назван "актинобацилла", а затем официально обозначен как *Actinobacillus lignieresii* (Красильников, 1941, 1952, 1965, 1970; Спесивцева, 1964; Целищев и др., 1974; Тутов, Ромм, 1984; Тутов И.К., 1980, 1989, 1996; Мещеряков и др., 1989; Костенко и др., 1992).

Прежде, чем установили анаэробный характер возбудителей актиномикоза человека и животных, было предпринято много попыток вырастить микроорганизмы в аэробных условиях. В многочисленных исследованиях актиномикоза у крупного рогатого скота и человека Vostroem (1891) выделил на аэробном желатине или агаре нитевидные микроорганизмы, которые он расценил, как патогенные и которым он дал название "*Actinomyces bovis*". Он также наблюдал остья зерна в центре актиномикотических повреждений и выделил культурально аналогичные аэробные нитевидные микроорганизмы из травы, зерна и других растительных материалов. В связи с этим он заключил, что трава или зерно являются экзогенными источниками актиномикотической инфекции и что жевание травы или зерна могло вызывать актиномикотические повреждения. Эта версия сохранялась длительное время даже после исследований Naeslund (1925, 1931), доказавшего, что *A. israelii* входит в состав постоянной микрофлоры полости рта человека, которая не встречается в окружающей

среде, и, таким образом, источник актиномикоза всегда эндогенный (Спесивцева, 1964).

Актиномикоз является подострым или, скорее, хроническим гранулематозным заболеванием, которое обычно вызывает нагноение и формирование абсцесса, а также имеет тенденцию образовывать свищевые ходы. Заболевание встречается у животных и человека. В дополнение к классическим патогенам, таким, как *A. bovis* и *A. israelii*, актиномикотические поражения могут вызывать и другие виды ферментативных актиномицетов (*Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*). Кроме того, все типичные актиномикотические поражения, в дополнение к патогенным актиномицетам, содержат разнообразные бактерии. Таким образом, термин "актиномикоз" скорее определяет полиэтиологический воспалительный синдром, чем просто заболевание, относящееся к отдельному патогенному микроорганизму. Чтобы избежать дополнительных уточняющих терминов, было предложено обозначить группу близко связанных воспалительных процессов термином "актиномикозы" во множественном числе (Schaal, 1984, 1986).

Друзы лучистого грибка (историческое название) наблюдали уже в середине прошлого века у человека в кариозно измененных костях и абсцессах (Лангенбек, 1845; Леберт, 1848; Лабульбен, 1853), отчасти у крупного рогатого скота в пораженных челюстных костях (Давень, 1850; Ривольта, 1868, и другие), а также в так называемом «деревянном языке» (Хан, 1870). Первые описания включений (друзы грибка) в патологическом материале, взятом из поражений у крупного рогатого скота и человека, относятся к 1845-1871 гг. Изучением материала, полученного от животных, занимались Перрончито, Ривольта и др. Предположение о грибковой природе заболевания было впервые высказано Перрончито в 1863 г. Однако только Харц (1877), по предложению Боллингера, подробно исследовал друзы и установил их грибковую природу. Наименование грибка - *A. bovis* дал Харц (Harz), а название болезни-актиномикоз предложил Боллингер. Нокар

(Nocard, 1888), затем Афанасьев (1889) и Эппингер (Eppinger, 1891) тоже выделили аэробные формы актиномицетов. Гасперини (Gasperini, 1894) привел список 39 видов, описанных к тому времени в литературе. Ваксман (Waksman, 1959, 1961) представил в своей книге характеристики рода *Actinomyces*. Понфик, а также Ионе (Ponfick, Johne) первыми установили случаи актиномикоза у свиней. Бострем (1891) вырастил в чистой культуре (*A. bovis*) из тканей, пораженных актиномикозом. Бострем (Bostraem, 1884) впервые выделил из гноя пораженных органов человека культуру возбудителя, который развивался в аэробных условиях в виде ветвистого мицелия с образованием спор (аэробный тип Бострема), а в 1891 г. Вольф и Израэль (Wolf, Jsrael) описали его как грибок в виде дифтероидных палочек (тип Вольфа-Израэля), который в течение десятилетий рассматривался как возбудитель болезни. Но после того, как Линьер и Шпиц в 1902 г. обратили внимание, что актинобациллез представляет собой болезнь, которая в некоторых отношениях клинически и анатомически подобна лучегрибковой болезни, вызывается маленькой бактерией (актинобациллой), то Райт, пожалуй, впервые (1905) усомнился в этиологической природе *A. bovis* Бострема (Спесивцева, 1964).

Систематические исследования Гриффита (1916), Хюльферса (1920), Бонгерта (1924), Магнуссона (1928) и других показали - *A. bovis* действительно не имеет ничего общего с данной болезнью, а заболевания, называемые актиномикозом, обуславливаются различными, смотря по обстоятельствам, видами бактерий. В первую очередь, это уже упомянутая актинобацилла Линьера и вид бактерий, на который Вольф и Израэль еще в 1891 г. указали, как на возбудителя актиномикоза человека. В патологоанатомическом отношении эту болезнь впервые тщательно исследовал Боллингер (1877). Позднее ценным вкладом явились клинические и анатомические исследования Ионе, Банга, Хармса и Азари, в то время как Джест, Шлегель и другие обогатили науку данными о более тонкой структуре актиномикотических разращений ткани. Кашкин (1962) провел

исследования десяти штаммов проактиномицетов, полученных им из разных лабораторий.

В России существование актиномикоза животных диагностировал в 1882 г. Гутман. Классические работы по актиномикозу принадлежат Берестеневу (1897-1908 гг.) и Дмитриеву (1943-1944 гг.).

В настоящее время актиномикоз рассматривается как хроническое инфекционное заболевание животных и человека, вызываемая бактерией *A. bovis*, характеризующаяся гранулематозными поражениями с некротическим распадом различных тканей и органов, образованием свищей (Спесивцева, 1964; Берджи, 1980, 1997; Шишков, 1981; Беннетт, 1994; Сидоров и др., 1995; Васильев и др., 2000; Колычев, Ощепков, 2001; Зубков, 2005; Зыкин, Хапцев, 2006, 2011; Бессарабов, 2007). При этом чаще болеет крупный рогатый скот, козы, овцы, лошади, собаки и другие плотоядные животные. Основные возбудители – бактерия *A. israelii* и *A. bovis* (Липницкий и др., 1996). По номенклатуре относятся к царству Bacteria, классу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales*, семейству *Actinomycetaceae*, роду *Actinomyces*. Патогенные виды: *A. israelii* (для человека) (Аравийский, Горшкова, 1995) и *A. bovis* (для животных) (всего - более 40 патогенных для человека и животных видов).

Род *Actinomyces* включает 12 видов, большинство из которых являются патогенными для животных и человека. Виды *A. suis* и *A. humiferus* имеют статус «*incertae sedis*» (Schaal, 1986).

*A. bovis* принадлежит к серогруппе В, *A. israelii* – к серогруппе D. У того и у другого вида выявлены серовары 1 и 2, которые идентифицируются с помощью люминисцирующих антител (Колычев, Ощепков, 2001).

Актиномикоз животных, особенно крупного рогатого скота, встречается повсеместно и описан в различных странах мира (Спесивцева, 1964; Сосова, 1969; Саркисов, 1971). Наиболее широкое распространение он получил в Украине, России, Казахстане и Средней Азии (Дудников и др., 2010, 2012). Болезнь протекает энзоотически или спорадически и чаще всего отмечается в зимне-весенний период, когда снижается резистентность организма

животных и значительно реже в летне-осенний (Шишков, 1981). Актиномикоз может регистрироваться и в течение всего года, но чаще в стойловый период при кормлении животных сухими грубыми кормами, а также при выпасах на стерне осенью (Волотко, 1980, 1987; Бакулов, 1987; Dymbahl, 2004). Среди травматических факторов большое значение имеют инородные тела растительного происхождения (травинки, ости, злаки), а обитающие на них актиномицеты являются этиологическим фактором болезни (Аснин, 1956; Осповат, 1963; Сутеев, 1951). Некоторые авторы считают, что актиномикоз имеет сезонный характер (Аскеров, 1977).

Случаев заражения человека от животных не установлено. Передача актиномикоза от человека человеку не зарегистрирована (Кузнецов, 2001). Болезнь часто встречается у крупного рогатого скота, особенно среди молодняка, и нередко принимает форму энзоотии (Гутира, Марек, 1961; Куриленко, 2000; An et al., 2006).

Природным резервуаром патогенных актиномицетов является внешняя среда (Бурцева и др., 1999, 2001). Возбудители болезни – облигатные паразиты тела животного. Они обитают в полости рта и желудочно-кишечного тракта, а также в области верхних дыхательных путей. Поэтому актиномикоз может возникать и без заноса возбудителя при условии, если повторные травмы слизистых оболочек или кожи открывают ворота для проникновения возбудителя в ткань. Пищеварительный тракт также может являться воротами инфекции при нарушении целостности слизистой рта и десен вследствие травмирования (Васильев и др., 2000). Так, например ферментирующие актиномицеты (ФА), к которым относят представителей родов *Actinomyces*, *Arachnia*, *Rothia*, *Bacterionema* (Schaal, 1984), составляют значительную часть (около 30 %) резидентной микрофлоры полости рта (Олейник, 1984; Fiorino, 1997; Саттон и др., 2001; Гарибова, Лекомцева, 2005; Hall et al., 2005; Enrico et al., 2007; Nurith, 2009).

В последние годы интерес к данной группе бактерий возрос, так как выяснилось, что они могут являться этиологическими агентами не только



актиномикоза, но и многих других патологических процессов у человека: абсцессов, эмпиемы, пневмонии, бактериального эндокардита, лакримального каналikulита, «болезни кошачьей царапины» и, возможно, воспалительных заболеваний пародонта, кариеса зубов (Curtis, Pine, 1981; Bhagavan et al., 1982; Cleghorn, Wilkinson, 1989; Dybdahl et al., 1991; Arora et al., 1997, 2003; Yeung, Kozelsky, 1997; Murakami et al., 1998; Moesta et al., 1999; Takele, Zerihun, 2000; Mansouri et al., 2001; Коротяев, Бабичев, 2002; Митрофанов, Шевяков, 2004; Афанасьев, 2005; Camenzind, 2005; Cleghorn, Wilkinson, 2007; Richman, Jeng, 2007; Orhan, Uner, 2009). Ферментирующие углеводы анаэробные и капнофильные актиномицеты, принадлежащие к семействам *Actinomycetaceae*, *Propionibacteriaceae* или *Bifidobacteriaceae*, выступают как этиологические агенты при разнообразных заболеваниях у человека и животных (Hijazin, 2012). Среди них актиномикоз – наиболее характерное проявление заболевания. Таким образом, термин «актиномикоз» скорее определяет полиэтиологический воспалительный синдром, чем просто заболевание, относящееся к отдельному патогенному микроорганизму (Курасова и др., 1971; Schaal, 1986).

В гранулематозных тканях и экссудате бактерию *A. bovis* обнаруживают в виде маленьких серых зерен, напоминающих крупинки песка, называемых друзами, со временем подвергающихся обызвествлению. Их обнаруживают в содержимом абсцесса или в выделениях из свищей приблизительно в 25% случаев, что имеет большую диагностическую ценность (Акулов, 1987; Букова, 1993). Друзы в зависимости от возраста могут быть маленькие (20-40 мкм) и большие (150-320 мкм) по наблюдению. По данным Ефимовой (1949), средний размер друз равен 60-80 мкм. Центральная часть друзы окрашивается по Граму положительно, периферическая - отрицательно. Механизм такого окрашивания друз по Граму до сих пор не выяснен (Спесивцева, 1964; Шлегель, 1980; Берджи, 1980, 1997; Шишков, 1981; Сидоров и др., 1995; Васильев и др., 2000; Колычев, Ощепков, 2001; Зубков, 2005; Зыкин, Хапцев, 2006, 2011). Друза построена из наружного слоя и ядра.

Первый состоит из булавовидно или колбовидно вздутых и лучисто расположенных нитей. Центральная часть друзы представляет густое сплетение очень тонких разветвленных нитей (Коляков, 1952). В препаратах из культур обнаруживаются грамположительные палочки, коккобактерии, палочки с утолщенными или разветвляющимися концами, могут присутствовать нити различной длины (Аснин, 1956, 1961; Сидоров и др., 1995; Аравийский и др., 2004). По определителю бактерий (Берджи, 1980) грамположительные, неравномерно красящиеся бактерии; не кислотоустойчивые, неспорообразующие и неподвижные. Нити с истинным ветвлением могут преобладать и весьма заметны в 18-48-часовых микроколониях. Обычно они представляют собой дифтероидные клетки или ветвящиеся палочки; встречаются V-, Y- и T-образные формы. На плотных питательных средах бактерия образует хорошо развитый несептированный одноклеточный мицелий, который имеет вид ветвящихся тонких нитей, достигающих 100-600 мкм в длину и 0,5-1,2 мкм в поперечнике (Коротяев, Бабичев, 2002; Колычев, Ощепков, 2001). У большинства штаммов встречаются нити 1 мкм или менее в диаметре, варьирующие по длине и степени ветвления. Пептидогликан клеточных стенок содержит аланин, глутаминовую кислоту и лизин, а также либо аспарагиновую кислоту, либо орнитин. Углеводы клеточной стенки могут включать глюкозу, галактозу, а также рамнозу и другие дезоксисахара. Типовой вид: *Actinomyces bovis* (Harz, 1877). Факультативный анаэроб, обычно его культивируют в анаэробных условиях при оптимальной температуре 37 °С на агаре и бульоне Сабуро, глюкозно-кровяном агаре при рН от 4,4 до 9,0. Для животных патогенен анаэробный тип (Саркисов, 1971). На 15-30-е сутки после посева обнаруживают небольшие белые или желтоватые колонии в толще агара. Колонии могут быть гладкими или шероховатыми, пушистыми или мучнистыми. Колонии с трудом снимаются с питательных сред. На жидких средах МПБ, в молоке, сахарном бульоне, среде Чапека, Китта-Тароцци грибок растет в виде зернышек, пушинок или морщинистых пленок

(Колычев, Ощепков, 2001). При культивировании в анаэробных условиях на мясном, декстрозном 1% агаре, глицериновом агаре при  $t$  37 ° С через 1-2 недели появляются белые, а затем светлорозовые колонии. На полужидкой среде колонии имеют желтовато-белый цвет, округлую форму (Саркисова, 1971).

Конидий не образуют в отличие от грибов. Факультативные анаэробы, нуждаются в дополнительном снабжении  $CO_2$ . Хемоорганотрофы с бродильным типом метаболизма. При сбраживании углеводов образуют кислоту. На плотных средах через 24 ч формируют характерные для отдельных видов микроколонии, а через 7-14 дней - макроколонии. Ферментируют глюкозу с образованием кислоты, обладают слабой протеолитической активностью (Васильев и др., 2000).

При исследовании гноя из не вскрытых актиномиком выделяют также пиогенную бактериальную флору (протей, стафило- и стрептококки, сенную палочку). Многие исследователи относят актиномикоз к полимикробным заболеваниям, которые вызываются ассоциацией грибов-актиномицетов с пиогенной микрофлорой (Кузьмин, 1958; Герхардт, 1983; Пяткин, Кривошеин, 1981; Аксонов, 1997; Колычев, Госманов, 2003; Кисленко, 2005; Емцев, Мишустин, 2005; Гусев, 2008). По мнению Сутеева (1951), нередко сопутствующая грибку инфекция – важный и часто решающий фактор в патогенезе актиномикоза, она понижает реактивную способность организма, ухудшает течение болезни. Распространение грибка в организме осуществляется лимфогематогенным путем (Спесивцева, 1964).

По данным Волотко и соавт. (1992, 1995) классификацию актиномикоза челюстно-лицевой области подразделяют на формы: кожную; подкожную; подслизистую; слизистую; одонтогенную актиномикозную гранулему; подкожно-мышечную; лимфатических узлов; периоста челюсти; кости челюсти; актиномикоз полости рта – языка, слюнных желез, заглоточных лимфатических узлов. Чаще всего в ветеринарной практике встречаются

слизистая, кожная, подкожная, кожно-межмышечная, костная формы (Пирогова, 1970).

Согласно мнению Волотко (1983), клинические признаки актиномикоза могут наблюдаться через три недели и более с момента внедрения в ткани возбудителя. Клиническая картина актиномикоза у животных зависит от места локализации и вирулентности возбудителя, резистентности организма и вида животного (Спиридонов Б.С., 1983). Актиномикозные поражения у крупного рогатого скота локализуются в области головы, шеи и бедра с вовлечением в процесс костной ткани, мышц, слюнных желез и лимфатических узлов (Сундуков и др., 1972; Маминов, 1977; Ильченко и др., 2009). В дальнейшем происходит образование свищей, из которых выделяется вначале сметанообразный желтоватый гной с желтовато – серыми крупинками друз величиной с просыное зерно. Затем гной становится кровянистым с примесью кусочков отторгаемой ткани. Актиномикомы в глотке и гортани ведут к затруднению дыхания и приема корма, поэтому больные животные могут быть истощены. Температура тела повышается в тех случаях, когда болезнь осложняется гнилостной микрофлорой или происходит генерализация процесса (Русланов, 1953; Спесивцева, 1974; Спиридонов, 1983; Волотко, 1995; Бессарабов, Воронин, 2007). На коже вокруг свища волосы выпадают. Поражение твердое, из-за образовавшейся новой кости, обуславливает увеличение размеров челюсти, также понижается подвижность челюсти и языка. В месте локализации процесса зубы могут шататься и выпадать. Все эти патологические изменения серьезно нарушают захватывание и пережевывание корма. В результате животное имеет болезненный вид, живая масса его снижается (Плахотин, 1966; Петрович, 1982, 1991; Nagaraja, 1998).

У крупного рогатого скота чаще поражаются кости и ткани нижней челюсти, лимфоузлы, но актиномикомы могут возникнуть и в других частях тела (на конечностях, вымени и др.). Для актиномикоза характерным считают выраженный фибросклероз ткани; это обуславливает ее каменную плотность.

Актиномикоз языка проявляется в большинстве случаев в форме язвы спинки языка («кормовая дыра») (Ильченко и др., 2009). Язва спинки языка – очень часто встречающееся изменение (в зависимости от местности, возраста и породы оно регистрируется у 10-65% убойного крупного рогатого скота). Язва спинки языка почти всегда (по Дедердингу, в 99 из 100 случаев) имеет актиномикотическую природу. На разрезе языка можно заметить серо-белые пятна; края их окружены желтовато-серыми узелками, содержащими казеозную или гнойную массу. В позднейшей стадии болезни соединительная ткань языка сильно разрастается, так что увеличившийся в объеме орган имеет очень плотную, как у дерева, консистенцию (так называемый «деревянный» язык). В глотке актиномикомы образуют полипозные опухоли, сидящие на коротких ножках. Заболевание брюшины проявляется множеством актиномиком различной величины. Они часто содержат гной и даже ихорозные массы, а в печени в таких случаях часто бывают метастазы. Актиномикоз легких проявляется в виде множества серых или желтоватых, подобных туберкулам, узелков и узлов, вкрапленных в содержащую воздух или гепатизированную легочную ткань, или же в виде опухолей, достигающих размеров куриного яйца и наполненных гноем (Гутира и др., 1961; Спесивцева, 1964).

В патогенезе актиномикоза ведущее значение отводится развитию воспалительного процесса на месте внедрения возбудителя, сопровождающегося клеточной пролиферацией и развитием гранулемы. Постепенно в центре гранулемы появляются отдельные размягченные участки, в которых находятся беловатые зерна или друзы очень плотной консистенции. В гранулеме может откладываться известь. Если процесс прогрессирует, образуются свищи, через которые выделяется гной, содержащий друзы (Липницкий и др., 1996). Инкубационный период составляет от нескольких дней до нескольких месяцев (Кузнецов, 2001).

Иммунодиагностика актиномикоза у людей осуществляется кожно-аллергическими и серологическими реакциями. Кожно - аллергические

реакции у больных, обследуемых на актиномикоз, ставятся, как правило, с актинолизатом, т.е. фильтратом спонтанно лизировавшихся бульонных аэробных культур возбудителя, предложенным для диагностики Дмитриевым и Сутеевым (Спесивцева, 1974).

При ветеринарно-санитарной экспертизе пораженные лимфатические узлы головы удаляют, а голову используют без ограничений. В случае поражения костей и мышц голову утилизируют. При генерализованном процессе в техническую утилизацию направляют тушу с внутренними органами (Колычев, Ощепков, 2001).

Для дезинфекции животноводческих помещений применяют 2-3% растворы едкой щелочи или свежегашеную известь. Гибнет бактерия при нагревании до 80 °С в течение 5 минут. Низкая температура способствует выживанию возбудителя в течение 1-2 лет (Спесивцева, 1974). Актиномицеты весьма устойчивы к высушиванию (сохраняются до 6 лет) (Коляков, 1952).

Прошло более 100 лет со дня открытия актиномикоза, за эти годы было предложено много различных средств и методов лечения этого заболевания. Одним из первых применил пенициллин при лечении актиномикозных животных Сушков (1951) (Сосова, 1969). С 1947 года в практике лечения актиномикоза нашли широкое применение антибиотики. Для лечения актиномикоза применяют оперативные методы и антибиотикотерапию пенициллином, стрептомицином и окситетрациклином. Консервативные методы лечения были предложены в 1885 году Томассеном, он использовал для этой цели йодистые препараты. В настоящее время основное место в ликвидации этого заболевания занимает лечение препаратами йода и антибиотикотерапия, которые являются малоэффективными, а способ применения трудоемким.

Таким образом, несмотря на предложенные лекарственные препараты для лечения актиномикоза, ни один из них пока не является достаточно надежным по своему действию в отношении возбудителя данного

заболевания, потому что не содержит его протективных компонентов. Это диктует необходимость разработки эффективных методов лечения и профилактики актиномикоза с помощью современных инновационных подходов, в первую очередь, терапевтических вакцин. Использование такого препарата позволило бы сократить время и затраты на проведение ветеринарных мероприятий и предотвратить экономический ущерб от вынужденного убоя животных.

## ГЛАВА 3. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### **3.1. Получение и характеристика штаммов-продуцентов для приготовления экспериментальной серии терапевтической вакцины против актиномикоза крупного рогатого скота**

Материалом исследований служил пунктат из актиномиком, привезенный из СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области (работа выполнялась с апреля по октябрь 2008 года). Выявление друз актиномицетов в гное осуществлялось по общепринятому плану исследования, согласно рекомендациям авторов (Спесивцева, 1964; Баринава, 1982). Из экссудата и гноя выбирали друзы (желтоватые крупинки) и комочки, которые промывали физиологическим раствором (0,85 % раствор NaCl), переносили на предметное стекло в каплю 10 %-ного раствора едкой щелочи (KOH или NaOH), смешивали, покрывали покровным стеклом и плотно прижимали (раздавливали друзы) и микроскопировали (под сухой системой х 40) в затемненном поле зрения. Из этих же друз и комочков делали тонкие мазки, окрашивая их по Граму (Колычев, Ощепков, 2001).

Выделение культуры возбудителя производили на стандартных плотных и жидких средах в аэробных условиях при температуре 37 °С. Желто-серые друзы актиномицетов, обнаруженные в гное из абсцесса, засеивали на следующие среды: полужидкий агар, залитый стерильным вазелиновым маслом, МПБ или МПА с 1% глюкозы (Спесивцева, 1964). Посевы просматривали визуально после 2-3 дней культивирования с последующей микроскопией мазков, окрашенных по Граму. Если колонии были загрязнены другой культурой, то делали последовательные пересевы до роста чистой культуры. Затем производили пересев изолированных культур на молоко; желатин; на цветной ряд с глюкозой, сахарозой, мальтозой, лактозой и маннитом.



Идентификацию возбудителя проводили по общепринятой методике (Берджи, 1980, 1997).

### **3.2. Методика приготовления экспериментальной серии вакцины для лечения и профилактики актиномикоза крупного рогатого скота**

Для приготовления ЭС вакцины, культуру *A. bovis*, выделенную от животных, больных актиномикозом, засекали на МПБ с 1% глюкозы, выдерживали в термостате при 37 °С в течение 42 суток. Затем надосадочную жидкость сливали, а полученный осадок подвергали замораживанию и оттаиванию. После этого осадок центрифугировали при 1609,92 g в течение 30 мин. К полученной после удаления осадка надосадочной жидкости добавляли равное количество дистиллированной воды и раствор формальдегида до конечной концентрации 0,4 %.

На этапах испытания ЭС вакцины ее использовали для введения животным по оригинальной методике.

### **3.3. Лабораторные животные**

Испытания ЭС вакцины проводили на морских свинках (24 шт.) весом 250-300 г в возрасте 4-5 месяцев, белых аутбредных мышках весом 16-18 г (5 шт.) и кроликах породы Шиншилла (8 голов) весом 2,5-3 кг в возрасте 12 месяцев (Голиков, 1963; Медведев, 1964; Деревлева, Сутеева, 1969; Западнюк и др., 1974; Бландова и др., 1983; Глотова, 1989; Бергхоф, 1999; Груздев, Груздев, 2000; Рахманов, 2002). Морские свинки были разделены на 3 группы по 8 голов в каждой (в том числе, 8 морских свинок – для экспериментального воспроизведения заболевания, 8 голов - для оценки эффективности действия препарата и 8 контрольных интактных животных). У всех лабораторных животных, включая контрольные группы, за сутки до эксперимента и на 21 день после введения ЭС вакцины исследовали

гематологические, биохимические показатели сыворотки крови и иммунный статус.

Использованные в работе животные были предоставлены сектором по разведению экспериментальных животных ГНУ Саратовский НИВИ Россельхозакадемии.

### **3.4. Сельскохозяйственные животные**

Работу проводили на КРС красно-пестрой голштиinizированной породы – 872 головы разной весовой категории.

Лечебные свойства ЭС вакцины исследовали на нетелях и первотелках (82 головы) с характерными актиномикозными поражениями в области нижней или верхней челюсти с подтвержденным клиническим и лабораторным диагнозом актиномикоз. Контрольную группу составили 10 голов интактных животных.

Для изучения профилактического действия ЭС вакцины было обработано 746 голов.

Все использованные в работе животные были предоставлены СПК колхозом «Красавский» Лысогорского района Саратовской области (с апреля 2008 г. по ноябрь 2013 г.), а также колхозом «Победа» Красноармейского района (в период 2007 - 2013 г).

В ходе проведения экспериментов рацион кормления и условия содержания животных не менялось.

### **3.5. Реактивы и растворы**

Препарат «Комплемент морской свинки» был изготовлен ЗАО «ЭКОлаб» (Россия).

Физиологический раствор (0,85 % раствор натрия хлорида) – ОАО Научно-производственный концерн «ЭСКОМ» (Россия).

0,1% раствор метиленового синего, 10-20 % раствор едкой щелочи (KOH или NaOH), 3 % раствор CH<sub>3</sub>COOH или жидкость Тюрка готовили по обычной методике (Кэтти Д., 1991; Коленько Е.И., 1963).

Набор для окраски по Граму – «Отдел Новых Технологий» (Россия).

Раствор формальдегида 0,4 % готовили из концентрированного (36-40%) раствора – «Нева Реактив» (Россия).

### 3.6. Оборудование и приборы

Термостат ТС-80 M2 (Россия) использовали для инкубирования культуры *A. bovis*.

Биохимические исследования (определение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), креатинкиназы (КК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), количество общего холестерина (Охс)) проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Sinnova BS 3000 P (Китай) с использованием стандартных коммерческих наборов реагентов.

Центрифуга CM-6M ELMi (Латвия) и MiniSpin, Eppendorf (США) применялась на разных стадиях приготовления ЭС вакцины.

Ультразвуковую дезинтеграцию культуры на жидкой питательной среде осуществляли на аппарате УЗДН-1 (Россия).

Замораживание-оттаивание выращенной культуры осуществляли в комбинированном холодильнике с использованием морозильной камеры INDESIT (Россия).

Мазки, приготовленные из культур *A. bovis* и окрашенные по Граму, просматривали под иммерсией в световой микроскоп Minimed-5021 (Россия).

Для очистки ЭС вакцины от примесей поврежденных компонентов актиномицетов использовали мембранные фильтры типа «Владипор - МФА № 3» с размером пор 0,25-0,35 мкм (Россия) согласно методическим рекомендациям (Ласкавый и др., 2005).

Фильтрацию проводили с применением вакуум-аппарата марки ВН ПД 10 У (Россия) как предложено ранее (Ласкавый и др., 2005).

### **3.7. Биохимические и иммунологические методы исследования**

Из биохимических показателей определяли ферменты – активность АЛТ, АСТ, КК, ЛДГ, количество Охс. Для определения активности АСТ использовали метод Karmen (1955) без применения пиридоксальфосфата; АЛТ – кинетический спектрофотометрический метод без применения 5-фосфопиридоксаля; ЛДГ – метод La Due et al. (1956); КК – ферментативный метод Oliver (1981); Охс определяли колориметрическим методом Trinder (1969) (Камышников, 2000). Содержание глюкозы в сыворотке крови экспериментальных животных исследовали унифицированным глюкозооксидазным методом Asp et al. (1967) (Камышников, 2000), концентрацию общего белка – методом осаждения сульфосалициловой кислотой (Пупкова, Прасолова, 2005; Малинин, 2008; Лелевич и др., 2013). Сыворотку крови экспериментальных животных получали по общепринятой методике (Предтеченский, 1950; Винников, 2000) за сутки до и через 21 день после введения препарата.

Для изучения иммунного статуса у животных опытной группы определяли лейкоцитарную формулу крови, включая количество лейкоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов (Тх), Т-супрессоров (Тс), Тх/Тс, В-лимфоцитов и Л<sub>о</sub> (Байд, 1951; Фримель, 1987; Ледванов, Киричук, 1996; Винников, 2000). Содержание Т- и В-лимфоцитов определяли в реакции спонтанного розеткообразования в присутствии теофиллина (Борисов, 2005; Резяпкин, 2001).

Иммуногенность ЭС вакцины разных серий, полученных с применением ультразвуковой обработки (Ласкавый и др., 2005), определяли в реакции агломерации лейкоцитов (РАЛ) (патент РФ на изобретение № 2176392). Для постановки реакции использовали: 1) испытуемую ЭС вакцины; 2)

цитратную кровь кролика-донора; 3) комплемент морской свинки; 4) изотонический раствор NaCl; 5) метанол; 6) 0,1% раствор метиленового синего. Окрашенные мазки просматривали под микроскопом при увеличении  $\times 45$ , выбирая для анализа 100 лейкоцитов с последующим определением среди них количества склеенных лейкоцитов и предварительной оценкой иммуногенности по величине индекса агломерации, как отношения числа склеенных в общем числе выбранных для анализа лейкоцитов. Антиген считали иммуногенным при величине индекса агломерации 6-15 %.

В качестве штамма-продуцента ЭС вакцины использовали образцы культуры *A. bovis*, выращенные на МПБ с 1% глюкозы и подвергнутые воздействию ультразвуковых волн в пределах 20 кГц и длительностью воздействия (экспозиции) до 60 мин для разрушения внешней мембраны и клеточной стенки клетки в соответствии с рекомендациями (Шах Махмуд, Филимонова, 2010) и повышения выхода антигенов в раствор (Ласкавый и др., 2005).

Для постановки РАЛ при выборе потенциального донора сывороток крови сначала проверяли естественную агломеративную способность лейкоцитов у 5 интактных кроликов. Для этого из краевой вены уха каждого животного брали по 1 мл крови с добавлением гепарина из расчета 0,1 мл гепарина на 1 мл крови.

Гепаринизированную кровь разливали по 0,2 мл в пробирки Флоринского, в которые затем добавляли по 0,02 мл комплемента морской свинки в рабочем разведении 1:20 с последующим встряхиванием и инкубированием при температуре 37 °С в течение 1 часа. Затем пробирки повторно встряхивали и инкубировали при той же температуре еще 1 час. Кровь из пробирок наносили на предметные стекла и делали мазки, которые подсушивали при комнатной температуре и фиксировали в метаноле 3 минуты. Фиксированные мазки окрашивали 0,1 % спиртовым раствором метиленового синего в течении 5 минут. Окрашенные мазки просматривали под микроскопом при увеличении  $\times 45$  в нескольких полях зрения,

подсчитывая не менее 100 лейкоцитов и учитывая при этом количество склеенных (агломерированных) клеток. От каждого животного-донора исследовали не менее 5 отдельных серий гепаринизированной крови. Агломерированными считали те серии, в которых отмечались, по крайней мере, не менее трех лейкоцитов. По результатам проведенных исследований отбирали кролика-донора, кровь которого обладала естественной агломеративной способностью в пределах 3-4 %.

Предварительную оценку иммуногенности полученных отдельных ЭС вакцины проводили по той же схеме, которая применялась для оценки естественной агломеративной способности лейкоцитов при отборе кроликов-доноров, добавляя к цитратной кроличьей крови ЭС вакцины в объеме 0,04 мл. Для каждой ЭС вакцины проводили подсчет в 3-4 полях зрения микроскопа.

Стерильность экспериментальных серий ЭС вакцины проверяли контрольным посевом каждой из них на МПА с 1 % глюкозы.

### **3.8. Статистическая обработка**

Статистический анализ полученных результатов исследований проводили с вычислением средней арифметической абсолютных и относительных величин ( $M$ ), средней ошибки средней арифметической ( $m$ ), коэффициента достоверности различия средних ( $t$ ) по методу Ашмарина и Воробьева (1986). Уровень значимости ( $P$ ) для различия между средними значениями вычисляли при помощи критерия  $t_p$  Стьюдента – Фишера. Для построения графиков, рисунков использовали программы Adobe Photoshop CS2, Microsoft Office Excel 2007, Adobe Acrobat Reader реализованные на персональном компьютере на базе процессора «Intel Centrino» с лицензионным пакетом операционной системы Microsoft Windows Vista.

#### **ГЛАВА 4. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СЕРИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ АКТИНОМИКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

В настоящее время для лечения актиномикоза в ветеринарной практике предложены препараты на основе йодсодержащих компонентов (патент РФ № 2297839), антибиотического действия (патент РФ № 2136272), а также растительный экстракт травы (сена) люцерны (патент РФ № 2311191). Несмотря на умеренное лечебное действие, они обладают рядом недостатков, связанных с сильным раздражающим действием на ткани больного животного (йодсодержащие препараты), отсутствием профилактического эффекта (антибиотики), а их длительное применение зачастую приводит к ряду побочных эффектов. Так, продолжительное использование препаратов на основе йода может привести, особенно при в/в или струйном введении, к развитию у животных тромбоэмболии или тромбоза за счет осаждения белков плазмы крови и, соответственно, вынужденному убою до 15-20% животных (патент РФ № 2297839). Наряду с этим данные препараты обладают низкой лечебной эффективностью ввиду отсутствия специфического компонента, требуют длительного применения в сочетании с другими препаратами, а фармакологическое действие их связано в основном общим стимулирующим местным воздействием на метаболические процессы организма (патент РФ № 2125427). Это не позволяет широко использовать их в лечении актиномикозов.

Препараты для специфической профилактики актиномикоза у сельскохозяйственных животных в настоящее время отсутствуют. В то же время известно, что для специфической иммунотерапии актиномикоза у людей Дмитриевым и Сутеевым были разработаны отечественные препараты «Актинолизат (Actinolyzat)» и актиномицетная поливалентная вакцина

(АПВ). Актинолизат – препарат с иммуностимулирующими и иммуномодулирующими действиями (Сутеев, 1951; Спесивцева, 1960, 1964), представляющий собой смесь стерильных фильтратов культуральной жидкости, содержащей продукты аутолиза и метаболизма штаммов-продуцентов (родов *Actinomyces* и *Micromonospora*), выделенных от больных актиномикозом людей. Созданная более 50 лет назад (в 1959 г.) в институте медицинской паразитологии и тропической медицины специальная актиномицетная поливалентная вакцина (АПВ) изготавливается из штаммов-продуцентов родов *Actinomyces* (Петровская, 1974). Вместе с тем, высокая стоимость актинолизата и необходимость длительного лечения затрудняют использование указанного препарата для лечения актиномикоза у сельскохозяйственных животных.

Поскольку штаммы микроорганизмов, изолированные от больных животных или людей, нашли широкую востребованность в биотехнологии производства лечебных и профилактических препаратов (Глик, Пастернак, 2002), на наш взгляд, целесообразно было бы выделить от больного актиномикозом животного изолят *A. bovis*, изучить его морфологические, биохимические и другие иммунобиологические свойства и оценить пригодность использования в качестве штамма-продуцента для разработки основных этапов биотехнологии препарата для лечения и профилактики актиномикоза у КРС.

#### **4.1. Выделение и идентификация штаммов *A. bovis* из актиномикомы больных нетелей**

Для реализации поставленной задачи нами было выбрано 2 хозяйства Саратовской области, неблагополучных по актиномикозу, с периодическими вспышками этого заболевания в зимне-весенний период за три последних года до начала наших исследований: колхоз «Победа» Красноармейского района и СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района.



При посещении животноводческого помещения СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района нами установлено, что больные актиномикозом животные (84 головы) в стойловый период содержались вместе со здоровыми (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Животноводческий комплекс СПК колхоз «Красавский» в стойловый период (нетели)

Чтобы выбрать потенциального донора для дальнейшего его убоя с целью взятия патматериала и последующего выделения культуры, мы проводили тщательный визуальный осмотр всех животных в стойле. На наш взгляд, среди осмотренного поголовья наиболее подходящими были два нетеля (обозначенных как № 1 и № 2) с множественными (Рисунок 2 А) или единичными обширными (Рисунок 2 Б) актиномикозными поражениями, которые, по данным ряда авторов (Гутира и др., 1961; Спесивцева, 1964), как правило, регистрируются при длительном течении инфекционного процесса.

После более детального осмотра было решено выбрать второе животное с более выраженными изменениями, характерными для этого заболевания.

После выбора, животное № 2 было убито на бойне хозяйства, а патматериал (голова с актиномикомой), упакованный в непроницаемую тару (полиэтиленовый пакет), в деревянном ящике доставлен в лабораторию ГНУ Саратовского НИВИ Россельхозакадемии для выделения возбудителя актиномикоза.



Рисунок 2 – Животные (нетели) с множественными (А) или единичными (Б) актиномикозными разрастаниями на лицевой части головы

После визуального осмотра патологического материала (Рисунок 3 А), иссекали актиномикому (Рисунок 3 Б), из которой изолировали абсцедированную ткань в стерильную посуду (Рисунок 3 В) с последующим выделением из гнойной ткани актиномикозных друз (Рисунок 3 Г). Вскрытие проводили стерильными инструментами с соблюдением правил асептики (Коленько, 1963; Шишков, Налетов, 1980; Кокуричев, 1994; Саркисов, Перов, 1996; Жаров, 2000). После окончания исследования оставшийся патматериал был утилизирован в крематории (Деревлева, 1969; Третьяков, 1972).

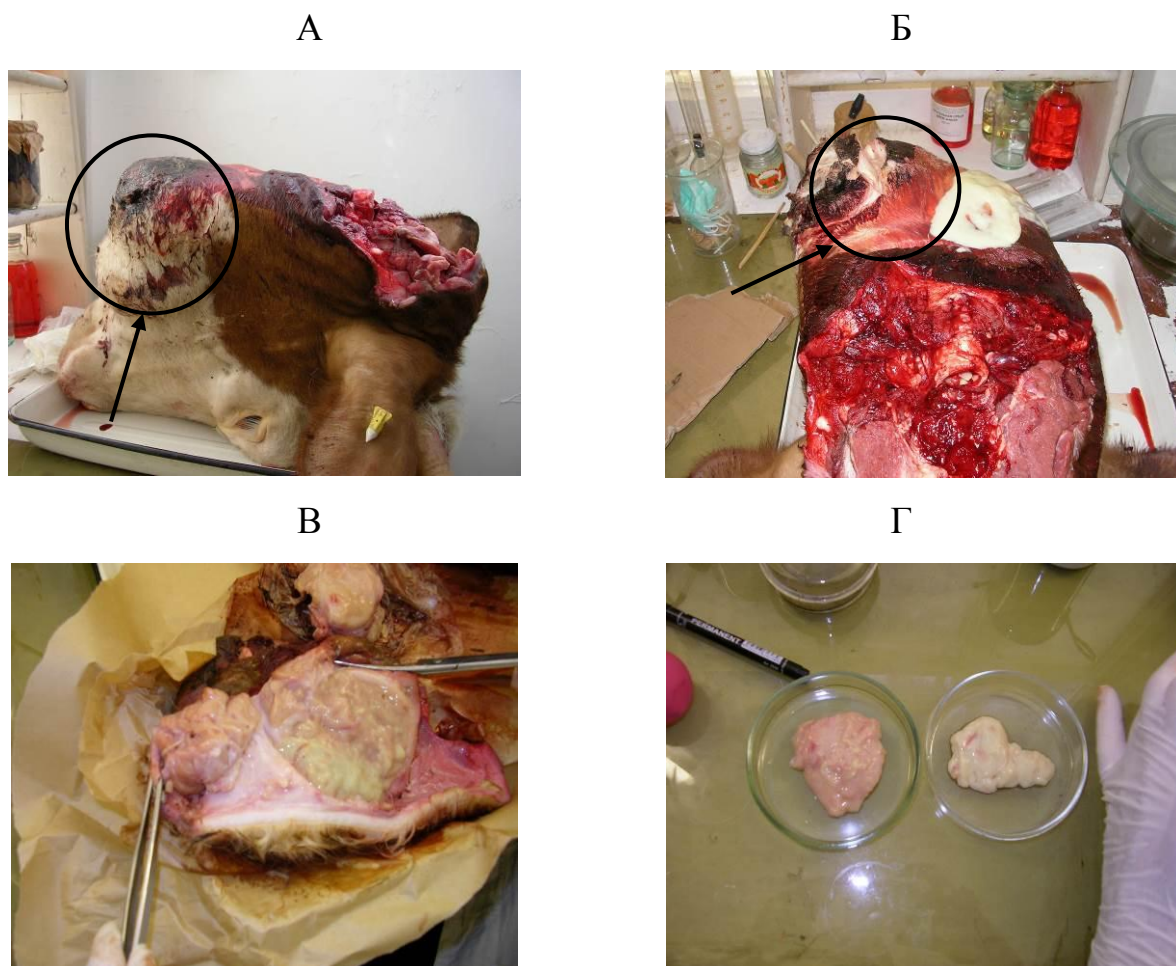


Рисунок 3 – Схема выделения друз *A. bovis* из нетеля № 2 СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района: (А) - актиномикомы в области нижней челюсти КРС (нетель); (Б) - иссечение актиномикомы из патматериала; (В) - отделение абсцедированной ткани из актиномикомы; (Г) – фрагмент гноя из актиномикомы для вымывания друз

Следующим этапом проводили отмывание друз с последующим их посевом на стандартные жидкие и плотные среды (Предтеченский и др., 1950; Сутеева, Фирюкова, 1963; Притулин, 1966; Саркисов и др., 1988; Зыкин, 2003, 2006, 2011) с последующим культивированием в аэробных условиях при температуре 37 °С в течение 3-42 сут. для выделения чистой культуры возбудителя, его идентификации, дифференциальной диагностики с *Actinobacillus lignieresii*, так как известно, что эти бактериальные агенты вызывают хронические инфекционные заболевания, сходные по эпизоотологическим данным, течению, симптоматике, но отличаются друг от

друга по ряду признаков (Спесивцева, 1964; Коленько, 1963; Сидоров и др., 1995). Для посева на плотные питательные среды исследуемый материал (гной с друзами) предварительно измельчали в ступке с физиологическим раствором и центрифугировали при 268,32 g в течение 20 мин. Осадок отмывали физраствором и одновременно засеивали в пробирки с полужидким агаром под вазелиновым маслом, в МПБ или МПА с 1% глюкозы (Деревлева, Сутеева, 1968; Емельяненко и др., 1982; Колычев, Ощепков, 2001).

Макроскопическое и микроскопическое исследование посевов проводилось нами на 3, 7, 14, 20, 42 дни с учетом рекомендаций ряда авторов (Розанов, 1952; Коленько, 1963; Берджи, 1980, 1997; Сидоров и др., 1995; Колычев, Ощепков, 2001; Васильев, 2000; Спесивцева, 1964).

Через три дня выращивания, в жидких питательных средах наблюдалось легкое помутнение бульона, на поверхности появлялась еле заметная пленка, аналогично наблюдениям других исследователей (Берджи, 1980, 1997; Сидоров и др., 1995; Радчук и др., 1991). На твердых питательных средах роста зафиксировано не было. Для идентификации культуры нами были приготовлены мазки из бульона с последующей окраской по Граму. При микроскопировании в мазках обнаруживались короткие и длинные грамположительные палочки дифтероидного типа (Рисунок 4), характерные для *A. bovis* (Берджи, 1980, 1997; Воробьев, Быков, 2003).



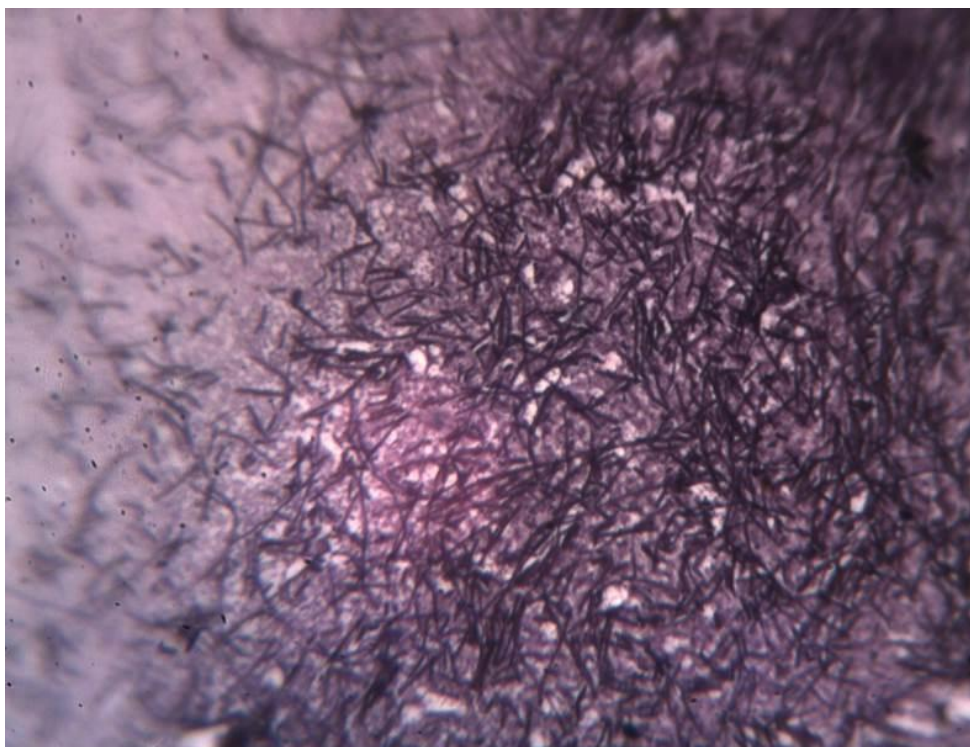


Рисунок 4 – Микроскопическое исследование чистой культуры, выделенной из патматериала нетеля № 2 (после трехдневного роста на МПБ с 1% глюкозы, мазки окрашены по Граму с последующей микроскопией под иммерсионным объективом  $\times 90$ )

Через семь дней, на твердых питательных средах появились гладкие, непрозрачные микроколонии в виде желтоватых округлых возвышений с ровным краем. В жидких питательных средах на поверхности образовалась выраженная морщинистая пленка и появился осадок с желтоватым оттенком. В пробирке с полужидким агаром под вазелиновым маслом наблюдалось едва заметное помутнение. В мазках по Граму из осадка нами были обнаружены длинные грамположительные цельные ветвящиеся нити (Рисунок 5), типичные для возбудителя актиномикоза (Берджи, 1980, 1997; Сидоров и др., 1995).



Рисунок 5 – Микроскопическое исследование культуры, выделенной из патматериала нетеля № 2 (после семидневного роста на МПБ с 1% глюкозы, мазки окрашены по Граму и исследованы под иммерсионным объективом  $\times 90$ )

Через четырнадцать дней культивирования, в жидких питательных средах на поверхности появилась морщинистая пленка, а на дне - хорошо выраженный осадок (Рисунок 6 А). На твердых питательных средах наблюдались типичные для актиномицетов макроколонии (Рисунок 6 Б). В пробирке с полужидким агаром под вазелиновым маслом наблюдался рост в виде зернышек в столбике агара. Для подтверждения принадлежности данной культуры к *A. bovis* со всех питательных сред нами были приготовлены мазки с последующей окраской их по Граму. Под микроскопом в мазках визуализировались характерные для *A. bovis* грамположительные ветвящиеся нити различной длины в виде сегментированных цепочек (Рисунок 6 В) и тонких, слегка изогнутых,

неподвижных грамположительных палочек, расположенных одиночно или в виде V -, и Y- образной формы (Рисунок 6 Г).

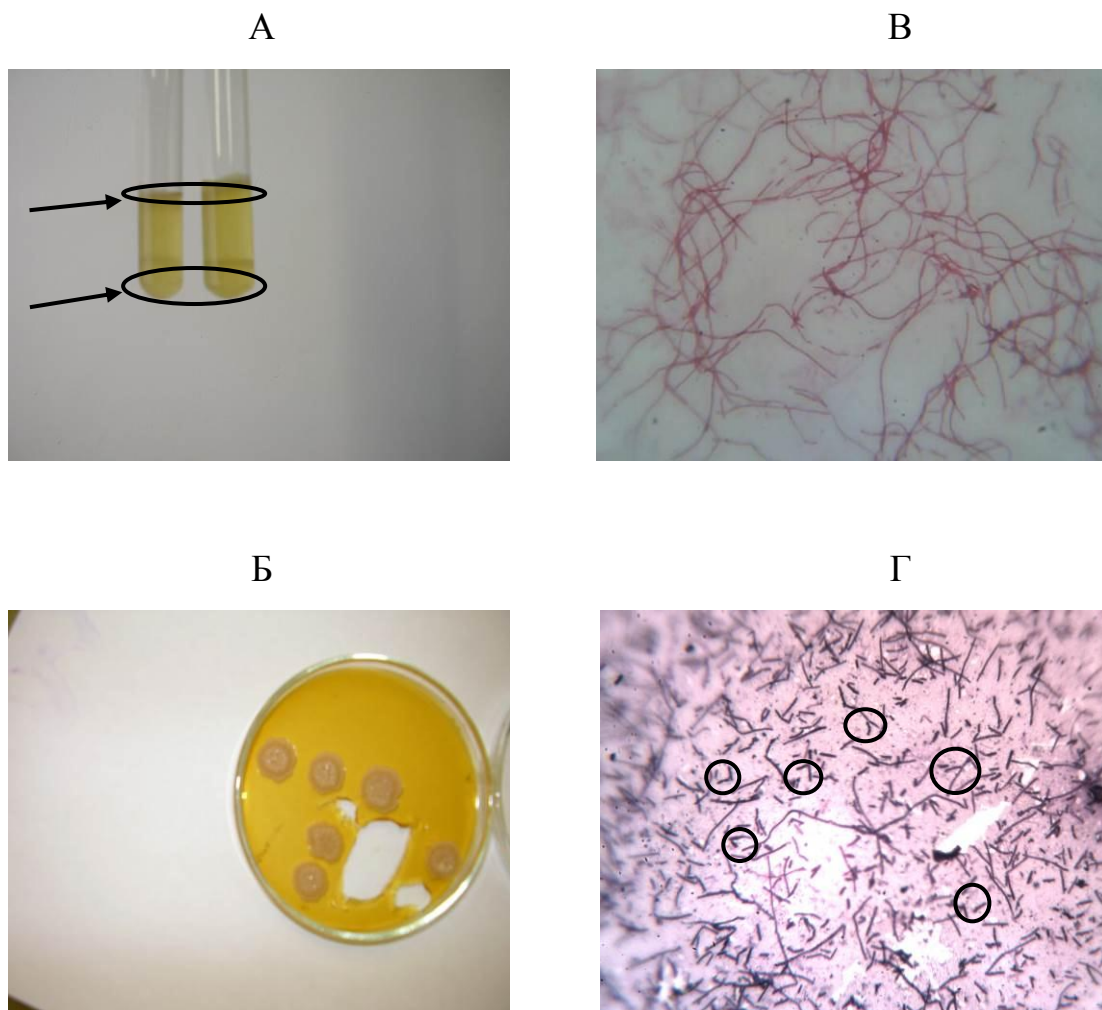


Рисунок 6 – Макроскопическое (А, Б) и микроскопическое (В, Г) исследование культуры из актиномикомы нетеля № 2, выделенной после 14 дневного роста на МПБ с 1% глюкозы (А, В, Г) или на МПА с 1% глюкозы (Б). Мазки окрашены по Граму с последующей микроскопией под иммерсионным объективом  $\times 90$

После двадцати дней культивирования на твердых и жидких питательных средах, нити, состоящие из сегментированных палочек, распались в результате деления путем фрагментации на отдельные части, которые представляли собой тонкие, слегка изогнутые неподвижные грамположительные палочки, располагающиеся одиночно, парами или в виде букв «V», «Y» (Рисунок 7).

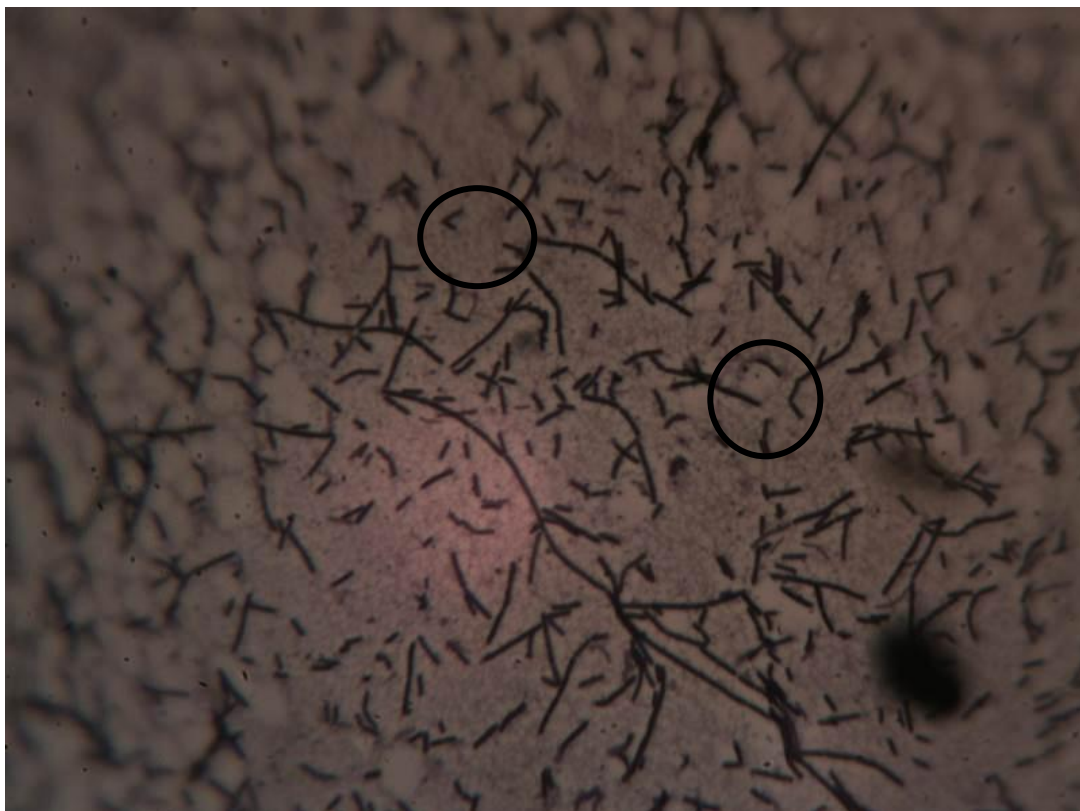


Рисунок 7 – Распавшиеся грамположительные нити различной длины в виде сегментированных цепочек и отдельно лежащие тонкие, слегка изогнутые неподвижные грамположительные палочки, располагающиеся одиночно, парами или в виде букв «V», «Y», характерные для культуры *A. bovis* выделенной из актиномикомы нетеля № 2 (после роста в течение 20 суток на МПБ с 1% глюкозы, мазки окрашены по Граму с последующей микроскопией под иммерсионным объективом  $\times 90$ )

На сорок вторые сутки нами отмечено просветление бульона, хотя осадок и морщинистая пленка сохранились. На твердых питательных средах наблюдались округлые с коричневым оттенком колонии. В мазках было видно множество отдельных длинных и коротких грамположительных палочек (Рисунок 8).



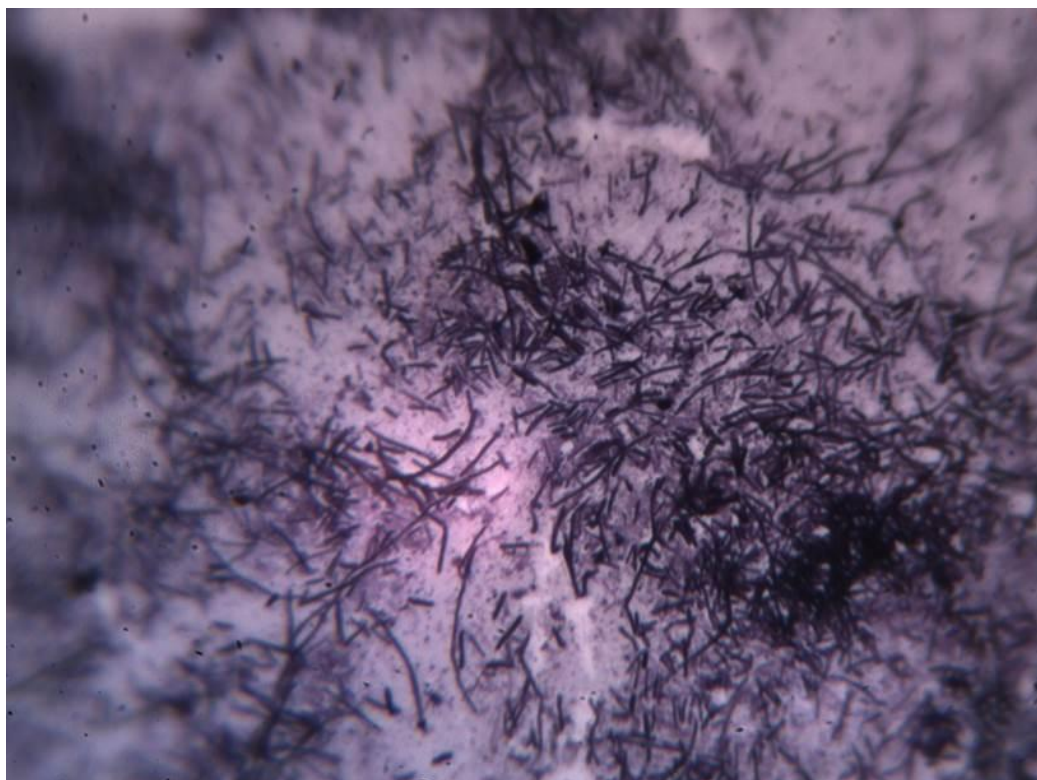


Рисунок 8 – Длинные и короткие грамположительные палочки, типичные для *A. bovis*, после инкубации культуры выделенной от нетеля № 2 на 42 сутки роста (окрашены по Граму с последующей микроскопией под иммерсионным объективом  $\times 90$ )

Таким образом, в ходе проведенных исследований по идентификации возбудителя, изолированного из актиномикомы нетеля № 2, в процессе культивирования и изучения морфологических, культуральных, тинкториальных свойств выделенной культуры нами выявлены характерные признаки *A. bovis*. Выделенный нами штамм был обозначен как *A. bovis* NV-01.

Аналогичным образом проводили выделение штаммов от больных животных (нетелей) из другого хозяйства - колхоза «Победа» Красноармейского района Саратовской области. В этом случае культуры изолированы из актиномиком с использованием сходного патматериала (голов КРС) от нетелей № 3 и 4 (Рисунок 9, А, Б).

После осмотра патматериала, мы также иссекали актиномикому для изолирования абсцедированной ткани и выделения из нее друз (Рисунок 9, В).

После отмывания друз (Рисунок 9, Г) производился их посев на стандартные жидкие среды с последующим культивированием в течение 3-42 сут. для выделения чистой культуры возбудителя и его идентификации. Для посева на плотные питательные среды исследуемый материал (гной с друзами) предварительно измельчали и засеивали также, как указано выше при выделении штамма *A. bovis* NV-01. Оставшийся патматериал был утилизирован в крематории аналогично предыдущему этапу исследований.

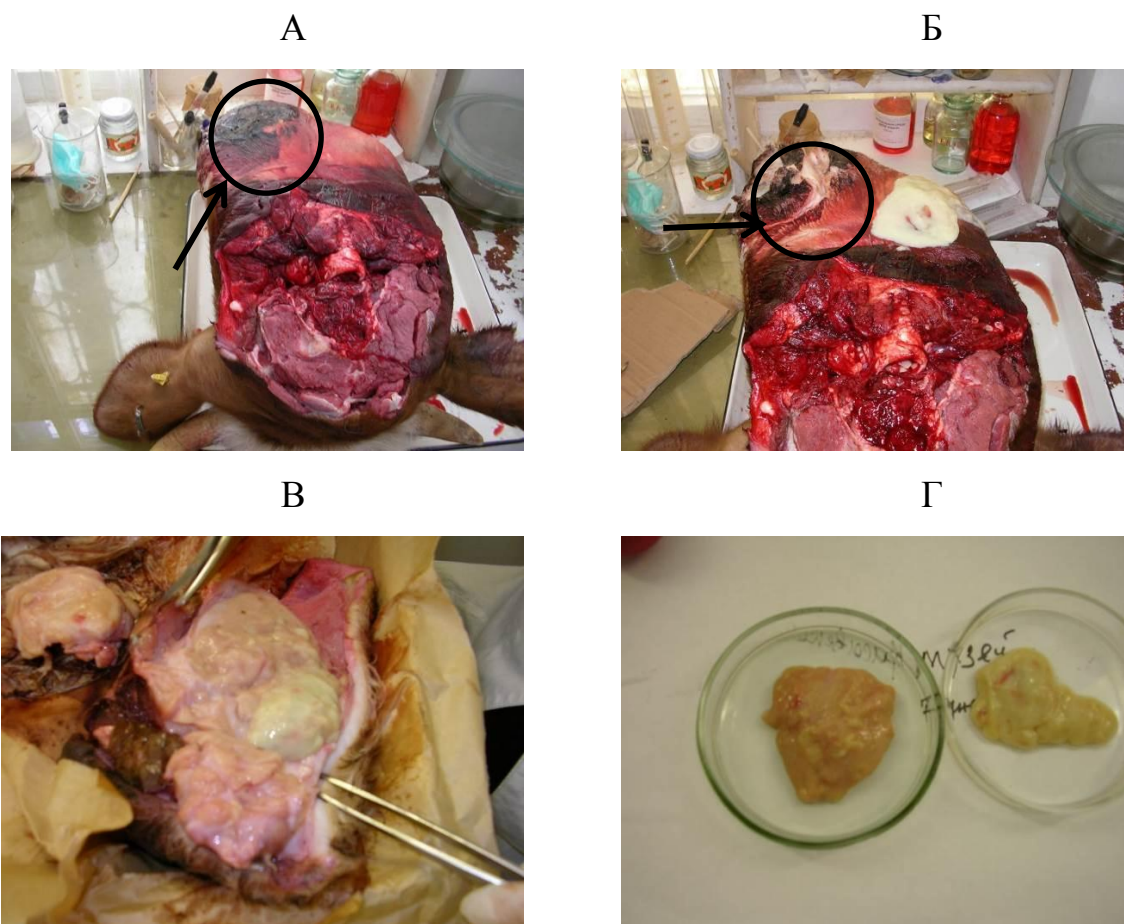


Рисунок 9 – Схема выделения друз *A. bovis* из нетеля № 3 и 4 колхоз «Победа» Красноармейского района: (А) - актиномикома в области нижней челюсти КРС (нетель); (Б) - иссечение актиномикомы из патматериала; (В) - отделение абсцедированной ткани из актиномикомы; (Г) – фрагмент гноя из актиномикомы для вымывания друз

Затем после выращивания культур в те же сроки, что и у штамма NV-01, нами проводилось ее макроскопическое и микроскопическое исследование. В результате удалось выделить еще две культуры, которые по всем морфологическим, культуральным и тинкториальным свойствам были идентифицированы как *A. bovis*. Данные штаммы мы обозначили *A. bovis* NV-02 и *A. bovis* NV-03.

#### **4.2. Изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств изолированных культур *A. bovis* NV-01, *A. bovis* 02 и *A. bovis* 03 и их дифференциация с другими видами рода *Actinomyces***

Для подтверждения принадлежности трех выделенных нами штаммов к роду *A. bovis* на следующем этапе мы проводили исследование их биохимических свойств общепринятым способом, как указано (Красильников, 1941, 1965, 1970; Берджи, 1980, 1997; Сидоров и др., 1995). С этой целью мы проводили посеvy каждого из трех штаммов на «цветной ряд» с глюкозой, сахарозой, мальтозой, лактозой, маннитом, арабинозой, рибозой, ксилозой, целлобиозой, раффинозой, рамнозой, трегалозой, растворимым крахмалом и желатином; определяли образование индола и каталазы; исследовали гидролиз крахмала и восстановление нитратов ( $\text{NO}_3^-$ ) до нитритов ( $\text{NO}_2^-$ ).

Как известно, бактерии *A. bovis* ферментируют с образованием кислоты глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, растворимый крахмал, не образуют кислоты из маннита, арабинозы, рибозы, ксилозы, целлобиозы, раффинозы, рамнозы, трегалозы; не образуют каталазу; гидролизуют крахмал и не гидролизуют желатин; не восстанавливают нитраты до нитритов; не образуют индола (Калакуцкий, 1960, 1961; Спесивцева, 1964; Коленько, 1963; Берджи, 1980, 1997; Сидоров и др., 1995; Колычев, Ощепков, 2001).

Согласно полученным данным, у всех трех изолированных в настоящем исследовании штаммов были выявлены идентичные биохимические свойства, типичные для *A. bovis* (Таблица 1).

Таблица 1 – Изучение основных биохимических свойств штаммов *A. bovis* NV-01, *A. bovis* 02 и *A. bovis* 03, выделенных от нетелей № 2, 3 и 4

| Основные типичные биохимические свойства <i>A. bovis</i> *       | Биохимические реакции штамма <i>A. bovis</i> № |         |         |
|--|--|---------|---------|
|  | NV – 01  | NV – 02 | NV – 03 |
| I. Сбраживание с образованием кислоты:                           |  |         |         |
| глюкозы  | +  | +       | +       |
| сахарозы   | +  | +       | +       |
| мальтозы   | +  | +       | +       |
| лактозы  | +  | +       | +       |
| маннита  | –  | –       | –       |
| арабинозы  | –  | –       | –       |
| рибозы   | –  | –       | –       |
| ксилозы  | –  | –       | –       |
| целлобиозы   | –  | –       | –       |
| раффинозы  | –  | –       | –       |
| рамнозы  | –  | –       | –       |
| растворимого крахмала  | +  | +       | +       |
| II. Образование каталазы   | –  | –       | –       |
| III. Гидролиз крахмала с формированием широкой зоны просветления | +  | +       | +       |
| IV. Редукция нитратов → нитритов                                 | –  | –       | –       |
| V. Образование индола  | –  | –       | –       |

Примечание - (+) положительные реакции; (-) отрицательные реакции; (\*) как указано (Берджи, 1980; Сидоров и др., 1995).

Дифференциацию культур *A. bovis* от *A. israelii* и других видов рода *Actinomyces* первоначально проводили по комплексу признаков (Васильев, 2000; Колычев, Ощепков, 2001). Как видно из таблицы 2, выделенные нами штаммы обладали морфологическими и биохимическими признаками, типичными для вида *A. bovis* рода *Actinomyces*.

Таблица 2 – Сравнение характеристик штаммов *A. bovis* NV-01, *A. bovis* NV-02 и *A. bovis* NV-03 с основными морфологическими и биохимическими признаками дифференциации видов рода *Actinomyces*

| Морфологические и биохимические свойства                 | Виды            |                                  |                             |                               |                             | Характеристика выделенных штаммов |                       |                       |
|--|-----------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|  | <i>A. bovis</i> | <i>Actinomyces odontolyticus</i> | <i>Actinomyces israelii</i> | <i>Actinomyces naeslundii</i> | <i>Actinomyces viscosus</i> | <i>A. bovis</i> NV-01             | <i>A. bovis</i> NV-02 | <i>A. bovis</i> NV-03 |
| Каталаза   | –               | –                                | –                           | –                             | +                           | –                                 | –                     | –                     |
| Формирование микроколоний гладких (Г) или нитевидных (Н) | Г               | Г                                | Н                           | Н                             | Н                           | Г                                 | Г                     | Г                     |
| Рост на кровяном агаре зрелых колоний – красного цвета   | –               | +                                | –                           | –                             | –                           | –                                 | –                     | –                     |
| Восстановление нитратов до нитритов                      | ±               | +                                | ±                           | +                             | +                           | ±                                 | ±                     | ±                     |
| Гидролиз крахмала с формированием широкой зоны           | +               | –                                | –                           | –                             | –                           | +                                 | +                     | +                     |
| При сбраживании (с образованием только кислоты):         |                 |                                  |                             |                               |                             |                                   |                       |                       |
| - арабинозы;   | –               | ±                                | ±                           | –                             | –                           | –                                 | –                     | –                     |
| - рибозы;  | –               | –                                | +                           | –                             | –                           | –                                 | –                     | –                     |
| - ксилозы;   | ±               | ±                                | +                           | –                             | –                           | ±                                 | ±                     | ±                     |
| - растворимого крахмала                                  | +               | (+)                              | ±                           | ±                             | ±                           | +                                 | +                     | +                     |
| Рост в аэробных условиях                                 | +               | +                                | –                           | +                             | +                           | +                                 | +                     | +                     |

Примечание - «+» – 90% штаммов положительны; «–» – 90% штаммов отрицательны; «±» – различные реакции, положительные или отрицательные; «(+))» – положительные, реакция замедленная.

На следующем этапе проводили более детальную дифференциацию трех выделенных нами культур *A. bovis* от других видов рода *Actinomyces* по комплексу признаков, а также от *Actinobacillus lignieresii*, способного вызвать у КРС сходное по клинической картине заболевание (Спесивцева, 1964; Берджи, 1980, 1997; Schaal, 1984, 1986, 1992, 1998; Сидоров и др., 1995). Для этого мы сравнивали культуральные, морфологические и тинкториальные свойства выделенных нами штаммов *A. bovis* с типичными свойствами указанных выше возбудителей. Полученные данные приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Изучение сравнительных микробиологических характеристик штаммов *A. bovis* NV-01, *A. bovis* 02 и *A. bovis* 03, выделенных от нетелей № 2, 3 и 4, по признакам внутривидовой дифференциации рода *Actinomyces*

| Дифференциальные признаки | Характеристика типичных представителей видов рода <i>Actinomyces</i> и <i>Actinobacillus</i>   |                    |                         |                      |                    |   | Характеристика выделенных штаммов   |                       |                       |
|---------------------------|--|--------------------|-------------------------|----------------------|--------------------|---|---|-----------------------|-----------------------|
|                           | <i>A. bovis</i>  | <i>A. israelii</i> | <i>A. odontolyticus</i> | <i>A. naeslundii</i> | <i>A. viscosus</i> | <i>Actinobacillus lignieresii</i>   | <i>A. bovis</i> NV-01   | <i>A. bovis</i> NV-02 | <i>A. bovis</i> NV-03 |
| 1                         | 2  | 3                  | 4                       | 5                    | 6                  | 7   | 8   | 9                     | 10                    |
| Время роста культуры      | Начало роста с 18-48 часов, наибольший рост на 7-14 сутки  |                    |                         |                      |                    | Через 24 часа, но гибель культур на 5-7 день  | Начало роста с 18 часов, наибольший рост на 7-20 сутки  |                       |                       |
| Питательные среды         | Полужидкий агар, залитый стерильным вазелиновым маслом, среда Китта-Тароцци; для выделения аэробного варианта – на кровяной агар, Сабуро, МПБ или скошенный МПА с 1% глюкозы; среде Чапека |                    |                         |                      |                    | Сывороточно-дрожжевой агар; сывороточный и кровяной агар (5-10%); сывороточный и сывороточно-дрожжевой МПБ; среды Мак-Конки | Полужидкий агар, залитый стерильным вазелиновым маслом, кровяной агар, Сабуро, МПБ или скошенный МПА с 1% глюкозы |                       |                       |
| Подвижность культуры      | Стационарный   |                    |                         |                      |                    | Стационарный  | Стационарный  |                       |                       |
| Окраска по Граму          | +  |                    |                         |                      |                    | -   | +   |                       |                       |

| 1  | 2  | 3 | 4 | 5 | 6 | 7  | 8 | 9   | 10 |   |
|--|--|---|---|---|---|--|---|---|----|---|
| Микроскопия  | Нити с истинным ветвлением; дифтероидные клетки или ветвящиеся палочки; встречаются V-, Y- и T- образные формы; нити, варьирующие по длине и степени ветвления |   |   |   |   | Бактериальные клетки сферические, овальные или палочковидные с примесью кокковых элементов на концах бациллы |   | Грамположительные нити различной длины в виде сегментированных цепочек, длинные или короткие, тонкие слегка изогнутые палочки дифтероидного типа, располагающиеся одиночно, парами или встречаются V, Y -образные формы |    |   |
| Тип дыхания  | Факультативный анаэроб   |   |   |   |   | Факультативный анаэроб   |   | Факультативный анаэроб  |    |   |
| Морфология колоний на МПА*                         | Г  | Н | Г | Н | Н | Г  |   | Г   | Г  |   |
| Морфология роста на МПБ                            | Пленка на поверхности среды и осадок на дне, бульон остается прозрачным  |   |   |   |   | Равномерное помутнение и формирование незначительного осадка в виде хлопьев                                  |   | Пленка на поверхности среды и осадок с желтоватым оттенком на дне   |    |   |
| Наличие красных зрелых колоний на кровяном агаре** | -  | - | + | - | - | серо-белые   |   | -   | -  | - |
| Консистенция культуры                              | Культуры плотные   |   |   |   |   | Культуры липкие, со слизью   |   | Культуры плотные  |    |   |

Примечание - МПА\* (Г) - гладкие или (Н) – нитевидные; \*\* (+) наличие красных колоний и (-) отсутствие красных колоний.



Как видно из таблицы № 3, все выделенные нами штаммы, в отличие от *A. lignieresii*, представляли собой грамположительные нити различной длины в виде сегментированных цепочек, длинные или короткие, тонкие слегка изогнутые палочки дифтероидного типа, располагающиеся одиночно, парами или встречались в виде V-, и Y- образных форм; по характеру и времени роста на МПБ также проявляли характерные для представителей рода *Actinomyces* свойства. Причем в отличие от *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, формировавших нитевидные колонии на МПА, изолированные нами штаммы росли в виде гладких колоний. Более того, эти штаммы не формировали красных колоний, характерных для *A. odontolyticus*.

Таким образом, все три штамма, выделенные нами из двух разных хозяйств Саратовской области за период 2007-2008 г., обозначенные, как *A. bovis* NV-01, NV-02, NV-03, по всем признакам (окраска по Граму, морфологии, по типу роста на МПА и МПБ) соответствовали типичным представителям вида *A. bovis*.

## **ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕЖИМОВ ВЫРАЩИВАНИЯ ШТАММА – ПРОДУЦЕНТА *A. BOVIS* NV-01 И ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОЙ АНТИГЕННОЙ КОМПОЗИЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ АКТИНОМИКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

Как известно из литературы (Берджи, 1980, 1997; Сидоров и др., 1995) для формирования колоний *A. bovis* требуется от 7-14 дней роста на соответствующих питательных средах. С другой стороны, в связи с медленным ростом возбудителя актиномикоза в условиях *in vitro*, только при более продолжительном его культивировании происходит существенное увеличение биомассы и наработка активных компонентов *A. bovis*. Как указано в ряде работ (Спесивцева, 1964; Радчук и др., 1991; Колычев, Ощепков, 2001), это возможно не ранее, чем на 15-30 день выращивания актиномицетов.

Не менее важным является выбор метода выделения фракций или антигенных компонентов из культур бактериальных агентов для создания лечебных и/или профилактических средств, обладающих требуемой биологической активностью. Несмотря на то, что за последние годы предложено достаточное количество разных методов получения из клетки протективных компонентов, метод замораживания-оттаивания остается одним из наиболее широко применяемых методов их выделения. Преимуществом данного метода является его простота, возможность одновременного киллинга и получения действующих компонентов различных патогенов (Болдырев, 1987; Досон и др., 1991; Фрайфелдер, 1980; Гланц, 1998; Кнорре, Мызина, 2000; Кольман, Рем, 2000; Кудряшова и др., 2002; Ленинджер, 1985; Мецлер, 1980; Орехович, 1997; Овчинников, 1981; 1987; Северина, Соловьева, 1989).

Ультразвуковой метод также широко используется для получения микробных антигенов или бактериальных компонентов. Особые перспективы

последнего связаны с простотой дезинтеграции клеток, получения в стандартных условиях нативных химически не измененных антигенных комплексов, которые характеризуются низкими аллергенными свойствами и обеспечивают высокую специфическую защиту.

Биологическому действию ультразвука посвящено большое число исследований. Это связано с тем, что при ультразвуковой обработке биообъектов возникают различные явления (диспергирование, кавитация, термическое и окислительное действие), которые могут оказывать существенное влияние на живые организмы. При этом частицы среды совершают интенсивные колебательные движения с большими ускорениями и в обрабатываемой жидкости на малых расстояниях (равных половине длины звуковой волны) возникают разности давлений в несколько атмосфер, то легко себе представить несколько перспективным является применение данного физического фактора в областях биологии, микробиологии, в частности в разделении микробных клеток на антигенные комплексы для разработки нового класса вакцин из нативных клеточных компонентов. Причиной изменений, возникающих в биологических объектах под действием ультразвука, могут быть вторичные эффекты физико-химического характера. Так, под действием акустических волн происходит энергичное перемешивание внутриклеточных микроструктур, а кавитация в среде приводит к разрыву молекулярных связей (Гинсбург, 1969; Агольцов, 2006; Борисов, 2006; Сотников и др., 2006).

Целью настоящего раздела является подбор оптимального режима выращивания штамма-продуцента ЭС вакцины, разработка метода его приготовления и проверка его эффективности на лабораторных и сельскохозяйственных животных.

### **5.1. Разработка способа получения эффективной антигенной композиции экспериментальной серии терапевтической актиномикозной вакцины методом замораживания-оттаивания**

Как известно, метод замораживания-оттаивания давно используется в биотехнологии препаратов для выделения из микробной биомассы активных компонентов или выделения антигенных фракций из цельных микробных клеток (Глик, Пастернак, 2002; Северина, Соловьева, 1989). Замораживание приводит к медленному разрушению бактерий, т.к. кристаллы льда нарушают стенки клеток, в результате чего происходит необратимая деструкция клеток. Для того, чтобы превратить в лед экстрацеллюлярную жидкость, необходимо снизить температуру среды до  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , для замораживания жидкости внутри клеток необходима более низкая температура ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  и ниже). Важно также отметить, что масса образовавшегося льда занимает объем на 10 % больше, чем объем воды, из которой образовался лед. Именно это явление лежит в основе данного метода щадящего разрушения структуры клеточной стенки и вплоть до девитализации клеток (Егоров, 1986; Каркищенко, 2004).

В связи с вышеизложенным, данный метод был использован в настоящей работе для приготовления ЭС вакцины.

Для получения биомассы, выделенную от больных животных культуру штамма *A. bovis* NV-01 засекали на МПБ с 1% глюкозы, выдерживали в термостате при температуре  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 42 суток. Полученную в результате ЭС *A. bovis* NV-01 мы обозначили ЭС-42.

На следующем этапе для выделения цитоплазматической фракции бактерий надосадочную жидкость из ЭС сливали, а полученный осадок подвергали 20-кратному замораживанию и оттаиванию. К полученной после удаления осадка надосадочной жидкости добавляли равное количество дистиллированной воды. Затем проводили проверку на стерильность путем высева серийных разведений ЭС-42 (1:10-1:10000) на МПА с 1% глюкозы.

В результате было установлено, что 20-кратное замораживание - оттаивание приводило к разрушению не менее 85 % клеток штамма *A. bovis* NV-01 (Рисунок 10).

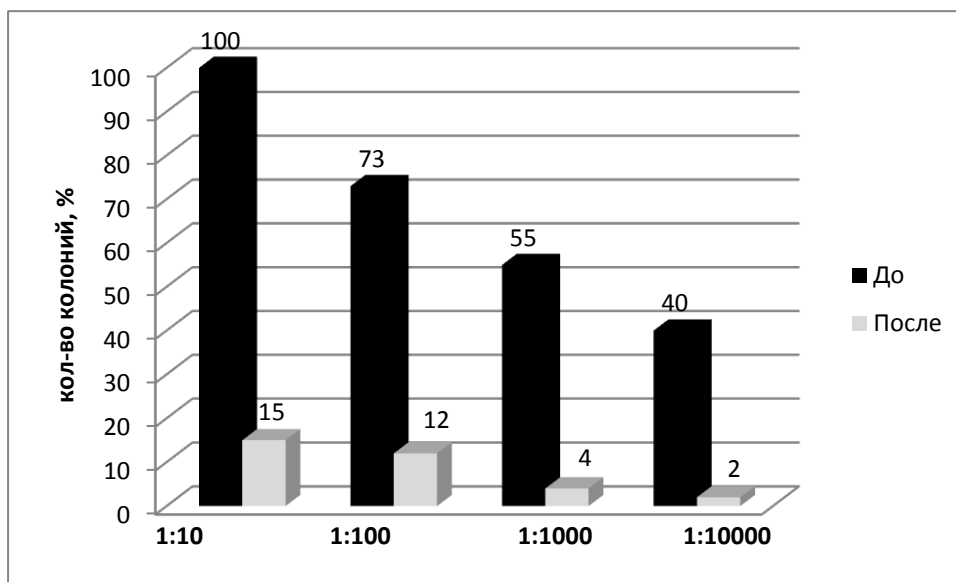


Рисунок 10 – Оценка стерильности ЭС-42 до и после 20-кратного замораживания-оттаивания

Следует отметить, что после 20-кратного замораживания-оттаивания количество выросших колоний значительно ( $\approx$  в 7-20 раз) сократилось в зависимости от разведения ЭС. Также после размораживания у ЭС-42 на жидких питательных средах выявлялась более низкая пролиферативная активность.

Для полного обеззараживания нами в каждую ЭС был добавлен раствор формальдегида до конечной концентрации 0,4 % в соответствии с рекомендациями (Уокер, 1957; Walker, 1964).

После экспозиции в течение 21 дня, производили контрольный высеv ЭС вакцины на стерильность. Как видно на рисунке 11, характерного роста актиномицетов не наблюдалось.



Рисунок 11 – Проверка стерильности ЭС-42 после добавления формальдегида (отсутствие роста бактерий)

На следующем этапе определяли биохимический состав ЭС-42. Полученные данные приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Биохимический состав ЭС-42 актиномикозной терапевтической вакцины

| Биохимический состав | Количество    |
|----------------------|---------------|
| белки                | 1,1-1,3 мг/мл |
| холестерины          | 0,25-0,3мМ/л  |
| триглицериды         | 0,9-1,0 мМ/л  |

Биохимические исследования препарата позволили выявить в нем преимущественное содержание белков и триглицеридов, соответствующих по составу цитоплазматической фракции бактерий (Остерман, 1981, 2002; Борисов, 2005; Шах Махмуд, Филимонова, 2010).

Для выяснения молекулярной массы белков, входящих в состав ЭС-42, проводили электрофорез в 20% ПААГ-SDS по методу Laemmli (1970). По результатам электрофореза (Рисунок 12) в ЭС-42 обнаружена доминантная полипептидная полоса с молекулярной массой 20 кДа, а также несколько минорных белков с молекулярной массой от 60 до 90 кДа.

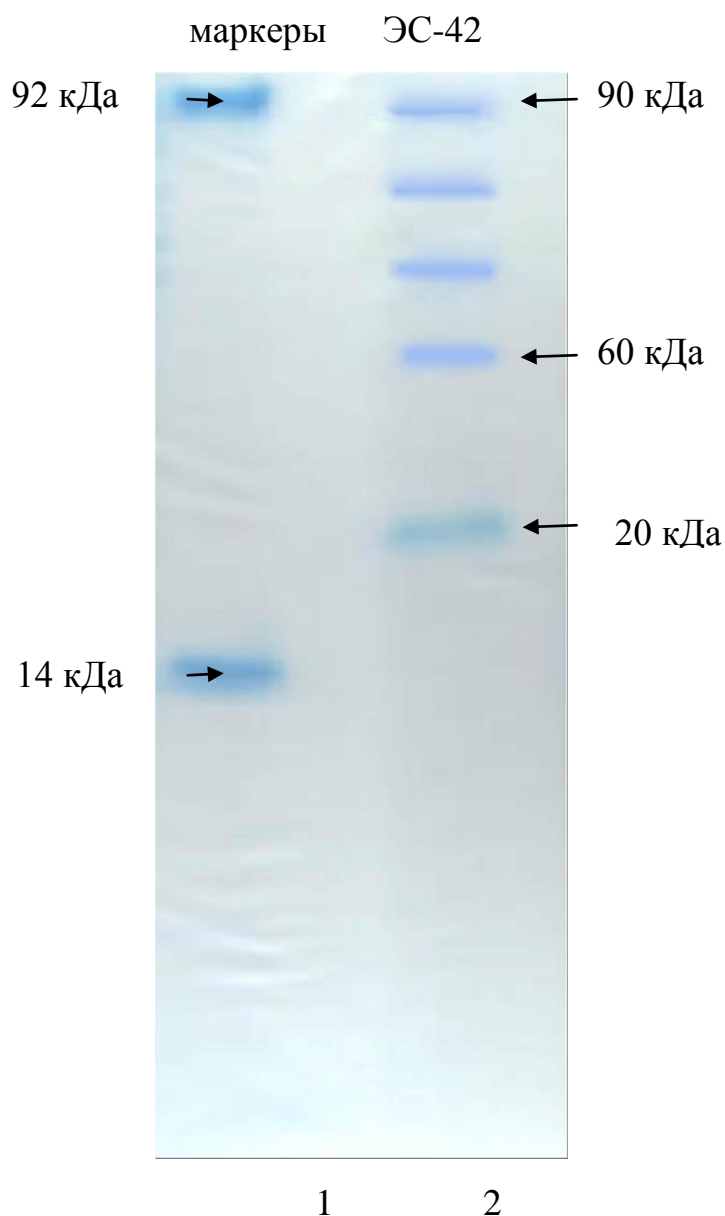


Рисунок 12 – Электрофорез препарата ЭС-42 вакцины в 20% ПААГ-SDS;  
1 – маркеры; 2 – ЭС-42

## **5.2. Разработка способа получения эффективной антигенной композиции экспериментальной серии терапевтической актиномикозной вакцины методом ультразвуковой дезинтеграции**

В литературе широко освещено влияние ультразвуковых полей на микроорганизмы (Буц, Скибенко, 1991; Филоненко, Хохлова, 1999; Шапхаев и др., 2005; Сорока, 2005; Агольцов, 2000, 2006). Степень разрушающего действия ультразвука находится в зависимости от его мощности, частотного

диапазона, экспозиции, морфологических и функциональных особенностей облученных микроорганизмов (Кудрявцев, 1972; Сотников, Гендриксон и др., 2006). Как правило, ультразвуковые колебания приводят бактериальные клетки к гибели, при этом данная микробная суспензия не теряет своих иммуногенных свойств (Скоупс, 1985; Филоненко, Хохлова, 1999). Изменяя интенсивность активности ультразвуковых волн, можно добиться снижения токсичности бактериальной суспензии, сохраняя ее антигенность. Эти положительные качества ультразвука используют в научных разработках для получения высокоэффективных бактериальных вакцинных препаратов (Медуницин, 1999; Агольцов, 2006).

В связи с вышеизложенным, целью настоящего раздела диссертации было применение ультразвуковой дезинтеграции для получения ЭС вакцины.

Материалом исследований также служила культура *A. bovis* NV-01. Аналогично предыдущим экспериментам (см. гл. 5.1.), культуру штамма-продуцента засеивали на 15 л МПБ с 1% глюкозы и выдерживали в термостате при температуре 37 °С в течение 42 суток. Затем, начиная с 7-дня роста, брали образцы культуры через каждые 3 дня выращивания. В результате отобрано 13 образцов культуральной жидкости *A. bovis* NV-01, обозначенных нами, соответственно, в зависимости от сроков выращивания штамма-продуцента как ЭС-7, ЭС-10, ЭС-13, ЭС-16, ЭС-19, ЭС-22, ЭС-25, ЭС-28, ЭС-31, ЭС-34, ЭС-37, ЭС-40 и ЭС-42 (УЗ). Каждую ЭС подвергали ультразвуковой дезинтеграции для разрушения структуры клеточной стенки бактерии *A. bovis* по методу, разработанному ранее (Ласкавый и др., 2005), позволяющему, в зависимости от объема культуральной жидкости, разрушать не менее 90 % клеток.

В настоящем исследовании нами был выбран режим воздействия волн ультразвукового дезинтегратора на ЭС в течение 60 мин. Для освобождения ЭС от поврежденных стенок и целых клеток штамма-продуцента *A. bovis* NV-01 использовали мембранные пластины типа «Владипор-МФА № 3». Фильтрацию каждой ЭС проводили с применением вакуумного аппарата.



Иммуногенность полученных дезинтегрантов указанных тринадцати серий (обозначены, соответственно, ЭС-7, ЭС-10, ЭС-13, ЭС-16, ЭС-19, ЭС-22, ЭС-25, ЭС-28, ЭС-31, ЭС-34, ЭС-37, ЭС-40 и ЭС-42 (УЗ)) предварительно оценивали в РАЛ, как указано (Агольцов и др., 2001, 2003; Ласкавый и др., 2000, 2001, 2005; патент РФ на изобретение № 2176392)).

Для проведения РАЛ предварительно осуществляли отбор кролика-донора с требуемыми характеристиками. С этой целью первоначально проверяли естественную агломеративную способность лейкоцитов у 5 интактных кроликов. Для этого мазки из гепаринизированной крови каждого кролика окрашивали 0,1 % спиртовым раствором метиленового синего с последующей микроскопией при увеличении  $\times 45$  в нескольких полях зрения. Из 1000 лейкоцитов учитывали количество склеенных клеток в 5 мазках. Агломерированными считали те лейкоциты, которые склеивались в количестве не менее 3. Как известно, рекомендовано использовать кролика-донора, кровь которого обладает наименьшей естественной агломерированной способностью - не более 4 % (Ласкавый и др., 2001; Полников, 2003).

Донором лейкоцитов крови в нашем случае стал кролик, естественная (физиологическая) агломерация лейкоцитов крови которого была 3,8 %. Кровь этого животного была использована для оценки активности полученных ЭС по индексу агломерации лейкоцитов. Для этого в пробирки вносили по 0,04 мл полученного образца каждой ЭС вакцины в объеме 0,04 мл, добавляли к нему по 0,02 мл компонента морской свинки. Смесь выдерживают 30 минут при 37 °С, затем вносят по 0,2 мл гепаринизированной крови отобранного нами интактного кролика. Содержимое пробирок встряхивают и инкубируют при 37 °С в течение 45 минут. Смесь из пробирок наносят на предметные стекла и делают мазки, при этом мазки фиксируют метиловым спиртом в течение 20 минут. Затем мазки окрашивают 0,1 % раствором метиленового синего в течение 5 минут. Окрашенные мазки просматривали под микроскопом при увеличении  $\times 45$  в

нескольких полях зрения, подсчитывая по 100 лейкоцитов и учитывая при этом количество склеенных (агломерированных) клеток. Для каждой ЭС проводили подсчет в 3-4 повторностях. Неиммуногенными считали ЭС с индексом агломерации  $0 - < 6 \%$ ; иммуногенными –  $6-15 \%$ ; слабоиммуногенными –  $15-20 \%$ ; неиммуногенными – более  $20 \%$ . Оценка индекса РАЛ основана на результатах ранее проводимых исследований и подтверждена экспериментально при иммунизации белых мышей и кроликов препаратами, полученных из различных фракций других микроорганизмов (Ласкавый и др., 2001; Ласкавый и др., 2005; Агольцов, 2005). Полученные нами данные приведены в таблице 5.

Как видно из таблицы 5, судя по результатам РАЛ, для изготовления ЭС

Таблица 5 – Результаты оценки иммуногенности в РАЛ различных ЭС вакцины из штамма-продуцента *A. bovis* NV-01

| № п/п | №-образца, в зависимости от времени отбора образцов культуральной жидкости штамма-продуцента | Индекс агломерации, % | Оценка                 |                   |
|-------|--|-----------------------|------------------------|-------------------|
|       |  |                       | Агломерации лейкоцитов | иммуногенности ЭС |
| 1     | 7  | 2,2                   | низкая                 | –                 |
| 2     | 10   | 2,3                   | низкая                 | –                 |
| 3     | 13   | 6,5                   | средняя                | +                 |
| 4     | 16   | 3,6                   | низкая                 | –                 |
| 5     | 19   | 3,9                   | низкая                 | –                 |
| 6     | 22   | 5,2                   | низкая                 | –                 |
| 7     | 25   | 5                     | низкая                 | –                 |
| 8     | 28   | 9,4                   | средняя                | +                 |
| 9     | 31   | 5,6                   | низкая                 | –                 |
| 10    | 34   | 9,2                   | средняя                | +                 |
| 11    | 37   | 9,8                   | средняя                | +                 |
| 12    | 40   | 8                     | средняя                | +                 |
| 13    | 42   | 10,8                  | средняя                | +                 |

Примечание - «+» – иммуногенный; «–» – неиммуногенный.

вакцины наиболее подходящими следовало считать серии ЭС-13, ЭС-28, ЭС-34, ЭС-37, ЭС-40 и ЭС-42 (УЗ), поскольку у них отмечалась средняя агломеративная активность с соответствующим индексом агломерации в диапазоне 6 – 15 %. Поэтому указанные серии ЭС предположительно могли обладать относительно высокой иммуногенностью. Вместе с тем, для получения препаративного количества штамма-продуцента ЭС вакцины более подходящим, на наш взгляд, следовало считать ЭС-42 (УЗ).

На следующем этапе приготовления ЭС вакцины мы делали высев ЭС-42 (УЗ) на стерильность. Нами обнаружено, что способ разрушения ультразвуковой дезинтеграцией позволил разрушить не менее 65 % клеток штамма-продуцента *A. bovis* в зависимости от разведений ЭС (Рисунок 13)

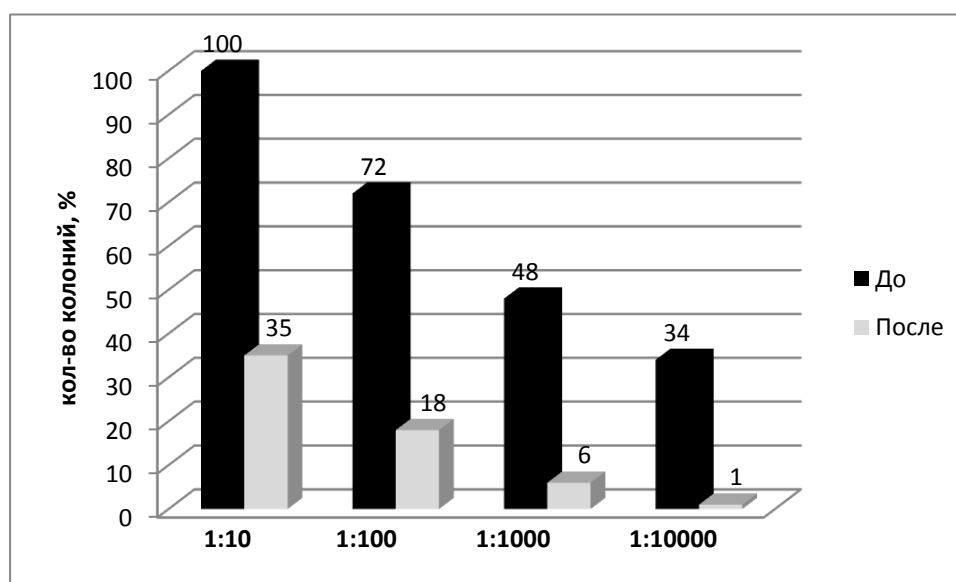


Рисунок 13 – Оценка стерильности ЭС-42 до и после ультразвуковой дезинтеграции

Для полного обеззараживания нами в каждую ЭС был добавлен раствор формальдегида до конечной концентрации 0,4 % в соответствии с рекомендациями (Уокер, 1957; Walker, 1964).

После экспозиции в течение 21 дня, производили контрольный высев ЭС-42 (УЗ) ЭС вакцины на стерильность. Как видно на рисунке 14, характерного роста актиномицетов не наблюдалось.

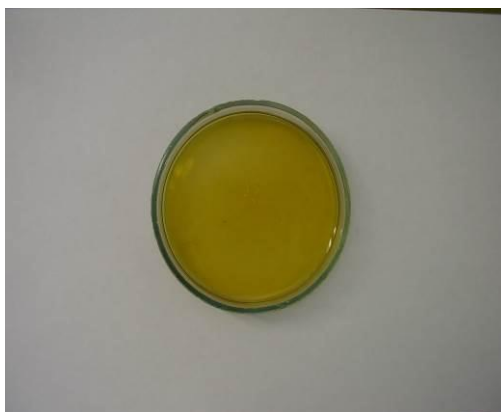


Рисунок 14 – Проверка стерильности ЭС-42 (УЗ) после добавления формальдегида (отсутствие роста бактерий)

Таким образом, применение ультразвуковой дезинтеграции биомассы *A. bovis* NV-01, потенциального штамма-продуцента ЭС вакцины, позволило получить ЭС-42 (УЗ) с предполагаемой высокой иммуногенностью.

### **5.3. Изучение лечебного действия экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины на животных в производственных условиях**

Для выявления лечебных свойств у полученных нами ЭС-42 и ЭС-42 (УЗ) проводили проверку соответствующей активности на ограниченном количестве КРС. С этой целью по разработанной нами выше биотехнологии были приготовлены соответствующие ЭС в небольших объемах по 15 литров каждая с применением штамма-продуцента *A. bovis* NV-01 и засеяли его на МПБ с 1% глюкозы, выдерживали в термостате при температуре 37 °С в течение 42 дней. Затем надосадочную жидкость сливали, а полученный осадок подвергали 20-кратному замораживанию и оттаиванию для приготовления ЭС-42 или ультразвуковой дезинтеграции – для ЭС-42 (УЗ). С целью освобождения каждой из указанных ЭС от поврежденных стенок и целых клеток штамма-продуцента, использовали мембранные пластины типа

«Владипор-МФА №3». Фильтрацию во всех случаях проводили с применением вакуумного аппарата.

К полученной серии добавляли раствор формальдегида (36-40 % раствора медицинского формальдегида) из расчета 0,4 мл формалина на 100 мл готового средства. Затем все ЭС ставили в термостат на 21 день для контроля стерильности. Через 21 день их разливали во флаконы по 100 мл и упаковывали под резиновую и железную пробку. После этого ставили в термостат на 7 дней для повторного контроля стерильности. Препараты ЭС хранили в холодильнике при температуре +4 °С в течение полутора лет (срок наблюдения). Для транспортировки в хозяйства их упаковывали в картонный ящик.

Проверку лечебных свойств ЭС мы начали с исследований в колхозе «Победа» Красноармейского района. Для этого мы сформировали группу КРС - телят 6-8 месячного возраста (12 голов), телок случного возраста (10 голов) и коров (8 голов), с характерными признаками актиномикоза и различной степенью выраженности актиномикомы: с диаметром до 7 см, до 12 см и более 25 см, соответственно, а также 10 голов контрольных интактных животных.

Всем животным вводили ЭС-42 (УЗ) вводили препарат внутримышечно в область средней трети шеи независимо от возраста и веса животных по 5 мл/гол., трехкратно на 1, 7 и 14 день. Животные были изолированы от общего стада и содержались в отдельных стойлах. После введения препарата наблюдения за больными животными осуществляли в течение 6-8 недель. В хозяйствах, где проводили испытания ЭС вакцины, больных животных изолировали от здоровых. Помещения, где находились больные животные, очищали и дезинфицировали ежедневно, остальные – раз в 10 дней, применяя при этом 2-3 % растворы едкой щелочи или свежегашеную известь.

Как видно из табл. 6, введение препарата больным актиномикозом животным с актиномикомой не более 10-12 см привело к их полному выздоровлению (100 % эффективность).

Таблица 6 – Результаты введения КРС ЭС-42 (УЗ) в колхозе «Победа»  
Красноармейского района

| Диаметр<br>актиномикомы, см | Кол-во<br>животных | Кол-во выздоровевших<br>животных |         | Лечебный<br>эффект |
|-----------------------------|--------------------|----------------------------------|---------|--------------------|
|                             |                    | абс.                             | отн., % |                    |
| 7                           | 12                 | 12                               | 100     | +                  |
| 12                          | 10                 | 7                                | 70      | ±                  |
| >25                         | 8                  | 0                                | 0       | -                  |

Примечание - (+) – полная редукция актиномикомы у всех животных в группе; (-) – отсутствие видимого эффекта у всех животных в группе; (±) – полная редукция актиномикомы у 70 % и частичная – у 30 % животных в группе.

Среди КРС с актиномикомой среднего размера (до 12 см), обработанных препаратом, выздоровела большая часть животных (70 %), а введение препарата на более поздней стадии развития актиномикоза не обеспечило лечебного эффекта, что может быть объяснено длительным течением болезни и необратимостью происшедших в организме коров патологических изменений.

Таким образом, ЭС-42 (УЗ) обладала выраженным терапевтическим эффектом в отношении животных с актиномикомой, не превышающей в диаметре 12 см (т.е. на начальной стадии болезни), но была менее эффективной при лечении КРС с актиномикомой большего диаметра.

ЭС-42 были проверены на сельскохозяйственных животных в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области. Хозяйство считалось неблагополучным по актиномикозу предыдущие 2 года. С апреля по октябрь 2008 года в нем было выявлено 84 головы (нетели, первотелки, коровы) с актиномикозными поражениями разной степени в области нижней и верхней челюсти. Для контроля было взято 10 голов (заведомо здоровые животные).

Животным ( $n = 82$ , т.к. две головы КРС были использованы в качестве патматериала для выделения культуры актиномицетов и, соответственно, штаммов – продуцентов *A. bovis*) вводили препарат внутримышечно в область средней трети шеи независимо от возраста и веса животных по 5 мл/гол., трехкратно на 1, 7 и 14 день.

Опытная группа была разделена на 4 подгруппы в зависимости от выраженности актиномикомы: животные с признаками актиномикоза на первой и в начале второй стадии развития заболевания и, соответственно, актиномикомой в диаметре до 5 см и 10-12 см; на второй стадии развития заболевания - 15-20 см, и с сильными поражениями – более 25 см.

Животные также были изолированы от общего стада и содержались в отдельных стойлах. Обработку помещения проводили аналогичным образом.

На рисунке 15 представлена динамика редукции актиномикомы у нетеля с актиномикомой в диаметре 10-12 см (Рисунок 15 А). При обследовании больных животных (нетели) через две недели после введения ЭС-42 установлено, что плотный актиномикозный фокус уменьшился в размере  $\approx$  на 4-5 см (Рисунок 15 Б). За последующие 3-4 недели у животных этой группы актиномикотическая гранулема размягчалась с последующим ее вскрытием и образованием фистулы (Рисунок 15 Б). Полное выздоровление наступало в течение 1-1,5 месяца и сопровождалось удалением гноя, после этого наружные отверстия фистулезных ходов заживали с образованием рубца (Рисунок 15 В, Г).

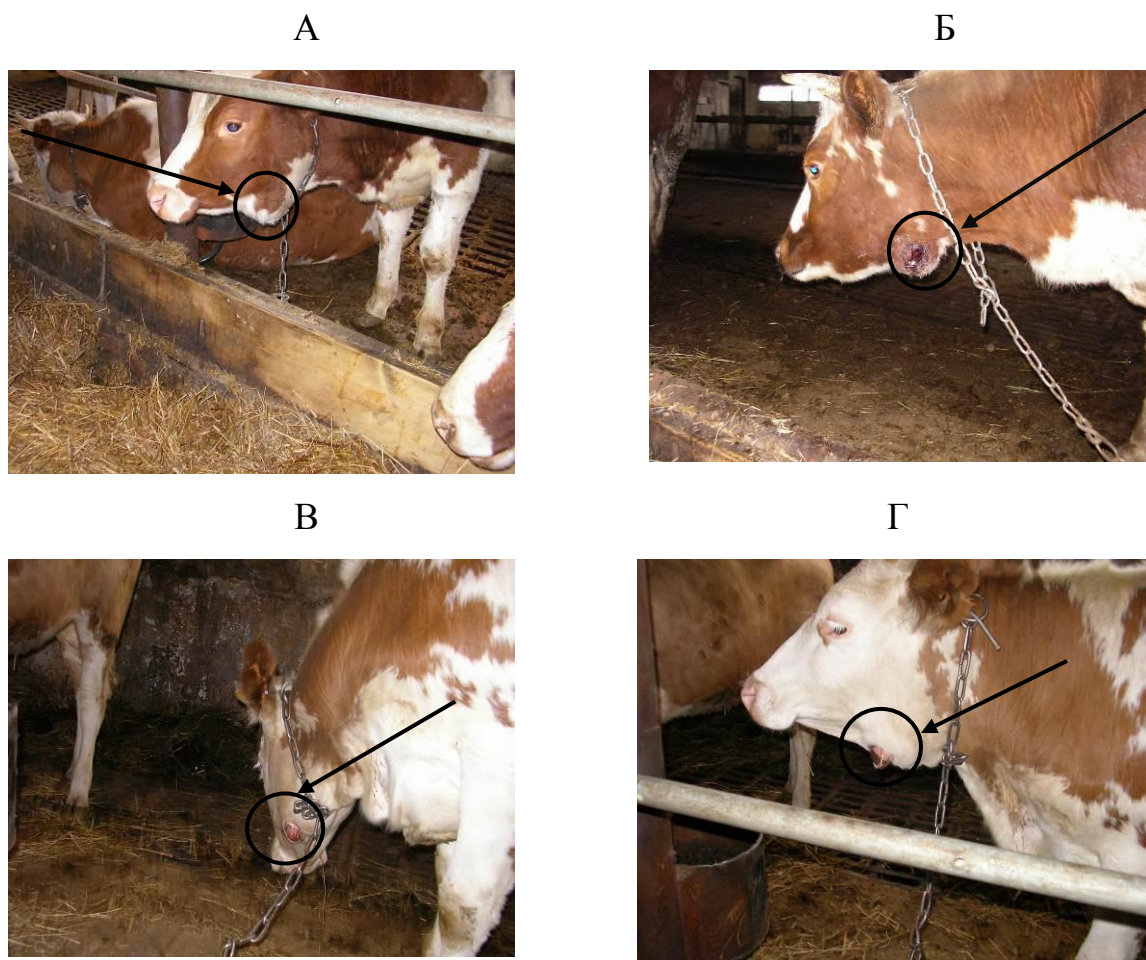


Рисунок 15 – Нетель до (А) и после (Б, В, Г) введения ЭС-42 в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района: (А) - актиномикома в области нижней челюсти; (Б) - размягчение опухоли с последующим ее вскрытием и образованием фистулы; (В) - заживание наружных отверстий фистулезных ходов с образованием рубца (вид с боку); (Г) - заживание наружных отверстий фистулезных ходов с образованием рубца (вид снизу)

В тех случаях, когда актиномикомы образовывались у животных в области глотки и гортани, затрудняя дыхание и глотание, в результате уменьшения актиномикозного очага, наблюдалась нормализация приема пищи и дыхания без хрипов.

У животных с актиномикомой в диаметре менее 5 см после обработки препаратом выздоровление наступало в более короткие сроки (до 4 недель).

В целом введение препарата больным актиномикозом нетелям привело к выздоровлению большинства животных на первой и второй стадиях развития



заболевания (Таблица 7). Однако сроки редукции актиномикомы варьировали. В дальнейшем выздоровление наблюдалось (в течение двух месяцев после проведенного лечения) у всех подвергшихся лечению животных.

У животных на более поздних стадиях актиномикоза (с гранулемой более 25 см) лечебного эффекта в указанные сроки не регистрировалось, что может быть объяснено также длительным и тяжелым течением болезни, необратимостью происшедших в организме животных патологических изменений.

У животных на более поздних стадиях актиномикоза лечебного эффекта в указанные сроки не регистрировалось, что может быть объяснено также длительным и тяжелым течением болезни, необратимостью происшедших в организме животных патологических изменений.

Таблица 7 – Оценка лечебного эффекта ЭС-42 вакцины у КРС в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района

| Диаметр<br>Актиномикомы,<br>см | Кол-во<br>животных | Кол-во выздоровевших<br>животных |         | Лечебный<br>эффект |
|--------------------------------|--------------------|----------------------------------|---------|--------------------|
|                                |                    | абс.                             | отн., % |                    |
| <5                             | 32                 | 32                               | 100     | +                  |
| 10-12                          | 20                 | 20                               | 100     | +                  |
| 15-20                          | 20                 | 15                               | 75      | ±                  |
| >25                            | 10                 | 0                                | 0       | -                  |

Примечание - (+) – полная редукция актиномикомы у всех животных в группе; (-) – отсутствие видимого эффекта у всех животных в группе; (±) – полная редукция актиномикомы у 75 % и частичная – у 25 % животных в группе.

Обработка ЭС-42 вакцины оказалась наименее эффективной на животных с обширными актиномикозными поражениями - через две–шесть недель после введения данной ЭС вакцины при обследовании больных животных было выявлено видимое отсутствие лечебного эффекта (Рисунок 16).

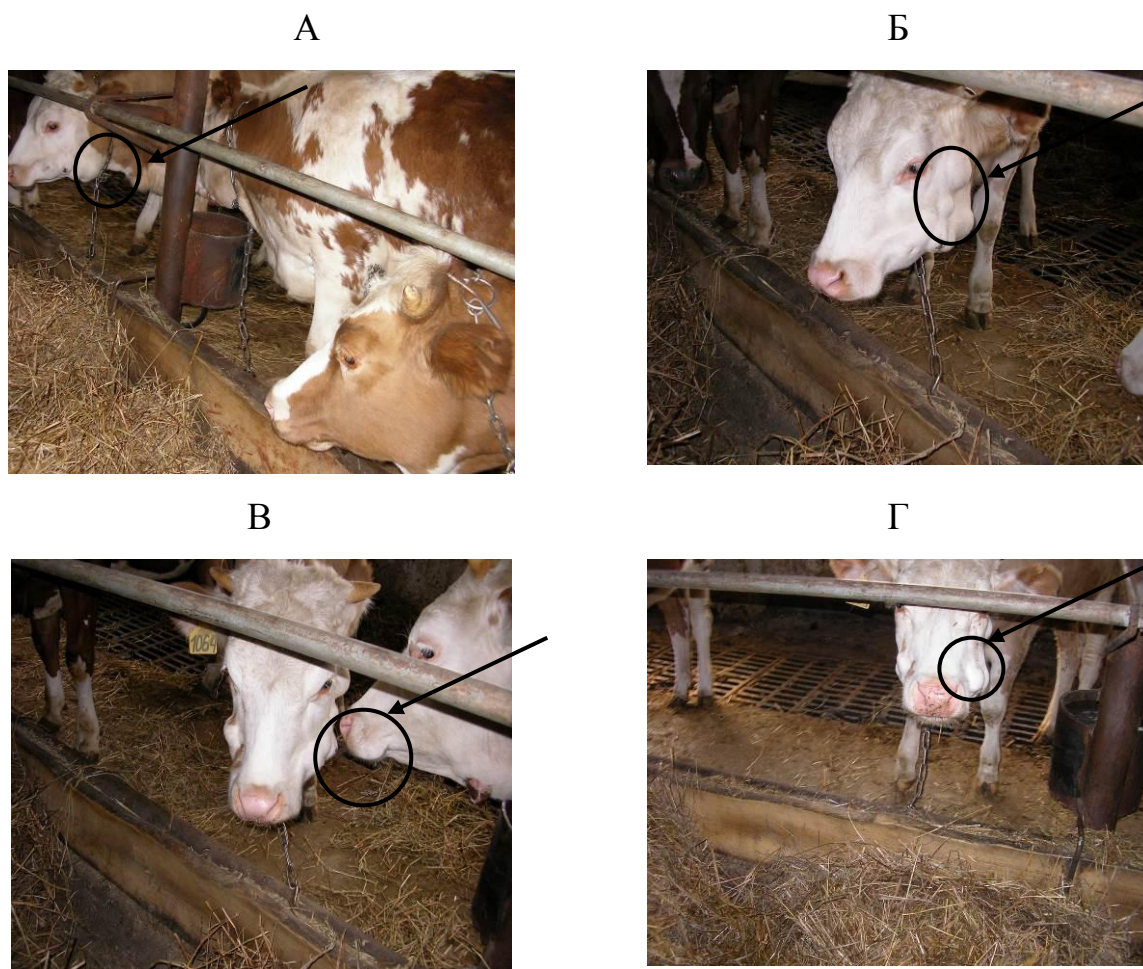


Рисунок 16 – Нетель до (А) и после (Б, В, Г) применения ЭС-42 в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района: (А) – корова с множественными актиномикозными разражениями на лицевой части головы; (Б) - корова с множественными актиномикозными разражениями на лицевой части головы через 14 дней после введения ЭС вакцины - отсутствие лечебного эффекта; (В) - корова (вид спереди) с множественными актиномикозными разражениями на лицевой части головы через 30 дней после введения ЭС вакцины - отсутствие лечебного эффекта; (Г) - корова через 1,5 месяца после проведенного лечения (отсутствие лечебного эффекта), подлежащая убою с дальнейшей технической утилизацией головы

Все животные были сданы на мясокомбинат.

#### **5.4. Изучение профилактического действия экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины на крупном рогатом скоте**

Для выявления профилактических свойств у полученной нами ЭС-42 проводили проверку соответствующей активности на КРС в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области. Всего было обработано в ноябре 2009 года 736 голов, из которых 244 первотелки, 235 телок случного возраста, 242 телки старше 6 месячного возраста, 15 бычков. Животным вводили препарат внутримышечно в область средней трети шеи независимо от возраста и веса животных по 5 мл/гол., двукратно на 1 и 7 дни. Место инъекции предварительно выстригалось и обрабатывалось 70° этанолом. В ходе проведения эксперимента состав рациона и количественное соотношение кормов не менялось.

Как видно на рисунке 17 А, животные с выраженной актиномикомой и группа КРС после обработки ЭС-42 для профилактики актиномикоза содержались в одном комплексе.

После обработки животных ЭС-42 при последующем обследовании через год (в ноябре 2010 г.) ни одной головы с актиномикозным поражением (Рисунок 17 Б) не выявлено (Таблица 8).



Рисунок 17 – Нетели с актиномикозом (А) и здоровые животные после введения ЭС-42 (Б) в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района: (А) - актиномикома в области нижней челюсти; (Б) – без актиномикозных изменений

Таблица 8 – Изучение эффективности введения ЭС-42 вакцины КРС в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района

| Сроки наблюдения                       | Кол-во животных | Кол-во больных актиномикозом животных в 2009 г |       | Кол-во больных актиномикозом животных в 2010 г | Кол-во больных актиномикозом животных в 2013 г | Эффективность, % |
|--|-----------------|--|-------|--|--|------------------|
|  |                 | Абс.   | %     |  |  |                  |
| До обработки ЭС-42 (октябрь 2009 г.)   | 820             | 84   | 10,24 | 0  | 0  | –                |
| После обработки ЭС-42 (ноябрь 2010 г.) | 736             | 0  | 0     | 0  | 0  | 100              |

При дальнейшем наблюдении в течение последующих трех лет в указанном хозяйстве не было выявлено ни одного случая актиномикоза у КРС.

Следовательно, проведенные профилактические мероприятия против актиномикоза крупного рогатого скота, основанные на двукратном введении животным препарата из выделенного нами штамма *A. bovis* NV-01, обеспечивали 100% эффективность.

Таким образом, нами разработаны основные этапы экспериментальной биотехнологии приготовления ЭС вакцины против актиномикоза КРС и проведена ее апробация на КРС фермерских хозяйств. Две ЭС (ЭС-42 и ЭС-42 (УЗ)) обладали выраженным лечебным эффектом, а у одной из них (ЭС-42) одновременно регистрировался профилактический эффект.

## **ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СЕРИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ (ЭС-42) НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТОК КРОВИ ЖИВОТНЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ**

Определение биохимического и иммунологического статуса сельскохозяйственных животных является неотъемлемым этапом многих лечебных и профилактических ветеринарных мероприятий. Как известно, изучение биохимических показателей крови обладает большой диагностической значимостью, так как результаты даже неполного биохимического анализа крови животного дают возможность ветеринарному специалисту достаточно точно определить состояние исследуемого организма, а более того, исследование некоторых ключевых показателей крови позволяет довольно точно прогнозировать исход того или иного заболевания, осуществлять корректировку проводимой терапии, оценивать эффективность новых инновационных препаратов или лекарственных средств, особенно в модельных экспериментах. Особую значимость изучение биохимических показателей крови приобрело при лечении хронических инфекционных и неинфекционных заболеваний, сопровождающихся отсутствием внешних клинических проявлений. В таких случаях комплексный анализ биохимических и иммунологических показателей крови позволяет в полной мере судить о состоянии организма животного, а также наблюдать за изменением метаболических процессов в его организме, особенно при оценке эффективности применения лечебных и/или профилактических препаратов, своевременно вносить нужные коррективы в схему проведения лечебных и/или профилактических мероприятий. Очевидно, что в итоге это может результировать значительное снижение затрат на медикаменты и ветеринарный персонал и, в целом, может способствовать росту ключевых макроэкономических показателей

отечественного животноводства (Мецлер, 1980; Овчинников, 1981; 1987; Болдырева, 1987; Северина, Соловьева, 1989; Орехович, 1997; Кнорре, Мызина, 2000; Кольман, Рем, 2000; Маршалл, 2000; Остерман, 2002; Луговская, 2002; Ткачук, 2004; Камышников, 2004; Волгин и др., 2009; Магер и др., 2009; Магер, Скрипко, 2009; Painter et al., 1999).

Иммунологические показатели крови используют с целью диагностики, профилактики и лечения ряда заболеваний, а также для определения особенности иммунных процессов при различных видах инфекций и неспецифических формах устойчивости организма к возбудителю. Всё большее значение приобретает изучение иммунологической перестройки организма, вызванной неинфекционными антигенами экзогенного и эндогенного происхождения, разработке методов борьбы с аллергическими заболеваниями, равно как и для исследования субпопуляций лимфоцитов и других клеток крови, причин и механизмов развития патологических состояний и др. (Ильина, 2004; Белов, Ларионов, 2010).

Целью настоящего раздела являлось определение биохимических и иммунологических показателей крови при экспериментальном моделировании актиномикоза у лабораторных животных, а также при введении КРС ЭС вакцины против актиномикоза, оценке ее эффективности и лечебно-профилактического действия.

### **6.1. Изучение влияния ЭС-42 на биохимические показатели сывороток крови морских свинок**

На первом этапе исследовали биохимические параметры сывороток крови у лабораторных животных – морских свинок (24 головы), после экспериментального моделирования актиномикоза путем внутримышечного введения штамма *A. bovis* NV-01. Для этого у биомоделей проводили забор крови за один день до и через 30 дней после введения указанного штамма возбудителя актиномикоза КРС (заражающая доза 1 млрд/мл КОЕ, 1 мл).

Затем животным вводили ЭС-42 однократно внутримышечно по 1 мл/гол. Взятие крови осуществляли спустя 21 день после инъекции препарата.

Как видно из табл. 9, после введения штамма *A. bovis* NV-01 наблюдалось изменение большинства биохимических параметров сывороток крови морских свинок. Так, нами зарегистрировано повышение АЛТ в 2,3 раза, а таких показателей как ЛДГ, КК и АСТ - в 3,9, 5,9 и 8,1 раза, соответственно (во всех случаях  $p < 0,05$ ). Также выявлялось некоторое повышение содержания общего белка - в 1,6 раз, и незначительное снижение ( $p > 0,05$ ) показателей глюкозы и холестерина.

Таблица 9 – Изучение влияния ЭС-42 вакцины на биохимические показатели сывороток крови морских свинок при экспериментальном актиномикозе, опосредованном бактериями вирулентного штамма *A. bovis* NV-01

| п/п | Параметр              | Единица измерения | Показатели сывороток крови морских свинок                   |   |   |
|-----|-----------------------|-------------------|---|---|---|
|     |                       |                   | До введения штамма <i>A. bovis</i> NV-01 и ЭС-42 (контроль) | После введения штамма <i>A. bovis</i> NV-01 | После последовательного введения штамма <i>A. bovis</i> NV-01 и ЭС-42 |
| 1   | АЛТ                   | ед/л              | 51,8± 4,3   | 121,4± 23,1                                 | 79,3± 0,7   |
| 2   | АСТ                   | ед/л              | 35,9±9,1  | 291,8±160,7                                 | 134,6±2,6   |
| 3   | Коэффициент Де Ритиса | ед/л              | 1,1±0,1   | 2,2±0,2                                     | 1,7±0,1   |
| 4   | КК                    | ед/л              | 680,3±149,5   | 4026,9±2376,9                               | 5163,9±21,8   |
| 5   | ЛДГ                   | ед/л              | 251,9±73,5  | 987,9±426,8                                 | 1357,9±10,1   |
| 6   | Общий белок           | %                 | 36,4±0,8  | 57,6±3,6                                    | 53,7±0,5  |
| 7   | Глюкоза               | %                 | 7,8±0,5   | 7,4±0,7                                     | 11,4±0,5  |
| 8   | Общий холестерин      | ммоль/л           | 0,8±0,1   | 0,6±0,1                                     | 1,4±0,1   |

Как было показано ранее (Малинин, 2009), одновременное повышение указанных параметров крови может указывать на усиление анаэробных процессов в клетках экспериментальных животных, уменьшение роли реакций цикла Кребса по сравнению с обходными путями метаболизма и, как следствие, снижение резистентности организма биомоделей. Выявленное в настоящем исследовании увеличение активности АЛТ, видимо, свидетельствовало о сходных биохимических изменениях у морских свинок после обработки ЭС-42 вакцины.

После введения ЭС-42 вакцины у инфицированных животных (в модельной актиномикозной инфекции) наблюдалась тенденция к снижению основных биохимических параметров в сторону физиологической нормы: АЛТ, АСТ – в 1,5 и 2,2 раза, а общего белка - в 1,1 раз. При этом выявлялось некоторое увеличение ряда показателей: КК - в 1,3 раза, ЛДГ - в 1,4, глюкозы - в 1,5, а общего холестерина - в 2,2 раза.

Достоверное повышение содержания глюкозы и холестерина у обработанных ЭС-42 зараженных животных, вероятно, указывало на активизацию у морских свинок глюконеогенеза и увеличение интеграции липидного и углеводного обмена. В данном случае увеличение активности АЛТ, сопровождающееся также достоверным возрастанием активности АСТ и свидетельствующее, по мнению ряда авторов (Овчинников, 1981; Ленинджер, 1985; Досон и др., 1991; Баранников и др., 1997; Северина, Соловьева, 1999; Кольман, Рем, 2000; Кнорре, Мызина, 2000), об активизации гепатоцитов и повышении нейтрализующей функции печени, в свою очередь, коррелировало с проявлением аналогичных изменений в организме биомоделей.

Индекс Де Ритиса, представляющий собой отношение АСТ/АЛТ и отражающий состояние аэробных катаболических процессов, также несколько снижался, хотя и был несколько выше, чем в контроле. По мнению некоторых исследователей (Рослый, 2002; Громыко, 2005), это может указывать на тенденцию к активизации кислородзависимых процессов у



обработанных (в нашем случае - после лечения ЭС вакцины) животных и повышение их резистентности к инфекции, что подтверждалось также достоверным увеличением концентрации общего белка и активности КК. В настоящем исследовании наблюдалась такая же закономерность (Таблица 9), что говорит о повышении резистентности к инфекции.

Увеличение активности ЛДГ на фоне повышенного по сравнению с контролем значения активности АСТ и АЛТ, а также увеличения коэффициента Де Ритиса (Таблица 9), свидетельствовало об активизации аэробных кислородзависимых катаболических процессов, что увеличивает неспецифическую резистентность организма животных (Рослый, 2002).

Таким образом, нами получены убедительные данные о способности ЭС-42 вакцины оптимизировать биохимические показатели сывороток крови морских свинок при моделировании актиномикозной инфекции в лабораторных условиях.

## **6.2. Изучение влияния ЭС-42 на биохимические показатели сывороток крови крупного рогатого скота**

Полученные при выполнении текущего раздела диссертации экспериментальные результаты в совокупности с установленной у ЭС-42 вакцины на предыдущем этапе выполнения настоящей работы терапевтической активностью (гл. 5.3) позволили перейти к решению одной из основных задач исследования – апробации разработанного нами препарата на больных актиномикозом сельскохозяйственных животных (КРС).

Поэтому на следующем этапе для оценки лечебных свойств ЭС-42 вакцины проводили исследование биохимических параметров сывороток крови нетелей с актиномикозными поражениями до и после введения препарата. Животным (14 голов) вводили ЭС-42 внутримышечно в область средней трети шеи по 5 мл/гол., трехкратно на 1, 3 и 7 день. Забор крови у животных проводили за один день до и через 21 день после последней

инъекции ЭС вакцины. Исследования выполняли в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области.

Как видно из таблицы 10, у больных актиномикозом животных также наблюдалось изменение большинства биохимических параметров сывороток крови. Но после введения ЭС вакцины нами зарегистрирована тенденция к нормализации всех изучаемых параметров.

Таблица 10 – Изучение влияния ЭС-42 вакцины на биохимические показатели сывороток крови нетелей, больных актиномикозом

| № п/п | Параметры             | Единица измерения | Показатели сыворотки крови нетелей   |                       |   |
|-------|-----------------------|-------------------|--|-----------------------|---|
|       |                       |                   | Показатели относительной нормы клинически здоровых КРС в СПК колхоз «Красавский» | Больные актиномикозом | Больные актиномикозом после обработки ЭС-42 вакцины |
| 1     | АЛТ                   | ед/л              | 27,0±1,1   | 32,3±2,1              | 29,9±3,9  |
| 2     | АСТ                   | ед/л              | 96,5±1,7   | 64,2±6,1              | 97,7±8,5  |
| 3     | Коэффициент Де Ритиса | ед/л              | 3,6±1,5  | 1,9±0,1               | 3,5±0,4   |
| 4     | КК                    | ед/л              | 174,8±10,1   | 139,53±19,4           | 152,3±21,5  |
| 5     | ЛДГ                   | ед/л              | 2316,9±114,3   | 2840,7±172,8          | 2940,0±291,0  |
| 6     | Общий белок           | %                 | 76,5±1,6   | 60,5±2,8              | 70,2±5,3  |
| 7     | Глюкоза               | %                 | 3,8±0,2  | 5,6±0,3               | 2,8±0,2   |
| 8     | Общий холестерин      | ммоль/л           | 4,3±0,1  | 2,9±0,1               | 3,6±0,4   |

Как и в предыдущих экспериментах на биомоделях, после введения ЭС-42 вакцины в сыворотках крови КРС достоверно возростала активность АСТ. Это указывало на повышение синтеза АТФ (Малинин, 2009). Коэффициент

Де Ритиса, представляющий собой отношение АСТ/АЛТ и отражающий состояние аэробных катаболических процессов (De Ritis et al., 2006), у обработанных препаратом животных повышался до контрольных показателей (Таблица 10). Видимо, это отражало тенденцию к активизации кислородзависимых процессов у обработанных животных и потенциальное повышение резистентности к инфекции, что подтверждалось также достоверным увеличением концентрации общего белка и активности КК. Увеличение коэффициента Де Ритиса свидетельствовало о преобладании энергетического обмена над пластическим (De Ritis et al., 2006).

В совокупности с повышением общего холестерина, снижение глюкозы свидетельствовало о том, что в энергетическом обмене больных актиномикозом животных после введения ЭС-42 вакцины значительную роль играют липиды (Комаров и др., 1999).

Тенденция к восстановлению концентрации белка до показателей нормы указывала на то, что преобладание энергетического обмена в указанной группе КРС не сопровождалось угнетением пластического обмена, а, напротив, приводила к интенсификации последнего.

Достоверное снижение глюкозы в группе животных после обработки препаратом предполагало увеличение интенсивности энергетического обмена.

Далее мы исследовали наличие взаимосвязи между выраженными профилактическими свойствами ЭС вакцины и изменениями биохимических параметров сывороток крови КРС. Эту часть диссертационной работы также проводили на нетелях в СПК колхоз «Красавский». В этом случае животные были разделены на две группы – контрольную (10 голов) и экспериментальную (10 голов). В первую из них объединяли клинически здоровых особей, которые были изолированы от основного стада на время проведения эксперимента. Животным экспериментальной группы вводили ЭС-42 двукратно внутримышечно в область средней трети шеи по 5 мл/гол., на 1 и 7 день от начала эксперимента. Забор крови у животных проводили за

один день до и через 14 дней после последней инъекции препарата. Обработанных ЭС вакцины животных содержали совместно с остальным поголовьем, среди которого находились особи с актиномикозными поражениями различной степени.

Как видно из таблицы 11, у животных (20 голов) экспериментальной группы до введения ЭС-42 большинство биохимических параметров сывороток крови соответствовало показателям относительной нормы клинически здоровых КРС. После введения препарата наблюдалась сходная тенденция аналогично предыдущим экспериментам по нормализации основных показателей.

Таблица 11 – Изучение влияния ЭС-42 вакцины на биохимические показатели сывороток крови нетелей, обработанных с целью профилактики актиномикоза

| №<br>п/п | Параметр                 | Едини-<br>ца<br>измере-<br>ния | Показатели сыворотки крови нетелей в группах  |                                 |                                 |
|----------|--------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|
|          |                          |                                | Контрольная<br>(относительная<br>норма<br>клинически<br>здоровых в СПК<br>колхоз<br>«Красавский») | Экспериментальная               |                                 |
|          |                          |                                |   | до введения<br>ЭС-42<br>вакцины | после введения<br>ЭС-42 вакцины |
| 1        | АЛТ                      | ед/л                           | 27,0±1,1  | 25,9±2,8                        | 34,5±1,6                        |
| 2        | АСТ                      | ед/л                           | 96,5±1,7  | 69,6±4,1                        | 92,7±5,4                        |
| 3        | Коэффициент<br>Де Ритиса | ед/л                           | 3,6±1,5   | 3,0±0,5                         | 2,7±0,1                         |
| 4        | КК                       | ед/л                           | 174,8±10,1  | 120,7±18,2                      | 280,3±76,9                      |
| 5        | ЛДГ                      | ед/л                           | 2316,9±114,3  | 1102,4±132,7                    | 1327,5±130,7                    |
| 6        | Общий белок              | %                              | 76,5±1,6  | 56,5±3,0                        | 49,6±2,3                        |
| 7        | Глюкоза                  | %                              | 3,8±0,2   | 2,9±0,2                         | 3,6±0,2                         |
| 8        | Общий<br>холестерин      | ммоль/л                        | 4,3±0,1   | 1,8±0,2                         | 2,2±0,2                         |

В частности, нами было установлено, что у обработанных ЭС-42 вакцины животных достоверно возрастали такие показатели как активность АСТ, АЛТ, КК, а также концентрация глюкозы. Имели тенденцию к повышению активность ЛДГ и содержание общего холестерина. Вместе с тем, наблюдалась тенденция к снижению концентрации общего белка и коэффициента Де Ритиса. На наш взгляд, это указывало на то, что энергетический обмен у нетелей экспериментальной группы после введения ЭС-42 находился на более высоком уровне, чем у контрольных животных, однако намечался незначительный сдвиг метаболизма в анаэробную сторону, как это отмечали ранее (Рослый, 2002).

Одновременное достоверное повышение активности АЛТ и концентрации глюкозы у животных после введения ЭС-42 вакцины, вероятно, могло свидетельствовать о том, что глюкозо-аланиновый шунт работал в направлении образования глюкозы аналогично ранее представленным данным (Рослый, 2002).

Повышение ЛДГ в наших экспериментах указывало на усиление интенсивности гликолиза и увеличение образования лактата, что вызывало повышение рН среды и, как следствие, смещение равновесия в реакции, катализируемой КК, в сторону образования креатинфосфата из креатина за счет АТФ, образующейся в гликолизе (Малинин, 2009; Мецлер, 1980; Маршал, 2000). При этом концентрация общего холестерина возрастала (Таблица 11).

Одновременное повышение активности АЛТ, концентрации холестерина и глюкозы при понижении концентрации белка, как правило, свидетельствует о снижении интеграции белкового и углеводного обмена (Рослый, 2002). В группе КРС, обработанной нами ЭС-42 вакцины для профилактики актиномикоза, отмечалась такая же корреляция.

Таким образом, введение ЭС-42 вакцины для лечения и профилактики актиномикоза у КРС сопровождалось оптимизацией у обработанных животных биохимических показателей до нормальных значений.

### **6.3. Изучение влияния ЭС-42 на иммунологические показатели сывороток крови морских свинок**

Для проверки безвредности отбирали пять клинически здоровых белых мышей и вводили им подкожно ЭС-42 терапевтической вакцины против актиномикоза КРС в дозе 0,5 мл. Мыши наблюдались в течение 10 дней. После окончания срока наблюдения лабораторные животные оставались живыми.

На следующем этапе исследовали иммунологические параметры сывороток крови у лабораторных животных – морских свинок (8 голов), после экспериментального моделирования актиномикоза также путем введения штамма *A. bovis* NV-01, вирулентного для КРС. Для этого у биомоделей проводили забор крови за один день до и через 30 дней после введения возбудителя актиномикоза КРС (заражающая доза 1 млрд/мл КОЕ, 1 мл). Затем животным однократно вводили ЭС-42 внутримышечно по 1 мл/гол. Взятие крови осуществляли спустя 21 день после инъекции препарата.

Как видно из таблицы 12, после введения вирулентного штамма *A. bovis* NV-01 наблюдалось изменение всех исследуемых нами иммунологических параметров сывороток крови морских свинок.

Таблица 12 – Изучение влияния ЭС-42 вакцины на иммунологические показатели сывороток крови морских свинок при экспериментальном актиномикозе

| № п/п | Параметр                 | Единица измерения | Показатели сывороток крови морских свинок       |   |  |
|-------|--------------------------|-------------------|---|---|--|
|       |                          |                   | До введения штамма <i>A. bovis</i> NV-01и ЭС-42 | После введения штамма <i>A. bovis</i> NV-01 | После последовательного введения штамма <i>A. bovis</i> NV-01и ЭС-42 |
| 1     | Тх                       | %                 | 35,3±2,0  | 45,6±4,8                                    | 58,2±6,5   |
| 2     | лимфоциты                | абс.              | 579±270,3                                       | 1528±749                                    | 1957±816,8   |
| 3     | Тс                       | %                 | 13,2±4,6  | 12,4±4,1                                    | 9,5±3,4  |
| 4     | лимфоциты                | абс.              | 1039±439,3                                      | 1851±917,2                                  | 1500±794,4   |
| 5     | Тх/Тс                    | %                 | 0,55±0,05                                       | 0,8±0,2                                     | 1,3±0,8  |
| 6     | В лимфоциты              | %                 | 15±1,3  | 33,5±20,3                                   | 11,7±1,5   |
| 7     | Л <sub>0</sub> лимфоциты | %                 | 36,5±4,9  | 28,4±9,1                                    | 20,5±4,7   |
| 8     |                          | абс.              | 1175±684,2                                      | 1879±1349,4                                 | 1060±596,9   |
| 9     | Лимфоциты                | %                 | 81,2±13,1                                       | 87,4±4,4                                    | 82,5±17,9  |
| 10    |                          | абс.              | 3275± 249,6                                     | 3927±1996,9                                 | 5027±506,7   |

Примечание - \*Л<sub>0</sub> – нулевые лимфоциты.

Так, нами зарегистрировано у морских свинок повышение соотношения Тх/Тс в основном за счет увеличения Тх, что характерно для острой фазы различных воспалительных заболеваний (Байд, 1951; Лебедев, Понякина, 1990). Также отмечалось почти двукратное повышение процентного соотношения В-лимфоцитов, которое сопровождалось определенным изменением их абсолютного количества. Мы регистрировали некоторое повышение, как общего числа лимфоцитов, так и количества Л<sub>0</sub> («нулевых лимфоцитов») при снижении процентного соотношения в группе животных после введения ЭС-42 вакцины.

При изучении тех же показателей иммунного статуса морских свинок, инфицированных *A. bovis* NV-01 с последующей обработкой ЭС-42 вакцины наблюдалась тенденция к повышению В-лимфоцитов и общего числа лимфоцитов с восстановлением их процентного соотношения до нормальных значений равно как и дальнейшее увеличение Тх/Тс. Вместе с тем количество и процентное соотношение  $L_0$  в группе обработанных животных снизилось почти до нормальных значений.

Таким образом, после исследования иммунологического статуса у морских свинок в модельных экспериментах нами получены убедительные доказательства выраженного воздействия ЭС-42 вакцины на иммунную систему организма биомоделей.

#### **6.4. Изучение влияния ЭС-42 на иммунологические показатели сывороток крови крупного рогатого скота**

На данном этапе проводили исследование иммунологических параметров сывороток крови нетелей с актиномикозными поражениями до и после введения ЭС-42 вакцины. Животным (14 голов) трехкратно вводили ЭС-42 внутримышечно в область средней трети шеи по 5 мл/гол., на 1, 3 и 7 день от начала эксперимента. Забор крови у животных проводили за один день до и через 21 день после последней инъекции вакцины. Исследования выполняли в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области.

Как видно из таблицы 13, у больных актиномикозом нетелей наблюдалось изменение всех исследуемых нами иммунологических параметров сывороток крови.



Таблица 13 – Изучение влияния ЭС-42 вакцины на иммунологические показатели сывороток крови нетелей, больных актиномикозом

| №<br>п/п | Параметр                 | Едини-<br>ца<br>измере-<br>ния | Показатели сыворотки крови нетелей в группах  |                          |  |
|----------|--------------------------|--------------------------------|---|--------------------------|--|
|          |                          |                                | Контрольная<br>(относительная<br>норма<br>клинически<br>здоровых КРС в<br>СПК колхоз<br>«Красавский») | Больные<br>актиномикозом | Больные<br>актиномикозом<br>после обработки<br>ЭС-42 вакцины |
| 1        | Тх                       | %                              | 61,4±2,5  | 54,8±1,58                | 58,4±1,10  |
| 2        | лимфоциты                | абс.                           | 1513±239,3  | 2403±837,13              | 1431±61,92   |
| 3        | Тс                       | %                              | 8,4±5,4   | 7,7±1,13                 | 5,9±0,76   |
| 4        | лимфоциты                | абс.                           | 955±112,8   | 1867±644,74              | 1025±59,72   |
| 5        | Тх/Тс                    | %                              | 1,6±0,2   | 1,3±0,06                 | 1,4±0,07   |
| 6        | В лимфоциты              | %                              | 8,2±0,4   | 12±0,60                  | 11,12±0,53   |
| 7        |                          | абс.                           | 285±30,6  | 531±84,47                | 408±21,39  |
| 8        | Л <sub>о</sub> лимфоциты | %                              | 22±2,3  | 26±1,76                  | 23±1,38  |
| 9        |                          | абс.                           | 798±128,04  | 1085±109,98              | 872,7±98,07  |

Так, у больных актиномикозом нетелей, обработанных ЭС-42, нами зарегистрировано некоторое повышение соотношения Тх/Тс в основном за счет увеличения Тх и Тс, что характерно для острой фазы различных воспалительных заболеваний (Лебедев, Понякина, 1990; Вершигора, 1990; Федоров, 2005).

В той же группе также отмечалось заметное снижение абсолютного количества В-лимфоцитов, которое сопровождалось несущественным снижением их процентного соотношения, по сравнению с показателями у необработанных животных. Как видно из таблицы 13, у больных нетелей после их обработки ЭС - 42 вакцины регистрировалось почти двукратное

повышение их абсолютного количества относительно контрольных животных.

Мы регистрировали некоторое повышение относительного процентного соотношения и абсолютного количества  $L_0$  у больных животных, и снижение их количества к норме после введения ЭС-42 вакцины аналогично исследованиям Лебедева и Понякиной (1990).

Также мы исследовали наличие взаимосвязи между выявленными у ЭС вакцины выраженными профилактическими свойствами и изменениями иммунологических параметров сывороток крови КРС. В этом случае животные также были разделены на две группы – контрольную (10 голов) и экспериментальную (10 голов). В первую из них объединяли клинически здоровых особей, которые были изолированы от основного стада на время проведения эксперимента. Животным экспериментальной группы вводили ЭС-42 двукратно внутримышечно в область средней трети шеи по 5 мл/гол., на 1 и 7 день. Забор крови у животных проводили за один день до и через 14 дней после последней инъекции препарата. Животных содержали совместно с остальным поголовьем, среди которого находились особи с актиномикозными поражениями различной степени.

Так (Таблица 14), у обработанных с профилактической целью животных, нами зарегистрировано повышение, т.е. восстановление значений соотношения  $T_x/T_c$  по сравнению с группой животных до введения препарата. Поскольку наблюдалась сходная с предыдущим экспериментом тенденция, на наш взгляд, и в данном случае эти изменения могли происходить в основном за счет увеличения  $T_x$  и  $T_c$ , что характерно для формирования адаптивного специфического иммунитета (Лебедев, Понякина, 1990).

Таблица 14 – Изучение влияния ЭС-42 вакцины на иммунологические показатели сывороток крови нетелей, обработанных с целью профилактики актиномикоза

| №<br>п/п | Параметр                    | Едини-<br>ца<br>измере-<br>ния | Показатели сыворотки крови нетелей в группах  |                               |                                 |
|----------|-----------------------------|--------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------------|
|          |                             |                                | Контрольная<br>(относительная<br>норма<br>клинически<br>здоровых КРС в<br>СПК колхоз<br>«Красавский») | Экспериментальная             |                                 |
|          |                             |                                |   | до введения ЭС-<br>42 вакцины | после введения<br>ЭС-42 вакцины |
| 1        | Тх                          | %                              | 61,4±2,5  | 49,5±1,4                      | 56,6±1,9                        |
| 2        | лимфоциты                   | абс.                           | 1513±239,3  | 1522,0±133,1                  | 1658,3±151,4                    |
| 3        | Тс                          | %                              | 8,4±5,4   | 8,2±1,0                       | 9,2±0,6                         |
| 4        | лимфоциты                   | абс.                           | 955±112,8   | 1559,0±132,3                  | 1280,0±130,4                    |
| 5        | Тх/Тс                       | %                              | 1,6±0,2   | 1,0±0,1                       | 1,3±0,1                         |
| 6        | В лимфоциты                 | %                              | 8,2±0,4   | 9,1±0,6                       | 9,2±0,5                         |
| 7        |                             | абс.                           | 285±30,6  | 517,0±39,5                    | 413,5±44,5                      |
| 8        | Л <sub>о</sub><br>лимфоциты | %                              | 22±2,3  | 33,8±2,5                      | 21,7±2,3                        |
| 9        |                             | абс.                           | 798±128,04  | 1616,0±242,7                  | 1180,0±175,6                    |
| 10       | Лимфоциты                   | %                              | 70±6,5  | 73,4±2,1                      | 71,4±1,4                        |
| 11       |                             | абс.                           | 3551± 339,3   | 521,4±405,7                   | 452,9±445,5                     |

В экспериментальной группе до введения ЭС-42 вакцины отмечалось почти двукратное повышение абсолютного количества В-лимфоцитов. После обработки тех же животных указанным препаратом мы регистрировали некоторое снижение этого показателя, хотя это заметно не влияло на % соотношение данной субпопуляции.

Также мы регистрировали повышение, как общего числа  $L_0$  ( почти в два раза), так и их процентное соотношения (в 1,5 раза). После введения ЭС вакцины наблюдалось их снижение к нормальным значениям.

Таким образом, введение ЭС-42 вакцины для лечения и профилактики актиномикоза у КРС сопровождалось нормализацией биохимических и иммунологических показателей до стандартных значений.

## **ГЛАВА 7. ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СЕРИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ (ЭС-42)**

В условиях современной ветеринарии, при проведении большого количества лечебных и профилактических мероприятий, у ветеринарного специалиста может возникнуть необходимость обосновывать экономическую целесообразность их проведения. Для этого в ветеринарной медицине предложено использовать методику определения экономической эффективности мероприятий, которая включает систему специальных формул, по которой рассчитывают ряд экономических показателей. Это позволяет определить эффективность конкретных затрат труда специалистов, экономическую целесообразность применения используемых средств и методов для борьбы с соответствующими болезнями животных. Разные направления ветеринарной работы и многообразие объектов ветеринарной деятельности, требуют учитывать особенности объемной системы экономических показателей, а также методов для их расчета. Оценка экономической эффективности ветеринарных мероприятий является сложной комплексной математической задачей, решение которой напрямую зависит от конкретной цели, поставленной перед ветеринарным специалистом. Во-первых, заболеваемость животных представляет собой крайне сложный многофакторный процесс. Зачастую возникновение и течение болезней управляется, например, при инфекциях, не только вакцинацией, но и схемой лечения при незаразных болезнях (Шатохин и др., 1997; Никитин, Воскобойник, 1999; Никитин, Апалькин, 2006)

Как известно, под экономической эффективностью ветеринарных мероприятий принято понимать суммарный показатель (в денежном выражении), который складывается из ущерба, предотвращенного в результате проведения ветеринарных мероприятий в животноводстве, стоимости продукции, полученной дополнительно за счет увеличения количества и

повышения ее качества, экономии трудовых и материальных затрат в результате применения более эффективных средств и методов профилактики болезней и лечения животных.

Для экономического анализа эффективности ветеринарных мероприятий было предложено (Шатохин и др., 1997; Никитин, Воскобойник, 1999; Никитин, Апалькин, 2006) использовать систему следующих показателей:

1. фактический экономический ущерб от заболевания.
2. затраты на проведение ветеринарных мероприятий.
3. предотвращенный экономический ущерб.
4. экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на рубль затрат.

В настоящем исследовании проводили расчет экономической эффективности применения ЭС-42 вакцины для профилактики актиномикоза в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области. С этой целью проводили обработку молодняка КРС в количестве 736 голов. При расчете общего количества вакцины для введения указанному поголовью мы руководствовались следующим:

- одной голове КРС для создания иммунитета против актиномикоза с применением ЭС-42 вакцины необходима двукратная инъекция препарата по 5 мл/гол (10 мл);

- тогда для обработки всего поголовья молодняка (736 голов) требовалось  $736 \times 10 = 7360$  мл вакцины.

- 1) Расчет фактического экономического ущерба, причиненного заболеванием

Фактический ущерб представляет собой денежное выражение потерь продукции, обусловленных болезнями животных. В данном хозяйстве указанный параметр, согласно формуле, включал в себя ущерб от падежа животных и ущерб от уменьшения живой массы.

А. Экономический ущерб от падежа и вынужденного убоя.

$$У_1 = M_{\text{п}} \times Ж \times Ц - С_{\text{ф}}$$

Где  $У_1$  – величина ущерба, руб.;

$М_п$  – количество павших или подлежащих убою животных, гол.;

$Ж$  – средняя живая масса одного животного, кг.;

$Ц$  – закупочная цена 1 кг мясной продукции, руб.;

$С_ф$  – денежная выручка от реализации трупного сырья.

По данным исследовательской работы, проводимой нами в Саратовской области на поголовье крупного рогатого скота за 2007-2008 годы, выявлено, что средний процент заболеваемости составил 11,41 % (из 736 голов всего в настоящем исследовании зарегистрировано 84 больных животных). В целом, это соотносится с доступными данными о числе больных людей актиномикозом, которые в Российской Федерации составляют до 2,5-10 % хронических гнойных процессов различной локализации (Сутеев, 1951; Петровский, 1974; Бакулов, 1987). По результатам информационно-аналитического центра Россельхознадзора при содействии ФГУ «Центр ветеринарии» и «Роспотребнадзора» в РФ заболеваемость актиномикозом КРС за 2010 год составила до 0,35 % от общего числа инфекционных заболеваний, а за 2011 год - до 0,24 % (Дудников с сост., 2010). По отчету Федерального государственного учреждения «Саратовская межобластная ветеринарная лаборатория» (ФГУ «Саратовская МВЛ») находящаяся в ведении Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) за 2010 год на актиномикоз проведена – 1 экспертиза, из них положительных - 1 результат: Советский р-он ОП «Советское» - 1. Очевидно, это связано с высокими затратами на ветэкспертизу, проведение соответствующего лабораторного обследования, включающего транспортировку или ветперсонала в хозяйство для забора материала, или непосредственно материала в лицензированную лабораторию, а также отсутствие нормативных документов, предписывающих обязательную подачу данных о заболеваемости хозяйствами в органы ветнадзора.

По данным АР Крым поражение крупного рогатого скота актиномикозом по отдельным хозяйствам в период с 2004 по 2008 гг. составило от 29,7 до 41,4% от всего заболевшего поголовья.

По данным исследовательской работы (Ильченко, 2009), проводимой в Ростовской области на поголовье КРС выявлено, что средний процент заболеваемости актиномикозом за 2003-2009 годы составил 10,27 %.

По результатам наших исследований в аналогичный период наблюдения смертность от указанного заболевания составила 10 голов (подлежали убою) из 84 больных актиномикозом животных, т.е. 11,9 % от всех заболевших животных; по данным СПК колхоз «Красавский», средняя живая масса одного нетеля составляла 500 кг (случка нетелей породы голштинизированный красно-пестрый скот в хозяйстве осуществлялась однократно в 18-21 месяц), а убойный выход составляет 60 % (300 кг); закупочная цена 1 кг мясной продукции в данном хозяйстве составляла - 150 руб. (на 2010-2011 г.); если учитывать, что денежная выручка от реализации трупного сырья отсутствует, то расчет будет следующий:

$$У_1 = 10 \text{ гол.} \times 300 \text{ кг} \times (150 - 0 \text{ руб.}) = 450\,000 \text{ (руб)}$$

Следовательно, ущерб от падежа больных актиномикозом КРС в хозяйстве СПК колхоз «Красавский» составил 450000 (руб).

В. Экономический ущерб от уменьшения живой массы.

В этом случае расчет проводился по следующей формуле:

$$У_3 = M_6 \times (П_3 - П_6) \times T \times Ц,$$

Где  $У_3$  – величина ущерба, руб.;

$M_6$  – количество заболевших животных, гол;

$П_3$  – среднесуточная продуктивность здоровых животных;

$П_6$  – среднесуточная продуктивность больных животных за период их болезни;

$T$  – продолжительность болезни, дни;

$Ц$  – закупочная цена 1 кг продукции, руб.



Как было показано выше, количество заболевших животных в СПК колхоз «Красавский» составило 11,41 % от всего поголовья; среднесуточный прирост массы здоровых животных 500 г (0,5 кг); среднесуточная продуктивность больных животных за период их болезни в зависимости от стадии актиномикоза 100-200 г (0,1-0,2 кг), т.о. в среднем 150 г (0,15 кг); продолжительность болезни до 150 дней; закупочная цена 1 кг мясной продукции 150 руб., тогда:

$$Y_3 = 84 \text{ гол.} \times (0,5 \text{ кг} - 0,15 \text{ кг}) \times 150 \text{ дней} \times 150 \text{ руб.} = 661500 \text{ (руб.)}$$

С. Сумма фактического ущерба равна сумме отдельных видов ущерба, поэтому ее в настоящем исследовании вычисляли по следующей формуле:

$$Y_{\phi} = Y_1 + Y_3$$

$$Y_{\phi} = 450\,000 + 661\,500 = 1\,111\,500 \text{ (руб.)}$$

Коэффициент ущерба ( $K_y$ ), т.е. денежное выражение ущерба на одно животное рассчитывали как отношение суммы фактического ущерба ( $Y_{\phi}$ ) к количеству заболевших животных ( $M_6$ ):

$$K_y = 1\,111\,500 : 84 = 13\,232,14 \text{ руб. (25\% от стоимости одного нетеля)}$$

## 2) Учет затрат на проведение ветеринарных мероприятий

Затраты на ветеринарные мероприятия (противоэпизоотические, ветеринарно-санитарные, лечебно-профилактические и др.) принято складывать из показателя стоимости материальных и трудовых ресурсов.

К материальным затратам относят такие параметры, как стоимость использованных биопрепаратов, медикаментов, дезсредств, инструментов, лабораторных исследований, сооружение дезбарьеров и т.д.

К трудовым затратам следует относить основную и дополнительную зарплату ветспециалистов, подсобных рабочих и т.д.

А. Нами рассчитаны расходы на биопрепарат (ЭС-42 вакцины), которые приведены в таблице 15.

Таблица 15 – Примерные затраты на проведение профилактических мероприятий против актиномикоза КРС с помощью ЭС-42 вакцины в СПК колхоз «Красавский»

| Препарат  | Количество живот-ных в группе, гол. | Доза препарат а, мл | Цена (одна доза), руб | Крат-ность вве-дения | Расход на одно животное, руб. | Денежные затраты, руб. |
|---|-------------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------|
| ЭС-42 вакцины для профилактики актиномикоза у КРС | 736                                 | 5                   | 100                   | 2                    | 200                           | 147200                 |
| Итого: 147200 руб.                                |                                     |                     |                       |                      |                               |                        |

Следовательно, как видно из таблицы 15, на одно животное потребовалось 2 дозы стоимостью 100 руб. каждая, т.е. 200 руб. на одно животное.

Расходы на 736 голов составят:  $736 \times 200 \text{ руб.} = 147200 \text{ руб.}$

Б. Затраты на оплату труда, рассчитанные нами по данным настоящего исследования, представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Затраты на оплату труда ветработникам колхоза СПК колхоз «Красавский» для профилактики актиномикоза КРС с помощью ЭС-42 вакцины

| Категория работников | Количество, чел. | Дневная ставка, руб. | Продолжительность работы, дни | Затраты на оплату труда, руб. |
|----------------------|------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Ветфельдшер          | 1                | 200                  | 2                             | 400                           |
| Подсобные рабочие    | 1                | 100                  | 2                             | 200                           |
| Итого: 600 руб.      |                  |                      |                               |                               |

Такой показатель, как общая сумма затрат определяли сложением всех видов расходов и обозначили как  $Z_v$ :

$$Z_v = Z_{v1} + Z_{v2},$$

Где  $Z_v$  – сумма затрат на все ветеринарные мероприятия, руб.;

$Z_{v1}$  – затраты на приобретение биопрепаратов и медикаментов, руб.;

$Z_{v2}$  – затраты на оплату труда ветспециалистов и подсобных рабочих, руб.

$$Z_v = 147200 \text{ руб.} + 600 \text{ руб.} = 147800 \text{ (руб.)}$$

### 3) Определение предотвращенного экономического ущерба

Предотвращенный ущерб представляет собой стоимостное выражение потерь продукции животноводства, не допущенных в результате проведения комплекса ветеринарных мероприятий, обеспечивающих предупреждение возникновения болезни, ограничения их распространения и сокращение заболеваемости и падежа животных.

Предотвращенный экономический ущерб при профилактике и ликвидации болезней животных определяли по следующей формуле:

$$P_y = M_o \times K_3 \times K_y - U_\phi,$$

Где  $P_y$  – величина предотвращенного ущерба, руб.;

$M_o$  – количество восприимчивых животных, гол.;

$K_3$  – коэффициент заболеваемости, %;

$K_y$  – коэффициент ущерба руб., т.е. денежное выражение ущерба на одно заболевшее животное в данном хозяйстве;

$U_\phi$  – фактический ущерб в хозяйстве, руб.

В настоящем исследовании при расчете  $\Pi_y$  мы руководствовались следующими цифрами (параметрами): из них кол-во восприимчивых животных ( $M_0$ ) составило 84 гол.; коэффициент заболеваемости животных ( $K_3$ ) – 0,11% ( $K_3 = M_3 : M = 10 : 84 = 0,11$ ;  $M_3$  - количество заболевших животных (переболевших, павших));  $K_y$  и  $У_\phi$  были рассчитаны нами на предыдущем этапе и составили 13232,14 руб. и 1111500 руб., соответственно.

В результате при расчете  $\Pi_y$  нами получены следующие данные:

$$\Pi_y = 1111500 \text{ руб.} - 13232,14 \text{ руб.} \times 0,11 \times 84 \text{ гол.} = 989235,03 \text{ (руб.)}$$

4) Определение экономического эффекта и эффективности ветеринарных мероприятий на рубль затрат

Экономический эффект от проведения ветеринарных мероприятий выражают разностью между предотвращенным экономическим ущербом и затратами на их проведение (Шатохин и др., 1997). Поэтому этот показатель как экономический эффект от проведенных в СПК «Красавский» профилактических и лечебных мероприятий рассчитывали по формуле:

$$\mathcal{E}_B = \Pi_y - Z_B,$$

Где  $\mathcal{E}_B$  – величина экономического эффекта от проведенных мероприятий, руб.;

$\Pi_y$  – предотвращенный экономический ущерб в результате проведения ветеринарных мероприятий, руб. (в настоящем исследовании – 989235,03 руб.);

$Z_B$  – затраты на ветеринарные мероприятия, руб. (в данной работе составил 147800 руб.).

Экономический эффект в данном случае был равен:

$$\mathcal{E}_B = 989235,03 \text{ руб.} - 147800 \text{ руб.} = 841435,03 \text{ руб.}$$

Эффективность ветеринарных мероприятий на рубль затрат ( $\mathcal{E}_p$ ) определяли по формуле:

$$\mathcal{E}_p = \mathcal{E}_B : Z_B,$$

$$\mathcal{E}_p = 841435,03 \text{руб.} : 147800 \text{руб.} = 5,7 \text{руб.}$$

Таким образом, в целом экономическая эффективность проведенных нами ветеринарных мероприятий в СПК колхоз «Красавский» представлена в таблице 17.

Таблица 17 – Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий в СПК колхоз «Красавский» после введения КРС ЭС-42 вакцины для профилактики актиномикоза

| Показатели                                  | Величина показателей, руб. |
|---|----------------------------|
| Предупрежденный ущерб                       | 989235,03                  |
| Ветеринарные затраты                        | 147800                     |
| Экономический эффект                        | 841435,03                  |
| Экономическая эффективность на рубль затрат | 5,7                        |

Итак, можно сделать вывод, что проводимые в СПК колхоз «Красавский» профилактические мероприятия оказались весьма эффективными. Денежные средства, сохраненные на каждый рубль ветеринарных затрат, составили 5,7 рубля.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как известно, ветеринарная биотехнология начала развиваться с конца XIX века, когда Луи Пастером была разработана первая профилактическая вакцина против куриной холеры (1879). Эта разработка стала важным шагом в использовании биотехнологических методов в ветеринарии, открывая новое прикладное направление в микробиологии, связанное с приготовлением специфических средств профилактики для животных (Борисов, 2005). Применение профилактических вакцинных препаратов для животных способствовало оздоровлению хозяйств от инфекционных заболеваний, обеспечивало повышение продуктивности поголовья и позволяло уменьшить риск заражения человека зооантропонозными инфекциями.

В дальнейшем были разработаны профилактические препараты против таких особо опасных болезней как сибирская язва, чума крупного рогатого скота, бешенство, ящур, сап, которые вызывали повальные эпидемии и наносили значительный ущерб животноводству (Коляков, 1952; Коленько, 1963). Так, более чем за вековую историю практического применения, данные вакцины хорошо зарекомендовали себя и до настоящего времени широко используются в животноводстве для профилактики опасных заразных заболеваний как в нашей стране, так и за рубежом (Bud, 1991; Глик, Пастернак, 2002; Poland et al., 2002).

Вакцины радикально преобразили ветеринарную медицину в XX веке и позволили существенно снизить потери от опасных инфекционных заболеваний, а также контролировать их распространение, как среди животных, так и среди людей. Так, по оценкам специалистов, на сегодняшний день мировой рынок средств и препаратов в данной сфере составляет почти 8 млрд. долларов. Всего 5 лет назад на нашем фармакологическом рынке было зарегистрировано 120 новых биотехнологических продуктов для ветеринарной медицины. Российский

рынок ветеринарных биотехнологических препаратов также показывает положительную динамику, что является следствием эпизоотической ситуации в стране, а также ростом основных отраслей-потребителей – птицеводства и животноводства (скотоводство, свиноводство). Объем российского рынка ветеринарных биотехнологических препаратов оценивается около 4 млрд. руб. Средние темпы роста за последние четыре года были на уровне 8-9%. За период 2010–2015 гг, по прогнозам Research.Techart, объем рынка ветеринарных биотехнологических препаратов увеличится более, чем на 20% (Глик, Пастернак, 2002).

Наличие прорывных инновационных технологий создания лечебно-профилактических препаратов в области современной ветеринарной медицины позволяет ожидать в ближайшие 5–15 лет кардинальных изменений в области вакцинологии и, прежде всего, это связано с таким новейшим направлением исследования, как создание терапевтических вакцин.

Основным преимуществом терапевтических вакцин является одновременная возможность индуцировать протективный иммунный ответ у больных животных, а также осуществлять лечебный эффект путем подавления или эрадикации уже существующего в организме инфекционного агента. Поэтому особую перспективу прогнозируют терапевтическим вакцинам при лечении хронических заболеваний, вызванных бактериями или вирусами. Вместе с тем, в настоящее время в ветеринарии используются в основном профилактические препараты, не обладающие терапевтическим эффектом (Глик, Пастернак, 2002; Нижегородцев, 2003; Ульянов, 2011).

В то же время для некоторых хронических инфекционных заболеваний, таких, как, например, актиномикоз сельскохозяйственных животных, отсутствуют и средства специфической профилактики. Поэтому основное место в ликвидации данного заболевания занимает лечение (Маминов, Колесникова, 1970; Пирогова, 1970; Мещеряков, Ромм, 1978; Солодовников, 1981; Розанов, Лапшин, 1982; Баринов, 1986; Панько, Черкез, 1986;

Маминов). Однако применяемые для этого в настоящее время лекарственные препараты являются малоэффективными и имеют ограниченный срок хранения, что может оказаться неудобным в условиях хозяйств. Такая терапия является дорогостоящей, не всегда дает желаемого результата и требует довольно продолжительного периода лечения. Так, например, применение антибиотиков приводит к определенным ограничениям при убое скота на мясо. В существующих наставлениях больное животное, подвергшееся лечению антибиотиками (стрептомицин и др.), не подлежит убою на мясо в течение месяца после применения препарата, а это необходимо учитывать при терапии больных животных. В связи с этим возникла необходимость в применении новых биотехнологических подходов к лечению и профилактике этого заболевания. (Голиков, 1963; Спесивцева, 1964; Колычев, Ощепков, 2001).

Целью нашего исследования явилась разработка основных биотехнологических этапов и апробация на лабораторных и сельскохозяйственных животных ЭС терапевтической вакцины для лечения и профилактики актиномикоза крупного рогатого скота и оценка ее экономической эффективности.

Для реализации поставленной задачи настоящее исследование мы начали с подбора штамма-продуцента для приготовления ЭС терапевтической вакцины. С этой целью проводили выделение культуры из патологического материала (из актиномикомы в области нижней челюсти КРС) с последующей идентификацией возбудителя, изолированного из актиномикомы нетеля № 2 из СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района. В процессе культивирования и изучения морфологических, культуральных, тинкториальных свойств выделенной культуры нами выявлены характерные признаки *A. bovis*. Выделенный и идентифицированный нами штамм был обозначен как *A. bovis* NV-01. Аналогичным образом проводили выделение других культур от больных животных из колхоза «Победа» Красноармейского района Саратовской



области. В этом случае использовали сходный патматериал (головы КРС) от нетелей № 3 и 4. Затем после выращивания бактерий в аэробных условиях при температуре 37 °С в течение 3-42 сут., аналогично штамму NV-01, нами проводилось их исследование. В результате было выделено еще две культуры, которые по морфологическим, культуральным и тинкториальным свойствам были идентифицированы как *A. bovis*. Данные штаммы мы обозначили *A. bovis* NV-02 и *A. bovis* NV-03.

Для подтверждения принадлежности трех выделенных нами штаммов к роду *A. bovis* на следующем этапе мы проводили исследование их биохимических свойств по «Определителю бактерий Берджи» (1980, 1997). Согласно полученным данным, у всех трех изолированных в настоящем исследовании штаммов были выявлены идентичные биохимические свойства, типичные для *A. bovis*. Нами был выбран штамм *A. bovis* NV-01, который был использован для приготовления экспериментальной серии терапевтической вакцины.

Следующим этапом в биотехнологии разрабатываемой терапевтической вакцины был разработан способ получения антигенной композиции ЭС препарата методом замораживания-оттаивания. Для накопления биомассы, выделенную от больных животных культуру штамма *A. bovis* NV-01 засекали на МПБ с 1% глюкозы, выдерживали в термостате при температуре 37 °С в течение 42 суток. Полученную в результате экспериментальную серию *A. bovis* NV-01 мы обозначили ЭС-42.

На следующем этапе для разрушения внешней мембраны и клеточной стенки бактерий надосадочную жидкость из колбы с выращенной культурой сливали, а полученный осадок подвергали 20-кратному замораживанию и оттаиванию путем воздействия низкой температуры (-18 °С и ниже) в соответствии с рекомендациями (Шах Махмуд, Филимонова, 2010).

Для полного обеззараживания нами в каждую ЭС был добавлен раствор формальдегида до конечной концентрации 0,4 % в соответствии с рекомендациями (Уокер, 1957; Walker, 1964).

После экспозиции в течение 21 дня, производили контрольный высеv ЭС вакцины на стерильность. Характерного роста актиномицетов не наблюдалось.

Для изучения состава антигенной композиции ЭС терапевтической вакцины проводили исследования препарата, которые позволили выявить в нём преимущественное содержание белков и триглицеридов, соответствующих по составу цитоплазматической фракции бактерий (Шах Махмуд, Филимонова, 2010). По результатам электрофореза в 20 % ПААГ-SDS ЭС-42 вакцины обнаружена доминантная полипептидная полоса с молекулярной массой 20 кДа, а также несколько минорных белков с молекулярной массой от 60 до 90 кДа.

На следующем этапе разрабатывали способ получения антигенной композиции ЭС вакцины методом ультразвуковой дезинтеgrации. В качестве штамма-продуцента использовали культуру того же штамма. Аналогично предыдущим экспериментам, мы делали высеv штамма *A. bovis* NV-01 на МПБ с 1% глюкозы и выдерживали в термостате при температуре 37 °С в течение 42 суток. Затем, с 7 по 42 день роста, брали образцы культуры через каждые 3 дня выращивания. В результате отобрано 13 образцов культуральной жидкости *A. bovis* NV-01, обозначенных нами, соответственно, в зависимости от сроков выращивания штамма-продуцента как ЭС-7, ЭС-10, ЭС-13, ЭС-16, ЭС-19, ЭС-22, ЭС-25, ЭС-28, ЭС-31, ЭС-34, ЭС-37, ЭС-40 и ЭС-42 (У3). Каждую ЭС подвергали ультразвуковой дезинтеgrации для разрушения структуры клеточной стенки бактерии *A. bovis* по методу, разработанному ранее (Ласкавый и др., 2005).

В настоящем исследовании нами был выбран режим воздействия ультразвуковых волн на ЭС вакцины в пределах 20 кГц и длительностью воздействия (экспозиции) в течение 60 мин. Для освобождения ЭС от поврежденных стенок и целых клеток штамма-продуцента *A. bovis* NV-01 использовали мембранные пластины типа «Владипор-МФА №3». Фильтрацию каждой ЭС проводили под вакуумом - аппаратом.

Иммуногенность полученных дезинтегрантов указанных тринадцати серий предварительно оценивали в РАЛ, согласно рекомендациям (Агольцов, 1999, 2001, 2003, 2006; Ласкавый, 2000, 2005; Ласкавый и др., 2001).

Судя по результатам РАЛ, для изготовления ЭС вакцины наиболее подходящими следовало считать серии ЭС-13, ЭС-28, ЭС-34, ЭС-37, ЭС-40 и ЭС-42 (УЗ), поскольку у этих образцов отмечалась средняя агломеративная активность с соответствующим индексом агломерации в диапазоне 6 - 15%. Поэтому указанные серии ЭС предположительно могли обладать относительно высокой иммуногенностью. Вместе с тем, для получения препаративного количества штамма-продуцента вакцины более подходящим, на наш взгляд, следовало считать ЭС-42 (УЗ), которая была нами выбрана для дальнейших исследований.

Для полного обеззараживания нами в каждую ЭС был добавлен раствор формальдегида до конечной концентрации 0,4 % в соответствии с рекомендациями (Уокер, 1957; Walker, 1964).

После экспозиции в течение 21 дня, производили контрольный высев ЭС-42 (УЗ) на стерильность. Характерного роста актиномицетов не наблюдалось.

Таким образом, применение ультразвуковой дезинтеграции биомассы *A. bovis* NV-01 в качестве потенциального штамма-продуцента ЭС вакцины позволило получить ЭС-42 (УЗ) с предполагаемой высокой иммуногенностью.

Затем мы перешли к изучению лечебного действия ЭС вакцины на КРС. Для выявления лечебных свойств у полученных нами ЭС-42 и ЭС-42 (УЗ) проводили проверку соответствующей активности на телятах, нетелях и коровах. С этой целью по разработанной нами методике были приготовлены соответствующие ЭС в ограниченных объемах (15 литров) с применением штамма-продуцента *A. bovis* NV-01.

Проверку лечебных свойств ЭС вакцины мы начали с исследований в колхозе «Победа» Красноармейского района. Для этого была сформирована группа КРС - телят 6-8 месячного возраста (12 голов), телок случного

возраста (10 голов) и коров (8 голов), с характерными признаками актиномикоза и различной степенью выраженности актиномикомы.

Всем животным вводили ЭС-42 (УЗ) внутримышечно в область средней трети шеи независимо от возраста и веса животных по 5 мл/гол., трехкратно на 1, 7 и 14 день. После введения препарата наблюдения за больными животными осуществляли в течение года.

Введение препарата больным актиномикозом телятам (12 голов) с размером актиномиком до 7 см привело к полной редукции очагов и полному выздоровлению животных (100% эффективность). Из 10 нетелей с актиномикомой до 12 см, обработанных препаратом, полное выздоровление зарегистрировано у 7 (70%), а введение препарата 8 больным коровам с актиномикомой более 25 см не обеспечило лечебного эффекта (100%), что может быть объяснено длительным течением болезни и необратимостью происшедших в организме коров патологических изменений.

Таким образом, ЭС-42 (УЗ) обладала выраженным терапевтическим эффектом в отношении животных на начальной стадии болезни и была менее эффективной при лечении КРС в более поздний период заболевания.

ЭС-42 была также проверена на КРС в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области. Хозяйство считалось неблагополучным по актиномикозу предыдущие 2 года. С апреля по октябрь 2008 года в нем было выявлено 84 головы (нетели, первотелки, коровы) с актиномикозными поражениями разной степени в области нижней и верхней челюсти. Для контроля было взято 10 голов (заведомо здоровые животные).

Данный препарат вводили животным внутримышечно в область средней трети шеи по той же схеме.

В целом введение препарата больным актиномикозом нетелям привело к выздоровлению большинства (72 головы) животных на первой и второй стадиях развития заболевания с актиномикомой в диаметре до 5 см и 10-12 см, соответственно. Однако сроки редукции актиномикомы варьировали. В дальнейшем выздоровление наблюдалось (в течение двух месяцев после

проведенного лечения) у всех подвергавшихся лечению животных (100%). После введения препарата наблюдение за больными животными осуществляли в течение двух месяцев с последующим контролем в течение года.

Обработка ЭС-42 вакцины оказалась менее эффективной для животных с обширными актиномикозными поражениями (с актиномикомой более 25 см) - через два месяца после введения данной ЭС при обследовании больных животных было выявлено видимое отсутствие лечебного эффекта (10 голов не излеченных больных актиномикозом животных из 84 больных - 11,9 %). Поскольку животные были сданы на мясокомбинат, дальнейшего наблюдения за ними не проводилось по объективным причинам.

Таким образом, разработанный нами экспериментальный препарат обладал выраженным терапевтическим эффектом в отношении животных с актиномикомой, не превышающей в диаметре 12 см (т.е. на начальной стадии болезни) и был менее эффективным при лечении КРС с актиномикомой диаметром более 25 см.

После проверки лечебного эффекта ЭС вакцины приступили к изучению ее профилактического действия на сельскохозяйственных животных.

Всего в ноябре 2009 года было обработано ЭС-42 вакцины 736 голов (перволетки, телки случного возраста, телки старше 6 месячного возраста, бычки). Животным вводили препарат двукратно в тех же дозах на 1 и 7 дни.

После обработки животных ЭС-42 при последующем обследовании в ноябре 2010 г. (через год) ни одной головы с актиномикозным поражением не выявлено. При дальнейшем наблюдении в течение последующих трех лет в указанном хозяйстве также не было выявлено ни одного случая актиномикоза у КРС.

Следовательно, проведенные профилактические мероприятия против актиномикоза КРС, основанные на двукратном введении животным препарата из выделенного нами штамма *A. bovis* NV-01, привели к их полному выздоровлению (100% эффективность).

Проводили также изучение влияния ЭС-42 вакцины на биохимические и иммунологические показатели животных в экспериментальных и производственных условиях.

На первом этапе исследовали биохимические и иммунологические параметры сывороток крови у лабораторных животных – морских свинок (24 головы), после экспериментального моделирования актиномикоза путем введения штамма *A. bovis* NV-01.

В модельных экспериментах у инфицированных животных наблюдалась тенденция к снижению основных биохимических параметров в сторону физиологической нормы: АЛТ, АСТ – в 1,5 и 2,2 раза, а общего белка - в 1,1 раз. При этом выявлялось некоторое увеличение ряда показателей: КК - в 1,3 раза, ЛДГ - в 1,4, глюкозы - в 1,5, а общего холестерина - в 2,2 раза.

При изучении тех же показателей иммунного статуса морских свинок, инфицированных *A. bovis* NV-01 с последующей обработкой ЭС-42 вакцины, наблюдалась тенденция к повышению В-лимфоцитов и общего числа лимфоцитов с восстановлением их процентного соотношения до нормальных значений равно как и дальнейшее увеличение Тх/Тс. Вместе с тем количество и процентное соотношение  $L_0$  в группе обработанных животных снизилось почти до нормальных значений.

Таким образом, нами получены обоснованные данные о способности ЭС оптимизировать биохимические показатели сывороток крови морских свинок при моделировании актиномикозной инфекции у лабораторных животных. Также после исследования иммунологического статуса у морских свинок в модельных экспериментах нами получены убедительные доказательства выраженного воздействия ЭС-42 вакцины на иммунную систему организма биомоделей.

Поэтому на следующем этапе для оценки лечебных свойств ЭС-42 вакцины проводили исследование ключевых биохимических и иммунологических параметров сывороток крови нетелей с актиномикозными поражениями до и после введения препарата.

Как и в предыдущих экспериментах на биомоделях, после введения ЭС-42 вакцины достоверно возростала активность АСТ. Это указывало на повышение синтеза АТФ (Малинин, 2009). Коэффициент Де Ритиса, представляющий собой отношение АСТ/АЛТ и отражающий состояние аэробных катаболических процессов (De Ritis et al., 2006), у обработанных препаратом животных повышался до контрольных показателей. Видимо, это отражало тенденцию к активизации кислородзависимых процессов у обработанных животных и потенциальное повышение резистентности к инфекции, что подтверждалось также достоверным увеличением концентрации общего белка и активности КК. Достоверное  $p < 0,05$  увеличение коэффициента Де Ритиса свидетельствовало о преобладании энергетического обмена над пластическим (De Ritis et al., 2006).

Так, у больных актиномикозом нетелей, обработанных ЭС-42 вакцины, нами зарегистрировано некоторое повышение соотношения Тх/Тс в основном за счет увеличения Тх и Тс, что характерно для острой фазы различных воспалительных заболеваний (Лебедев, Понякина, 1990; Вершигора, 1990; Федоров, 2005).

Введение ЭС-42 вакцины для лечения актиномикоза у КРС сопровождалось оптимизацией биохимических и иммунологических показателей до нормальных значений.

В результате расчетов экономической эффективности проведенных нами ветеринарных мероприятий в СПК колхоз «Красавский» после введения КРС ЭС-42 вакцины для профилактики актиномикоза было установлено, что предупрежденный ущерб составил 989235,03 руб., ветеринарные затраты – 147800 руб., экономический эффект – 841435,03 руб., экономическая эффективность на рубль ветеринарных затрат – 5,7 руб.

Итак, можно сделать вывод, что проводимые в хозяйстве профилактические мероприятия с использованием ЭС-42 терапевтической вакцины против актиномикоза КРС оказались эффективными.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны основные биотехнологические этапы приготовления экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины из штамма-продуцента *A. bovis* NV-01с применением метода замораживания-оттаивания и ультразвуковой обработки биомассы. Установлено, что 20-кратное размораживание-оттаивание или ультразвуковая дезинтеграция обеспечивают выход цитоплазматической фракции бактерии, необходимой для приготовления препарата.

2. Установлено, что клинический изолят *A. bovis* NV-01, выделенный из патологического материала больных актиномикозом коров, по всем морфологическим, тинкториальным, биохимическим признакам соответствуют типичным представителям вида *A. bovis* и является пригодным для приготовления экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины.

3. В результате исследования препарата ЭС-42 вакцины с помощью электрофореза в 20% полиакриламидном геле выявлена цитоплазматическая фракция бактерии с молекулярной массой белков (20-90 кДа) и содержанием 0,25-0,3 мМ/л холестерина и 0,9-1,0 мМ/л триглицеридов.

4. Исследованием биохимических и иммунологических показателей крови у лабораторных и сельскохозяйственных животных после введения экспериментальной серии терапевтической вакцины с лечебной и профилактической целью удалось показать гармонизацию биохимических и иммунологических показателей у крупного рогатого скота.

5. Разработанный экспериментальный препарат обладал выраженным терапевтическим эффектом в отношении животных с актиномикомой, не превышающей в диаметре 12 см (т.е. на начальной стадии болезни) и был менее эффективным при лечении КРС с актиномикомой большего диаметра (более 25 см). Проведенные профилактические мероприятия против актиномикоза крупного рогатого скота, основанные на двукратном введении



животным препарата из выделенного нами штамма *A. bovis* NV-01, обеспечивают 100% эффективность.

6. Экспериментальная серия терапевтической вакцины против актиномикоза КРС удобна в применении, не требует длительных сроков лечения, не вызывает нежелательных побочных эффектов и повышает резистентность животных к возбудителю *A. bovis* NV-01 путем нормализации обменных процессов и иммунного статуса животных.

7. Установлена высокая экономическая эффективность ветеринарных мероприятий после введения экспериментальной серии терапевтической вакцины крупному рогатому скоту в условиях СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области. Денежные средства сохраненные на каждый рубль ветеринарных затрат, составили 5,7 рубля.

**Список сокращений и условных обозначений**

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

Вт – Ватт

КК – креатинкиназа

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

Охс – общий холестерин

ООИ – особо опасная инфекция

ГНУ – Государственное научное учреждение

КРС – крупный рогатый скот

кГц – килогерц

МПА – мясопептонный агар

МПБ – мясопептонный бульон

НИВИ – научно-исследовательский ветеринарный институт

РАСХН – Российская академия сельскохозяйственных наук

РАЛ – реакция агломерации лейкоцитов

с/х – сельскохозяйственный

СПК – сельскохозяйственный производственный кооператив

ЭС – экспериментальная серия

УЗ – ультразвук

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акулов, А. В. Патологоанатомическая диагностика болезней крупного рогатого скота / А. В. Акулов, В. М. Апатенко, Н. И. Архипов. – М.: Агропромиздат, 1987. – 399 с.
2. Ашмарин, И. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.А. Ашмарин, А.А. Воробьев – Л.: Медгиз, 1986. – 180 с.
3. Аскеров, А. Р. Актиномикоз крупного рогатого скота в Азербайджане / А. Р. Аскеров // Ветеринария. – 1976. – №8. – С.62 - 63.
4. Аскеров, А. Р. Этиологическая структура, некоторые вопросы эпизоотологии и химиотерапии актиномикоза крупного рогатого скота в Азербайджане: автореф. дис... канд. ветер. наук: 16.00.33 / Аскеров Ариф Рагим Оглы. – Тбилиси, 1977. – 18 с.
5. Аснин, Д. И. Иммунодиагностика актиномикоза / Д. И. Аснин. – М.: Медгиз, 1956. – 91 с.
6. Аснин, Д. И. Лизис друз лучистого грибка в тканях больных актиномикозом / Д. И. Аснин, А. В. Талалаева // Архив патологии. 1961. – № 9.
7. Асонов, Н. Р. Микробиология / Н. Р. Асонов – М.: Колос, 1997. – 352 с.
8. Аравийский, Р. А. Диагностика микозов / Р. А. Аравийский, Н. И. Климко, Н. В. Васильева. – СПб.: МАПО, 2004. – 162 с.
9. Агольцов, В. А. Разработка специфической профилактики кандидоза животных / В. А. Агольцов // Мат-лы науч.-практич. конф. ин.-та вет. медицины и биотехнологии СГАУ им. Н.И. Вавилова. – Саратов, 2000.- Вып.1. – С.20-22.
10. Агольцов, В. А. Пат. 2176392 Российская Федерация 7 G 01 №33/53,33/569 Способ оценки иммуногенности антигенов микроорганизмов / Агольцов В. А. [и др.]; заявитель и

- патентообладатель Саратов. Научн. исслед. вет. Станция. – № 99123796/13; заявл. 10.11.1999; опубл. 27.11.01.Бюл. №33.
11. Агольцов, В. А. Пат. 2217163 Российская Федерация А 61 К 39/00, С12 №1/14 Вакцина против кандидоза сельскохозяйственных животных / Агольцов В. А.; заявитель и патентообладатель Саратов. научн. исслед. вет. станция. – № 2002104050/13; заявл. 19.02.2002; опубл. 27.11.2003; Бюл. №33 (п. ч.). – 12 с.: табл.
  12. Агольцов, В. А. Получение противокандидозной вакцины и изучение ее иммуногенных и биохимических свойств / В. А. Агольцов // Вестник СГАУ им. Н.И. Вавилова. – 2005. – № 1. – С. 3-5.
  13. Агольцов, В. А. Пат. 2270694 Российская Федерация А 61 К 39/00 С 12 № 1/4 А 61Р 31/10 С 12 R 1/645 Вакцина против висцеральных микозов сельскохозяйственных животных, вызываемых грибом рода *Mucor racemosus* / Агольцов В. А.; заявитель и патентообладатель Саратов. научн. исслед. вет. станция. - № 2004125814/13; заявл. 24.08.2004; опубл. 27.02.2006. Бюл. №6 (п. ч.). – 6 с.: табл.
  14. Алтухов, Н. Н. Краткий справочник ветеринарного врача / Н.Н. Алтухов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 574 с.
  15. Афанасьев, В. В. Хирургическая стоматология (запись и ведение истории болезни): практ.руководство / МЗ РФ; В. В. Афанасьев, Г. А. Пашинян, В. Н. Новосельская; Под ред. В. В. Афанасьева. – М.: ГОУ ВУНМЦ, 2005. – 124 с.
  16. Аравийский, Р. А. Практикум по медицинской микологии / Р. А. Аравийский, Г. И. Горшкова. – Санкт-Петербург, 1995. – 40 с.
  17. Актиномикоз животных: методические рекомендации / Т. Н. Глотова [и др.] // РАСХН. Сиб. отд-ние. ГНУ ИЭВСиДВ. Новосибирск, 2004. – 31 с.
  18. Баринов, В. Н. Лабораторная диагностика висцеральных микозов с/х животных (Рекомендации для врачей микологов ветеринарных лабораторий) / В. Н. Баринов. – Саратов, 1982. – С. 13-16.

19. Баринов, В. Н. Актиномикоз и меры его профилактики / В. Н. Баринов // Степные просторы. – 1986. – №10. – С. 37.
20. Байд, С. В. Основы иммунологии / С. В. Байд. – М., 1951. – 140 с.
21. Болдырева, А. А. Биохимия мембран: [учеб. пособие для биол. и мед. спец.] / Под. ред. А. М. Белоус., Е. М. Гордиенко, Л. Ф. Розанов. Замораживание и криопротекция. – Кн. 3. – М.: Высш. шк., 1987. – 80 с.
22. Бурова, С. А. Совершенствование диагностики и лечения актиномикоза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1993. – 42 с.
23. Борисов, Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Л. Б. Борисов. – МИА, 2005. – С. 154-156. – ISBN 5-89481-278-X.
24. Белов, Л. Г. Теоретическая эпизоотология: [учебное пособие] / Белов Л. Г., Ларионов С. В. Под. ред. С. В. Ларионова; ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2010. – 240 с. ISBN 978-5-7011-0690-9.
25. Белов, А. В. Лечение и профилактика некробактериоза у крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. ветер. наук: 16.00.05. / Белов А. В. – Воронеж, 2000. – 22 с.
26. Бессарабов, Б. Ф. Инфекционные болезни животных / Б. Ф. Бессарабов, А. А. Ватутин, Е. С. Воронин и др. – М.: Колос, 2007. – 671 с.
27. Беннетт, Д. Е. Актиномикоз. Внутренние болезни / Беннетт Д. Е. Под ред. Харрисона. – М.: Медицина, 1994. – С. 205-207.
28. Бергхоф, П. К. Мелкие домашние животные. Болезни и лечение / П. К. Бергхоф. – М.: Аквариум, 1999. – С. 16-17.
29. Блинов, В. А. Общая биотехнология: курс лекций / В. А. Блинов. – Ч. II. ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2004. – 144 с.
30. Блинов, В. А. Общая биотехнология: курс лекций / В. А. Блинов. – Ч. I. – ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2003. – 162 с.

31. Блинов, В. А. Тесты по общей биотехнологии (Учебно-методическое пособие). ФГОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова». – Саратов, 2003. – 116 с.
32. Блинов, В. А. Что такое биотехнология? / В. А. Блинов, В.И. Воробьев, И.И. Калюжный. – Саратов: Приволжское книжное издательство, 1996. – с. 80 – (Саратовская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии).
33. Блинов, В. А. Биологическая химия: курс лекций / В.А. Блинов, И.А. Сазонова. – Саратов, 2007. – 398с.
34. Блинов, В. А. Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / Блинов В. А. ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2003. – 196 с.
35. Бурцева, С. А. Актиномицеты почв против возбудителей болезней пчел / С. А. Бурцева, И. О. Растимешина, А. Ф. Тодераш // Ветеринария. – 1999. – №12. – С. 23-24.
36. Бурцева, С. А. Антибиотические свойства актиномицетов / С.А. Бурцева, И. О. Растимешина, А. Ф. Тодераш, В. Ф. Рудик // Ветеринария. – 2001. – №3. – С. 26-28.
37. Буц, В. А. Изменение иммуногенности клеток и супернатанта под воздействием ультразвука / В. А. Буц, К. П. Скибенко // Биофизика. – 1991. – Том 36. вып. – №5. – С. 263-265.
38. Бакулов, И. А. Эпизоотология с микробиологией Москва / И. А. Бакулов. – М.: Агропромиздат, 1987. – 415 с.
39. Воробьева, А. А. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: [учеб. пособие для студентов медицинских вузов] / Под. ред. А. А. Воробьева, А. С. Быкова – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – С. 236. – ISBN 5-89481-136-8.
40. Волотко, И. И. Обсемененность кормов лучистыми грибами / И. И. Волотко, А. Г. Бочарова // Ветеринария. – 1980. – №8. – С. 28 - 29.

41. Волотко, И. И. Кормовой травматизм крупного рогатого скота / И.И. Волотко // Уральские Нивы. – 1980. С. 45.
42. Волотко, И. И. Оперативное лечение бычков больных актиномикозом / И.И. Волотко // Уральские Нивы. – 1985. – №2. – С. 41 - 42.
43. Волотко, И. И. Кормовой травматизм крупного рогатого скота / И.И. Волотко. – М.: Агропромиздат, 1987. – 79 с.
44. Волотко, И. И. Актиномикоз крупного рогатого скота / И.И. Волотко, А.В. Смирнова, О.И. Зуева // Ветеринария. – 1992. – №2. – С. 32-34.
45. Волотко, И. И. Классификация актиномикоза челюстно-лицевой области у крупного рогатого скота / И.И. Волотко // Ветеринария. – 1995. – №2. – С. 26-28.
46. Волотко, И. И. Кормовой травматизм крупного рогатого скота и его последствия: дис.... доктора ветерин. наук / Волотко И. И. – Троицк, 1996. – 467 с.
47. Волгин, В. И. Биохимические показатели крови молодняка крупного рогатого скота в высокопродуктивных стадах / В. И. Волгин, Л. В. Романенко, А. С. Бибикова, З. Л. Федорова // Успехи современного естествознания. – 2009. – № 2 – С. 75.
48. Васильев, Д. А. Методы частной бактериологии: учебное пособие / Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, Н. М. Никишина. – Ульяновская ГСХА. – Ульяновск, 2000. – 224 с.
49. Винников, Н. Т. Лабораторные методы исследования в ветеринарии: методические указания для студентов 3, 4, 5 и 6 курсов факультета ветеринарной медицины очной и заочной формы обучения / Н. Т. Винников, И.И. Калюжный, А. В. Коробов. – Часть 1. – Саратов: Саратов. Гос. агр. ун-т им.Н. И. Вавилова, 2000. – 88 с.
50. Визнер, Э. Болезни крупного рогатого скота / Э. Визнер. – М.: Колос, 1970. – С. 246-248.
51. Вершигора, А. Е. Общая иммунология: [учеб. пособие для биол. спец. вузов.] / А. Е. Вершигора. – К.: Выш. шк., 1990. – 735 с.

52. Ветеринарная микробиология и иммунология / Н. А. Радчук, Г. В. Дунаев, Н. М. Колычев [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1991. – С. 297-300.
53. Влияние физико-химических факторов на выживаемость возбудителя актинобациллеза / Ю. Г. Костенко [и др.] // Ветеринария. – 1992. – №2. – С. 57-50.
54. Гарбуз, В. И. Актиномикоз / В. И. Гарбуз, Ф. Г. Пильгаев, А. И. Леткин // Ветеринария. – 1998. – №2. – С.12.
55. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеев – М.: Академия, 2008. – 464 с.
56. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
57. Груздев, К. Мыши и крысы / К. Груздев, Л. Груздев. – М.: Дельта, 2000. – 96 с.
58. Гутира, Ф. Частная патология и терапия домашних животных / Ф. Гутира, И. Марек, Р. Маннингер, И. Мочи. Инфекционные болезни. – Том 1. – М.: СельхозГиз, 1961. – С. 267-282.
59. Гарибова, Л. В., Лекомцева С. Н. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов: [учебное пособие] / Л. В. Гарибова, С. Н. Лекомцева. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 220 с.
60. Глотова, Т. Н. Восприимчивость лабораторных животных к актиномикозу крупного рогатого скота и материалы по культурально-морфологической характеристике возбудителя болезни: дис. ... канд. вет. наук / Т. Н. Глотова. – М., 1989. – 156 с.
61. Голиков, А. В. Экспериментальный актиномикоз у одно- и двухсуточных крольчат / А. В. Голиков // Микробиология. Эпидемиология. Иммунология. – 1963. – С.137-141.



62. Голиков, А. В. Лечение крупного рогатого скота, больного актиномикозом / А. В. Голиков // Ветеринария. – 1963. – № 7. – С.15-16.
63. Голиков, А. В. Актиномикоз крупного рогатого скота и антибиотикотерапия этого заболевания: автореф. дис. ... канд. вет. наук / А. В. Голиков. – М., 1963. – С. 7.
64. Гинсбург, Н. Н. Живые вакцины / Н. Н. Гинсбург. – М.: Медицина, 1969. – 334 с.
65. Громыко, Е. В. Оценка состояния организма коров методами биохимии / Е. В. Громыко // Экологический вестник Северного Кавказа. – 2005. – № 10. – С. 80-94.
66. Дудников, С. А. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации (2010 год) [Электронный ресурс] / [сост. О. Н. Петрова, Н. С. Бардина, Е. Е. Ерастова, М. В. Дудорова, Ф. И. Коренной, Н. С. Дудникова], при содействии В. Н. Боровой (ФГУ «Центр ветеринарии»); С. А. Коломыцев (ФГУ «Центр ветеринарии»); А. А. Мельникова («Роспотребнадзор») // Информационно – аналитический центр Россельхознадзора ; ФГУ ВНИИЗЖ ИАЦ Управления Ветнадзора г. Владимир. – Режим доступа: [http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2011/files/iac2011\\_9mes.pdf](http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2011/files/iac2011_9mes.pdf) (дата обращения 23. 01. 2012).
67. Дудников, С. А. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации (2012 год) [Электронный ресурс] / [сост. С. А. Дудников, О. Н. Петрова, Н. С. Бардина, Е. Е. Ерастова, М. В. Дудорова, Ф. И. Коренной, Н. С. Дудникова], при содействии В.Н. Боровой (ФГУ «Центр ветеринарии»); С.А. Коломыцев (ФГУ «Центр ветеринарии»); А.А. Мельникова («Роспотребнадзор») // Информационно – аналитический центр Россельхознадзора; ФГУ ВНИИЗЖ ИАЦ Управления Ветнадзора г. Владимир. – Режим доступа: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2012/files/iac2012.pdf> (дата обращения 23. 01. 2012).

68. Действие некоторых стресс-факторов на организм телят / В. Д. Баранников, Г. К. Волков, Н. С. Маковлева [и др.] // Ветеринария. – 1997. – №10. – С. 48-51.
69. Деревлева, Т. А. Материалы к этиологии актиномикоза крупного рогатого скота и свиней и ветоценка продуктов убоя при этом заболевании: автореф. дис. ... канд. вет. Наук / Т. А. Деревлева. – М., 1967. – С.25.
70. Деревлева, Т. А. Экспериментальная модель актиномикоза / Т. А. Деревлева, Т. Г. Сутеева // Проблемы глубоких микозов. – Вып. I. – 1969. – С.436 - 443.
71. Деревлева, Т. А. Аэробные возбудители актиномикоза животных / Т. А. Деревлева, Т. Г. Сутеева // Ветеринария. – 1968. – №12. – С.60 - 61.
72. Досон, Р. Справочник биохимии / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот [перев. с английского канд. хим. наук В. Л. Друцы и канд. хим. наук О. Н. Королевой]. – М.: Мир, 1991. – 539 с.
73. Емцев, В. Т., Мишустин Е. Н. Микробиология / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 445 с.
74. Емцев, В. Т. Рубежи биотехнологии / В. Т. Емцев. – М.: Агропромиздат, 1986. – 159 с.
75. Емельяненко, П. А. Ветеринарная микробиология / П. А. Емельяненко, Г. В. Дунаев, Д. Г. Кудлай. – М.: Колос, 1982. – 225 с.
76. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках: [учеб. для студентов биолог, спец. ун-тов] / Н. С. Егоров. – Изд 4-е., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1986.– 448 с.
77. Егоров, Н. С., Самуилов В.Д. Биотехнология / Н. С. Егоров, В. Д. Самуилов. – М.: Высш.шк., 1987. – 145 с.
78. Жаров, А. В. Вскрытие и патоморфологическая диагностика болезней животных / А. В. Жаров, И. В. Иванов, А. П. Стрельников. – М.: Колос, 2000. – 400 с.

79. Зыкин, Л. Ф. Клиническая микробиология для ветеринарных врачей: [учеб. пособие] / Л. Ф. Зыкин, З. Ю. Хапцев. – ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», Саратов, 2003. – 84 с.
80. Зыкин, Л. Ф. Клиническая микробиология для ветеринарных врачей: [учебники и учеб. пособия для студентов высших учеб. заведений] / Л. Ф. Зыкин, З. Ю. Хапцев. – М.: Колосс, 2006. – 96 с.
81. Зыкин Л. Ф. Современные методы в ветеринарной микробиологии: [учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений] / Л. Ф. Зыкин, З. Ю. Хапцев, Т. В. Спиряхина. – М.: Колосс, 2011. – 109 с. ISBN 978-5-9532-0568-9
82. Западнюк, И. П. Лабораторные животные / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария. – Киев, 1974. – 303 с.
83. Зубков, М. Н. Современная таксономия и номенклатура облигатно-анаэробных бактерий, выделенных от человека / М. Н. Зубков // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – Том 7. – 2005. – № 4. – Москва. – С. 312-321.
84. Ильина, Н. А. Естественный ингибирующий фактор и его взаимосвязь с иммунным статусом крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. ветер. наук: 16.00. 03 / Ильина Наталья Александровна. – Воронеж, 2004. – 28 с.
85. Ильченко, В. И. БИОМ, йодистые и другие препараты в консервативном способе лечения крупного рогатого скота при актиномикозе / В. И. Ильченко, И. И. Михайлова, Т. Р. Лещенко // Материалы Международной научно-практической конференции «Развитие инновационного потенциала агропромышленного производства науки и аграрного образования» – ДонГАУ, 2009. – Том 3. – С. 62-64.
86. Инфекционные болезни животных / А. А. Сидорчук, Б. Ф. Бессарабов, Е. С. Воронин [и др.]; А.А. Сидорчук (гл. ред.). – М.: Колосс, 2007. – 671 с.

87. Калакуцкий, Л. В. Изучение анаэробных проактиномицетов. Культура льно-физиологические свойства / Л. В. Калакуцкий // – 1961. – Т.30, Вып.5. – С. 921-927.
88. Каркищенко, Н. Н. Основы биомоделирования / Н. Н. Каркищенко. – М.:Межакадемическое издательство ВПК, 2004. – 607 с.
89. Канаев, И. И. Избранные труды по истории науки / И. И. Канаев // Сборник статей СПб. – 2000. – Алетейя. – 494 с.
90. Калакуцкий, Л. В. Изучение анаэробных проактиномицетов / Л. В. Калакуцкий // Морфология, микробиология. – 1960. – Т.29, Вып.3. – С.371-376.
91. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия: [учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов.] / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. – Изд. 3-е, испр. – М.: Высшая школа, 2000. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7.
92. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
93. Козлов, И. Г. О повышении эффективности взаимодействия практической ветеринарной службы и ветеринарной науки в решении актуальных вопросов обеспечения эпизоотического благополучия и биологической безопасности на территории области // От теории – к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины: сб. тр. межд. науч. – практ. конф. Саратов, 2011. – 384 с.
94. Кузнецов, А. Ф. Справочник ветеринарного врача / А. Ф. Кузнецов. – Москва: Лань, 2002. – 896 с.
95. Кузнецов, А. Ф. Ветеринарная микология / А. Ф. Кузнецов. – СПб.: Лань, 2001. – С. 223–228.
96. Коленько, Е. И. Практикум по ветеринарной микробиологии / Е. И. Коленько. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Сельхозиздат, 1963. – С. 224.
97. Кисленко, В. Н. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / В. Н. Кисленко. – М.: Колос, 2005. – 232с.

98. Колычев, Н. М. Ветеринарная микробиология и иммунология / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. – М.: Колос, 2003. – 432 с.
99. Кузьмин, В. В. Ветеринарная микробиология / В. В. Кузьмин. – М.: Госсельхозиздат, 1958. – 231 с.
100. Кучерук, Н. Х. Применение йодиола при актиномикозе у крупного рогатого скота / Н. Х. Кучерук // Ветеринария. – 1997. – №6. – С. 15-16.
101. Кучерук Н. Х. Профилактика и лечение актиномикоза и актинобациллёза крупного рогатого скота йодвысокополимером "йодиол" / Н. Х. Кучерук // Ветеринария. – 1998. – №11(5/98). – С. 30-35.
102. Курасова, В. В. Болезни, вызываемые актиномицетами / В. В. Курасова, В. В. Костин, Л. С. Малиновская. – М., 1971. – С. 103-108.
103. Колычев, Н. М., Ощепков В. Г. Зоопатогенные бактерии и меры борьбы с ними / Н. М. Колычев, В. Г. Ощепков. Монография: ОмГАУ. – Омск, 2001. – С. 461-467.
104. Красильников, Н. А. Определитель лучистых грибков / Н. А. Красильников. – М.: Изд. академии наук СССР, 1941. – С. 43-61.
105. Красильников, Н. А. Биология отдельных групп актиномицетов / Н. А. Красильников. – М.: Наука, 1965. – С. 5-28.
106. Красильников, Н. А. Лучистые грибки (высшие формы) / Н. А. Красильников. – М.: Наука, 1970. – С.420-427.
107. Коляков, Я. Е. Ветеринарная микробиология / Я. Е. Коляков. – М.: Гос. изд. сельскохозяйств. лит., 1952. – С. 364-366.
108. Коротяев, А. И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. – Изд. 3-е, исправленное и дополненное. – Санкт-Петербург, СпецЛит, 2002. – С. 477-479.
109. Карасева, Е. И. Флавоноиды-б-фосфат дегидрогеназы от инактивации ультразвуковой кавитацией / Е. И. Карасева, В. П. Курченко, Д. И.

- Метелица // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, №2. – С. 158-168.
110. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – М.: МЕДПресс-информ, 2004. – 920 с.
111. Кокуричев, П. И. Патологическая анатомия сельскохозяйственных животных: альбом / П. И. Кокуричев, Б. Г. Домнин, М. П. Кокуричева. – СПб.: Агропромиздат, 1994. – 212 с.
112. Куриленко, А. Н. Инфекционные болезни молодняка сельскохозяйственных животных / А. Н. Куриленко, В. Л. Крупальник. – М.: Колос, 2000. – 144 с.
113. Лабораторная гематология / С. А. Луговская [и др.] – М.: Юнимед-пресс, 2002. – 115 с.
114. Ледванов, М. Ю. Введение в клиническую иммунологию (лекции) / М. Ю. Ледванов, В. Ф. Киричук. – М., 1996. – С. 43-49.
115. Ласкавый, В. Н. Рекомендации по приготовлению вакцин и иммунопрофилактике кандидоза, аспергиллеза и мукороза животных / В. Н. Ласкавый, В. А. Агольцов, В. Н. Баринов. – ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2005. – С. 4-12.
116. Ленинджер, А. Основы биохимии / А. Ленинджер. – В 3-х т. – Т.1. – М.:Мир, 1985. – 367 с.
117. Лебедев, К. А., Понякина И. Д. Иммунограмма в клинической практике / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. – М.: Наука, 1990. – 224 с.
118. Лебедев, А. В. Общая ветеринарная хирургия / А. В. Лебедев, В. А. Лукьяновский, Б. С. Семенов. – М.: Колос, 2000. – С. 135-137.
119. Лекарственное средство для лечения актиномикоза // Пат. № 2297839 Российская Федерация, по кл. МПК А61Р31/10; А61К33/18; А61К33/14 / Н. В. Шаньшин, Т. П. Евсеева, В. Г. Луницын; заявитель и патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт пантового оленеводства (ВНИИПО) (RU); опуб. 27.04.2007.

- Режим доступа: <http://www.findpatent.ru/patent/229/2297839.html>  
(дата обращения: 07.04.2014).
120. Ласкавый, В. Н. Оценка иммуногенности культур грибов *Mucor* и *Aspergillus* / В. Н. Ласкавый, В. А. Агольцов: Мат-лы науч.-практич. конф. ин.-та вет. медицины и биотехнологии СГАУ им. Н.И. Вавилова. – Вып. 1. – Саратов, 2000. – С.41-43.
121. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований / З. К. Бландова, В. А. Душкин [и др.] – М.: Наука, 1983. – 172 с.
122. Маминов, Л. С. Содержание йода в крови и тканях у крупного рогатого скота при актиномикозе / Л. С. Маминов, Т. Х. Колесникова // Сб. науч. тр. Донского СХИ. – 1970. – Т. 6, Вып. 3. – С. 140-141.
123. Мещеряков, Ф. А., Ромм В. Л. Анализ различных методов лечения актинобациллеза (псевдоактиномикоза) крупного рогатого скота / Ф.А. Мещеряков, В.Л. Ромм // Науч. тр. Ставропольского СХИ. – 1978. – Т. 5, Вып. 41. – С. 3-7.
124. Маминов, Л. С. Эффективность применяемых в практике методов лечения актиномикоза крупного рогатого скота / Л. С. Маминов, Г. П. Алпатова // Сборник науч. тр. Донского СХИ. – 1975. – Т. X, Вып. 1. – С. 50-57.
125. Маминов, Л. С. Комбинированный метод лечения крупного рогатого скота при актиномикозе. Меры борьбы с незаразными болезнями крупного рогатого скота и свиней / Л. С. Маминов, В. И. Ильченко // Сб. науч. тр. ДонСХИ. – 1987. – С. 76-80.
126. Мари, Н. Н. Материалы к учению об актиномикозе / Н. Н. Мари. – Казань, 1980. – 154 с.
127. Мещеряков, Ф. А. Актинобациллезы крупного рогатого скота на Северном Кавказе / Ф. А. Мещеряков, В. Л. Ромм, А. Н. Пилипенко // Диагностика, лечение, профилактика инфекционных и паразитарных заболеваний с.-х. животных. – Ставрополь, 1989. – С. 4-8.

128. Медведев, Н. Н. Линейные мышцы / Н. Н. Медведев. – Л. Медицина, 1964. – 180 с.
129. Медуницин, Н. В. Вакцинология / Н. В. Медуницин. – М., Триада-Х, 1999. – 272 с.
130. Методические рекомендации по лабораторной диагностике актиномикоза животных / А. Х. Саркисов [и др.]. – М., 1988. – 18 с.
131. Герхардт, Ф. Методы общей бактериологии. Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – Том 1. – М.: Мир, 1983. – 536 с.
132. Малинин, М. Л. Использование стандартного метода определения общего белка при исследовании сыворотки крови животных / М. Л. Малинин // Успехи современного естествознания. – 2008. – №3. – С.105-106.
133. Малинин, М. Л. Биохимические и гематологические показатели у цыплят кросса «Родонит-2» в норме и при инфицировании эшерихиями / М. Л. Малинин // СГАУ им. Н.И.Вавилова, 2008. – С. 34-37.
134. Малинин, М. Л. Оценка устойчивости цыплят к колибактериозу по микробиологическим и биохимическим показателям: дис. ...канд. биол. наук: 03.02.03, 03.01.06 / Малинин Михаил Леонидович. – Саратов, 2009. – 156 с.
135. Мецлер, Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке / Д. Мецлер. – Т.1. – М.:Мир, 1980. – 387с.
136. Маршалл, В. Д. Клиническая биохимия / В. Д. Маршалл. – М.-СПб.: «издательство БИНОМ» - «Невский диалект». – 2000. – 368 с.
137. Магер, С. Н. Биохимическое исследование крови и сыворотки крови крупного рогатого скота с использованием спектроанализатора «INFRAPID-61» [Электронный журнал] / С. Н. Магер, Ю. В. Итэсь, В. Н. Скрипко. УДК 619:616. 155. 392:636. 22/28:612.1, 2009.



138. Митрофанов, В. С. Абдоминальный актиномикоз (обзор литературы и описание двух случаев) / В. С. Митрофанов, М. А. Шевяков // Гастроэнтерология. – 2004. – №1. – С.20-22.
139. Миронова Э. М., Гришин Е. В. Патент РФ № 2125427 по кл. МПК А61F9/00, опуб. 27.01.1999.
140. Никитин, И. Н. Организация и экономика ветеринарного дела / И. Н. Никитин, В. А. Апалькин. – Изд. 5-е – М.: Колосс, 2006. – С. 210-252.
141. Никитин, И. Н. Организация и экономика ветеринарного дела / И. Н. Никитин, В. Ф. Воскобойник. – Изд. 4-е – М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 1999. – С. 209-261.
142. Нижегородцев, С. А. Разработка новой технологии получения О-антигена холерного вибриона для производства профилактических препаратов: дис....канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00. 04 / Нижегородцев Сергей Анатольевич. – Саратов, 2003. – 145 с.
143. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулт [и др.]; Перевод с английского С. Ш. Тер-Казарьяна – М.:Мир, 1980. – 495 с.
144. Определитель бактерий Берджи в 2 томах. – Том 2. / Под ред. Дж. Хоулт [и др.]. – М.: Мир, 1997. – 325 с.
145. Описание материала, расположенного на сайте Мешковой Р. Я. Руководство по иммунопрофилактике для врачей [Электронный ресурс] / Р. Я. Мешковой. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/books/immun/imm07.shtml> (дата обращения:25.01.2012).
146. Орлов, Ф. М. Инфекционные болезни крупного рогатого скота / Ф. М. Орлов. – М.: Колос, 1974. – С. 317-322.
147. Орехович, В. Н. Современные методы в биохимии / В. Н. Орехович. – М.: Медицина, 1997. – 387с.
148. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А.Овчинников. – М.: Просвещение, 1987. – 815с.

149. Овчинников, Ю.А. Основы биохимии / Ю. А.Овчинников. – В 3-х т. – Т.1. – М.:Мир, 1981. – 534 с.
150. Остерман, Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. – М., МЦНМО, 2002 – 248 с.
151. Основы клинической биохимии: [пособие для студентов медико-диагностического факультета] / С.В. Лелевич [и др.]. – Гродно: ГрГМУ, 2013. – 184 с. ISBN 978-985-558-237-3.
152. Препарат для лечения инфекционных заболеваний, вызываемых микобактериями, актиномицетами, прежде всего *nocardia sp.*, и возбудителями токсоплазмоза // Пат. № 2136272 Российская Федерация, по кл. МПК А61К31/18; А61К31/505 / Ф. Хоффманн - Ля Рош АГ (СН), Иван Компис (СН), Рудольф Тен (DE); заявитель и патентообладатель Ф.Хоффманн - Ля Рош АГ (СН) – № 94019991/14; заявл. 03.06.1994; опубл. 10.09.1999. – Режим доступа: <http://ru-patent.info/21/35-39/2136272.html> ((дата обращения: 07.04.2014).
153. Применение полимиксина при актиномикозе крупного рогатого скота / С. Н. Вахидов [и др.] // В кн.: Новое в незаразных болезнях с.-х. животных: Материалы 1 Республиканской науч.-производ. конференции. – 1970. – С. 144-145.
154. Панько, И. С. Меры борьбы с актиномикозом в спецхозьях по откорму / И. С. Панько, В. М. Черкез // Ветеринария. – 1986. – №11. – С. 35-36.
155. Пяткин, К. Д. Микробиология (с вирусологией и иммунологией) / К. Д. Пяткин, Ю.С. Кривошеин. – М.: Медицина, 1981. – 512 с.
156. Петрович, С. В. Микозы / С. В. Петрович // В кн.: Микотические заболевания животных. – М.: Колос., 1982. – С. 4-89.
157. Петрович, С. В. Микозы животных / С. В. Петрович. – М.: Росагропромиздат, 1991. – 238 с.
158. Плахотин, М. В. Актиномикоз. В кн.: Общая ветеринарная хирургия / М.В. Плахотин. – М., Колос, 1966. – С. 26-129.

159. Предтеченский, В. Е. Руководство по лабораторным методам исследования / В. Е. Предтеченский, В. М. Боровская, Л. Т. Марголина. – М.: Медгиз, 1950. – 804 с.
160. Поль де К. Охотники за микробами / Поль де К. – М.: Астрель, 2012. – С. 89-151, 196—243, ISBN 978-5-271-35518-9
161. Полников, И. А. Воспроизведение аспергиллеза и мукороза животных и разработка средств специфической диагностики и профилактики: дис.... канд. ветеринарных наук: 16.00.03 / Полников Игорь Александрович. – ГНУ Российская академия сельскохозяйственных наук Саратовская научно-исследовательская ветеринарная станция. – Саратов, 2003. – 139 с.
162. Петровская, В. П. О так называемых, условно-патогенных микроорганизмах / В. П. Петровская. – ЖМЭИ. – 1974. – № 6. – С. 94-100.
163. Притулин, П. И. Ускоренная микробиологическая диагностика инфекционных болезней животных и индикация патогенных микроорганизмов во внешней среде / П. И. Притулин. – М.: Россельхозиздат, 1966. – 176 с.
164. Пирогова, Н. И. К вопросу изучения хирургической анатомии при актиномикозе крупного рогатого скота / Н. И. Пирогова // Тр. Киргизского СХИ. – Т. 3, Вып. 15. – 1970. – С. 15-19.
165. Пирогова, Н. И. Классификация клинических форм актиномикоза крупного рогатого скота / Н. И. Пирогова // Тр. Киргизского СХИ, Вып. 15. – Т. 3. – 1970. – С. 20-22.
166. Пупкова В. И., Прасолова Л. М. Определение белка в моче и спинномозговой жидкости / В. И. Пупкова, Л. М. Прасолова. – Кольцово, 2005. – 43 с.
167. Рахманов, А. И. Хомяки и морские свинки / А.И. Рахманов. – М.: Аквариум, 2002. – С. 39-47.

168. Розанов, А. П. О некоторых аспектах профилактики и лечения актиномикоза у крупного рогатого скота в условиях крупного животноводческого хозяйства / Розанов А. П., Лапшин А. А. // В кн.: *Общ. патология с.-х. животных.* – Омск, 1982. – С. 5-8.
169. Розанов, Н. И. Микробиологическая диагностика заболеваний сельскохозяйственных животных / Н. И. Розанов. – М., 1952. – С. 253-254.
170. Резяпкин, И. Н. Эпизоотический процесс и меры борьбы при эхинококкозе животных: автореф. дис. ... докт. ветер. наук: 03.00.19/ Резяпкин Иван Николаевич . – Саратов, 2001. – 57 с.
171. Рослый, И. М. Ферментемия – адаптивный механизм или маркер цитолиза?/ И.М. Рослый, С.В. Абрамов, В.И. Покровский // *Вестник РАМН.* – 2002. – № 8. – С. 3-9.
172. Русланов, И. Г. Актиномикоз / И. Г. Русланов // В кн.: *Общая хирургия.* – М.: Колос, 1953. – С. 82-83.
173. Сассон, А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир, 1987. – 247 с.
174. Спесивцева, Н. А. Микозы и микотоксикозы / Н. А. Спесивцева. – М.: Колос, 1960. – С. 223-247.
175. Спесивцева, Н. А. Микозы и микотоксикозы / Н. А. Спесивцева. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Колос, 1964. – с. 223-239.
176. Северина, С. Е. Практикум по биохимии: [учеб. пособие] / С.Е. Северина, Г. А. Соловьева. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: МГУ, 1989. – 509 с.
177. Сосова Р. Ф. Эпизоотология / Р. Ф. Сосова. – М.: Колос, 1969. – С. 171–173.
178. Спесивцева, Н. А. Меры борьбы и профилактики актиномикоза и актинобациллеза крупного рогатого скота / Н. А. Спесивцева // *Сб. трудов ШЦИВС.* – 1964. – Т.23. – С.142-144.

179. Спиридонов, Б. С. Актиномикоз молочной железы у свиноматок / Б. С. Спиридонов // Ветеринария. – 1983. – №5. – С. 39-40.
180. Справочник по болезням домашних и экзотических животных / С. С. Липницкий [и др.]. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – Мн.: Ураджай, 1996. – С. 219-220.
181. Сутеева, Т. Г. Микробиологическая диагностика актиномикоза / Т. Г. Сутеева, М. В. Фирюкова // Лабораторное дело. – М., 1963. – С. 35-39.
182. Сутеев, Г. О. Актиномикоз / Г. О. Сутеев. – М.: Медгиз, 1951. – С. 291-301.
183. Сидоров, М. А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов / М. А. Сидоров, Д. И. Скородумов, В. Б. Федотов. – М.: Колос, 1995. – С. 137-142.
184. Саттон, Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди. – М.: Мир, 2001. – 486 с.
185. Сорока, С. А. Влияние акустических колебаний на биологические объекты / С. А. Сорока // Вибрация в технике и технологиях, 2005. – №1. – С. 39-41.
186. Солодовников Л. В. Актиномикоз крупного рогатого скота и его лечение / Л. В. Солодовников, В. И. Воробьев, Г. В. Воробьева // В кн.: Общая патология с.-х. животных. – Омск, 1981. – С. 85-89.
187. Сундуков, П. П. Актиномикоз мягких тканей головы у герефордов. Особенности клиники и послеоперационного заживания / П. П. Сундуков, А. П. Розонова, Д. Н. Бондарько // Науч.тр. Ом. вет. ин-та, 1972. – Т. 29. – Вып. 2. – С. 83-86.
188. Саркисов, Д. С., Перов Ю. Л. Микроскопическая техника: руководство / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
189. Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – М., Мир, 1985. – 237 с.

190. Способ оценки иммуногенности антигенов микроорганизмов // Пат. РФ на изобретение №2176392, класс МПК, 2001 / Ласкавый В. Н., Агольцов В. А., Парфенов А. А., Полников И. А., Федотова Е. В.; заявитель и патентообладатель Саратов. Научн.-исслед. вет. Станция.
191. Терентьев Ф. А. Инфекционные и инвазионные болезни крупного рогатого скота / Ф. А. Терентьев, А. А. Марков. – М.: Гос. издат. с.-х. лит-ры, 1956. – С. 388-398.
192. Третьяков, А. Д. Ветеринарное законодательство / А. Д. Третьяков. – Том II. – М.: Колос, 1972. – 718 с.
193. Ткачук, В. А. Клиническая биохимия / В.А. Ткачук. – Изд. 2-е, испр. и доп. – М.: Гэотар-Мед., 2004. – 512 с.
194. Тутов, И. К. К номенклатуре возбудителя актинобациллеза / И. К. Тутов // Ветеринария. – 1996. – №11. – С. 9.
195. Тутов, И. К. Особенности эпизоотологии актинобациллеза (псевдоактиномикоза) животных в Ставропольском крае / И. К. Тутов, В. Л. Ромм // В кн.: Диагностика, лечение, профилактика инфекционных и паразитарных заболеваний с.-х. животных. – Ставрополь, 1984. – С. 7-10.
196. Тутов, И. К. Морфология возбудителя псевдоактиномикоза (актинобациллеза) / И. К. Тутов // Науч. тр., Ставропольский СХИ. – 1980. – Т.4, Вып. 43. – С. 34-37.
197. Тутов, И. К. Особенности иммунитета при псевдоактиномикозе (актинобациллезе) животных / И. К. Тутов // Диагностика, лечение, профилактика инфекционных и паразитарных заболеваний с.-х. животных. – Ставрополь, 1989. – С. 9-14.
198. Указ Президента РФ от 07.07.2011 № 899 «Об утверждении приоритетных направлений развития науки, технологий и техники в Российской Федерации и перечня критических технологий Российской Федерации» [Электронный ресурс] // Биомедицинские и ветеринарные технологии: Разработка ветеринарных фармпрепаратов

- и вакцин. – URL: <http://graph.document.kremlin.ru/page.aspx?1;1563800> (30.04.2014).
199. Ульянов, А. Ю. Совершенствование производства вакцины холерной бивалентной химической таблетированной: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06, 03.02.03 / Ульянов Александр Юрьевич. – Саратов, 2011. – 22 с.
200. Уокер, Д. Ф. Формальдегид / Д. Ф. Уокер. – М.: Мир, 1957. – 608с.
201. Фримель Г. Иммунологические методы / Г. Фримель. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
202. Филоненко, Е. А. Моделирование тепловых процессов в биологических тканях при воздействии сфокусированным ультразвуком / Е. А. Филоненко, В. А. Хохлова // Вестник Московского университета. – 1999.– Серия 3. Физика, астрономия. – №6. – С.29-30.
203. Федоров, Ю. Н. Иммунология. Иммунокоррекция: применение и механизм действия иммуномодулирующих препаратов / Ю. Н. Федоров // Ветеринария. – 2005. – №2. – С 4.
204. Целищев, Л. И. Актинобациллез крупного рогатого скота и овец / Л. И. Целищев, В. Л. Ромм, В. К. Свистухина // Ветеринария. – 1974. – №3. – С. 56-57.
205. Шатохин, Ю. Е. Методика определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий / Ю. Е. Шатохин [и др.]. – М: МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 1997. – С. 36.
206. Шах Махмуд, Р. О получении цитоплазматической фракции бактерий *serratia marcescens* / Р. Шах Махмуд, М. Н. Филимонова // Естественные науки. – 2010. – Том 152, кн. 1. – С. 121-126.
207. Шишков, В. П. Ветеринарный энциклопедический словарь / В. П. Шишков. – М.: Советская энциклопедия, 1981. – С. 12–13.

208. Шапхаев, Э. Г. Дезинтеграция клеток в биотехнологии: [Учебное пособие] / Э. Г. Шапхаев, В. Ж. Цыренов, Е. И. Чебунина. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2005. – С. 53-65.
209. Шишков, В. П. Патологическая анатомия сельскохозяйственных животных / В. П. Шишков, Н.А. Налетова. – Изд. 2-е, испр. и доп. – М.: Колос, 1980. – 440 с.
210. Шлегель, Т. Общая микробиология / Т. Шлегель. – М.: Мир, 1980. – 594 с.
211. Экстракт люцерны и способ его получения // Пат. № 2311191 Российская Федерация, по кл. МПК А61К36/48 / К. А. Лукманова, Т. Г. Нигматуллин, М. Х. Мухамадеева, М. М. Алсынбаев, В. Г. Юсупов; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное унитарное предприятие "Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам "МИКРОГЕН" Министерства Здравоохранения Российской Федерации (RU); опуб. 27.03.2012. – Режим доступа: <http://www.findpatent.ru/patent/231/2311191.html> (дата обращения: 07.04.2014).
212. Arora, B. Actinomycotic cholecystitis / B. Arora, R. S. Ponia, D. R. Arora // *Indian J. Gastroenterol.* – 1997. – Vol.16. – No. 2. – P.68.
213. Arora, A. K. Esophageal actinomycosis: a case report and review of the literature / A. K. Arora, J. Nord, O. Olofinlade, B. Javors // *Dysphagia.* – 2003. – Vol.18. – No. 1. – P.27-31.
214. An, D. *Actinomyces\_ruminicola* sp. nov., isolated from cattle rumen / D. An, S. Cai, X. Dong // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2006. – Vol. 56(Pt 9). – P. 2043-8.
215. Anguille, S. Dendritic cell-based therapeutic vaccination for acute myeloid leukemia / S. Anguille , V. Van Tendeloo , Z. Berneman // *Bull Cancer.* – 2012. – Vol. 99. – No. 6. – P. 635-42.



216. Barouch, D. H. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys / *Nature*. – 2013. – Vol. 14;503(7475). – P. 224-8.
217. Bhagavan, B. S. Pseudoactinomycotic radiate granules in the lower female genital tract: relationship to the Splendore-Hoeppli phenomenon / B. S. Bhagavan, J. Ruffier, B. Shinn // *Hum. Pathol.* – 1982. – No. 13. – P.898-904.
218. Bud, R. Biotechnology in the twentieth century. – 1991. – *Soc. Stud. Sci.* Vol. – 21. – P. 415-457.
219. Buddle, B. M. Overview of vaccination trials for control of tuberculosis in cattle, wildlife and humans / B. M. Buddle , N. A. Parlane , D. N. Wedlock , A. Heiser // *Transbound Emerg Dis.* – 2013. – Vol. 60. – P. 136-46.
220. Bird, R. E. Walker. Single chain anti-body variable regions / R. E. Bird, B. W. Walker // *Trends Biotechnol.* – 1991. – Vol 9. – P. 132-137.
221. Chamow, S. M. Immunoadhesins: principles and applications. *Trends Biotechnol* / S. M. Chamow, A. Ashkenazi. – 1996. – Vol. 14. – P. 52-60.
222. Chaudhary, V. K. Selective killing of HIV-infected cells by recombinant human CD4-Pseudomonas exotoxin hybrid protein / V. K. Chaudhary, T. Mizukami, T. R. Fuerst, D. J. FitzGerald, B. Moss, I. Pastan, E.A. Berger // *Nature*. – 1988. – Vol. 335. – P. 369-372.
223. Camenzind, D. Mass appearance of actinomycosis in a llama herd in Switzerland / D. Camenzind // *Schweiz Arch Tierheilkd.* – 2005. – Vol. 147(8). – P. 351-6.
224. Cleghorn, A. G. The IUCD associated incidence of *Actinomyces israelii* in the female genital tract / A. G. Cleghorn, R. G. Wilkinson // *Aust. N.Z. J. Obstet. Gynecol.* – 1989. – No. 29. – P.445-449.
225. Conrad, D. P. Leukemia cell-rhabdovirus vaccine: personalized immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia / D. P. Conrad , J. Tsang, M. Maclean , J.S. Diallo, F. Le Boeuf , C. G. Lemay , T. J. Falls, K. A.

- Parato, J. C. Bell, H. L. Atkins // *Clin Cancer Res.* – 2013. – Vol. 15;19(14). – P. 3832-43.
226. Cohen, E. Infective endocarditis due to *Actinomyces neuii* / E. Cohen, J. Bishara, B. Medalion, A. Sagie, M. Garty // *Scand J Infect Dis.* – 2007. – Vol. 39(2). – P. 180-3.
227. Curtis, E. M. Actinomycetes in the vaginas of women with and without intrauterine contraceptive devices / E. M. Curtis, L. Pine // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1981. – No. 140. – P.880-884.
228. Crawford, P. C. Modulation of *Actinomyces viscosus* colonization of mouse teeth in vivo by immunization with fimbrial adhesions / P. C. Crawford, W. B. Clark // *Infect Immun.* – 1986. – Vol. 54(2). – P. 516-21.
229. Dybdahl, H. The clinical significance of actinomyces colonisation as seen in cervical smears / H. Dybdahl, J. Hastrup, U. Baandrup // *Acta Cytol.* – 1991. – No. 35. – P.142-143.
230. Duarte, E. R. Otitis in cattle, an aetiological review / E. R. Duarte, J. S. Hamdan // *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* – 2004. – Vol. 51(1). – P. 1-7.
231. De Ritis, F. «An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis: the transaminase serum activities / F. De Ritis, M. Coltorti, G. Giusti 1957» // *Clin. Chim. – Acta* 369 (2). – 2006. – P. 148–52.
232. Ding, H. Measurement of *Actinomyces pyogenes* specific antibodies in bovine blood samples by an enzyme-linked immunosorbent assay / H. Ding, C. Lämmeler, U. Vecht // *Zentralbl Veterinarmed B.* – 1998. – Vol. 45(5). – P. 297-303.
233. Enrico, R. Pulmonary actinomycosis in two chamois (*Rupicapra rupicapra*). Abstract Actinomycosis is a widespread non-contagious infectious condition, occurring both in animals and... / R. Enrico , A. Elena , M. Silvana und S. Eugenio // *European Journal of Wildlife Research.* – 2007. – Vol. 53. – No. 3. – P. 231-234.

234. Fiorino, A. S. Intrauterine contraceptive device-associated actinomycotic abscess and actinomyces deflection on cervical smear / A. S. Fiorino // *Obstet. and Gynecol.* – 1996.– No. 1. – Vol.87. – P.142-149.
235. Georg, L. K. Identification of species of actinomyces / L. K. Georg, G. W. Robertstad, S. A. Brinkman *J Bacteriol.* – 1964. – Vol. 88. – P. 477-90.
236. Gröschel, M. I. Therapeutic vaccines for tuberculosis-A systematic review / M. I. Gröschel , S. A. Prabowo, P. J. Cardona, J. L. Stanford, T. S. Werf // *Vaccine.* – 2014. – doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.047. [Epub ahead of print]
237. Hall, V. *Actinomyces\_dentalis* sp. nov., from a human dental abscess / V. Hall, M. D. Collins, P. A. Lawson, E. Falsen, B. I. Duerden // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2005. – Vol. 55(Pt 1). – P. 427-31.
238. Haas, L. Use of biotechnical methods in veterinary medicine / L. Haas, V. Moennig, O. R. Kaaden // *Rev Sci Tech.* – 1990. – Vol. 9(1):245-51. PMID: 1966725 [PubMed - indexed for MEDLINE]
239. Hijazin, M. *Actinomyces weissii* sp. nov., isolated from dogs / M. Hijazin, J. Alber, C. Lämmler, P. Kämpfer, S. P. Glaeser, H. J. Busse, J. Kassmannhuber, E. Prenger-Berninghoff, T. Förnges, A. A. Hassan, A. Abdulmawjood, M. Zschöck // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2012. –Vol. 62(Pt 8). – P. 1755-60.
240. Hunter, P. Failure of an *Actinomyces pyogenes* vaccine to protect sheep against an intravenous challenge / P. Hunter, J. J. van der Lugt, J. J. Gouws // *Onderstepoort J Vet Res.* – 1990. – Vol. 57(4). – P. 239-41.
241. Ivanov, A. V. A live vaccine from *Brucella abortus* strain 82 for control of cattle brucellosis in the Russian Federation / A.V. Ivanov, K. M. Salmakov, S. C. Olsen, G. E. Plumb // *Anim Health Res Rev.* – 2011. – Vol. 12(1):113-21. doi: 10.1017/S1466252311000028. Review. PMID: 21676343 [PubMed - indexed for MEDLINE]
242. Joseph, G. Language, and Molecular Chirality / G. Joseph, P. Louis // *I. Background and Dissymmetry, Chirality.* – 2011. – Vol. 23. – P. 1–16.

243. Kan, Q. C. Vector-mediated expression of interferon gamma inhibits replication of hepatitis B virus in vitro / Q. C. Kan, D. L. Li, Z. J. Yu // *Acta Virol.* – 2013. – Vol. 57(4). – P. 421-8.
244. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the Head of Bacteriophage T 4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
245. Lazzeroni, M. Potential use of vaccines in the primary prevention of breast cancer in high-risk patients / M. Lazzeroni, D. Serrano // *Breast Care (Basel).* – 2012. – Vol. 7(4). – P.281-7.
246. Lim, E. J. Prevention of hepatitis C virus infection and liver cancer / E. J. Lim, J. Torresi // *Recent Results Cancer Res.* – 2014. – Vol. 193. – P. 113-33.
247. Mansouri, P. Primary cutaneous actinomycosis caused by *Actinomyces bovis* in a patient with common variable immunodeficiency / P. Mansouri, S. Farshi, A. Khosravi, Z.S. Naraghi // *J Dermatol.* – 2011. – Vol. 38(9). – P. 911-5.
248. Mandic, A. Primary prevention of cervical cancer: prophylactic human papillomavirus vaccines / A. Mandic // *J BUON.* – 2012. – Vol. 17(3). – P. 422-7.
249. Moesta, K. T. Die fremdkörperinduzierte thorakale Actinomykose als Differentialdiagnose der mediastinalen Raumforderung / K. T. Moesta, S. Totkas und P. M. Schlag // *Der Chirurg.* – 1999. Vol. 70. – No. 5. – P. 602-604.
250. Murakami, S. Immunohistochemical detection for *Actinomyces* sp. in swine tonsillar abscess and granulomatous mastitis / S. Murakami, R. Azuma, T. Koeda, H. Oomi, T. Watanabe, H. Fujiwara // *Mycopathologia.* – 1998. – Vol. 141(1). – P. 15-9.
251. Mukhopadhyay, A. Comparison of prophylactic and therapeutic immunisation with an ErbB-2 (HER2) fusion protein and immunoglobulin V-gene repertoire analysis in a transgenic mouse model of


- spontaneous breast cancer / A. Mukhopadhyay, C. Dyring , D. I. Stott // *Vaccine*. – 2013. – Vol. S0264-410X(13). – P. 01474-6.
252. Nagaraja, T. G. Liver abscesses in feild cattle: a review / T.G. Nagaraja, M.M. Chegappa // *J. Anim. Sei.* 1998. – Vol. 76. – P. 287-298.
253. Nurith, J. J. Aktinomyzeten mit fermentativem Kohlenhydratmetabolismus / Nurith J. Jakob // *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*. – 2009. – Part 1. – P. 14-18.
254. Nolte, O. Autovaccination of dairy cows to treat post partum metritis caused by *Actinomyces pyogenes* / O. Nolte, J. Morscher , H. E. Weiss , H. Sonntag // *Vaccine*. – 2001. – Vol. 19(23-24). – P. 3146-53.
255. Orhan, Y. Pulmonary Actinomycosis / Y. Orhan, K. Uner // *Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Disease*. – 2009. – Part.16. – P. 1753-1754.
256. Palma, P. Therapeutic DNA Vaccination of Vertically HIV-Infected Children: Report of the First Pediatric Randomised Trial (PEDVAC) / P. Palma, M. L. Romiti, C. Montesano, V. Santilli , N. Mora, A. Aquilani , S. Dispinseri, H. K. Tchidjou, M. Montano, L. E Eriksson, S. Baldassari, S. Bernardi, G. Scarlatti , B. Wahren, P. Rossi // *PLoS One*. – 2013. Vol. 28. – P. 8(11).
257. Poland, G. A. Guerrero / G. A. Poland, D. Murray, R. Bonilla // *BMJ*. – 2002. – № 7349. – P. 1315–19.
258. Richman, M. Intra-abdominal co-infection with *Mycobacterium bovis* and *Actinomyces* in an AIDS patient: the first reported case and review / M. Richman, A. Jeng // *J Infect*. – 2007. – Vol. 55(4). – P. 115-8.
259. Schaal, K. P. Actinomycete infection in human - a review / K. P. Schaal, H.-J. Lee // *Gene* - 1992. – Vol.115. – P.201-211.
260. Schaal, K. P. *Biology of the Actinomycetes* / K. P. Schaal // London. – 1984.– P. 425-456.
261. Schaal, K. P. Actinomycoses, actinobacillosis and related diseases, in L.Collier, A.Balows, M.Sussma (Eds.): *Topley & Wilson's Microbiology*

- and Microbial Infections, 9<sup>th</sup> Edition / W.J. Hausler, M. Sussman (Vol. Eds) // Bacterial Infections. Arnold, London-Sydney-Auckland. – 1998. – Vol.3. – P. 777-798.
262. Schaal, K. P. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology / K. P. Schaal // London. – 1986. – 9<sup>th</sup> Ed. – P. 1383-1418.
263. Singha, H. Escheriosomes entrapped DNA vaccine co-expressing Cu-Zn superoxide dismutase and IL-18 confers protection against Brucella abortus / H. Singha, A. I. Mallick, C. Jana, D. P. Isore, T. K. Goswami, S. K. Srivastava, V. A. Azevedo, P. Chaudhuri, M. Owais // Microbes Infect. – 2008. – Aug-Sep;10(10-11):1089-96. Epub 2008 Jun 17. PMID: 18602490 [PubMed - indexed for MEDLINE]
264. Takele, G. Epidemiology of infectious keratoconjunctivitis in cattle in south-east Ethiopia / G. Takele, A. Zerihun // J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. – 2000. – Vol. 47(3). – P. 169-73.
265. Treanor, J. J. Vaccination strategies for managing brucellosis in Yellowstone bison / J. J. Treanor, J. S. Johnson, R. L. Wallen, S. Cilles, P. H. Crowley, J. J. Cox, D. S. Maehr, P. J. White, G. E. Plumb // Vaccine. – 2010. – Oct 1;28 Suppl 5:F64-72. Epub 2010 Apr 1. PMID: 20362620 [PubMed - indexed for MEDLINE]
266. Tu, J. A multi-epitope vaccine based on Chlamydia trachomatis major outer membrane protein induces specific immunity in mice / J. Tu, B. Hou, B. Wang, X. Lin, W. Gong, H. Dong, S. Zhu, S. Chen, X. Xue, K. N. Zhao, L. Zhang // Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). – 2014. – [Epub ahead of print]
267. Walker, J. F. // Formaldehyde, 5 ed., N. Y. – 1964. – P. 346-364.
268. Wang, F. Deep-sequencing analysis of the mouse transcriptome response to infection with Brucella melitensis strains of differing virulence / F. Wang, S. Hu, W. Liu, Z. Qiao, Y. Gao, Z. Bu // PLoS One. – 2011;6(12):e28485. Epub 2011 Dec 28. PMID: 22216095 [PubMed - indexed for MEDLINE]

269. Wang, J. W. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies / J.W. Wang, R. B. Roden // *Expert Rev Vaccines*. – 2013. – Vol. 12(2). – P. 129-41.
270. Wengerter, B. C. Aptamer-Targeted Antigen Delivery / B. C. Wengerter, J. A. Katakowski, J. Rosenberg, C. G. Park, S. C. Almo, D. Palliser, M. Levy // *Mol Ther*. – 2014. – doi: 10.1038/mt.2014.51. [Epub ahead of print]
271. Yeung, M. K. Transfection of *Actinomyces* spp. by genomic DNA of bacteriophages from human dental plaque / M. K. Yeung, C. S. Kozelsky // *Plasmid*. – 1997. – Vol. 37(2). – P. 141-53.

## **ПРИЛОЖЕНИЯ**





**VI САРАТОВСКИЙ  
САЛОН ИЗОБРЕТЕНИЙ,  
ИННОВАЦИЙ И ИНВЕСТИЦИЙ**



**СПЕЦИАЛЬНЫЙ ПРИЗ**




Генерального спонсора  
Саратовского регионального  
филиала ОАО «Россельхозбанк»


присуждается за проект

**«Инновационные технологии  
в лечении и профилактике  
актиномикоза крупного  
рогатого скота»**

Авторы проекта  
**Богоутдинов Н.Ш., Ласкавый В.Н.**  
ГНУ «Саратовский научно-  
исследовательский ветеринарный  
институт РАСХН»



Министр  
промышленности и энергетики  
Саратовской области  
К.В. ГОРШЕНИН



Ректор  
Саратовского государственного  
аграрного университета  
имени Н.И. Вавилова  
Н.И. КУЗНЕЦОВ

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2378001

СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АКТИНОМИКОЗА  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Патентообладатель(ли): *Государственное научное учреждение  
Саратовская научно-исследовательская ветеринарная  
станция Российской академии сельскохозяйственных наук  
(RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2008145111

Приоритет изобретения 17 ноября 2008 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре  
изобретений Российской Федерации 10 января 2010 г.

Срок действия патента истекает 17 ноября 2028 г.

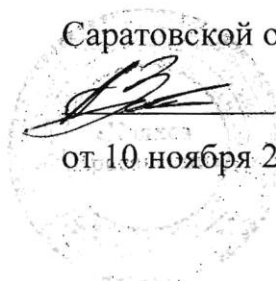
*Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной  
собственности, патентам и товарным знакам*

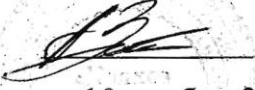


Б.П. Симонов

УТВЕРЖДАЮ:

Председатель СПК  
колхоз «Красавский»  
Лысогорского района  
Саратовской области




 Тихонов А.В.  
от 10 ноября 2010 г.

УТВЕРЖДАЮ:

Директор Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института, доктор ветеринарных наук



 Ласкавый В.Н.  
от 10 ноября 2010 г.

Акт

об эффективности примененного лечебно-профилактического средства против актиномикоза крупного рогатого скота в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области от 10 ноября 2010г.

Хозяйство неблагополучно по актиномикозу с 2008 года. Общее количество поголовья составляло 1407 голов, из которых 620 коров, 260 первотелки, 260 телок случного возраста, 250 телки старше 6 месячного возраста, 17 бычков. Из них выявлено 82 головы с апреля по октябрь 2008 года (нетели и первотелки) с актиномикозными поражениями в основном области нижней челюсти, а так же верхней челюсти и шейной части. Эти животные были подвергнуты лечению лечебно-профилактическим средством (патент №2378001). Из них 10 голов сдали на мясокомбинат в связи с сильной пораженностью. При обследовании больных животных через две недели после введения лечебного препарата установлено, что плотный актиномикозный фокус уменьшался. У многих животных опухоль размягчалась с последующим ее вскрытием и образованием фистулы. После удаления гноя наружные отверстия фистулезных ходов заживали с образованием рубца. В дальнейшем выздоровление наблюдалось у всех леченых животных. Лечебный препарат вводили в количестве 5 мл внутримышечно, трехкратно по схеме: 1, 3, 7 день, в область средней трети шеи.

Введение препарата больным актиномикозом нетелям привело к выздоровлению 87,8% животных. У 12,2% животных лечебного эффекта не регистрировалось, что может быть объяснено длительным и тяжелым течением болезни, необратимостью происшедших в организме животных патологических изменений.

Мы, нижеподписавшиеся, заместитель директора по научной работе ГНУ Саратовской НИВИ РАСХН, кандидат ветеринарных наук, доцент Панферов В.И., младший научный сотрудник НИВИ Богоутдинов Н.Ш., главный ветеринарный врач СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области Лебедев Н.В., начальник комплекса К.Р.С. этого хозяйства Рябов А.В., провели профилактическую обработку лечебно-профилактическим средством приготовленным из выделенного возбудителя *Actinomyces bovis* в ГНУ Саратовском НИВИ РАСХН против актиномикоза крупного рогатого скота (патент №2378001) в ноябре 2009 года. В ходе проведения экспериментов состав рациона и количественное соотношение кормов не менялось. Всего было обработано 736 голов, из которых 244 первотелки, 235 телок случного возраста, 242 телки старше 6 месячного возраста, 15 бычков. Препарат вводили в количестве 5 мл/гол. внутримышечно, двухкратно по схеме: 1,7 день, в область средней трети шеи. Место инъекции предварительно выстригали и обрабатывали 70° спиртом.

При осеннем обследовании в ноябре 2010 г. ни одной головы с актиномикозным поражением не выявлено. Проведенные профилактические мероприятия против актиномикоза крупного рогатого скота, основанные на двухкратном введении животным препарата из выделенного возбудителя *Actinomyces bovis*, обеспечивают 100% эффективность.

Зам. Директора по научной работе  
ГНУ Саратовской НИВИ РАСХН,

кандидат ветеринарных наук, доцент



Панферов В.И.

Младший научный сотрудник

ГНУ Саратовской НИВИ РАСХН



Богоутдинов Н.Ш.

Главный ветеринарный врач

СПК колхоз «Красавский» Лысогорского

р-на Саратовской обл.



Лебедев Н.В.

Начальник комплекса К.Р.С. хозяйства



Рябов А.В.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
САРАТОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ГНУ Саратовского НИВИ  
Россельхозакадемии  
В.Н. Ласкавый



«18» \_\_\_\_\_ 2011

МЕТОДИЧЕСКИЕ НАСТАВЛЕНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ  
ЛЕЧЕБНО – ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ИЗ  
*Actinomyces bovis* ПРОТИВ АКТИНОМИКОЗА КРУПНОГО  
РОГАТОГО СКОТА

Саратов