

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Якутский научный центр сибирского отделения
Российской Академии наук»
ЯКУТСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОГО
ХОЗЯЙСТВА ИМЕНИ М.Г. САФРОНОВА
(ЯНИИСХ)

На правах рукописи

ЭЛЬБЯДОВА ЕВДОКИЯ ИГНАТЬЕВНА

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ МЫТНОГО
СТРЕПТОКОККА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ МЫТА
ЛОШАДЕЙ**

06.02.02. - Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук,
профессор М.П. Неустроев

Якутск - 2022

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Краткая историческая справка	15
1.2 Особенности ведения коневодства и природно-климатические условия в Якутии.....	17
1.3 Морфологические, культурально-биохимические и биологические свойства возбудителя мыта лошадей	20
1.4 Течение, клинические признаки и патогенез.....	25
1.5 Эпизоотия и особенности распространения мыта лошадей	29
1.6 Диагностика и лечение мыта лошадей.....	33
1.7 Иммунитет и специфическая профилактика	40
ГЛАВА 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1 Материалы и методы исследований.....	49
2.2 Эпизоотическая обстановка по мыту лошадей в Республике Саха (Якутия)	60
2.3 Выделение и идентификация возбудителя мыта лошадей	65
2.4 Молекулярно-генетическая идентификация выделенных культур мытного стрептококка методом ПЦР.....	75
2.5 Штамм бактерий <i>Streptococcus equi</i> «Н-5/1»	78
2.6 Депонирование нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК штамма Н-5/1 в международной базе данных NCBI GenBank.....	80
2.7 Разработка технологии изготовления новой инактивированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором.....	81
2.7.1 Изучение параметров инаktivации формалином в различной концентрации	84
2.8 Доклинические испытания новой инактивированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором.....	85
2.8.1 Определение стабильности вакцины.....	85
2.8.2 Определение внешнего вида и стерильности	86
2.8.3 Определение безвредности	87

2.8.4 Изучение острой токсичности вакцины против мыта.....	87
2.8.5 Изучение пирогенности вакцины против мыта лошадей.....	89
2.8.6 Иммунобиологические свойства вакцины против мыта лошадей	91
2.9 Клинические испытания вакцины против мыта лошадей на целевых животных и экономическая эффективность	94
2.10 Разработка досье на вакцину. Утверждение в Россельхознадзоре	107
ГЛАВА 3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	124
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	125
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	126
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	148

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Табунное коневодство в Республике Саха (Якутия) является национальным достоянием, традиционным видом деятельности и одной из основных отраслей сельского хозяйства. Однако успешное развитие, восстановление поголовья, повышение продуктивности и получение продуктов высокого качества сдерживаются из-за распространения инфекционных болезней в хозяйствах. В республике одним из наиболее распространенных и наносящих существенный экономический ущерб коневодству заболеваний является мыт (особенно среди молодняка лошадей), который вызывается мытным стрептококком – *Streptococcus equi*.

Мыт лошадей имеет широкое распространение по всему миру и является причиной значительных экономических потерь и затрат в коневодстве. Так, наибольшее распространение мыт лошадей получил в Новосибирской, Иркутской областях, Красноярском и Алтайском крае (К.А. Густокашин, 2013), Республиках Тыва (Р.Б. Чысыма, 1989), Хакасия, Саха (Якутия) (М.П. Неустроев, 2000, М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, С.Г. Петрова и др., 2018) Российской Федерации, а также в Казахстане (А.Р. Сансызбаев, 1993), Монголии (Б. Баянжаргал, О.Б. Бадмаева, В.Ц. Цыдыпов, 2014), Кыргызстане (Д.Р. Раимбеков, Э.А. Джетигенов, К.А. Карыпов и др., 2016; Э.А. Джетигенов, А.Б. Бекташев, А.А. Айтбаев, 2016), Нидерландах (O.M. Khartford, T.D. Foster, A.K. Jakobs, 2002), Арабской Республике Египта (A.N.F. Nearnmat-Allah, H.M. Damaty, 2016), Кореи (J.W. Kim, J.Y. Jung, K. Lee et al., 2018), Бразилии (F. Libardoni, G. Machado, L.T. Gressler et al., 2016), Японии (K. Kasuya, N. Tanaka, F. Oshima et al., 2019), Великобритании (N.J. Parkinson, C. Robin, J.R. Newton et al., 2010).

В Республике Саха (Якутия), где развито табунное коневодство, заболеваемость молодняка лошадей мытом составляет 57,8-62,7% от общего поголовья, летальность в зависимости от развития эпизоотического процесса достигает 4,0-22,0% (М.П. Неустроев, 2000). Заболеваемость мытом в

Республике Казахстан составляет 30,1-46,7%, летальность – 16,0-28,3 % (А.Б. Бижанов, А.Р. Сансызбай, А.М. Намет и др., 1997).

Основными факторами, формирующими экономический ущерб вследствие возникновения мыта лошадей являются падеж, снижение продуктивности, а также финансовые затраты на лечебно-профилактические мероприятия.

Наиболее эффективной, малозатратной и безопасной мерой в борьбе с мытом лошадей является своевременная вакцинопрофилактика. Однако отсутствие разработанных, утвержденных или разрешенных в России вакцин против мыта способствует распространению инфекционного заболевания.

Для разработки эффективных методов и средств профилактики мыта необходимо выделить штаммы бактерий *Str. equi* с наиболее выраженными антигенными и иммуногенными свойствами.

Степень разработанности темы. Проанализированы исследования по изучению распространения, методам диагностики, лечения и профилактики мыта лошадей в Якутии, России, а также в других странах.

В современном мире разрабатываются и применяются разные виды вакцин (инактивированные, аттенуированные, живые). Вакцины, предложенные ранее из живых, ослабленных и убитых штаммов мытного стрептококка, не нашли практического применения (P.L. Bazelle, 1940, 1942, 1943). Тем не менее, ученые из разных стран мира продолжают разрабатывать вакцины против мыта лошадей, которые также не нашли широкого практического применения. Так, в Нидерландах из депонированного штамма *Str. equi* TW 928 разработана живая вакцина против мыта лошадей. Авторы этой вакцины утверждают, что ее можно применить для животных с рождения в различных формах введения (парентерально, внутримышечно, подкожно, интрадермально, орально, внутриназально) (O.M. Khartford, T.D. Foster, A.K. Jakobs, 2002). Однако вакцина не имеет регистрации в Российской Федерации. В США разработаны и применяются живая вакцина из ослабленного штамма, которая вызывает выработку антител сыворотки крови через 7-10 дней, а также модифицированная

интраназальная вакцина «Pinnacle IN» двукратного применения. Эти вакцины не применяются в России, кроме того, данные вакцины требуют двух- и трехкратное введение с интервалом в несколько недель, что тоже неудобно на практике (A.G. Boyle, J.F. Timoney, J.R. Newton et al., 2018; A.G. Boyle, C. Mitchel, D. Stefanovski et al., 2021). В Казахстане разработана инактивированная субъединичная вакцина из штамма *Str. equi* ЮС-15, вакцина «КазНИВИ» и вакцина «Акынтай» (А.Б. Бижанов, Б.Ш. Каратаев, Н.А. Мырзахметулы, 2013, 2016), которые содержат антибиотики. Однако использование антибиотиков наносит большой вред не только самому животному, но и здоровью людей, потребляющих в пищу продукты животного происхождения (П.Е. Максимова, 2020; В.В. Ерофеева, В.П. Пухлянко, 2013).

Учеными Якутского НИИ сельского хозяйства в 1996-2000 гг. разработана и внедрена в производство инактивированная вакцина против мыта лошадей с иммуномодулятором - полирибонат (М.П. Неустроев, 2000). Данная вакцина была изготовлена на основе депонированного штамма *Str. equi* Н-34. Производственные испытания показали высокую эффективность (до 95%). В настоящее время эта вакцина не производится из-за истечения срока регистрации в Российской Федерации и потерей специфических свойств штамма. Разработанные в других странах вакцины не могут использоваться в России из-за отсутствия регистрации в реестре лекарственных средств Россельхознадзора. В доступных нам работах последнего десятилетия нет данных о выделении штаммов мытного стрептококка и разработке специфических средств профилактики мыта в России.

Цель исследования: Выделить, изучить и идентифицировать по морфологическим, культуральным, биохимическим и молекулярно-генетическим свойствам новые изоляты мытного стрептококка для разработки вакцины против мыта лошадей.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи:**

1. Изучить эпизоотическую ситуацию по мыту лошадей в Республике Саха (Якутия).

2. Выделить и изучить культурально-морфологические, биохимические, молекулярно-генетические свойства изолятов мытного стрептококка.

3. Депонировать новый штамм *Str. equi*.

4. Изготовить инактивированную вакцину против мыта лошадей из депонированного штамма *Str. equi* с иммуномодулятором.

5. Провести доклинические и клинические испытания вакцины против мыта.

Научная новизна. Впервые выделен, идентифицирован и депонирован во Всероссийской государственной коллекции микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве штамм бактерий *Str. equi* «Н-5/1» (регистрационный номер ВКШМ-Б-141П от 22.05.2018 г.) (приложение А). Нуклеотидная последовательность ампликонов штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1» депонирована в международной базе данных NCBI GenBank (MW486609) (приложение Б).

Получен патент Российской Федерации на изобретение «Штамм бактерий *Str. equi* используемый для изготовления вакцины против мыта лошадей» (№ 2703485 от 17.10.2019 г.) (приложение В).

Впервые разработана методика изготовления новой инактивированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором однократного применения. В качестве иммуномодулятора использована культуральная жидкость (КЖ) штамма бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3. На основании доклинических и клинических испытаний разработана научно-техническая документация (досье) на вакцину против мыта с иммуномодулятором, которая утверждена Россельхознадзором РФ, регистрационное удостоверение №71-1-27.21-4828 №ПВР-1-27.21/03691 от 08.12.2021 г. (приложение Г).

Разработана база данных «Мыт лошадей», получено свидетельство №2018621835 от 20 ноября 2018 г. (приложение Д).

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены новые данные о морфологических, культуральных, ферментативных и молекулярно-

генетических свойствах возбудителя мыта лошадей, которые позволили идентифицировать 6 штаммов, относящиеся к семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*, виду *Streptococcus equi* 55p *equi*. Штаммы могут служить основой для дальнейших теоретических и прикладных исследований по изучению эпизоотологии, разработке диагностических и специфических препаратов борьбы и профилактики мыта лошадей.

Новый штамм мытного стрептококка - *Str. equi* «Н-5/1» - использован для разработки инактивированной вакцины против мыта лошадей.

Штамм *Str. equi* «Н-5/1», депонированный во Всероссийской коллекции микроорганизмов ФГБУ «ВГНКИ» под номером ВКШМ-Б141П, его нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК, депонированная в международной базе данных NCBI GenBank (MW 486609), а также патент на изобретение «Штамм бактерий *Streptococcus equi*, используемый для изготовления вакцины против мыта» №2703485 от 17.10.2019 г. могут быть использованы для усовершенствования средств специфической профилактики мыта лошадей.

Разработанная научно-техническая документация (досье) позволила утвердить в Россельхознадзоре препарат «Вакцина против мыта лошадей инактивированная». Регистрационное удостоверение №71-1-27.21-4828 №ПВР-1-27.21/03691 от 08.12.2021 г. (приложение Г). Инструкция по применению вакцины будет способствовать эффективной профилактике мыта лошадей в России и странах Евразии (приложение Е).

Материалы диссертационной работы вошли в методические пособия «Система ведения сельского хозяйства в РС (Я) на период 2021 – 2025 годы», Белгород, 2021 г. (утв. Ученым советом Якутского НИИСХ имени М.Г. Сафронова ФГБУН ФИЦ ЯНЦ СО РАН), предложенные для внедрения в производство (приложение Ж).

Изданы методические пособия на якутском языке «Хабарҕаһыт (мыт) ыарыыны эмтииргэ уонна сэрэтэргэ сүбэлэр» (приложение И).

Полученные результаты исследований могут быть использованы в учебном процессе, при проведении лекционных и практических занятий для студентов, магистрантов, аспирантов по курсу «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология», а также в практике ветеринарными специалистами.

Методология и методы исследований. В основе методологии проведенных исследований лежит анамнез и синтез информации по проблемам эпизоотологии, иммунитета и мер борьбы с мытом лошадей. Исследуемая информация представлена в отечественной и зарубежной научной литературе, а также получена экспериментальным путем.

Бактериологические исследования проводились, руководствуясь методическими указаниями по лабораторной диагностике мыта лошадей, утвержденными ГУВ МСХ и П РБ от 14.12.2007 (№10-2-5/1098). Таксономическую принадлежность устанавливали по «Краткому определителю бактерий Берджи» (Д.Г. Хоулт, Н. Криг, П. Смит и др., 1997), а также с использованием обучающих пособий «Диагностика стафилококкозов и стрептококкозов» (2013); «Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии» (1989).

Молекулярно-генетический анализ. При генотипировании изолятов *Streptococcus* проводили ПЦР, используя штамм-специфические праймеры Seel-F 5'-CGGATACGGTGATGTTAAAGA-3' и Seel-R: 5'-TTCCTTCCTCAAAGCCAGA-3' (амплификатор «BIO-RAD T100, США) и набор qPCRmix-HS LowROX («Evrogen», Россия).

Депонирования штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1» осуществлены во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве (ФГБУ ВГНКИ) и ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск).

Для изготовления вакцины использован штамм бактерий *Str. equi* «Н-5/1», депонированный во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве ФГБУ

«ВГНКИ» (регистрационный номер ВКШМ-Б-141П, справка о депонировании от 22 мая 2018 г.). В качестве иммуномодулятора в вакцину добавляли культуральную жидкость (КЖ) штамма бактерий *Bac. subtilis* ТНП-3, депонированного в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ (справка о депонировании от 27.12.2017 г.).

Доклинические и клинические испытания вакцины проведены согласно приказу Министерства сельского хозяйства РФ № 101 от 6 марта 2018 г. «Об утверждении правил проведения доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения» и Федеральному закону №61-ФЗ от 12.04.2010 (ред. от 02.08.2019) «Об обращении лекарственных средств».

Регистрационное досье на вакцину против мыта лошадей инаktivированной оформлено согласно приказу Министерства сельского хозяйства РФ от 10.01.2018г. № 4 «Об утверждении порядка формирования регистрационного досье на лекарственный препарат для ветеринарного применения и требований к документам в его составе и порядка представления документов, из которых формируется регистрационное досье на лекарственный препарат для ветеринарного применения в целях государственной регистрации».

Для статистической обработки данных подсчитали средние арифметические (M) и стандартные ошибки (m). Достоверность результатов выводили с использованием критерия Стьюдента.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты бактериологических и молекулярно-генетических исследований по выделению и идентификации штаммов мытного стрептококка.
2. Морфологические, культурально-биохимические, молекулярно-генетические свойства и депонирование штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1».

3. Доклинические и клинические испытания новой инактивированной вакцины против мыта лошадей. Разработка досье и утверждение в Россельхознадзоре.

Вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором в лаборатории ветеринарной биотехнологии Якутского НИИ сельского хозяйства и ООО НПЦ «Хоту - Бакт» в соответствии с календарным планом рабочей программы. Часть исследований проводили на базе Всероссийского государственного научно-контрольного института ветеринарных препаратов (г. Москва), лаборатории биотехнологии ГАУ Технопарк Якутии (г. Якутск) и ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск).

Автор лично принимал активное участие на всех этапах исследования: в выявлении проблемы, постановке задач научно-исследовательских работ, сборе и обобщении материалов, организации и проведении экспериментов и опытов на лабораторных животных и молодняке лошадей. Соискатель лично проводил молекулярно-генетические исследования по идентификации изолятов мытного стрептококка методом ПЦР, доклинические и клинические испытания вакцины против мыта.

В результате совместной работы соискателя с сотрудниками лабораторий ветеринарной биотехнологии и разработки микробных препаратов профессором, доктором ветеринарных наук Неустроевым М.П., старшим научным сотрудником, кандидатом ветеринарных наук Петровой С.Г., старшим лаборантом Поповым А.А. и профессором, доктором ветеринарных наук Тарабукиной Н.П. получены следующие результаты: депонирован во Всероссийской государственной коллекции микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве штамм бактерий *Str. equi* «Н-5/1» под номером ВКШМ-Б141П (ФГБУ «ВГНКИ»); нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма бактерий *Str. equi* Н-5/1 депонирована в международной базе данных NCBI GenBank (MW486609); получен патент на изобретение «Штамм бактерий *Str. equi* используемый для изготовления вакцины против мыта» № 2703485 от 17.10.2019 г.; получено свидетельство о регистрации базы

данных «Мыт лошадей» № 2018621835 Российской Федерации; на основе депонированного штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1» ВКШМ-Б141П, разработана технология изготовления новой инактивированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором; разработана научно-техническая документация (досье) на вакцину против мыта; инактивированная вакцина против мыта лошадей регистрационный номер № 71-1-27.21-4828 № ПВР-1-27.21/03691 от 08.12.2021 г.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждена достаточным объемом исследований с использованием общепринятых, молекулярно-генетических методов, разработкой технологии изготовления инактивированной вакцины против мыта, доклиническими и клиническими испытаниями, а также статистической обработкой цифровых данных. Чувствительность и достоверность метода ПЦР для идентификации мытного стрептококка была подтверждена исследованиями в Отделении качества и стандартизации пробиотических препаратов ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (г. Москва). Штамм бактерий *Str. equi* «Н-5/1» и вакцина против мыта успешно прошла комиссионные испытания и экспертизу в ФГБУ ВГНКИ ветеринарных препаратов.

Материалы диссертационной работы обсуждены и доложены на: заседаниях Ученого совета Якутского научно-исследовательского института сельского хозяйства им. М. Г. Сафронова (ЯНИИСХ) (2018-2020); XII Республиканской научно-практической конференции «Интеллектуальный потенциал молодежи – селу XXI века» (Якутск, 23 марта 2018 г.); международной конференции «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration (Пекин, 29-30 мая 2018 г.); международной конференции «Emerging threats for human health imoact of socioeconomic and climate change on zoonotic diseases» (Якутск, 13 августа 2018 г.); XX Международной научно-практической конференции: «Аграрная наука сельскохозяйственному производству Сибири, Казахстана, Монголии, Беларуси и Болгарии» (Улан-

Батор, Монголия, 20–21 сентября 2018 г.); Юбилейной Международной научно-практической конференции, посвященной 120-летию со дня создания ВИЭВ «Здоровье животных: Современные научные подходы, направления, тенденции» (Москва, 22 ноября 2018 г.); VII Международной научно-практической конференции «Информационные технологии, системы и приборы в АПК Агроинфо – 2018» (Новосибирск – Краснообск, 2018); Региональной научно-практической конференции «Аграрная наука: вызовы и перспективы» (Якутск, 30 ноября 2018 г.); XXII международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию образования Сибирского отделения Российской академии сельскохозяйственных наук и 70-летию Якутского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук (Якутск, 14–15 августа 2019 г.); Международной онлайн конференции «Veterinary science – sustainable cooperation» Dedicated to the 60th anniversary of the institute of veterinary medicine (Монголия, г. Улан-Батор, 18 ноября 2021 г.); III Молодежной конференции ФИЦ «ЯНЦ СО РАН», (Якутск, 17 декабря 2021 г.).

Публикации результатов исследований. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 18 научных работах, 2 из них в рецензируемых журналах, индексируемых в международной базе данных Scopus, 2 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в наукометрической базе данных Russian Science Citation Index (RSCI), а также к публикациям, приравненным рецензируемым - патент на изобретение и база данных. Изданы методические пособия на якутском языке «Хабар5аһыт (Мыт) ыарыыны эмтээһин уонна сэрэтии», утвержденные на заседании Ученого совета Якутского научно-исследовательского института сельского хозяйства им. М.Г.Сафронова (Якутск, 2019).

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации размещены на 173 страницах машинописного текста, проиллюстрированы 9 рисунками и 17 таблицами. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, собственные исследования, заключение, практические предложения, список

использованных сокращений и условных обозначений, список использованной литературы (208 источников, в том числе 76 зарубежных) и приложения.

Благодарности. Выражаю свою искреннюю благодарность и признательность научному руководителю, доктору ветеринарных наук, заслуженному деятелю науки РФ, профессору Михаилу Петровичу Неустроеву за чуткое руководство, советы и значимые замечания при проведении диссертационной работы. Также я крайне признательна доктору ветеринарных наук, профессору Надежде Петровне Тарабукиной за научную консультацию и бесценный опыт, переданный мне в процессе научных исследований. Я выражаю искреннюю благодарность старшему научному сотруднику лаборатории ветеринарной биотехнологии, кандидату ветеринарных наук Саргылане Гурьевне Петровой за ценные советы и моральную поддержку. Также хотела бы выразить искренние слова благодарности своим коллегам кандидату ветеринарных наук Светлане Ивановне Парниковой и Андриану Афанасьевичу Попову за поддержку в проведении данной работы.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Краткая историческая справка

Мыт (от лат. – *Adenitis equorum*; от англ. – *Strangles*) – острое инфекционное заболевание лошадей (преимущественно молодняка), которое характеризуется повышением температуры тела, воспалением слизистых оболочек носовой полости и носоглотки с последующим образованием абсцесса и нагноением регионарных лимфатических узлов.

Болезнь известна с давних времен. Есть сообщения о том, что данное заболевание описано еще в 1251 году в книге J. Ruffus, которая является древней рукописью, хранящейся в Государственной библиотеке Берлина (J.F. Timoney, 1993). В своей книге Giordano Ruffo (1251) описал характерные клинические признаки мыта: образование у больных животных абсцесса в лимфатических узлах глотки и шеи. Описание мыта впервые упоминается в трудах Золлейзеля, выпущенных во Франции в 1664 г. В начале XIX века Эрдели Виборг доказал, что носовое истечение больных лошадей является заразным. Однако причина болезни оставалась длительное время неизвестной и только в 1873 г. Ривольт и Д. Пас впервые обнаружили в гное больной мытом лошади микрококк. Затем в 1888 г. Шютц, Иенсен и Занд установили, что возбудителем данной инфекции является мытный стрептококк (*Str. equi*) (S.R. Harris, C. Robinson, K.F. Steward et al., 2015).

Мыт лошадей встречается практически во всех странах, однако особенно часто в зонах, где преобладает умеренный и холодный климат. Болезнь регистрировали в Австралии (J.B. Woolcock, 1975; P.L. Bazelle, 1940), США (L.J. Reile, R.M. Genetzky et al., 1983, N.L. Norcross, 1969, D. Clabough, 1985; E.F. Ebert, 1969), Канаде (C.A. Piche, 1984), Югославии (J.F. Prescott, S.K. Srivastava, R. de Gannes et al., 1982), Чехословакии (/ C. Proks, P. Sedlacek, V. Vladik, 1975, C.R. Sweeney, R.H. Whitlock, D.A. Meirs et al., 1987), Колумбии, Франции (J. Vaissaire, E. Plateau, M. Laroche et al., 1984), Ирландии (M.T. Gronin, 1952), Иране (F.N. Zadeh, F.G.A. Pour, S.M. Khajeh-Nasiri, 1992), Польше (D.

Romanowska, Z. Szyrkiewicz, 1986), Индии (M.L. Ahooja, T.S. Gulrajani, 1971), Казахстане (А.Р. Сансызбаев, 1993), Монголии (Б.Баянжаргал, О.Б. Бадмаева, В.Ц. Цыдыпов, 2014), Кыргызстане (Д.Р. Раимбеков, Э.А. Джетигенов, К.А. Карыпов и др., 2016), Нидерландах (О.М. Khartford, T.D. Foster, A.K. Jakobs, 2002), Арабской Республике Египта (A.N.F. Nearnmat-Allah, H.M. Damaty, 2016), Кореи (J.W. Kim, J.Y. Jung, K. Lee et al., 2018), Бразилии (F. Libardoni, G. Machado, L.T. Gressler et al., 2016;), Японии (K. Kasuya, N. Tanaka, F. Oshima et al., 2019) и в других странах мира.

В России данные о мыте лошадей появляются с конца XIX века. В работах В. Воронцова (1894); Г.И. Светлова (1895); И. Ковалевского (1898); А. Новикова (1902); И. Потапенко (1904); М.А. Гонтарева (1904); И. Шантыра (1903); А.Ю. Двужильного (1905); Г.Н. Габричевского (1906) размещены данные о возбудителе мыта на основе клинической картины болезни.

В различных регионах страны изучением эпизоотологической ситуации, разработкой механизмов лечения и профилактики мыта лошадей занимались Б.М. Гурвич (1929, 1932); И.Я. Садовский (1927); А.П. Панин (1937); М.С.Ганнушкин, М.Е. Аввакумов, Т.М. Заболоцкий (1943,1947); А.А. Бреус (1944); К.И. Цветков (1931, 1945); В.П. Говорухин (1945); Ф.Ф. Луцевич (1955); А.А. Третьяков (1957); И.В. Окунцов (1955, 1976); Р.С. Москалик (1970, 1971, 1974); З.Н. Чоенбаев, Ж.К. Коспаков, (1980); И.А. Бакулов (1969); П.И. Притулин (1981) и другие.

По изучению эпизоотологии, клинических проявлений, разработке мер профилактики и лечении мыта лошадей, оценке продуктов убоя при мыте лошадей за последние тридцать лет представлены работы Р.Б. Чысыма (1989); А.Р. Сансызбаева (1991, 1993); К.П. Юрова (1991); Ш.О. Токеева (1994); А.Б. Бижанова (1994, 1997, 2013, 2016); М.П. Неустроева (1993, 1994, 1995, 2000, 2001, 2003, 2006, 2021); А.Х. Байдарова (1998); А.А. Баишева (2002); И.С. Иванова (2004).

Впервые в Республике Саха (Якутия) заболевание жеребят вирусными болезнями и мытом установлено в хозяйствах Мегино-Кангаласского, Усть-

Алданского, Амгинского, Намского и Хангаласского улусов (М.П. Неустроев, 1993).

1.2 Особенности ведения коневодства и природно-климатические условия в Якутии

Республика Саха (Якутия) занимает значительную часть Восточно-Сибирского плоскогорья, лежащего между $55^{\circ}30'$ и 76° с.ш. и $105^{\circ}30'$ в.д. 3103,2 тыс. кв.км составляет общая площадь Якутии. На западе республика граничит с Красноярским краем и Иркутской областью, на юге – с Амурской областью и Забайкальским краем, на востоке – с Магаданской областью и Чукотским автономным округом.

На долю гор и плоскогорий приходится более $2/3$ поверхности Республики Саха (Якутия), $1/3$ расположена на низменности. Вилуйский, Верхневилуйский, Нюрбинский, Таттинский, Мегино-Кангаласский, Усть-Алданский, Намский и Чурапчинский улусы, значительные площади Кобяйского, Жиганского, Хангаласского, Сунтарского, Усть-Майского и Булунского улусов расположены на территории Центрально-Якутской низменности.

Также территория Якутии по геоморфологическим признакам разделяется на три крупные части: восточную, южную, западную.

Климат преимущественно резко-континентальный, отличается весьма продолжительным зимним и очень коротким летним периодами. Средняя температура в январе от $-28...-29$ до $-40...-60^{\circ}\text{C}$. Абсолютный рекордный минимум температуры достигался в Оймяконской и Верхоянской котловинах от $-64...-72^{\circ}\text{C}$. Температура в центральной части республики местами достигает до $-61...-66^{\circ}\text{C}$. 204-219 дней составляет длительность зимнего периода (со средней суточной температурой ниже 0°C в юго-западных и центральных районах), а на побережьях моря Лаптевых 255-260 дней.

В республике годовое среднее количество осадков находится в диапазоне 136-290 мм. Этим объясняется особенная сухость климата, сравнимого с климатом полупустынь. С ноября по март выпадает порядка 20-25%, а в летний

– 75-80% годовой суммы осадков. Практически вся территория Республики Саха (Якутия) находится в зоне вечной мерзлоты, глубина которой в отдаленных местах может достигать 1500 м (в верховьях реки Марха, южнее Полярного круга). Соответственно, на глубине 10-15м грунт уже имеет отрицательные температуры: на юге – 1°C, в центральных частях – -30С....-50С, на северо-востоке – -60С....-10°C. В короткий летний период в северо-западной и центральной частях Якутии глубина сезонного протаивания составляет 1-2 м, в северной части – от 0,3 до 0,8 м.

Якутию отличает разнообразие растительного мира: две трети всей площади заняты лесами, а оставшаяся часть – тундрой. Наличие посреди лесных пространств множественных островков степной и лесостепной растительности является отличительной чертой растительного мира территории. Сельскохозяйственные угодья в совокупности составляют 1 млн. 664 тыс. га, из которых пашни – 138,5 тыс., сенокосные угодья – 800 тыс., а пастбища – 725 тыс.га.

Доля естественных кормовых угодий в годовом балансе свыше 90%, из них 20% на практике не используются. Естественные луга Якутии, как правило, отличаются низкой урожайностью и бедным составом травостоя, а осоковые травы получили наибольшее распространение. Урожайность естественных лугов в среднем составляет 7,5 ц/га, причем в засушливые годы показатели урожайности гораздо ниже. Совокупность этих неблагоприятных факторов приводит к ежегодному дефициту кормов в республике, который доходит до 30%.

Перечисленные выше географические условия Республики Саха (Якутия) оказывают существенное влияние на характер климата, сельхозугодий, полезных ископаемых, особенности ведения животноводства и деятельность населения.

Из-за суровых климатических условий в Якутии можно разводить только местные породы лошадей, которые отличаются простотой содержания, выносливостью, благодаря длинной и густой шерсти. Лошадь самостоятельно

добывает себе пропитание даже в условиях суровой зимы, выкапывая отаву из-под глубокого снега.

Несмотря на исключительную выносливость якутских пород лошадей, существуют факторы, тормозящие развитие коневодства в республике. Одним из этих факторов являются инфекционные и инвазионные болезни.

45-46% своей годовой потребности в кормах лошади якутских пород удовлетворяют за счет летних пастбищных трав, а 25-35% – за счет тебеневочных кормов. Питание, размножение, в целом существование якутской лошади прямым образом зависят от природно-климатических условий, присущих календарному году. Таким образом, суровые неблагоприятные факторы оказывают негативное влияние и создают чрезвычайно тяжелые условия для существования лошадей.

В таблице 1 приведена статистика Департамента ветеринарии МСХ РС(Я) по общему поголовью лошадей. Так, в 1985 году насчитывалось 187072 голов, с 1986 года по 1993 год наблюдалось увеличение поголовья на 5643 тыс. голов. Самый высокий пик поголовья зафиксирован в 1992 году и составил 209134 голов. Самый низкий показатель численности лошадей отмечался в 2005 году - 122335 голов. С 2008 года численность лошадей в Республике Саха (Якутия) начинает стабилизироваться и в 2020 году насчитывается около 184 тыс. голов.

Таблица 1 – Динамика численности лошадей с 1985 года по 2020 год

Год	Кол-во поголовья лошадей	Год	Кол-во поголовья лошадей	Год	Кол-во поголовья лошадей	Год	Кол-во поголовья лошадей	Год	Кол-во поголовья лошадей
1985	187072	1993	201643	2001	126591	2009	151484	2017	181505
1986	196000	1994	186397	2002	128361	2010	151589	2018	184182
1987	194900	1995	167199	2003	128722	2011	156627	2019	177967
1988	189600	1996	160924	2004	128722	2012	155354	2020	183923
1989	194000	1997	143839	2005	122335	2013	151756		
1990	196570	1998	125085	2006	123065	2014	162715		
1991	199537	1999	126688	2007	125578	2015	158956		
1992	209134	2000	127609	2008	140137	2016	176649		

1.3 Морфологические, культурально-биохимические и биологические свойства возбудителя мыта лошадей

Термин «стрептококк» произошел от греческого слова "*Streptos*". Это микроорганизмы округлой или овальной формы диаметром 0,5-2 мкм. Данные микроорганизмы встречаются в мазках в виде коротких либо длинных цепочек, парами иногда в форме отдельных кокков. Размножаются путем деления на две части в дочерние клетки, которые сохраняют связь друг с другом (Н.И. Брико, А.С. Ещина, Л.А. Ряпис и др., 2002).

Согласно «Определителю Берджи» (Д.Г. Хоулт, Н. Криг, П. Смит и др., 1997), стрептококки относятся к типу Фирмикиту – *Firmicutes*, грамположительные кокки, классу *Bacilli*, подряду *Lactobacillales*, семейству *Streptococcaceae*. В свою очередь семейство *Streptococcaceae* делится на самостоятельные роды, в том числе *Streptococcus* и *Enterococcus*.

Возбудителем мыта лошадей является мытный стрептококк (*Str. equi*) – микроб кокковидной формы, который обнаруживается в гнойной жидкости, выделяющейся из носа либо в содержимом абсцесса больного животного. В среднем диаметр кокка колеблется от 0,4 до 1 мкм. Мытный стрептококк неподвижен, спор не образует, окрашивается всеми анилиновыми красками, положительно окрашивается по Граму. В анаэробных и аэробных условиях на простых питательных средах (МПА, МПБ) с глюкозой и стерильной сывороткой крови лошади растет хорошо, на кровяном агаре образует β – гемолиз (И.А. Бакулов, 1969; Р.С. Москалик, 1971; М.Р. Starr, J.M. Schmidt, 1981; Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин и др., 2007).

Мытный стрептококк относится к роду *Streptococcus*. В ранний исследовательский период в род *Streptococcus* относились пиогенные стрептококки, энтерококки и молочнокислые стрептококки. В настоящее время они разделены на отдельные роды: *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Lactococcus* (D.H. Bergey, 1986).

Стрептококки в реакции преципитации (РП) по системе R.C. Lancefield (1933) подразделяют на серологические группы, обозначенные заглавными

буквами латинского алфавита. В настоящее время, согласно классификации, базирующейся на антигенной структуре, существует более 20 серологических групп. Известно, что мытный стрептококк относится к серологической группе С (Р.С. Москалик, 1971).

В настоящее время по систематике «The Taxonomicon and Systema Naturae 2000» известны три подвида *Streptococcus equi*: *Str. equi subsp. Equi*; *Str. equi subsp. Zooepidemicus* и *Str. equi subsp. Ruminantium*. Из них возбудителем, который поражает дыхательный путь жеребят является *Str. equi subsp. Equi*. Однако, имеются доказательства того, что подвид *Str. equi subsp. Equi* произошел от подвида *Str. equi subsp. Zooepidemicus* и последний, в свою очередь, тоже может выделяться от клинически больных мытом лошадях (С.Р. Sweeney, J.F. Timoney, J.R. Newton et al., 2005; Э.М. Мешев, Х.К. Амшонов, 2013).

Подвид *Zooepidemicus* можно выделить от различных видов животных (свиньи, крупный рогатый скот, собаки, кролики), птиц и даже от человека (С.Р. Sweeney, J.F. Timoney, J.R. Newton et al., 2005; J.F. Timoney, 2004; S. Pelkonen, S. Lindahl, P. Suomala et al., 2013). Как отмечает S. Lindahl (2013), подвид *Zooepidemicus* часто выделяется у молодняка лошадей с клиническими признаками поражения верхних дыхательных путей. Зарубежными исследователями установлено что, *Str. equi zooepidemicus* может вызывать артриты у козлят (A.G. Boyle, D. Stefanovski, S.C. Rankin, 2017).

Подвид *Ruminantium* впервые был выделен у больных маститом овец и коз. Сравнительные секвенирования гена 16S рРНК подтвердили, что этот подвид является представителем рода *Streptococcus*. Далее авторы этого исследования установили родство выделенного подвида с типовыми характеристиками штамма *S. equi subsp. equi* (сходство 98,8%) и *S. equi subsp. Zooepidemicus* (сходство 70%) (E. Fernandez, V. Blume, P. Garrido et al., 2004).

Заболевание, вызванное *Str. equi subsp. Equi*, характеризуется лихорадкой, слизисто-гнойным выделением из носа и образованием абсцессов в регионарных лимфоузлах. Мытный стрептококк может быть выделен и у клинически

здоровых лошадей (М.П. Неустроев, 2000; F. Libardoni, G. Machado, L.T. Gressler et al., 2016).

Эпидемиологическая значимость мытного стрептококка среди населения до сих пор не изучена. Роль мышевидных грызунов в распространении возбудителя мыта не установлена. Между тем, для бактериологической диагностики и изучения вирулентности мытного стрептококка как модель используются белые мыши. Установление высокой выживаемости в почве и навозе мытного стрептококка требует проведения общих и специфических мер борьбы (М.П. Неустроев, 2000).

Мытный стрептококк на 0,2% МПА при 4° С сохраняется в течение 210 суток, в воде при 18-20°С - 21 день, 4°С – 35 и 8°С – 60 дней (Р.С. Москалик, 1971). При температуре от нуля и ниже мытный стрептококк консервируется, не теряя свои патогенные свойства (А.И. Протасов, А.Д. Ледяев, 1952). В обычном МПА и МПБ с добавлением глюкозы и сыворотки при температуре 4-5°С выживает в течение 30-35 суток. В лиофилизированном виде мытный стрептококк сохраняется до одного года (Н.И. Розанов, 1952; Н.М Щелкунова, 1980). А.Р. Сансызбаев (1993) рекомендует использовать при процессе лиофилизации питательные среды, содержащие 10% раствор сахарозы, 0,5% раствор желатина и 10% сыворотки крови лошади.

Образование длинных извитых цепочек в исследуемых мазках из гноя, а также поперечно-овальное расположение кокков в виде «частокола» являются характерной особенностью данного стрептококка (первичная микроскопия). Возбудитель имеет вид длинной цепочки в мазках из бульонной культуры, из агаровых культур цепочки обычно короткие.

М.М. Сыртланов, И.В. Окунцов, Б.И. Казанин (1975) обнаружили у мытного стрептококка капсулу, которую напрямую связывают с его вирулентностью и иммуногенностью. Биохимическая активность при этом выражена слабо. Не ферментирует лактозу, сорбит, маннит. Именно данными свойствами он отличается от других стрептококковых групп. Молоко не свертывает, лакмусовое молоко не изменяет, на среде с 40% желчи и 6,5% натрия

хлорида не растет. Между тем, мытный стрептококк меняет свои отличительные признаки при частых пересевах на простые питательные среды и последующем длительном хранении в искусственных питательных средах (К.И. Цветков, 1931; Б.М. Гурвич, 1932; П.К. Полищук, 1951; Р.С. Москалик, 1971, 1974; З.Н. Чоенбаев, 1991).

Согласно данным, культуральные, биохимические и патогенные свойства мытного стрептококка возможно восстановить, если осуществить их пересев на сывороточные и кровяные питательные среды (Р.С. Москалик, 1971; Н.М. Щелкунова, 1980; А.Р. Сансызбаев, 1993).

Мытный стрептококк довольно устойчив к различным воздействиям: нагревание при 70-75⁰С убивает его через 1 час, кипячение – мгновенно, солнечный свет – через 6-8 часов. В помещениях с земляным полом (на глубине 10-15 см) сохраняется до 9 месяцев, в сухом гное - не менее года. Период сохранности непосредственно в навозе составляет до четырех недель, на волосах лошади, сене и соломе— до 22 дней. В 10%-ном сывороточном МПБ при 37⁰С микроорганизм выживает в течение 5 дней, а при 4⁰С – до 31 дня; в воде – 6 и 35 дней, а во льду – 60-80 дней. На 0,2%-ном МПА стрептококк погибает при полном подсыхании среды через 250 дней. Однако лиофильно-высушенные культуры стрептококка сохраняются жизнеспособными несколько лет (М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, 1995; Н.И. Розанов, 1952; Н.М. Щелкунова, 1980; А.Р. Сансызбаев, 1993).

В ходе многочисленных опытов сотрудниками Якутского НИИ сельского хозяйства изучена циркуляция возбудителя мыта в популяции якутских лошадей. Авторы установили, что штамм мытного стрептококка, выделенный от жеребят якутской породы в зимне-весенний период в условиях Крайнего Севера, сохраняет жизнеспособность и патогенность не более 120 дней. Обсемененные мытным стрептококком во время массового заболевания почва, навоз, сено и зерно могут быть факторами распространения возбудителя довольно длительное время (М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, 1995, М.П. Неустроев, 2000).

По литературным данным, возбудитель мыта лошадей чувствителен к дезинфицирующим препаратам. Практическими испытаниями доказано, что во внешней среде 5%-ные растворы креолина, едкого натра, карболовой кислоты, 2%-ные растворы хлорно-известкового молока и формалина, серная кислота в соотношении 1:150 обезвреживают мытный стрептококк через 15-20 минут (К.И. Цветков, 1931; Г.С. Рябова, 1956; И.А. Бакулов, 1969; Р.С. Москалик, Р.Ф. Сосов, 1970).

В условиях Крайнего Севера разработаны специальные методы дезинфекции при мыте лошадей. Так, Н.П. Тарабукина и М.П. Неустроев (2000) установили, что в условиях Якутии при очищении объектов внешней среды от условно-патогенных и патогенных микроорганизмов основную решающую роль играют аэробные спорообразующие почвенные бактерии. Исходя из этого авторы проводили опыты по разработке режимов санации мерзлотных почв. По результатам проведенных работ было установлено, что при внесении суспензии *Bacillus subtilis* ТНП-3, на 48-й день от начала опыта происходит санация обсемененной мытным стрептококком почвы. Следовательно, при внесении штамма бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3, срок естественной санации почвы, загрязненной мытным стрептококком, существенно ускоряется. Также для обеззараживания поверхностей из дерева (изгороди, инвентарь и др.), загрязненных мытным стрептококком, авторами рекомендуется применять на практике аэрозоли 2%-ного раствора НУК (расход 200 мл/м²), 3%-ный раствор КГН «А» (расход 1 л/м²), 4%-ный при расходе 0,5 л/м² поверхности. В зимних условиях авторы предлагают обрабатывать 4%-ным раствором КГН «А» с добавлением антифриза (10% NaCl), а также надуксусную кислоту при аналогичных режимах.

Э.М. Мешев, Х.К. Амшонов (2013) установили биоцидность сополимера диалилдиметиламмонийхлорида с диалилгуанидинацетатом в отношении *Str. equi subsp. Zooepidemicus*, который был выделен от больной лошади. Отмечается, что сополимер диалилдиметиламмонийхлорида с диалилгуанидинацетатом нарушает целостность клеточной стенки возбудителя и приводит к изменению

ее формы, далее к нарушению проницаемости и разрыву. А также вместе с этим испытан диалилгуанинацетат, который тоже оказывает влияние на культуральные, биохимические и патогенно-вирулентные свойства, однако при этом не вызывает их гибели.

Из перечисленного необходимо сделать вывод о том, что возбудитель мыта лошадей достаточно долго сохраняется во внешней среде и устойчив к дезинфицирующим средствам. Обсемененные объекты могут длительное время служить факторами передачи инфекции и обуславливать периодичность эпизоотии. Следует отметить, что большинство дезинфицирующих средств и методы санации объектов разработаны для применения в более теплых условиях внешней среды. И некоторые дезинфицирующие средства малоэффективны в условиях Крайнего Севера.

Впервые в условиях Крайнего Севера М.П. Неустроевым и др. (2000) выделен, идентифицирован и депонирован во ВГНКИ штамм бактерий *Str. equi* Н-34. Изучены морфологические, культурально-биохимические свойства возбудителя мыта. Для идентификации *Str. equi* предложена диагностическая сыворотка в реакции преципитации. Штамм *Str. equi* Н-34 был включен в состав инактивированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором – полирибонат, а также применен для усовершенствования диагностики мыта и дифференциации стрептококкозов животных. Авторами были изучены эпизоотология, методы профилактики и лечения, выживаемость во внешней среде возбудителя мыта лошадей, циркулирующего в популяции якутских лошадей, предложены режимы дезинфекции объектов внешней среды и методы обеззараживания навоза. Однако штамм бактерий *Str. equi* Н-34 снят из депонирования. Таким образом, данного штамма в настоящее время нет.

1.4 Течение, клинические признаки и патогенез

Течение и клинические признаки. Согласно опубликованным в научной литературе данным, инкубационный период при мыте лошадей, как правило,

продолжается от 4 до 15 дней, а при резком ослаблении резистентности организма инкубационный период сокращается до 1-2 дней.

Мыт лошадей проявляется типично со всеми характерными для этой болезни признаками и атипично: абортивно (легко) и метастатически (тяжелое течение болезни).

Лихорадка (до 40-41°C), угнетенное состояние, потеря аппетита, гиперемия конъюнктивы являются характерными признаками типичной формы проявления мыта. Далее следует острое воспаление слизистой оболочки полости носа и носоглотки. Вначале из носовой полости выделяются катаральные, потом серозно-гнойные выделения, учащается дыхание и пульс. При вовлечении в процесс глотки и гортани появляется болезненный судорожный кашель. Кроме того при типичном течении болезни увеличиваются подчелюстные лимфатические узлы, изменяется форма (дольчатое строение исчезает) и повышается местная температура тела на местах образования припухлости. Со временем и развитием заболевания плотная припухлость стремительно увеличивается и занимает все подчелюстное пространство. Затруднен прием корма, при этом больные животные голову держат в вытянутом положении. Воспалительный отек становится менее напряженным и к 4–5-му дню болезни, появляется местами флюктуация. Волосы в пораженных местах выпадают, абсцесс созревает и вскрывается, из него обильно вытекает сливкообразный гной. После этого общее состояние животного улучшается, температура снижается до нормального уровня, воспалительный процесс прекращается. Животное выздоравливает через 15-25 дней. (Р.С. Москалик, Р.Ф. Сосов, 1970).

При абортивной (легкой) форме незначительно увеличиваются подчелюстные лимфатические узлы, наблюдается небольшое слизисто-гнойное истечение из носовой полости. Болезнь обычно быстро заканчивается выздоровлением животного.

При метастатической (осложненной) форме мыта характерно выявление образования абсцессов в околоушных, плечевых и коленных, реже в лимфатических узлах грудной и брюшной полостей, а также на

паренхиматозных органах. Может диагностироваться гнойная бронхопневмония и перитонит. Метастатическая форма развивается при плохих условиях содержания больных жеребят и при несвоевременном проведении лечебных мероприятий. Такое течение болезни может привести к летальному исходу. Из литературных данных известно, что мыт лошадей протекает и в хронической форме, при случае осложнения которой также возможен падеж (C.R. Sweeney, J.F. Timoney, J.R. Newton et al., 2005; J.F. Timoney, 2004; D.J. Harrington, I.C. Sutcliffe, N. Chanter, 2002).

Мыт лошадей может осложняться вторичной вирусной (грипп, ринопневмония) и бактериальной (сальмонеллез лошадей) инфекциями (М.П. Неустроев, 1993). При таком течении падеж молодняка может достичь 10-22,2% от числа заболевших.

Впервые в республике заболевание жеребят вирусными болезнями и мытом установлено в хозяйствах Мегино-Кангаласского, Усть-Алданского, Амгинского, Намского и Хангаласского улусов (М.П. Неустроев, 1993).

Патогенез. Попад на слизистую оболочку носоглотки стрептококки вызывают воспаление, в результате чего происходит выделение слизисто-серозного, а затем гнойного экссудата. В последующем возбудитель по лимфатическим путям достаточно оперативно заносится в подчелюстные лимфаузлы, образуя воспалительные отеки и гнойные очаги. Из литературных данных известно, что подчелюстные лимфатические узлы и миндалины являются естественными барьерами, которые блокируют распространение возбудителя мыта лошадей по всему организму. В данных частях организма животного образуется и развивается воспалительный процесс локального характера, в целом защищающий организм от возбудителя мыта. Есть сообщения о том, что через пару часов после проникновения в организм *Str. equi* с трудом обнаруживается на поверхности слизистой оболочки, так как возбудитель перемещается к подчелюстным лимфатическим узлам (J.F. Timoney, P. Kumar, 2008). Между тем, некоторые противоречивые исследования доказывают, что возбудитель мыта сохраняется в носовой полости в течение нескольких недель и

их можно обнаружить в выделениях из носа через 24-48 часов от начала заражения (C.R. Sweeney, J.F. Timoney, J.R. Newton et al., 2005; J.F. Timoney, 1993, 2004).

Если организм с высокой резистентностью и ярко выраженной чувствительностью, при этом микробы слабовирулентные, то процесс абсцедирования в лимфоузлах не проявляется. Организм затрачивает нервную и биохимическую энергии по минимуму, но при этом запускает в ход ликвидирующие возбудителя защитные механизмы — фагоциты и антитела. Следовательно, болезнь типично не развивается, а животное в скором времени выздоравливает (абортивная форма мыта). Если возбудитель отличается высокой патогенностью, а организм со слабой резистентностью (в организме сравнительно медленно повышается специфическая чувствительность по отношению к возбудителю), то воспалительный процесс в подчелюстных лимфатических узлах приобретает более выраженный характер, поскольку в этом случае фагоциты не способны вначале уничтожить стрептококков. По мере появления специфических антител осуществляется завершённый фагоцитоз. Вследствие расплавления ткани лимфатических узлов гнойные фокусы в большом количестве сливаются в один абсцесс. Обмен веществ в поражённом организме нарушает всасывание токсинов бактерий и продуктов распада тканей из очага воспаления, что, в свою очередь, обуславливает нарушение в работе сердца, появление лихорадки и угнетения. Между тем вокруг абсцесса образуется демаркационная ткань, не позволяющая проникать возбудителю за пределы полости. Интоксикация организма прекращается лишь после вскрытия абсцессов, после чего происходит выздоровление. Если речь идет об организме животного с пониженной резистентностью, то тогда удержание стрептококков в абсцессе подчелюстных лимфатических узлов не происходит. Возбудитель в подобном варианте резистентности заносится по лимфатическим путям в отдаленные лимфоузлы, а в дальнейшем, попадая в кровь, становится причиной метастатических абсцессов уже во внутренних органах. Возникает септикопиемия, которая, как правило, становится причиной летального исхода.

(Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин и др., 2007; D.J. Harrington, I.C. Sutcliffe, N. Chanter, 2002).

1.5 Эпизоотия и особенности распространения мыта лошадей

Мыт лошадей имеет широкое распространение по всему миру и является причиной значительных экономических потерь и затрат в коневодстве. В Российской Федерации наибольшее распространение мыта отмечается в следующих регионах: Новосибирской и Иркутской областях, Красноярском и Алтайском краях (К.А. Густокашин, 2013), Республиках Тыва (Р.Б.Чысыма, 1989), Саха (Якутия) (М.П. Неустроев, 2000).

За рубежом мыт распространен в Казахстане (А.Р. Сансызбаев, 1993), Монголии (Б. Баянжаргал, О.Б. Бадмаева, В.Ц. Цыдыпов, 2014), Кыргызстане (Д.Р. Раимбеков Э.А. Джетигенов, К.А. Карыпов и др., 2016; Э.А. Джетигенов, А.Б. Бекташев, А.А. Айтбаев, 2016), Нидерландах (О.О.М. Khartford, Т.Д. Foster, А.К. Jakobs, 2002), Арабской Республике Египта (А.Н.Ф. Nearmat-Allah, Н.М. Damaty, 2016), Кореи (J.W. Kim, J.Y. Jung, K. Lee et al., 2018), Бразилии (F. Libardoni, G. Machado, L.T. Gressler et al., 2016), Японии (К. Kasuya, N. Tanaka, F. Oshima et al., 2019), Великобритании (N.J. Parkinson, C. Robin, J.R. Newton et al., 2010) и другие.

В настоящее время мыт лошадей приобретает эпизоотическое распространение и является существенной проблемой коневодства в странах СНГ и Монголии.

В Алтайском крае, где насчитывается значительное количество лошадей, К.А. Густокашиным (2013) проведен эпизоотологический мониторинг мыта лошадей в 1964-2011 гг. Пик болезни автор фиксирует с 1969 по 1972 гг.

Д.Р. Раимбеков, Э.А. Джетигенов, К.А. Карыпов и др. (2016) отмечают, что заболеваемость мытом лошадей в Республике Кыргызстан с каждым годом увеличивается не только среди жеребят, но и среди взрослых лошадей. При этом установлена циркуляция двух подвидов *Str. equi* в коневодческих хозяйствах Республики Кыргызстан: *Str. equi subsp. Equi*, который является основным

возбудителем мыта лошадей и *Str. equi subsp. Zooepidemicus*, который, по мнению некоторых зарубежных авторов, является возбудителем, способным вызывать аборт, эндометриты, маститы у кобыл и пневмонии у разных видов животных.

Мыт занимает наибольший высокий удельный вес в общей структуре инфекционной патологии животных в Монголии ($13,67 \pm 1,7\%$) за исследуемый (2003-2012 гг.) период. Авторы связывают распространение инфекции и повышение уровня заболеваемости со снижением иммунной резистентности организма животных и приготовлением кумыса, вследствие чего молодняк недополучает достаточное количество молока от матери (Б. Баянжаргал, О.Б. Бадмаева, В.Ц. Цыдыпов, 2014; О.Б. Бадмаева, Б. Баянжаргал, В.Ц. Цыдыпов, 2017).

По литературным данным мытом болеют ослы, мулы и лошади, то есть только однокопытные животные. Наиболее восприимчивы к данному заболеванию жеребята (старше 2 месяцев) и молодые лошади (до 5 лет). В то же время наблюдались заболевания лошадей в возрасте 15-20 лет во время отдельных эпизоотий (М.С. Ганнушкин, М.Е. Аввакумов, 1943).

Молодняк заболевает преимущественно в период отъема от материнского молока. Таким образом, известны случаи заболевания как жеребят месячного и даже 10-дневного возраста, так и взрослых 23-26-летних лошадей (В.М. Ибрагимов, 1954; Р.С. Москалик, 1971).

Симптомы и тяжесть болезни часто связывают с иммунным статусом организма и возрастом животного. По результатам многочисленных исследований и наблюдений С.Р. Sweeney, J.F. Timoney, J.R. Newton et al. (2005) отмечено, что молодняк переболевает более тяжелой формой, чем взрослое поголовье.

Ш.Т. Дамдамаев и М.М. Сантуев (1958) описали эпизоотию мыта среди ослов. Известны случаи заболевания жеребят с первых дней жизни и в возрасте 1-3 месяцев (Ю.В. Власов, 1948; И.В. Окунцов, 1955; В.С. Федосеев,

Н.А. Уразаев, И.Л. Жалобовский, 1971; Ж.А. Атачкин, 1974; L. Jurkovic, 1981; С.А. Piche, 1984).

По данным зарубежных авторов, выздоревшие от мыта животные могут быть носителями и переносчиками данной инфекции долгое время, без проявления клинических признаков (S.R. Harris, C. Robinson, K.F. Steward et al., 2015; J.R. Newton, J.L. Wood, K.A. Dunn et al., 1997; K. Verheyen, J.R. Newton, N.C. Talbot et al., 2000).

По литературным данным лошади тяжеловесных пород переболевают мытом тяжелее, чем представители легковесных пород (Г.В. Олейник, 1945; В. Петров 1952). Кроме того, имеются данные о возможности заражения жеребят от матерей, больных маститами мытной этиологии (И.В. Поддубский, 1938). В своих исследованиях Э.П. Брагина (1979) выделила возбудитель мыта у кобылиц, больных мытом. Заболеваемость жеребят 2-3-месячного возраста может быть связана с внутриутробным заражением или передачей возбудителя от матерей вместе с молозивом (М.П. Неустроев, 2000). Отмечены случаи внутриутробного заражения, после которых были случаи аборт у кобыл (З.Н. Чоенбаев, 1991; D. Romanowska et.al., 1986).

По сообщениям зарубежных авторов L.J. Reile, R.M. Genetzhy (1983) лошади могут заразиться мытом через поврежденные слизистые оболочки носового прохода и ротовой полости, а также глотки и носоглотки. Кроме того не исключается проникновение мытного стрептококка через половые органы во время случки и кишечника (Ф.Гутира, И.Марек, 1931; D.Kust, F.Schaetz, 1983; С.А.Piche, 1984).

Основным источником возбудителя болезни служат больные животные. Последние, выделяя мытный стрептококк из абсцессов лимфатических узлов, а также из носовой полости при кашле и фыркании, инфицируют корм, воду, подстилку, кормушки и другие окружающие предметы, которые в дальнейшем становятся факторами передачи мытного стрептококка восприимчивым животным (A.S. Waller, K.A. Jolley, 2007; C.R. Sweeney, J.F. Timoney, J.R. Newton et al., 2005).

Стационарность и сезонность являются характерными особенностями мыта лошадей в субъектах РФ, странах СНГ и Монголии. Вспышки заболевания в отдельных хозяйствах могут быть выявлены 2-3 раза в течение одного года. Однако, максимальное количество заболевших жеребят отмечается в ноябре-декабре (Р.С. Москалик, 1971; Р.Б. Чысыма, 1989; Б.К. Алиев, 1976; А.Р. Сансызбаев, 1993).

По данным А.А. Баишева и М.П. Неустроева (2002) в ноябре-декабре в Якутии мытом болеет до 70% жеребят. В республике отъем жеребят от матерей по принятой технологии ведения коневодства проводится поздней осенью: в конце октября-начале ноября. В отмеченный период взрослые лошади (мытоносители) служат основным источником заражения жеребят.

М.П. Неустроев (1996) указывает, что ослабление естественной резистентности организма в условиях неблагоприятных факторов окружающей среды (резко-континентальный климат) как раз и способствует возникновению мыта лошадей. Это такие факторы, как неполноценное белково-витаминно-минеральное питание, резкие колебания температуры воздуха, несвоевременная подкормка, длительные перегоны табунов. Поэтому в условиях Якутии мыт имеет ярко выраженный сезонный характер и периодичность (через 2-3 года). Стационарность мыта лошадей также отмечает Р.Б. Чысыма (1989).

Заболеваемость мытом лошадей достигает пика в ноябре, это объясняется тем, что по принятой технологии ведения коневодства отъем жеребят от матерей проводится в октябре-ноябре - месяцах, когда суровые погодные условия способствуют снижению резистентности организма жеребят. Кроме того, большое скопление поголовья лошадей разных возрастов в момент отъема, среди которых имеются носители инфекции, приводит к пассированию возбудителя мыта из организма в организм, вследствие чего он становится более вирулентным. Не исключается передача возбудителя через корм, почву и инвентарь (М.П. Неустроев, 2000).

1.6 Диагностика и лечение мыта лошадей

Мыт диагностируется на основании эпизоотических данных, клинических признаков и лабораторных исследований.

Для подтверждения диагноза на мыт в лабораторию направляют содержимое абсцесса лимфатических узлов головы, взятых путем пункции или смывы из носовых истечений. От павших животных направляют пораженные лимфатические узлы, гной из абсцессов, смывы из носовых истечений, кровь из сердца, части легких, печени и селезенки.

Лабораторные исследования проводятся согласно утвержденным ГУВ МСХ и П РБ 14.12.2007 (№10-2-5/1098) методическим указаниям по лабораторной диагностике мыта, включающим микроскопические, бактериологические, биологические и биохимические исследования.

Клинические признаки мыта в начале заболевания могут вызвать подозрение на сап, ринопневмонию, грипп, фарингит, ринит и бронхопневмонию.

При сапе происходит поражение слизистой оболочки носовой полости, на носовой перегородке появляются язвы и рубцы; подчелюстные лимфатические узлы холодные, неподвижные и бугристые. В этом случае диагноз уточняют на основании отрицательных показателей глазной маллеинизации и РСК. Глазная аллергическая проба с маллеином выявляет сап как при активном, так и при скрытом его течении, а РСК дополняет показания аллергических реакций и выявляет случаи обострения болезни.

Грипп и ринопневмонию исключают путем вирусологических исследований, которые направлены на ретроспективное выявление специфических антител к вирусу в крови больных животных в серологических реакциях (РТГА, РСК, РН) (И.А. Бакулов, 1969; Б. Яримпил, Г.А. Юдин, 1971; Р.С. Москалик, 1974; Н.Н. Крюков, 1976; К.П. Юров, 1972, 1976, 1980).

Гнойный фарингит и ринит протекают без поражения подчелюстных лимфатических узлов спорадически.

В настоящее время наиболее часто используемым серологическим методом дифференциации стрептококков является реакция, предложенная R.C.Lancefield (1933) с группоспецифическими сыворотками и полисахаридным антигеном, приготовленным из испытуемых культур. Стрептококки в реакции преципитации (РП) в строгом соответствии с его антигенными вариантами по системе Lancefield разделяются на независимые серологические группы, обозначенные заглавными буквами латинского алфавита. Следуя данной классификации, мытный стрептококк внесен в серологическую группу С (Р.С. Москалик, 1971). В группу С вместе с *Str. equi* включены также возбудители мастита животных, полиартритов ягнят, стрептококкозы свиней (*Str. Zooepidemicus*, *Str. equisimilis*), стрептококкозы нутрий и кур (А.Н. Панин, 1983, 1986; А.А. Конопаткин, В.А. Есепенок, М.Р. Вашакидзе, 1989; S.T. Grant, A. Efstration, N. Chanter, 1993).

Э.П. Брагина (1979), А.Н. Панин и др. (1981,1992), В.К. Астафьева, Е.П. Цветков (1985), А.А. Конопаткин, В.А. Есепенок, М.Р. Вашакидзе (1989) предложили усовершенствованные методы получения диагностических сывороток и выделения антигенов для определения групповой принадлежности стрептококков. В настоящее время разработаны наставления по применению стрептококковых диагностических сывороток для идентификации в реакции кольцепреципитации культур, выделяемых от животных (А.Н. Панин, 1983).

Р.С. Москалик (1971) утверждает, что идентификацию и дифференциацию мытного стрептококка можно провести, используя только одну среду - 5% кровяной МПА. На этой среде *Str. equi* образует капсулу, крупные, слизистые и сливающие колонии, вызывает бета-гемолиз. З.Н. Чоенбаев (1991) предложил модифицированный метод бактериологической диагностики, который предусматривает посев гноя либо смывов из носовой полости в МПБ обогащенной 25% сывороткой крови лошади и последующим пересевом в МПБ с 10% сыворотки. Для постановки диагноза мыт и изучения гуморального иммунного ответа возможно воспользоваться реакцией связывания комплемента (Я.Е.Коляков, 1965; А.А. Бреус, 1944).

Для наиболее четкой идентификации каталазоотрицательных грамположительных кокков фирма «ПЛИВА-Лахема» выпускает апробированные тест-системы: Энкоккустест (идентификация энтерококков) и Стрептотест 16 (идентификация стрептококков). А при дифференциации данных микроорганизмов используется «Пиратест», который у большинства клинически значимых энтерококков показывает положительный результат (по стрептококкам тест положителен лишь у *Str. pyogenes*).

Для проведения биологического исследования с целью определения патогенных свойств культур стрептококков, а также для их полноценного выделения из контаминированного материала используют трех белых мышей (масса тела каждой особи 14-16 г). Мышей заражают свежевыделенными суточными бульонными культурами стрептококков. Культура в объеме 0,5 мл вводится внутрибрюшинно. Наблюдения непрерывно ведутся в течение 5 суток, в случае заражения патогенной культурой мыши погибают в течение 1-2 суток. Гибель хотя бы одной мышки оценивается как положительный результат.

На следующем этапе из органов павших белых мышей готовят мазки и окрашивают их по Грамму, затем микроскопируют. Одновременно из паренхиматозных органов мышей проводятся посевы на глюкозо-кровяной агар и глюкозо-сывороточный бульон.

Следуя методическим указаниям по лабораторной диагностике стрептококкозов при диагностике мыта из исследуемых биологических материалов (гной, истечение из носовой полости, суспензия из лимфатических узлов и органов) рекомендовано заражать подкожно двух белых мышей массой тела 12-15 г. в дозе 0,1 мл (гной) или 0,5 мл (суспензия тканей) в область спины. Для выявления характеристик патогенности чистой культуры делают инъекцию таким же способом в объеме 0,1 мл. Непрерывное наблюдение за животными ведется на протяжении 10 дней, гибель в положительных случаях происходит на 2-7 сутки.

В начальной стадии заболевания, когда клиническими признаками являются острый катар носа или глотки, отсутствие нагноения лимфатических

узлов, ставить диагноз затруднительно. В таких случаях необходимо учитывать одновременное заболевание других лошадей с характерными симптомами мыта.

Диагноз на мыт достигается полноценным бактериологическим исследованием, а именно обнаружением мытного стрептококка в гное лимфатических узлов. Необходимо с осторожностью относиться к обнаружению стрептококка в носовом истечении, поскольку его можно находить и у здоровых лошадей. Для этого мазки окрашивают по Граму или Романовскому-Гимзе. Возбудитель мыта располагается в форме длинных цепочек в мазках из гноя, одиночно, попарно, иногда короткими цепочками – в мазках из крови сердца и органов.

Посевы из исходного материала делают в МПБ и на МПА, обогащенные 10% сывороткой крови лошади и 1% глюкозой. Инкубируют в термостате в течение 18-24 ч. При росте возбудителя мыта МПБ мутнеет, в нем появляются пушистые, нежные хлопья, которые в дальнейшем оседают на дно пробирки, а на агаре мытный стрептококк образует мелкие росинчатые, слизистые колонии, на кровяном агаре дает β -гемолиз. Из выросших культур готовят мазки. Их фиксируют над пламенем спиртовки и окрашивают по методу Грама, Романовскому-Гимзе, Ольту и др. В мазках из суточных бульонных культур стрептококки располагаются в виде длинных нитей, что характерно мытному стрептококку, а в мазках, сделанных из агаровых культур, стрептококки лежат короткими цепочками, иногда попарно или одиночно.

Биологические и серологические методы исследования дают достаточную возможность поставить дифференциальный диагноз.

В последние годы с развитием молекулярно-генетических исследований есть сообщения о выделении и идентификации мытного стрептококка полимеразной цепной реакцией (ПЦР) на основе видоспецифичных генов, потенциально участвующих в формировании вирулентного фенотипа мытного стрептококка, в частности *Str. equi subsp. Equi* (C.R. Sweeney, J.F. Timoney, J.R. Newton et al., 2005; K.Webb, C.Barker, T.Harrison et al., 2013; G. Cordoni, A. Williams, A. Duram et al., 2015; A.G. Boyle, S.C. Rankin, L. Duffee et al., 2016; A.G.

Boyle, D. Stefanovski, S.C. Rankin, 2017; S. Lindahl, 2013; J. Pringle, E. Storm, A. Waller et al., 2020; K. Kasuya, N. Tanaka, F. Oshima et al., 2019; A.R.L. Charbonneau, E. Taylor, C.J. Mitchell et al., 2020; С.Г. Ботанина, М.А. Тренина, Ю.Д. Цыганков и др., 2007) и другие.

Раннее выявление больных, своевременная изоляция их от здорового поголовья, полноценное кормление, уход и терапия имеют большую роль в системе мер борьбы и профилактики.

При лечении мыта лошадей рекомендуется вскрытие созревших абсцессов широким продольным разрезом. Собранный гной уничтожают. Каждый день носовую полость промывают теплым раствором перманганата калия в соотношении 1:1000, риванола (1:1000), фурациллина (1:5000), натрия гидрокарбоната (2%) и других антисептических средств. Для ускорения созревания абсцессов в условиях конюшенного содержания накладывают согревающую повязку на область подчелюстных лимфоузлов или тепло укутывают. Полости абсцессов промывают антисептическими растворами.

D.J. Harrington, I.C. Sutcliffe, N. Chanter (2002) установили наиболее высокий терапевтический эффект антибиотиков пенициллинового ряда при мыте лошадей. При этом авторы указывают на риск возникновения антибиотикорезистентных штаммов. Поэтому, прежде чем начать лечение больных жеребят, необходимо определить чувствительность возбудителя мыта к различным антибиотикам.

В последнее время в мировой ветеринарной практике возрос интерес к органическому животноводству (Mallicote M., 2015). Однако 70% всех производителей добавляют в корм здоровым животным антибиотики в целях предотвращения болезней, а не в лечебном качестве (А.С. Кудрявцева, 2018). При анализе данных, полученных из литературных источников, становится ясно, что применение антибиотиков при профилактике и лечении мыта лошадей является одним из наиболее распространенных методов борьбы с мытом (D. Lee, B.T. Birhanu, E. Lee et al., 2020; M.C. Duran, L.S. Goehring, 2021; A.S. Waller, 2014). Известно, что антибиотики подавляют полезную микрофлору кишечника,

от которой зависит работа желудочно-кишечного тракта, иммунной системы и всех обменных процессов организма животных, а также способствуют появлению антибиотикорезистентных штаммов бактерий (М.П. Неустроев, 2000, М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, 2003; В.В. Ерофеева, В.П. Пухлянко, 2021). Кроме того, продукт от животных, выращенных с использованием антибиотиков, не может считаться экологичным и безопасным для здоровья населения, употребляющих его в пищу (В.Г. Амелин, А.М.Андоралов, Н.М. Волкова и др., 2015). В своих работах авторы (J. Pringle, E. Storm, A. Waller et al., 2020) предполагают, что лечение животных и человека от инфекции, вызванной *Str. equi*, антибиотиками заметно ухудшает развитие гуморального иммунитета и в дальнейшем повышается риск повторного заражения. Таким образом, использование антибиотиков становится нецелесообразным в период развития органического животноводства.

В ранней стадии мыта для лечения применяли мытный антивирус. Препарат готовили из свежевыделенных местных штаммов и вводили подкожно по 50-150 мл в нескольких точках вокруг формирующегося абсцесса. Также в лечебных целях внутривенно вводили 33% раствор этилового спирта; 33% раствор этилового спирта на 30%-ной глюкозе с 1%-ным раствором норсульфазола; камфарную сыворотку по Кадыкову; раствор Люголя на физиологическом растворе (И.И. Бочкарев и др., 2003).

Ранее в своих исследованиях К.П. Юров, А.Р. Сансызбаев, А.Б. Бижанов (1989) предложили способ лечения мыта бициллином-3 и бициллином-5 в сочетании с этонием. Установлено, что антибактериальная активность антибиотиков пенициллинового ряда (бициллин-3 и бициллин-5) при сочетании с поверхностно-активным веществом катионного соединения этонием значительно возрастает в отношении *Str. equi*. На этой основе разработан препарат «Этобиц» для лечения мыта лошадей. «Этобиц» назначают интраназально, внутримышечно и лимфотропно. Применение этония в сочетании с бициллином способствует ускоренному разжижению гноя и проникновению антибиотика вглубь пораженных тканей.

Для терапии мыта лошадей учеными Казахского НИВИ совместно с К.П. Юровым (1990) был разработан эффективный способ химиотерапии (Авторское свидетельство СССР №1537258).

М.П. Неустроев (1994) при лечении мыта использовал бициллин-3 с этонием, а также мытный антивирус. Подобная схема лечения снижала тяжесть протекания заболевания и сокращала сроки выздоровления. Следует констатировать, что в условиях Якутии применение мытного антивируса признано нецелесообразным ввиду трудоемкости приготовления и введения, а также неудобств при обработке, когда жидкий препарат часто замерзает при низких температурах. Кроме того, он мало эффективен по сравнению с антибиотиками.

Ш.О. Токеев (1994) применял раствор изатэтония (изатизон – антибактериальный препарат + этоний - поверхностно-активное вещество) для лечения заболевших жеребят в Казахстане. Терапевтический эффект при двукратном внутримышечном введении раствора изатэтония достигал 98,6%, профилактический – 81%. В 1992 г. Президиумом Ветеринарного фармакологического совета РФ (протокол №4 от 20.10.1992) была подтверждена безвредность и эффективность изатэтония.

Сотрудниками Якутского НИИ сельского хозяйства (М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, С.Г. Петрова и др., 2015) предложен метод интраназального впрыскивания суспензии из штамма культур *Bacillus subtilis* ТНП-3 в дозе 5 мл (5 млрд. микробных клеток в 1 мл) в носовую полость больных мытом жеребят. Штаммы бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3 и ТНП-5, выделенные данными авторами, обладают в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов ярко выраженной антагонистической активностью. На основе выделенных штаммов бактерий разработано пробиотическое средство «Сахабактисубтил», зарегистрированное в Российской Федерации. Перспективность и эффективность пробиотика «Сахабактисубтил» достоверно установлены в заготовке кормов, профилактике и лечении гнойно-некротических ран, болезней органов дыхания и пищеварения, при

воспроизводстве, микотоксикозах. Отмечается повышение иммунобиологической реактивности организма, а также нормализация микробиоценоза животных (А.Д. Жирков, С.С. Татарина, Н.П. Тарабукина и др., 2013; М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, С.Г. Петрова и др., 2018).

К. Verheyen, J.R. Newton, N.C. Talbot et al. (2000) сообщают о наружном применении смеси желатина с пенициллином для лечения мыта лошадей. При этом они отмечают, что при применении в полости абсцесса сочетание желатина с пенициллином более эффективно, чем водный раствор пенициллина. Желатин долго держится в полости из-за своей консистенции, следовательно, пенициллин долго сохраняется, где это необходимо.

С.Р. Sweeney и др. (2005) отмечают, что лечение антибиотиками повышает риск повторного заболевания мытом, так как антибиотикотерапия препятствует синтезу защитных антигенов, вследствие чего не развивается защитный иммунитет от мыта лошадей.

1.7 Иммунитет и специфическая профилактика

Изучение способности организма животных проявлять защитно-иммунологические реакции в отношении возбудителей инфекционных болезней необходимо для разработки специфических средств профилактики. Различают общую и специфическую иммунологическую реактивность.

Возбудители инфекционных болезней или антигены любой природы, согласно современным представлениям, вызывают два вида реакций в организме животного: неспецифические, связанные с общей иммунореактивностью (неспецифическая-естественная) и специфические, связанные с качественным своеобразием данного микроорганизма. Они определяются специфической иммунореактивностью организма (специфическая резистентность или иммунитет).

Эмбриональный и ранний постнатальный период формирования иммунологической реактивности организма изучали: М. Black, F. Speer (1959), Ю.Н. Федоров (1984) и другие.

А.А. Конопаткин (1973), П.И. Притулин (1981), J.G. Thalhammer, W. Stoeki, C. Reyere (1978) отмечают, что формирование клеточных и гуморальных факторов иммунитета у молодняка животных осуществляется постепенно. Так, устойчивость молодняка животных к некоторым инфекционным заболеваниям, которая обусловлена защитными свойствами антител, получаемых с молозивом, отмечают С.Г. Балашенко, В.П. Урбан (1972), Н.М. Гриценко, Д.И. Поливода (1977), В.М. Чекишев, Т.В. Бойдарь, О.А. Колганова (1985). На высокую активность факторов клеточного иммунитета и неспецифической резистентности у молодняка животных указывают Н.Е. Курочка (1977), П.А. Емельяненко, О.Н. Грызлова, В.Н. Денисенко и др. (1980). Также авторы отмечают, что неблагоприятные факторы (неполноценное кормление, стрессовые факторы внешней среды, недостаток в организме белково-минерально-витаминных веществ) могут привести к снижению иммунитета.

При определении уровня иммунобиологической реактивности организма исследуемых животных серьезное первостепенное значение имеет полноценное изучение всех факторов естественной резистентности. Это бактерицидная и лизоцимная активности сыворотки крови, определение фагоцитарной способности лейкоцитов, также биохимического и морфологического состава крови животных (П.А. Емельяненко, О.Н. Грызлова, В.Н. Денисенко и др., 1980; М.П. Неустроев, 2000).

В условиях природно-климатических особенностей Якутии М.П. Неустроевым (2000) подробно изучены как сезонные, так и возрастные особенности естественной резистентности молодняка якутской породы лошади. Проведена тесная взаимосвязь с динамикой минерального, витаминного, белкового состава крови. Установлено, что 2-месячный и весь зимний период являются критически важными периодами развития жеребят, как в иммунологическом, так и в физиологическом отношении. Понижение уровня белка, его фракций, активности лизоцима, фагоцитирующих клеток, минерального состава крови способствуют снижению иммунобиологической

реактивности организма лошадей и повышению восприимчивости к инфекционным заболеваниям, в том числе и мыту лошадей.

В настоящее время для повышения иммунобиологической реактивности и коррекции иммунодефицитов используют иммуномодуляторы, восстанавливающие функции иммунной системы. Препараты назначают в комплексной терапии параллельно с антибиотиками, противогрибковыми, противопротозойными, либо противовирусными средствами (Ю.Н. Федоров, 2005; Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, 2000).

Сотрудниками ЯНИИСХ (М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, М.П. Федорова, 2005; Н.П. Тарабукина, М.П. Неустроев, 2006) разработан препарат «Сахабактисубтил», обладающий антагонистическими, иммуностимулирующими и ферментативными свойствами, который применяется при лечении больных мытом лошадей.

Развитие иммунологии тесно связано с практическими опытами Э. Дженнера, которые продолжены и развиты Л. Пастером. Ими сформированы принципы профилактики от инфекционных заболеваний в виде иммунизации ослабленными или убитыми возбудителями. В дальнейшем, в 1887 году И.И. Мечниковым была создана фагоцитарная, сформулированная теория иммунитета и в 1901 году П. Эрликом – гуморальная, обоснованная теория иммунитета. В 1957 г. А. Яссеком и Ж. Линденманном были открыты «естественные» антибиотики – интерфероны. Открытию интерферонов послужил «Дженнеровский эффект», который заключался в следующем наблюдении: у пациентов с рецидивами простого герпеса при прививке от натуральной оспы наблюдалось сокращение частоты обострений.

По литературным данным, у переболевших мытом лошадей создается напряженный, но не продолжительный иммунитет. Однако, есть сообщения о том, что у лошадей, перенесших естественную инфекцию, иммунитет сохраняется в течение нескольких лет (И.А. Бакулов, 1969; N.L. Norcross, 1969; J. T. Bryans, B.O. Moore, 1972; K. Srivastava, D.A. Barnum, 1981). Помимо этих, известны данные о проявлении мыта лошадей в течение года после

выздоровления и об иммунитете низкой напряженности (Б.М. Гурвич, 1932; И.В. Окунцов, 1955; D.C. Blood, J.A. Henderson, 1974; W.D. Wilson, 1987).

Одной из действующих основных мер, применяемой в профилактике инфекционных болезней, признана вакцинация (И.В. Окунцов, Н.Ф. Бельков, 1976; А.Р. Сансызбаев, 1993). Известно, что профилактика является эффективным, в то же время менее затратным способом устранения заболеваний. Существуют специфические иммуногены, которые после однократного применения способны защищать от инфекции пожизненно. В современном мире изготавливают и применяют разные виды вакцин (инактивированная, аттенуированная, живая), в то же время неудачных попыток по изысканию эффективных средств профилактики множество.

При создании и применении специфических иммуногенов В. Бронников, С. Славицкий (2016) неудачами считают применение не жизненно важных биополимеров, а также ошибки в дозировке и применении препаратов.

Вакцинные препараты, предложенные в ранних исследованиях многих авторов, из живых, ослабленных и убитых штаммов мытного стрептококка, не нашли практического применения (P.L. Bazelley, 1940, 1942, 1943; П.К. Полищук, 1951; Л.А. Степанова, 1966 и др.). Также была разработана бесклеточная вакцина против мыта, содержащая М-белок, но опубликованные данные четко свидетельствуют о том, что препарат не обеспечивает продолжительный иммунитет и вызывает побочные реакции на местах введения (А.М. Hoffman, H.R. Staempfli, J.F. Prescott et al., 1991). Тем не менее, ученые из разных стран мира продолжают разработку вакцин против мыта лошадей, которые не нашли широкого практического применения. Так, в Нидерландах из депонированного штамма *Str. equi* TW928 разработана живая вакцина против мыта лошадей. Авторы этой вакцины утверждают, что ее можно применять для животных с рождения в различных формах (парентерально, внутримышечно, подкожно, интрадермально, орально, внутриназально) (O.M. Khartford, T.D. Foster, A.K. Jakobs, 2002). Однако, данная вакцина не имеет регистрации в России.

В Великобритании в настоящее время существует многокомпонентная вакцина против мыта лошадей Strangvac. Данная вакцина вводится внутримышечно. Авторы утверждают, что значительный уровень защиты от мыта достигается после второй или третьей ревакцинации (B. Guss, M. Flock, L. Frykberg et al., 2009; C. Robinson, L. Frykberg, M. Flock et al., 2018, C. Robinson, A.S. Waller, L. Frykberg et al., 2020).

На данный момент в США разработаны и применяются живая вакцина из ослабленного штамма, вызывающая выработку антител в сыворотке крови через 7-10 дней и модифицированная интраназальная вакцина Pinnacle IN двукратного применения (J.A. Walker, J.F. Timoney, 2002; J.F. Timoney, P. Suther, S. Velineni et al., 2014; A.G. Boyle, J.F. Timoney, J.R. Newton et al., 2018). Эти вакцины не могут применяться в России, также данные вакцины требуют двух- и трехкратное введение с интервалом в несколько недель, что тоже неудобно на практике.

В странах Европы на сегодняшний день существует живая вакцина против мыта Equilis StepE. Однако установлено, что данная вакцина защищает от заболевания мытом только на 3-6 месяцев (A.A. Jacobs, D. Goovaerts, P.J. Nuijten et al., 2000; A. Waller, 2018).

По данным зарубежных исследователей вакцины Pinnacle IN и Equilis StepE вызывают побочные реакции и не вырабатывают иммунитет от мыта лошадей (R. Cursons, O. Patty, K.F. Steward R. et al., 2015; C. Kelly, M. Bugg, C. Robinson et al., 2006; J. Kemp-Symonds, T. Kemble, A. Waller, 2007; J.L. Livengood, S. Lanka, C. Maddox et al., 2016).

Ученые Казахстана с ранних времен занимаются изысканием вакцины против мыта лошадей. Так, А.Р. Санзысбаев и К.П. Юров (1993) выделили и изучили М-белок мытного стрептококка, а затем разработали метод подбора и селекции производственного штамма, содержащего М-белок в максимальном количестве. Авторы депонировали штамм *Str. equi* ЮС-15, изготовили и испытали субъединичную вакцину из М-белка клеточной оболочки штамма. Защитное действие вакцины в производственных условиях составило 61,3-85%.

Вакцина применялась в хозяйствах Казахстана. В 1998 г. А.Х. Байдаров разработал вакцину против мыта «КазНИВИ», которую с профилактической целью применяют однократно. Профилактический эффект от вакцинации составил 90%. А.Б. Бижанов, А.Р. Сансымбаев, Ш.О. Токеев (1994) разработали вакцину против мыта лошадей, включающую в качестве мытного антигена инактивированную культуру мытного стрептококка и отличающуюся тем, что вакцина содержит Т-активин, бициллин с содержанием 30-40 млн. ЕД, 0,1 % раствор этония (А.Б. Бижанов, А.Р. Сансымбаев, 1996). Б.Ш. Каратаевым, А.М. Наметом, Г.К. Жусуповым и др. (2011) испытана ассоциированная вакцина против мыта и пастереллеза, которая содержит оптимальное соотношение доз вакцинных штаммов *Str. equi CM – I* и *Pasteurella multocida 626*, обеспечивающих формирование сбалансированного иммунного ответа к данным возбудителям. При этом отсутствовали отрицательные явления негенетического взаимодействия бактерий. А.И. Бижанов, Б.Ш. Каратаев, Н.А. Мырзахметулы (2013) разработали новую вакцину против мыта лошадей. Производственные испытания вакцины показали более продолжительный иммунитет (до 12 мес.). Но в связи со снятием с производства отдельных компонентов препарата, которые входили в состав вакцины против мыта лошадей, дальнейшее ее изготовление оказалось невозможным.

Для неспецифической профилактики мыта лошадей А.Р. Сансымбаев (1993) предлагает двукратное внутримышечное введение этобица. При этом отмечается, что подкожная инъекция этобица в форме водно-масляной эмульсии значительно повышает профилактическое действие препарата.

В данное время на территории Республики Казахстан применяется вакцина против мыта лошадей «Акынтай» (А.Б. Бижанов, Б.Ш. Каратаев, Н.А. Мырзахметулы, 2016). Вакцина против мыта лошадей «Акынтай» дополнительно содержит современные компоненты (сульфадимезин, триметропин – антибиотик широкого спектра действия, полиоксидоний в качестве адъюванта и иммуномодулирующего средства), которые позволяют повысить иммуногенность, ускорить сроки выздоровления и исключить

поствакцинальные осложнения. Профилактический эффект составил 93,33-100%. Продолжительность иммунитета - 12 мес. Вакцина «Акынтай» в России не применяется, так как не зарегистрирована в реестре Россельхознадзора РФ.

Профилактика и ликвидация мыта лошадей в табунном коневодстве в условиях Крайнего Севера, усложняется в связи с резкими колебаниями температуры внешней среды, плохими условиями содержания, кормления и отсутствием вакцинопрофилактики.

В 1996-2000 гг. в Якутском НИИ сельского хозяйства разработана и внедрена в производство эффективная инактивированная вакцина против мыта лошадей с иммуномодулятором полирибонат. При изготовлении вакцины применялся штамм *Str. equi* «Н-34» (справка о депонировании №988/27 от 17.12.1993 г.) (М.П. Неустроев, 2000; А.А. Баишев, 2002). Однако из-за сравнительно высокой стоимости компонентов разработанной вакцины специфическая профилактика не смогла охватить большинство коневодческих звеньев и крестьянских хозяйств. Из-за высокой стоимости иммуномодулятора складывалась общая дороговизна вакцины. В данное время истек срок регистрации данной вакцины, полирибонат снят с производства, а штамм мытного стрептококка, из которого изготовлена вакцина, утратил свои специфические свойства. Следовательно, с целью широкого применения эффективного метода профилактики мыта лошадей поставлена задача выделения нового штамма мытного стрептококка, подбора и изыскания экологически безвредных, эффективных и сравнительно дешевых компонентов вакцинного препарата.

Заключение по обзору литературы

Обзор и анализ доступной нам научной отечественной, иностранной литературы дают представление о том, насколько мыт лошадей получил широкое распространение во многих странах мира, в том числе и в Российской Федерации (К.А. Густокашин, 2013; Р.Б. Чысыма, 1989; М.П. Неустроев, 2000; А.Р. Сансызбаев, 1993; Б. Баянжаргал, О.Б. Бадмаева, В.Ц. Цыдыпов, 2014; Д.Р. Раимбеков и др., 2016; Э.А. Джетигенов, А.Б. Бекташев, А.А. Айтбаев, 2016;

O.M. Khartford и др. 2002; A.N.F. Nearmat-Allah, H.M. Damaty, 2016; J.W. Kim, J.Y. Jung, K. Lee et al., 2018; F. Libardoni, G. Machado, L.T. Gressler et al., 2016; K. K. Kasuya, N. Tanaka, F. Oshima et al., 2019; N.J. Parkinson, C. Robin, J.R. Newton et al., 2010).

К данному заболеванию восприимчивы все виды однокопытных животных. В настоящее время по систематике «The Taxonomicon and Systema Naturae 2000» известны три подвида *Str. equi*: *Str. equi subsp. Equi*; *Str. equi subsp. Zooepidemicus* и *Str. equi subsp. Ruminatorum*. Из них возбудителем, который поражает дыхательный путь жеребят, является *Str. equi subsp. Equi*. Но имеются доказательства того, что подвид *Str. equi subsp. Equi* произошел от подвида *Str. equi subsp. Zooepidemicus* и последний, в свою очередь, тоже может выделяться от клинически больных мытом лошадях (C.R. Sweeney, J.F. Timoney, J.R. Newton et al., 2005; Э.М. Мешев, Х.К. Амшонов, 2013).

Мыт лошадей может осложняться вторичной вирусной (грипп, ринопневмония) и бактериальной (сальмонеллез лошадей) инфекциями. При таком течении падеж молодняка может достигать 10-22,2% от числа заболевших. (М.П. Неустроев, 1993).

В последние годы с развитием молекулярно-генетических исследований в мире становится популярным выделение и идентификация мытного стрептококка полимеразной цепной реакцией (ПЦР) на основе видоспецифичных генов, потенциально участвующих в формировании вирулентного фенотипа мытного стрептококка, в частности *Str. equi subsp. Equi*.

Как доказывает мировой и отечественный опыт, вакцинопрофилактика была и остается одним из главных средств борьбы с мытом лошадей. В некоторых странах Европы, США, Казахстане доступны различные вакцины против мыта лошадей из живых, ослабленных штаммов. Однако эти вакцины не могут применяться в России, также данные вакцины требуют двух- и трехкратное введение с интервалом в несколько недель, что в практическом применении неудобно.

Между тем, в настоящее время эпизоотология, сезонность, периодичность заболевания, возбудитель и его выживаемость, а также режимы обеззараживания объектов и навоза достаточно продуктивно изучены как в России, так и, с учетом региональных особенностей субъекта, в Якутии. Впрочем, до сих пор экстремальные природно-климатические условия, огромная территория, стационарность, особенности ведения табунного коневодства обуславливают нерешенность проблем профилактики мыта.

Таким образом, система действенных мер диагностики, борьбы и профилактики мыта лошадей обязана предусмотреть комплексное проведение ветеринарных и организационно-хозяйственных мероприятий, которые должны включать в себя плановые диагностические исследования, обязательную дезинфекцию объектов внешней среды и, в особенности, применение средств специфической профилактики.

ГЛАВА 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Исследовательская работа проведена в период 2017-2020 гг. на базе лаборатории ветеринарной биотехнологии Якутского НИИ сельского хозяйства, ООО НПЦ «Хоту - Бакт» совместно со Всероссийским научно-исследовательским институтом экспериментальной ветеринарии (г. Москва) и лабораторией биотехнологии ГАУ Технопарк Якутии. Биологические пробы взяты из коневодческих хозяйств Намского, Хангаласского, Мегино–Кангаласского, Амгинского улусов и г. Якутска Республики Саха (Якутия), а также Республики Казахстан. Производственные испытания проведены в коневодческих хозяйствах Республики Саха (Якутия).

В совокупности исследовано 63 пробы биологического материала от молодняка 6-10-месячного возраста. Основными материалами для исследований служили содержимое абсцессов лимфатических узлов головы, смывы из носовых полостей здоровых и заболевших мытом жеребят и паренхиматозные органы от вынужденно забитых жеребят.

При выполнении работы были использованы эпизоотологические, клинические, бактериологические и генетические методы исследований. Молекулярно – генетическая идентификация штаммов проведена методом ПЦР (полимеразная цепная реакция) с секвенированием 16 s РНК.

Учет случаев заболеваемости молодняка лошадей мытом и процент их выбраковки по Республике Саха (Якутия) проведен на основании отчетов единичных хозяйств и Департамента ветеринарии по Республике Саха (Якутия) в период 1987-2020 гг.

Отбор проб биологического материала проводился до лечения животных от мыта лошадей. Смывы носовых полостей и пробы гноя вскрывшихся абсцессов брали стерильными зонд-тампонами (тупферами). Пробы каждого животного были размещены в отдельные стерильные пробирки. Учет отобранных проб проведен по номеру пробирки и инвентарному номеру

животного в рабочем журнале. Пробы биологического материала после отбора транспортировались не менее 2-3 часов в термоконтейнере.

Первичное *микроскопическое исследование* проведено в мазках-отпечатках. Для этого на сухое обезжиренное предметное стекло ровным тонким слоем нанесен биологический материал. Мазки просушены при комнатной температуре, далее зафиксированы над пламенем горелки. Фиксированные мазки окрашены по Граму.

Бактериологическое исследование проводилось согласно «Методические указания по лабораторной диагностике мыва лошадей», утвержденной ГУВ МСХ и П РБ от 14.12.2007 (№ 10-2-5/1098). Родовая и видовая принадлежность выделенных культур составлена согласно определителю «Берджи» (Д.Г. Хоулт, Н. Криг, П. Смит и др., 1997), а также с использованием следующих учебных пособий: «Диагностика стафилококкозов и стрептококкозов» (2013); «Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии» (1989).

Для накопления изучаемой бактериальной массы произведен посев биологических материалов в МПБ и на МПА с 1% глюкозой и 10% стерильной сывороткой крови лошади. Питательные среды были подготовлены и стерилизованы согласно инструкции.

Для изучения культурально-биохимических свойств использованы следующие микробиологические среды: глюкозо-сывороточный бульон с 40% желчи КРС (крупного рогатого скота), МПА с 6,5% натрия хлорида. Для дифференциально-диагностической идентификации применены среды Гисса.

Постановка пробы на фермент каталаза проведена с использованием перекиси водорода. Для определения фермента редуктаза применено молоко с метиленовым синим.

Сохранение выделенных и типизированных изолятов стрептококков произведено на ПЖА (полужидкий агар) и лиофилизированном состоянии при температуре +4-6°C в холодильнике.

На протяжении всей работы для культивирования микроорганизмов использованы следующие питательные среды:

1. Мясопептонный бульон (МПБ) – жидкая, прозрачная питательная среда янтарного цвета (рН 7,2-7,6). Готовили согласно инструкции по приготовлению, которая прикреплена каждой таре.

2. Мясопептонный агар (МПА) – плотная питательная среда. Готовили согласно способу приготовления, указанного на этикетке среды. Стерильный агар в асептических условиях разливали по пробиркам или чашкам Петри. Для приготовления скошенного агара в пробирках, расплавленным МПА после стерилизации раскладывали в наклонном положении и оставляли при комнатной температуре для застывания.

3. Полужидкий мясопептонный агар (ПЖА) приготовили так же, как и мясопептонный агар, но с одной разницей - к мясопептонному бульону добавили 50 % агара из 100% (рН 7,4-7,5). До полного расплавления кипятили в водяной бане, фильтровали и разливали по пробиркам и автоклавировали при 1 атм. в течение 20 мин.

4. 1%-ный МПБ с глюкозой и 10% сыворотки крови лошади – к обычному мясо-пептонному бульону добавили 1% глюкозы. Разливали в стерильные пробирки или колбы, стерилизовали путем автоклавирования при температуре 121⁰С в течение 15-20 мин. К остуженному 1%-ному МПБ добавили стерильную сыворотку крови лошади в количестве 10% от объема среды (производство «Биолот», г. Санкт-Петербург).

5. 1%-ный МПА с глюкозой и 10% сыворотки крови лошади – к обычному мясопептонному агару добавили 1% глюкозы. К стерильному остуженному до 45⁰С 1%-ному МПА добавили стерильную сыворотку крови лошади в количестве 10% от объема среды (производство «Биолот», г. Санкт-Петербург).

6. Кровяной мясопептонный агар (МПА) – приготавливается с добавлением в асептических условиях дефибринированной крови лошади к ранее расплавленному и остуженному 1% МПА с глюкозой.

7. Среда Гисса – это жидкие или полужидкие дифференциально-диагностические питательные среды, которые предназначены для определения и

дифференциации бактерий согласно их способности разлагать различные углеводы с образованием кислоты либо кислоты и газа; содержат пептон, соответствующий углевод индикатор, иногда агар или сыворотку крови.

8. Среда Чапека – твердая синтетическая питательная среда, используемая для культивирования плесневых грибов и дрожжей.

9. 40% желчный агар – среда для предположительной идентификации видов *Enterococcus* и группы стрептококков *Str. bovis*.

10. 6,5% солевой агар – элективная питательная среда для стафилококков.

Молекулярно-генетический анализ выделенных культур проведен в лаборатории биотехнологии «Технопарк Якутия» с использованием амплификатора «BIO-RAD T100» (США), для амплификации ДНК использован qPCR-mix-HS LowROX from Evrogen (Россия).

Подготовка образцов ДНК для постановки полимеразной цепной реакции проведена следующим образом:

1. Для того, чтобы осадить клетки бульонной суточной культуры *Str. equi* (3,5 мл) центрифугировали при 5000 об/мин. в течение 5 мин. Полностью убрали супернатант, не затрагивая осадок. Добавили к осадку 0,6 мл лизирующего раствора (TE + 10% SDS). Активно перемешали. Встряхнули в вортексе до гомогенного состояния. Перенесли взвесь (лизат) в новую пробирку типа Эппендорф, объемом 1,5 мл. Инкубировали взвесь при 37° С – 1 час.

2. Выделение (экстракция) ДНК фенолхлороформным методом.

Данный метод в различных вариациях применяется при необходимости достижения высокого уровня стандартизации в процедуре экстракции и получения таким образом высокоочищенных препаратов ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) из различных типов биологических объектов. Принцип действия основан на том факте, что сам ДНК является полярной молекулой, то есть в органических растворителях не растворяется. Известно, что смесь хлороформа с фенолом также не смешивается с водой. При дополнении лизата смесью фенола с хлороформом с последующим интенсивным

перемешиванием в растворе белки денатурируют, а гидрофобные примеси (липиды, жиры) растворяются хлороформом. Дальнейшее центрифугирование приводит к четкому разделению на фазы: водную (верхнюю) и органическую (нижнюю). Таким образом, ДНК находится в водной фазе, а денатурированные белки на границе раздела фаз формируют кольцо или, в другом случае, растворяются в нижней фазе.

Таким образом, выделение (экстракция) ДНК добились с использованием фенола (300мкл) и хлороформа (300мкл) в соотношении 1:1. Полученный раствор перемешали до полного соединения фаз. Не вортексировали, так как это может привести к разрушению ДНК. Центрифугировали при максимальной скорости (14000 об/мин.) в течение 5 мин. Аккуратно перенесли верхнюю фазу (водная фаза) в чистую пробирку с помощью пипетки объемом 1мл. Добавили 95% холодный этанол (этанол хранили при -20°C в морозильнике) в 2-3 раза больше, чем содержимое пробирки. После этого перемешивали. Пробирки с ДНК держали при -20°C в морозильнике как минимум 30 мин, но чем дольше, тем лучше.

3. Постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с помощью 96-луночного термоциклера BIO-RAD T100. Охлажденные ДНК в морозильнике центрифугировали в течение 5 мин. при 14 тыс. об/мин. После этого слили этанол (одним движением), пробирку высушили, наклонив в бумажную салфетку. Далее пробирки при комнатной температуре оставили до полного испарения спирта (15-30 мин.). Затем добавили 30 мкл ТЕ-буфера (буферный раствор, используемый для разведения ДНК перед постановкой ПЦР). При добавлении ТЕ-буфера в реакционную смесь практически не изменяется рН раствора и концентрация ионов магния, поэтому эффективность амплификации не снижается. Далее вортексировали смесь в течение 10 мин. От каждой пробы ДНК взяли по 1 мкл, к нему добавили по 0,240 мкл qPCR-mix-HS LowROX (Мастер-микс). Перемешали. Мастер-микс содержит все необходимые компоненты для ПЦР: HS Taq ДНК полимеразу, реакционный буфер, раствор Mg^{2+} , референсный краситель ROX. Для постановки реакции ПЦР в мастер-микс

добавили только олигонуклеотиды (праймеры), образец ДНК и очищенную воду (Nuclease-free Water #B1500S):

PCR-mix (Мастер микс)	25 μL реакция
PCR-mix	5мкл
Pr 1	0.5мкл
Pr 2	0,5мкл
H ₂ O	18мкл

4. Далее образцы с ДНК поместили в термоциклер (BIO-RAD T100), где увеличивается число копий ДНК за счет попеременных нагревов и охлаждений, повторяющихся множество раз. Копирование участков ДНК происходит тысячи раз. Необходимо задавать в амплификаторе нужное количество циклов и выбирать оптимальные временные и температурные параметры. Перед постановкой в амплификатор рекомендуется осадить выявленные капли со стенок пробирок на вортексе.

Температурно-временной профиль реакции был следующим: вначале предварительная инкубация (длительная денатурация) проб при 95°C - 5 мин, а затем повторение следующих этапов в течение 40 циклов (амплификация):

✓ **Денатурация.** ДНК-матрицу инкубировали при 95°C в течение 30 сек, при этом цепи ДНК расходятся, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК и тогда двунитевая ДНК переводится в одонитевую форму.

✓ **Отжиг** достигается понижением температуры реакционной смеси до 50°C в течение 30 секунд. В процессе происходит создание двунитевого участка в той области, в которой праймеры комплементарны соответствующему участку последовательности ДНК, то есть праймеры связываются таким образом с одонитевой матрицей ДНК.

✓ **Элонгация.** На этом этапе ПЦР происходит удлинение или развитие цепи. В процессе элонгации полимеразы начинает формировать синтез второй цепи от 3' конца нуклеотида (праймера), связавшийся с матрицей, в направлении 5'→3', таким образом синтезируя новую цепь. Температура работы

термостабильной ДНК-полимеразы в оптимальном варианте обычно составляет 30°C (в течение 30 секунд) и 68°C (в течение 45 секунд).

✓ **Финальную элонгацию** проводили в течение 10 минут при температуре 4°C. При этом достраиваются все односторонние фрагменты.

В работе использовали гены и праймеры, представленные в таблице 2.

Таблица 2 – Гены и праймеры, использованные в работе

Гены	Последовательность праймера, ориентация (5'- 3')
16S рРНК	Seel-F: 5'-CGGATACGGTGATGTTAAAGA-3' Seel-R: 5'-TTCCTTCCTCAAAGCCAGA-3'

5. Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 3% агарозном геле с добавлением ТАЕ-буфера и бромистого этидия.

Приготовление 3% агарозного геля: взвешиваем 1,82 г сухой агарозы (учитываем вес колбы). К нему добавляем по весу до 60 г ТАЕ-буфер (однократный). Горло колбы закрываем полиэтиленовой пленкой, прокалываем в нескольких местах. Показания весов не стираем. Нагреваем взвесь агарозы в микроволновой печи до растворения агарозы. Добавляем к агарозе 0,6-0,8 мкл красителя бромистый этидий (Ethidiumbromide – Solution 1%). Колбу с гелем взвешиваем повторно. При необходимости добавляем ТАЕ-буфер до исходного веса.

Далее агарозу тонким слоем налили в форму и с помощью специальных гребенок сделали в геле лунки для нанесения образца. После полного застывания геля, аккуратно удалили гребенки. Агарозный гель поместили в электрофоретическую камеру. Заранее в камеру электрофореза набрали достаточное количество ТАЕ – буфера, так чтобы буфер покрыл гель на 2-5 мм.

Вытащили пробирки из термоциклера и добавили шестикратный краситель для загрузки образцов (6xOrangeDNA) по 5 мкл. Пипетировали до полного растворения краски. Краситель в буфере нужен для того, что образец был легко заметен в лунке и в геле.

Нанесли по 15 мкл из каждого образца и заполнили лунки геля исследуемой пробой. Крышку электрофоретической камеры закрыли и электропровода подсоединили таким образом, чтобы ДНК двигалась далее в направлении от катода (-) к аноду (+) при напряжении 5-10 в/см длины геля. Визуально осуществляли контроль над электрофоретическим разделением, ориентируясь по движению полосы красителя (примерно 30 мин).

В завершение электрофоретического разделения извлеченный из формы гель просматривали в ультрафиолетовом свете при помощи УФ-трансиллюминатора. Зафиксировали проявление фрагментов анализируемой ДНК в виде светящихся оранжево-красных полос.

Чувствительность и достоверность метода ПЦР для идентификации мытного стрептококка подтверждены исследованиями в отделе качества и стандартизации пробиотических препаратов ВГНКИ.

Нуклеотидная последовательность ампликонов исследована в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН и депонирована в международной базе данных NCBI.

Секвенирование гена 16S рРНК проводилось в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск). Ампликон размером около 1500 п.н. получено с использованием специфических 16S праймеров (27F: 5'-AG-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3' и 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') для каждого изолята в препаративном количестве и очищено с помощью сорбции на магнитных частицах (Agencourt AMPure XP, «Beckman Coulter, Inc.», США). Секвенирование по Сэнгеру выполнено на ABI 3130xl Genetic Analyser («Applied Biosystems, США) по стандартным протоколам производителя. Нуклеотидные последовательности проанализированы с помощью программы BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), выявляющей гомологию с нуклеотидными последовательностями, которые депонированы в базе данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Для определения *патогенных свойств* односуточной культурой стрептококков, содержащих не менее 2 млрд. микробных клеток изучаемых

изолятов, заражены подкожно в области спины и внутрибрюшинно белые мыши массой 16-18 г. За подопытными животными наблюдение проводилось в течение 10 суток.

При **изготовлении вакцины** использован штамм бактерий *Str. equi* «Н-5/1», депонированный во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве ФГБУ ВГНКИ (регистрационный № ВКШМ-Б-141П, справка о депонировании от 22 мая 2018 г.).

При изготовлении вакцины для накопления стабильной бактериальной массы использован МПБ с 1% глюкозой с добавлением сыворотки крови лошадей. Накопление биомассы осуществлялось во флаконах объемом 200 см³. По окончании выращивания необходимой бактериальной основы и определения их инфекционной активности их инактивировали формалином (содержание активного формальдегида не менее 36%). Гидроокись алюминия применена в качестве адъюванта.

В качестве иммуномодулятора в состав вакцины добавлена культуральная жидкость (КЖ) штамма бактерий *Bac. Subtilis* ТНП-3, который выращен в течение 5 суток в мясном бульоне при температуре 37°C. Культуральная жидкость (КЖ) отделена от клеток путем центрифугирования (7000 об/мин.) в течение 15 минут и путем фильтрования в стерильные флаконы через мембранные фильтры. Добавление в готовую вакцину осуществлено в соотношении 2:1, где одна часть иммуномодулятора и две части мытной основы. Штамм бактерий *Bac. subtilis* ТНП-3 депонирован в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ (справка о депонировании от 27.12.2017 г.).

Лабораторное испытание вакцины против мыта проведено на беспородных лабораторных мышах обоего пола 5-8-недельного возраста весом 18-20 г и здоровых кроликах мужского пола с массой тела 1,5-1,6 кг.

Таблица 3 отражает параметры проведения доклинических испытаний. Для установления наличия механических примесей, плесени, трещин флаконов

и нарушения укупорки, флаконы с препаратом просматривали в проходящем свете. Стабильность вакцины проверена общепринятым способом, путем изучения внешнего вида, стерильности, безвредности и иммуногенности каждые 3 месяца в течение 24 мес. В полном соответствии с ГОСТ 28085-2013 «Препараты биологические. Метод бактериологического контроля стерильности» определена стерильность. Безвредность вакцины выявлено на белых мышах с массой тела 18-20 г. Для этого трем белым мышам вакцина вводилась подкожно в область спины в дозе 1,0 см³, согласно ГОСТ 9380-067-00008064. Наблюдение производилось в течение 10 дней. Острая токсичность вакцины против мыта изучена на лабораторных беспородных мышах, путем патоморфологических и гистологических исследований после введения препарата внутривенно. Испытание на пирогенность проведено на 2 группах по 3 головы здоровых кроликов мужского пола с массой тела 1,5-1,6 кг. В течение трех суток перед испытанием препарата и во время опыта у кроликов измеряли температуру тела. Измерение температуры тела проводили при помощи медицинского ртутного термометра. Термометр вводился ректально на 5 мин. Результаты измерения температуры сразу фиксировались. Для оценки иммуногенных свойств вакцины против мыта лошадей предварительно определялась летальная доза производственного штамма «*Str. equi* H-5/1» (LD₅₀). Определение величины вирулентной активности LD₅₀ штамма *Str. equi* «H-5/1» проведено согласно методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева (1962). Эффективность иммунизации определена по количеству мышей, устойчивых по заболеваемости и летальности к заражению в сравнении с животными контрольной группы.

Таблица 3 – Параметры и характеристика доклинических исследований вакцины против мыта

Наименование показателя	Характеристика и норма
Внешний вид и цвет	Вакцина представляет собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета с белым осадком, при

	встряхивании легко разбивается в равномерную взвесь.
Наличие механической примеси, трещин флаконов, нарушение укупорки флаконов, плесени.	Не допускается
Стерильность	Должна быть стерильной
Безвредность	Должна быть безвредна
Токсичность и аллергизирующая способность	Не допускается
Пирогенность	Не допускается
Иммуногенность	Должна быть иммуногенна

Доклинические и клинические испытания вакцины проведены согласно приказу Министерства сельского хозяйства РФ №101 от 6 марта 2018 г. «Об утверждении правил проведения доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения» и Федеральному закону от 12.04.2010 №61-ФЗ (в редакции от 02.08.2019) «Об обращении лекарственных средств».

На клиническое испытание вакцины получено разрешение Департамента ветеринарии РС(Я) в неблагополучных по мыту хозяйствах.

Регистрационное досье на вакцину против мыта лошадей инаktivированной оформлено согласно приказу Министерства сельского хозяйства РФ №4 от 10.01.2018 г. «Об утверждении порядка формирования регистрационного досье на лекарственный препарат для ветеринарного применения и требований к документам в его составе и порядка представления документов, из которых формируется регистрационное досье на лекарственный препарат для ветеринарного применения в целях государственной регистрации».

Для статистической обработки данных подсчитаны средние арифметические (M) и стандартные ошибки (m). Достоверность результатов выведена с использованием критерия Стьюдента.

Более подробные описания методов исследования изложены в соответствующих главах.

2.2 Эпизоотическая обстановка по мыту лошадей в Республике Саха (Якутия)

Нами проведен анализ отчетных данных Департамента ветеринарии МСХ РС(Я) за долгосрочный период (с 1985 по 2020 годы). Как показывает анализ отчетных данных, мыт распространен в основном в центральной и виллюйской группах улусов республики, где находится наибольшее количество лошадей. Так, болезнь ежегодно регистрируется в Мегино-Кангаласском, Усть-Алданском, Намском, Чурапчинском, Верхневиллюйском, Виллюйском, Нюрбинском и Сунтарском улусах.

Динамику количества неблагополучных пунктов и заболеваемости мытом лошадей отражает рисунок 1. Как показано в диаграмме, наибольшее число неблагополучных пунктов и случаев заболеваемости зарегистрировано с 1985 по 2003 годы.

В таблице 4 представлены эпизоотические данные отчетности Департамента ветеринарии РС(Я) по мыту лошадей с 1985 по 2016 гг. По нему заболеваемость в среднем составляет – 0,3 % от общего поголовья и от поголовья молодняка – 0,9%, а летальность в среднем – 5,5 %.

За 1986-1991 гг. среднее количество неблагополучных пунктов ежегодно составляло 26,1. В 2000-2011 гг. каждый год регистрировались от 9 до 31 неблагополучных пунктов по мыту лошадей.

За период 2012-2016 гг. наблюдается спад заболевания мытом (в среднем от 1 до 10 неблагополучных пунктов). В 2016-2020 гг. по данным Департамента ветеринарии, мыт лошадей нигде не зарегистрирован. Однако, по нашим наблюдениям и исследованиям, заболеваемость мытом в стационарно-неблагополучных пунктах остается высокой – до 65 %, а летальность – 4-22 %.

Мы предполагаем, что отчетные данные ветеринарной службы республики не могут отразить настоящую эпизоотическую картину по мыту по следующим причинам:

- атипичная форма мыта трудно диагностируется;
- в хозяйствах плохо организован учет заболеваемости и падежа лошадей;
- отчетные данные отражают данные только текущего года, а мыт отмечается в осенний, зимний и весенний периоды;
- отсутствие эффективных методов экспресс диагностики и дифференциации.

Особенно неблагополучными были 2016-2017 гг. В эти годы болезнь регистрировалась с летнего периода в Хангаласском, Мегино-Кангаласском, Усть-Алданском и Намском улусах. Однако неблагополучие по мыту в отчетных данных районов не отражено.

Таким образом, заболеваемость мытом в Республике Саха (Якутия) остается причиной значительных экономических потерь и затрат в коневодстве.

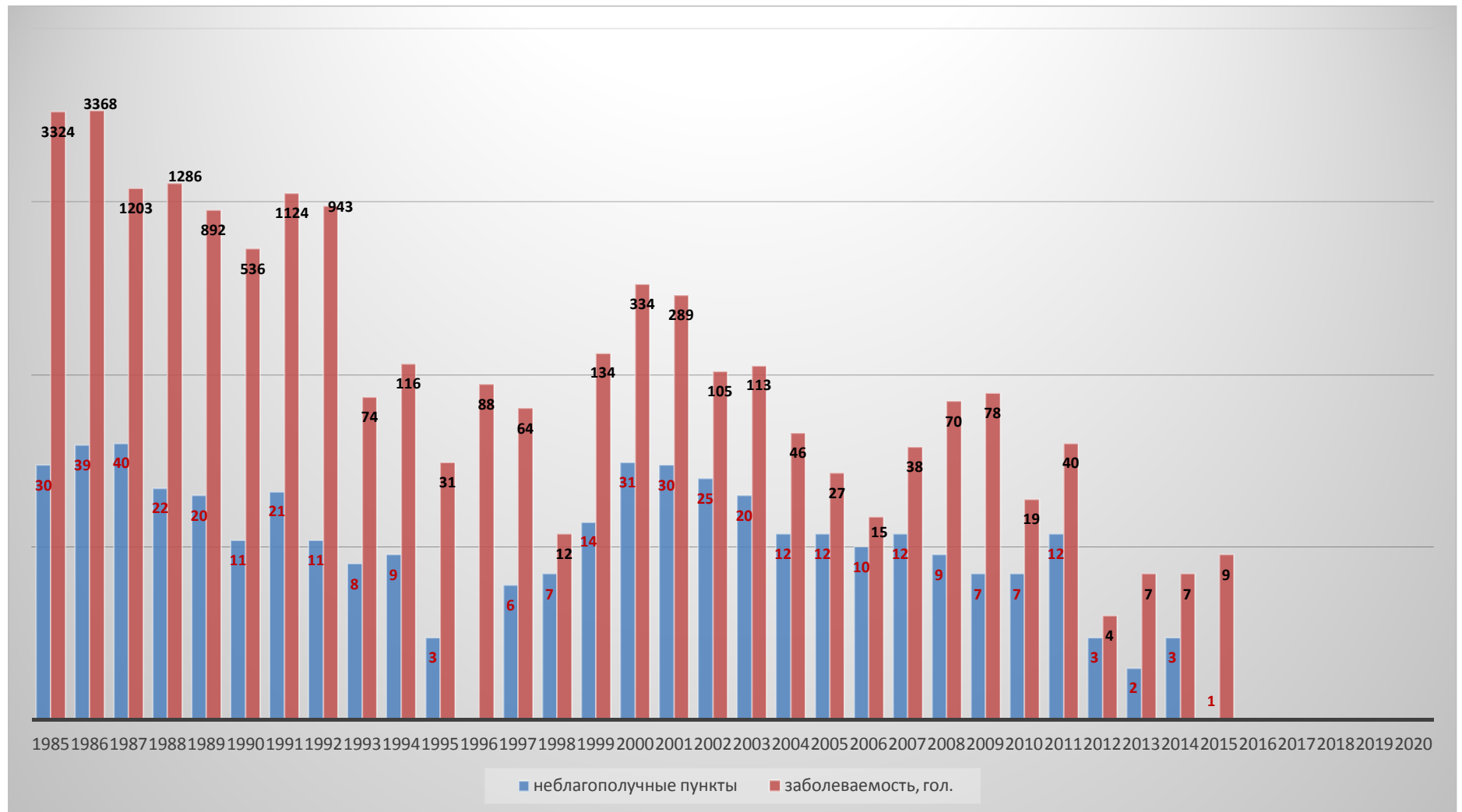


Рисунок 1 – Динамика количества неблагополучных пунктов и заболеваемость мытом лошадёй в Республике Саха (Якутия) за 1985 - 2020 гг.

Таблица 4 – Эпизоотическая ситуация по мыту в Республике Саха (Якутия) (на основе отчетных данных Департамента ветеринарии МСХ РС (Я) с 1985-2016 гг.)

Показатели	Годы															
	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Всего голов	187072	196000	194900	189600	194000	196570	199537	209134	201643	186397	167199	160924	143839	125085	126688	127609
Получено приплода	55198	50609	48808	47026	42877	57672	55439	41940	37350	25566	29724	25439	18366	15796	17461	14131
Неблагополучные пункты	30	39	40	22	20	11	21	11	8	9	3	0	6	7	14	31
Заболело, гол.	3324	3368	1203	1286	892	536	1124	943	74	116	31	88	64	23	134	334
Заболеваемость от общего поголовья, %	1,78	1,72	0,62	0,68	0,46	0,27	0,56	0,45	0,04	0,06	0,02	0,05	0,04	0,02	0,11	0,26
Заболеваемость от поголовья молодняка, %	6,02	6,65	2,46	2,73	2,08	0,92	2,02	2,24	0,19	0,45	0,1	0,34	0,34	0,14	0,76	2,3
Пало	89	79	112	87	19	15	13	63	4	13	1	0	10	1	5	7
Летальность, %	2,6	2,3	9,3	6,7	2,1	2,7	1,15	6,6	5,4	11,2	3,2	0	5,6	4,3	3,7	2,09
Показатели	Годы															
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Всего голов	126591	128361	128722	128722	122335	123065	125578	140137	151484	151589	156627	155354	151756	162715	158956	161887
Получено приплода	34895	39682	41660	38035	32070	36838	41065	45703	48682	47020	54230	46007	43588	57310	59921	61211
Неблагополучные пункты	30	25	20	12	12	10	12	9	7	7	12	3	2	3	1	0
Заболело, гол.	289	105	113	46	27	15	38	70	78	19	40	4	7	7	9	0

Продолжение таблицы 4

Заболеваемость от общего поголовья, %	0,23	0,08	0,09	0,03	0,02	0,01	0,03	0,05	0,05	0,01	0,02	0,002	0,004	0,004	0,005	0
Заболеваемость от поголовья молодняка, %	0,82	0,26	0,27	0,12	0,08	0,04	0,09	0,15	0,16	0,04	0,07	0,008	0,01	0,01	0,01	0
Пало	5	-	22	2	1	2	3	3	0	0	1	0	3	0	0	0
Летальность, %	1,7	-	19,4	4,3	3,7	13,3	7,8	4,2	0	0	2,5	0	42,8	0	0	0

2.3 Выделение и идентификация возбудителя мыта лошадей

Выделение и идентификация микроорганизма включают в себя описание самого штамма, его морфологических, культуральных и биохимических свойств, а также его сравнение с ранее классифицированными микроорганизмами. Следовательно, микроорганизм можно идентифицировать, т.е. он идентичен конкретному таксону, только если он уже известен, а микроорганизмы, которые не были выделены, должны быть сначала идентифицированы как новые, а затем классифицированы в соответствии с существующей таксономией и названы в соответствии с Международным кодексом бактериальной номенклатуры.

Для идентификации чистой культуры применены методы, основанные на изучении морфологических и культурально-биохимических свойств культур. Всего нами исследовано за период 2017-2018 гг. 63 пробы биоматериала от молодняка 6-10-месячного возраста: в том числе 45 смывов носовых истечений (27 от клинически больных мытом жеребят, 18 от клинически здоровых жеребят); 4 пробы содержимого вскрывшегося абсцесса подчелюстных лимфатических узлов, 11 проб паренхиматозных органов от павших жеребят. Патологические материалы собраны в хозяйствах Амгинского, Мегино-Кангаласского, Намского, Хангаласского районов, г. Якутска Республики Саха (Якутия) и Республики Казахстан. Смывы из носовых полостей, содержимое абсцессов подчелюстных лимфатических узлов получены при помощи стерильных зонд-тампонов (тупферами).

Перед бактериологическими исследованиями применена предпосевная обработка. Смывы с зонд-тампонами, кусочки органов и гной из лимфоузлов были погружены в течение 5 минут в 0,9% стерильный физраствор. Затем были обработаны 70⁰С спиртом с последующим двух-трехкратным промыванием в стерильном физрастворе. В наших исследованиях промывания оказались весьма эффективными для подавления роста сопутствующей микрофлоры, что приводит к облегчению и ускорению срока выделения чистой культуры.

Прижизненная диагностика мыта лошадей, особенно в суровых условиях Крайнего Севера, является весьма сложной задачей. Мыт лошадей протекает

наряду с другими инфекционными болезнями, которые проявляются за счет неблагоприятных факторов окружающей среды. Так, при наступлении низких температур образование устойчивых наледей поверх отавы и сена, которые служат основными источниками корма для тебеневки и стойлового содержания лошадей в зимний период, могут быть главными причинами отвесов и снижения иммунитета лошадей. Установлено, что недоброкачественный и скудный рацион способствует поражению грибами респираторного тракта лошадей, которое протекает совместно с мытом лошадей. Так, у 11 необработанных проб микробиологическими исследованиями выделены токсигенные и плесневые грибы родов *Aspergillus* и *Mucor*. В таком случае дальнейшее исследование данных проб не имеет смысла, поскольку выделить чистую культуру из загрязненных плесневыми грибами проб практически невозможно. В связи с этими данными следует отметить, что предпосевная обработка биологических материалов является важным моментом при выделении чистой культуры стрептококков.

Далее из исследуемых биологических проб были сделаны мазки-отпечатки, произведено окрашивание по Граму для последующей микроскопии. Ниже представлена первичная микроскопия некоторых мазков-отпечатков, полученных из содержимых абсцессов лимфатических узлов и смывов носовых истечений, показавшая наличие Грам положительных стрептококков, которые лежат длинными цепочками, а также сопутствующей микрофлоры (рис.2). Следует отметить, что первичная микроскопия мазков-отпечатков имеет ориентировочное диагностическое значение.

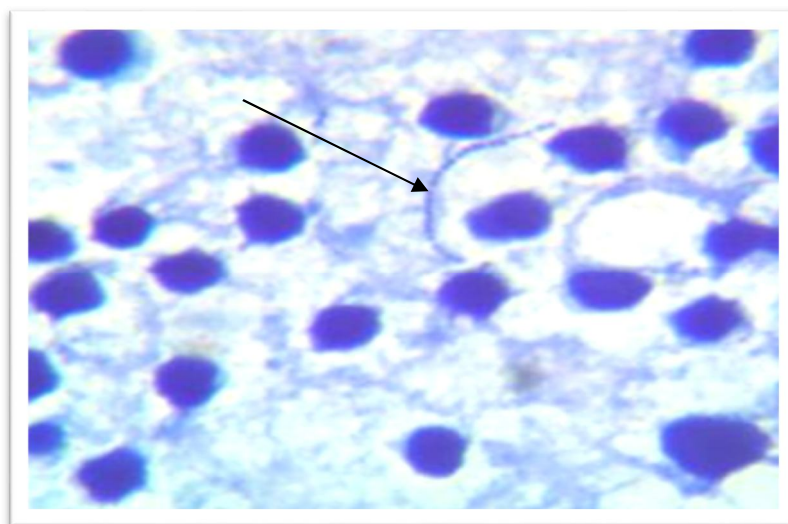


Рисунок 2 – Проба № 5, мазок-отпечаток из содержимого абсцесса подчелюстного лимфоузла жеребенка. Окраска по Граму. Ув. 100

Посев биологических материалов проведен согласно общепринятым методам диагностики мыта лошадей в лабораторных условиях на глюкозносывороточном бульоне (МПБ) и агаре (МПА).

Для упрощения выделения чистых культур проведен бактериологический посев на плотной питательной среде (1% МПА) в трех точках. Для этого дно чашки Петри расчерчивали маркером на три части (точки), затем раскаленной над пламенем спиртовки петлей делали рассев в первой части чашки, далее из первой части брали материал для посева и высевали во второй части. Посев в третьей части сделали аналогично предыдущей. Для дальнейшей идентификации отобраны одиночные и наиболее характерные колонии из третьей точки.

Культурально-морфологические свойства выделенных микроорганизмов изучали путем высева их в 1%-й мясо-пептонный бульон (МПБ), обогащенный глюкозой и 10% лошадиной сывороткой крови, 1%-й мясо-пептонный агар (МПА), обогащенный глюкозой и 10% сыворотки крови, полужидком агаре (ПЖА). После чего среды с культурами инкубировали в течение 18-20 часов в термостате при температуре 37°C. При этом учитывали характер роста и морфологию выросших колоний на плотной и жидкой питательной среде.

Из исследованных 63 проб 11 проб были загрязнены плесневыми грибами рода *Aspergillus* и *Mucor*. Эти пробы не были подвергнуты предпосевной обработке. Всего нами выделены 40 изолятов кокковидной формы. Все выделенные бактерии кокковидной формы, дают хороший рост в МПБ с 10% сывороткой крови лошади и 1% МПА с 10% сывороткой крови лошади. Некоторые культуры росли в виде равномерного помутнения среды с выпадением белого осадка, поднимающегося при встряхивании косичкой вверх в 1% МПБ с 10% сывороткой крови лошади. Некоторые культуры на 1% МПА с 10% сывороткой крови лошади растут в виде мелких росинчатых колоний, также наблюдается рост блестящих, выпуклых, с ровными краями белых колоний и слившихся матовых выпуклых колоний. На полужидком агаре (ПЖА) культуры растут по всей поверхности хода укола.

При изучении характера роста исследуемых изолятов микроорганизмов на плотных, так и на жидких питательных средах было установлено, что они относятся к факультативным анаэробам.

Путем посева на средах Гисса с глюкозой, лактозой, маннитом, мальтозой, сахарозой, сорбитом и дульцитом изучены биохимические свойства культур. Их инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 18-24 часов.

С целью дифференциации от стафилококков произведена постановка пробы на фермент каталаза с использованием перекиси водорода. Для этого бактериологической петлей вносили исследуемую колонию на предметное стекло в каплю 3% раствора перекиси водорода. Как известно, стафилококки выделяют каталазу и потому наблюдается пенообразование, а стрептококки и энтерококки – нет.

Далее проводили дифференциацию от энтерококков путем посева их на МПА с 40%-й желчью и 6,5% солевой МПА. При этом у 7 изолятов (№ 8-3; 20-3; 3-1; 9-3; 46; 49; 50) наблюдается рост на МПА с 1% глюкозой и 40% желчью КРС (крупного рогатого скота) и на 6,5% МПА с хлоридом натрия. При исследовании этих микроорганизмов на углеводы была отмечена повышенная биохимическая активность. Некоторые изоляты ферментировали с образованием

кислоты без газа все углеводы (глюкозу, лактозу, маннит, мальтозу, сахарозу, сорбит и дульцит). Для всех семи изолятов характерны общее помутнение среды и придонный рост плотного белого осадка на жидких питательных средах. На плотных питательных средах дают рост в виде слизистых колоний белого цвета. При микроскопии бульонной культуры видны грамположительные кокки. Кокки расположены короткими цепочками, а в мазках из плотной питательной среды – в виде «виноградных гроздьев». Данные изоляты по морфологическим и культуральным свойствам отнесены к энтерококкам. Следует отметить, что в кишечной микробиоте молодняка лошадей М.П. Неустроевым, Н.П. Тарабукиной, С.Г. Петровой и др. (2015) были обнаружены и идентифицированы патогенные и условно-патогенные культуры энтерококков. Следовательно, можно предположить о роли энтерококков в развитии инфекционного процесса при заболевании органов дыхания и в том числе при мыте.

При постановке каталазной пробы у некоторых изолятов (№ 46; 49; 50) замечена способность продуцировать каталазу (образование пены), что является характерным свойством для стафилококков (Таблица 5).

В жидкой питательной среде остальные изоляты дают пристеночный рост с образованием белого хлопьевидного осадка. На плотной питательной среде - растут в виде росинчатых, мелких, полупрозрачных колоний. На питательных средах с добавлением желчи и натрия хлорида не растут. Сахарозу, глюкозу и мальтозу ферментируют с образованием кислоты без газа, а лактозу, сорбит, маннит и дульцит не сбраживают. При микроскопии в мазках из суточной бульонной культуры, окрашенных по Граму, заметны длинные, извитые цепочки из грамположительных кокков (рис. 3), из агаровой культуры – короткие цепочки или парные, одиночные кокки (рис.4). В чашках Петри с кровяным мясопептонным агаром выявлен рост мелких, с гладкими краями колоний, имеющих вид росы, окруженных зоной просветления – β -гемолиз (рис.5). Морфологические и культурально-биохимические свойства данных изолятов характерны для мытного стрептококка.

Выделенные изоляты хранятся на полужидком агаре (ПЖА) в течение 2

месяцев с дальнейшими пересевами или в лиофилизированном виде до одного года.

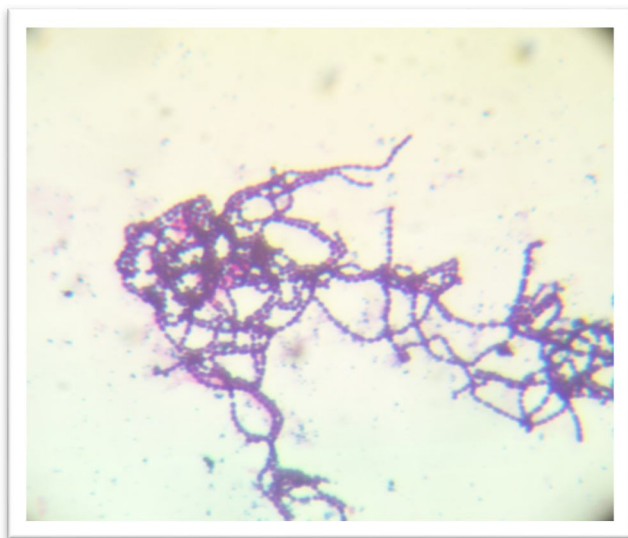


Рисунок 3 – Мазок из бульонной культуры (штамм 5/1). Окраска по Граму. Ув. 100

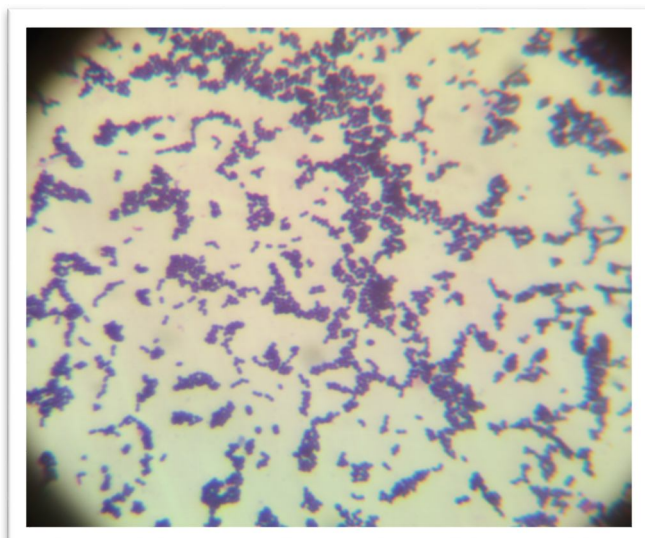


Рисунок 4 – Мазок из агаровой культуры (штамм 5/1). Окраска по Граму. Ув. 100

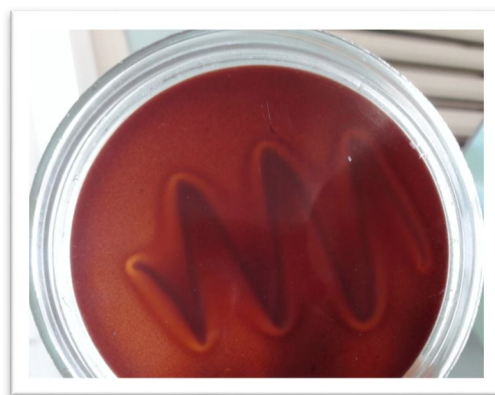


Рисунок 5 – Образование β -гемолиза у исследуемого штамма № 5-1

Таким образом, нами при исследовании 63 проб биологического материала от здоровых, клинически больных, а также павших жеребят, выделены 40 изолятов кокковидной формы. Из них при дальнейшей дифференциации 3 изолята отнесены к роду *Staphylococcus* и 4 изолята – к роду *Enterococcus*. Характеристики некоторых выделенных штаммов представлены в таблице 5. У 11 необработанных проб микробиологическими исследованиями выделены

токсигенные и плесневые грибы родов *Aspergillus* и *Mucor*. Следовательно, можно утверждать, что причинами респираторных болезней лошадей, как показали конечные результаты проведенных бактериологических исследований, могут стать не только возбудитель мыта – *Str. equi*, но и его ассоциация с другими видами рода *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, а также плесневыми грибами. Для дальнейшей идентификации необходимо провести молекулярно-генетические исследования.

Таблица 5 – Характеристика изучаемых изолятов микроорганизмов

п/п	№ штамма	Микроскопия (Окраска по Граму)	Рост в МПБ	Рост в МПА	Тип гемолиза	Рост на МПА, содержащем 40% желчи	Рост в 6,5% солевом агаре	Тест на каталазу	Сбраживание углеводов						
									глюкоза	лактоза	маннит	мальтоза	сахароза	сорбит	дульцит
1	1 каз	Грам + кокки, в мазках из бульонной культуры лежат длинными цепочками, из агаровой – короткими цепочками, одиночно	Легкое помутнение среды, пристеночный рост, образование хлопьевидного осадка, который при встряхивании поднимается косичкой вверх	Мелкие, прозрачные, росинчатые колонии с сероватым оттенком	β	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
2	1 П	Грам + кокки, в мазках из бульонной культуры лежат длинными цепочками, из агаровой – короткими цепочками, одиночно	Легкое помутнение среды, пристеночный рост, образование хлопьевидного осадка, который при встряхивании поднимается косичкой вверх	Мелкие, прозрачные, росинчатые колонии с сероватым оттенком	β	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
3	1-3	Грам + кокки, в мазках из бульонной культуры лежат длинными цепочками, из агаровой – короткими цепочками, одиночно	Легкое помутнение среды, пристеночный рост, образование хлопьевидного осадка, который при встряхивании поднимается косичкой вверх	Мелкие, прозрачные, росинчатые колонии с сероватым оттенком	β	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
4	5-1	Грам + кокки, в мазках из бульонной культуры лежат длинными цепочками, из агаровой – короткими цепочками, одиночно	Легкое помутнение среды, пристеночный рост, образование хлопьевидного осадка, который при встряхивании поднимается косичкой вверх	Мелкие, прозрачные, росинчатые колонии с сероватым оттенком	β	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-

Продолжение таблицы 5

5	7-3	Грам + кокки, в мазках из бульонной культуры лежат длинными цепочками, из агаровой – короткими цепочками, одиночно	Легкое помутнение среды, пристеночный рост, образование хлопьевидного осадка, который при встряхивании поднимается косичкой вверх	Мелкие, прозрачные, росинчатые колонии с сероватым оттенком	β	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
6	12-3	Грам + кокки, в мазках из бульонной культуры лежат длинными цепочками, из агаровой – короткими цепочками, одиночно	Легкое помутнение среды, пристеночный рост, образование хлопьевидного осадка, который при встряхивании поднимается косичкой вверх	Мелкие, прозрачные, росинчатые колонии с сероватым оттенком	β	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
7	8-3	Крупные Грам + кокки, расположенные короткими цепочками, в мазках из плотной питательной среды – кокки в виде «виноградных гроздьев»	Помутнение среды с плотным придонным осадком белого цвета	Крупные слизистые колоний белого цвета	β (крупные колонии)	+	+	-	+	+	+	+	нд	-	нд
8	20-3	Крупные Грам + кокки, расположенные короткими цепочками, в мазках из плотной питательной среды – кокки в виде «виноградных гроздьев»	Помутнение среды с плотным придонным осадком белого цвета	Крупные слизистые колоний белого цвета	β (крупные колонии)	+	+	-	+	+	+	+	нд	-	нд
9	3-1	Крупные Грам + кокки, расположенные короткими цепочками, в мазках из плотной питательной среды – кокки в виде «виноградных гроздьев»	Помутнение среды с плотным придонным осадком белого цвета	Крупные слизистые колоний белого цвета	β (крупные колонии)	+	+	-	+	-	+	+	нд	-	нд
10	9-3	Крупные Грам + кокки, расположенные короткими цепочками, в мазках из плотной питательной среды – кокки в виде «виноградных гроздьев»	Помутнение среды с плотным придонным осадком белого цвета	Крупные слизистые колоний белого цвета	β (крупные колонии)	+	+	-	+	+	+	+	нд	-	нд

Продолжение таблицы 5

11	46	Крупные Грам + кокки, расположенные короткими цепочками, в мазках из плотной питательной среды – кокки в виде «виноградных гроздьев»	Интенсивное помутнение среды с образованием обильного осадка	Крупные выпуклые колонии с ровными краями	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	49	Крупные Грам + кокки, расположенные короткими цепочками, в мазках из плотной питательной среды – кокки в виде «виноградных гроздьев»	Интенсивное помутнение среды с образованием обильного осадка	Крупные выпуклые колонии с ровными краями	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	50	Крупные Грам + кокки, расположенные короткими цепочками, в мазках из плотной питательной среды – кокки в виде «виноградных гроздьев»	Интенсивное помутнение среды с образованием обильного осадка	Крупные выпуклые колонии с ровными краями	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: + положительный результат; - отрицательный результат; нд – нет данных

2.4 Молекулярно-генетическая идентификация выделенных культур мытного стрептококка методом ПЦР

В современной науке с развитием новых технологий при изучении видовой идентификации микроорганизмов все большее место занимают молекулярно-генетические методы исследований. На данный момент существуют современные методы, позволяющие идентифицировать видовой состав каждого микроорганизма из одной колонии на генном уровне, увеличивая код ДНК. Ранее, перед тем, как использовать те или иные методы видовой идентификации, считалось необходимым применять различные способы культивирования, тем самым увеличивая численность микроорганизмов.

Известно, что некоторые виды микроорганизмов можно исследовать непосредственно в исходном образце, к примеру, методом микроскопирования, но полученные таким методом данные не достоверны. На данном этапе развития современной науки с учетом всех сложностей видовой идентификации, чаще применяются методы молекулярной биологии и генетики. Они позволяют на уровне молекул нуклеиновых кислот различать виды и штаммы микроорганизмов.

Молекулярно-генетическая идентификация 40 выделенных нами в лабораторных условиях изолятов на наличие видоспецифичных генов, потенциально участвующих в формировании вирулентного фенотипа мытного стрептококка, в частности *Str. equi subsp. Equi*, проведена в лаборатории биотехнологии ГАУ РС(Я) «Технопарк Якутия».

С помощью ПЦР определено наличие нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рПНК. В работе использованы следующие штамм-специфические праймеры на различные участки гена 16S рПНК: Seel-F: 5'-CGGATACGGTGATGTTAAAGA-3' и Seel-R: 5'-TTCCTTCCTCAAAGCCAGA-3' (A.G. Boyle, S.C. Rankin, L. Duffee et al., 2016; A.G. Boyle, D. Stefanovski, S.C. Rankin, 2017).

Для амплификации ДНК применен qPCRMix from Evrogen (Россия). Использована методика проведения ПЦР в соответствии с инструкциями производителя.

Молекулярно-генетическое типирование 40 изолятов проводилось с использованием методов экстракции ДНК, ПЦР и электрофореза в агарозном геле.

Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК *Str. equi* была обнаружена у 6 изолятов («П1», «Н-1 каз», «Н-5/1», «Н-12-3», «1-3», «7-3»), выделенных от клинически больных мытом жеребят (протокол испытаний № 1 от 04.12.2017 г.) (приложение К). Результаты анализа продуктов ПЦР приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты анализа продуктов ПЦР, разделенных методом электрофореза по показателю «Молекулярно-генетическое типирование штамма *Str. equi*»

№ п/п	Номера изолятов бактерий <i>Str. Equi</i>	Результат испытаний	№ п/п	Номера изолятов бактерий <i>Str. equi</i>	Результат испытаний
1	4-1		21	Str. 2ПС	
2	П2		22	15-1	
3	6-2		23	Н-34	
4	2-1 мказ		24	6-3	
5	2-4 мказ		25	3-2	
6	4-2		26	Моск.	
7	П1	<i>Str. Equi</i>	27	1 каз	<i>Str. equi</i>
8	20-1		28	2П	
9	11-3		29	3-1	
10	1 каз	<i>Str. equi</i>	30	16-1	
11	6-1		31	Ю	
12	12-1		32	20-3	
13	2-2		33	12-2	
14	5-1	<i>Str. equi</i>	34	1 П	<i>Str. equi</i>
15	8-3		35	2-4 мказ	
16	12-3	<i>Str. equi</i>	36	13-2	
17	7-2		37	8-3	
18	1-3	<i>Str. equi</i>	38	17	
19	9-3		39	2-1 мказ	
20	7-3	<i>Str. equi</i>	40	5-1	<i>Str. equi</i>

На рисунке 6 представлена электрофореграмма исследуемых образцов. По ней видно, что ген *16S pPHK Str. equi subsp. equi* обнаружен у 6 образцов (треки № 7, 10, 14, 16, 18, 20).

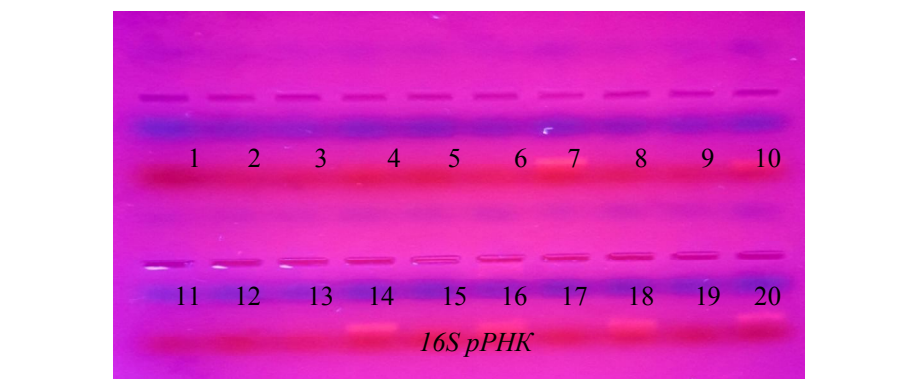


Рисунок 6 – Результаты электрофореза изолятов на наличие нуклеотидной последовательности гена *16S pPHK*. Трек №7 – образец «П1», трек №10 – образец «Н-1 каз», трек №14 – образец «Н-5/1», трек №16 – образец «Н-12/3», трек №18 – образец «1-3», трек №20 – образец «7-3».

Далее три штамма *Str. equi* из 6 были отобраны для дальнейшего исследования в ВГНКИ. Эти штаммы обладают наиболее высокими свойствами накапливать бактериальную массу («Н-1 каз», «Н-5/1», «Н-12-3»). Накопление обильной бактериальной массы является обязательным свойством для производственных штаммов, которые используются для разработки вакцинного препарата.

Дальнейшее молекулярно-генетическое типирование в ФГБУ «ВГНКИ» подтвердило, что анализируемая нуклеотидная последовательность исследованных трех штаммов *Str. equi* «Н-5/1», «Н-12-3», «Н-1 каз» 100 % идентична нуклеотидной последовательности фрагмента гена *16S pPHK Str. equi subsp. equi* (приложение Л).

Таким образом, выделены и идентифицированы три перспективных штамма *Str. equi subsp. equi*, которые могут быть использованы для разработки иммунобиологических препаратов.

2.5 Штамм бактерий *Streptococcus equi* «Н-5/1»

Штамм *Str. equi subsp. equi* «Н-5/1», как самый активный, прошел комиссионные испытания во Всероссийском государственном центре качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ») (приложение М).

Штамм *Streptococcus equi* Н-5/1 продуцировал ферменты β -глюкозидазу, β -глюкоронидазу и лейцинариламидазу. Ферментировал с образованием кислоты без газа эскулин, крахмал и гликоген. Не сбраживал аргинин, рибозу, арабинозу, маннит, сорбит, лактозу, трегалозу, инулин и раффинозу. Не образовывал ацетоин и не гидролизировал гиппурат.

Вирулентная активность LD₅₀ штамма *Streptococcus equi* Н-5/1 для белых мышей составляла 1×10^2 КОЕ/гол. при парентеральном введении.

Таким образом, установлено, что культура *Str. equi* «Н-5/1» по показателям культуральных, морфологических и биохимических свойств относится к семейству *Streptococcaceae*, роду *Str.*, виду *Str. equi* *ssp. equi* и соответствует типовым характеристикам представителей этого вида (Таблица 7). Идентификация штамма стрептококка «Н-5/1» проводилась с использованием стрипа «API 20 strep» тест системы «APIR» bioMerieux (Франция).

Штамм *Str. equi* «Н-5/1» выделен из смыва, вскрывшегося подчелюстного лимфоузла больного мытом жеребенка из с. Немюгюнцы Хангаласского улуса. Штамм *Str. equi* «Н-5/1» растет на 1%-ном МПБ с 10% сыворотки крови в виде равномерного помутнения среды с выпадением белого осадка, поднимающегося при встряхивании косичкой вверх. На 1%-ном МПА с 10% сыворотки крови дает рост в виде росинчатых мелких колоний. В ПЖА растет по ходу посева. С образованием кислоты без газа ферментирует мальтозу, глюкозу, сахарозу, а

лактозу, сорбит, маннит и дульцит не сбраживает. Соответствует виду *Streptococcus equi* по своим биохимическим свойствам.

Таблица 7 – Результаты комиссионных испытаний штамма *Str. equi* «Н-5/1»

Штамм <i>Str. equi</i> «Н-5/1»		
Культурально-морфологические свойства	Биохимические свойства	Вирулентная активность
Типичные граположительные бактериальные клетки шаровидной и овальной формы, расположенные попарно или в виде цепочек разной длины. На колумбийском агаре с добавлением 5% взвеси эритроцитов барана, образует мелкие полупрозрачные «росинчатые» колонии S-формы, окруженные зоной β-гемолиза. На триптон-соевом бульоне растет с образованием придонного осадка. Оставляет среду прозрачной. Неподвижны, каталазоотрицательны.	Продуцирует ферменты: β-глюкозидазу, β-глюкоронидазу и лейцинариламидазу. Ферментирует с образованием кислоты без газа эскулин, крахмал и гликоген. Аргинин, рибозу, арабинозу, маннит, сорбит, лактозу, трегалозу, инулин и раффинозу не сбраживает. Не образует ацетоин и не гидролизует гиппурат.	Летальная доза LD₅₀ для мышей составляет 1×10² микробных клеток (КОЕ) при парантеральном введении

В соответствии с проведенными исследованиями штамм *Str. equi* «Н-5/1» депонирован в коллекции микроорганизмов в ФГБУ «ВГНКИ» (регистрационный номер ВКШМ-Б141П от 22.05.2018 г.) (приложение А), получен патент на изобретение №2703485 «Штамм бактерий *Str. equi*, используемый для изготовления вакцины против мыта» от 17.10.2019 г. (приложение В).

Таким образом, штамм *Str. equi* «Н-5/1» может использоваться в качестве производственного при изготовлении иммунобиологических препаратов для профилактики мыта лошадей в Российской Федерации, а штамм *Str. equi* «Н-1

каз», выделенный от больной лошади из Республики Казахстан, может быть использован для разработки вакцины, используемой в табунном коневодстве Казахстана.

Производственный штамм микроорганизмов *Str. equi* «Н-5/1» сохраняет все свои основные свойства при хранении в холодильнике (+4°C) в течение 2 месяцев. В лиофилизированном состоянии в течение 12 месяцев сохраняется без существенного изменения биологических свойств.

2.6 Депонирование нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК штамма Н-5/1 в международной базе данных NCBI GenBank

В центре «Геномика» проведены исследования, подтверждающие наши результаты, а также проведено депонирование в международной базе данных.

Получена ДНК фрагмента гена 16S размером около 1500 н.п, с помощью ПЦР и специфических для гена 16S рРНК праймеров в препаративном количестве. Полученная ДНК очищена от компонентов реакции ПЦР (праймеры, dNTP, полимеразы) с помощью сорбции на магнитных частицах. Секвенограммы всех исследуемых образцов ДНК проанализированы на предмет гомологии/идентичности с помощью программы BLAST базы данных ГенБанк

Анализ секвенограмм гена 16S рРНК для изолята Н-5/1 позволил получить следующую нуклеотидную последовательность:

```
TGCAAGTGGAACGCACAGATGATACGTAGCTTGCTACAATTATCTGTGAGTCGCGAA
CGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTAGCTTATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACG
ATAGCTAATACCGCAAAAGTGGTTGACCCATGTTAACCATTTAAAAGGAGCAACAGC
TCCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCA
AGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGGAACCCT
GACCGAACAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCTAAGCTCTGTTGTTAGA
GAAGAACAGTGATGGGAGTGGAAAGTCCATCATGTGACGGTAACTAACCAGAAAGG
GACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCTGGT
TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGG
CTTAACCATTTGTATGCTTTGGAAACTGTAAACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGA
ATTCCATGGTAGGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCG
```

GCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
 GATACCCTGGTAGTCCACGCCTAAACCTGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGG
 CTTAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAACGGTGGGCATGTGGTTTAATTCTG
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGATGCTATTCTTAGAGATAA
 GAAGTTACTTCGGTACATTGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCGCTCGTGCGTG
 AGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTA
 AGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
 TCAATCATCAGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAAC
 GAGTCGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTGAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTG
 TAGGCTGCAACTCGCTACATGAATCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCG
 CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTA
 ACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGTAAGGAGCCAGCGC

Анализ с помощью BLAST показал, что эта последовательность соответствует генам 16S pPHK *Str. equi subsp. equi* двух штаммов — *Str. equi subsp. equi* strain NCTC9682 genome assembly, chromosome: 1 и *Str. equi subsp. equi* strain ATCC 39506, complete genome.

Таким образом, нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S pPHK изолята Н-5/1 после секвенирования депонирована в базе данных NCBI GenBank (MW486609) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW486609>.

2.7 Разработка технологии изготовления новой инактивированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором

На территории РФ в настоящее время выпуск вакцин для специфической профилактики мыта лошадей не производится. При этом ущерб, наносимый данным заболеванием, не вызывает сомнений. Нами были выделены и идентифицированы новые штаммы микроорганизмов *Str. equi* для последующего использования их в производстве новой вакцины против мыта лошадей. Далее для изготовления вакцины был выбран штамм *Str. equi* «Н-5/1», как наиболее активный по культурально-биохимическим, патогенным и иммуногенным показателям. В результате контроля накопления микробных клеток на обогащенном глюкозно-сывороточном бульоне установлено, что способность

накопления биомассы штамма *Str. equi* «Н-5/1» составляет 10-20 млрд. м.к./см³. Обогащенный глюкозно-сывороточный МПБ для выращивания необходимого бактериального сырья был выбран из-за его доступности, а также низкой себестоимости по сравнению с иными питательными средами.

Разработанная нами методика изготовления новой вакцины против мыта лошадей содержит в себе несколько этапов.

Сначала проводится освежение производственного штамма микроорганизма *Str. equi* «Н-5/1». Для этого штамм бактерий *Str. equi* «Н-5/1» выращиваем на 1% мясопептонном бульоне (МПБ), обогащенном глюкозой, содержащем 10% сыворотки крови лошади. Через 18 ч культивирования при $t+37^{\circ}\text{C}$ из выросшей бульонной культуры делаем посев на 1% мясо-пептонный агар с 10% сыворотки крови лошади. Через 18 ч культивирования при $t+37^{\circ}\text{C}$ из выросших в чашках Петри колоний отбираем характерные для бактерий *Str. equi* «Н-5/1» колонии и делаем пересев на скошенный в пробирках 1% мясо-пептонный агар с 10% сыворотки крови лошади. Так же через 18 ч культивирования выросшие колонии переносим в 1% мясо-пептонный бульон с 10% сыворотки крови. После каждого пересева проводилось окрашивание микроорганизмов по Граму.

После 18 ч культивирования проведено выращивание бактериологического сырья с использованием флаконов объемом 200 мл с МПБ, обогащенной до 1% концентрации глюкозой и 10% сывороткой крови лошади (рН 7.2-7.4). В приготовленный питательный бульон внесена культура штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1», содержащая не менее 2×10^9 микробных клеток в 1 мл по оптическому стандарту в объеме 2 см³. Инкубация произведена в шейкере-термостате при $t+37^{\circ}\text{C}$ в течение 18-20 часов. По окончании периода инкубации осуществлено окрашивание микроорганизмов по Граму.

Далее проведена инаktivация культуры. Для этого в полученное сырье (концентрация не менее 2×10^9 микробных клеток в 1 см³) внесен формалин в объеме 0,4 см³ (конечная концентрация 0,4%). Продолжительность полной инаktivации составляет 72 ч. при температуре $t+37^{\circ}\text{C}$. Проведены высевы

бактериальной массы на различные питательные среды (МПБ, МПА, 1% МПА и МПБ с глюкозой и 10% сывороткой крови, Эндо, Байрд-Паркера и Чапека) для четкого фиксирования полноты инактивации. Контроль полной инактивации длилось 10 суток. Кроме того, полнота инактивации проверена на белых мышах массой тела 16-18 г, над которыми также в течение 10 суток производилось наблюдение.

Следующим этапом изготовления вакцины является добавление 6% раствора гидроокиси алюминия (адьювант) для усиления иммунного ответа организма.

В качестве иммуномодулятора использовали КЖ штамма микроорганизмов *Bacillus subtilis* ТНП-3, депонированного в ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (RCAM) (справка о депонировании от 24.12.2017 г.). Доказано, что одновременное введение инаktivированных вакцин с культуральной жидкостью *Bacillus subtilis* ТНП-3 вызывает индукцию интерферона в высоких титрах в организме. Следовательно, штамм бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3 целесообразно использовать в качестве компонента вакцин для повышения иммунобиологической реактивности и напряженности иммунитета (М.П. Неустроев, К.П. Юров, 2006; Н.П. Тарабукина, М.П. Неустроев, 2006).

Штамм бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3 был культивирован на протяжении 5-7 суток в термостате при температуре 37°C. Бактериальную массу с содержанием 1 млрд. микробных клеток в 1 мл центрифугировали при 7000 об/мин для отделения культуральной жидкости в течение 15 мин. Далее ее пропускали через мембранный фильтр.

Культуральную жидкость (КЖ) штамма бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3 добавляли в соотношении 1:2, где одна часть вакцины составляет КЖ, а две части - штамм бактерий *Str. equi* «Н-5/1».

Далее разливка вакцины во флаконы, упаковка и этикетирование вакцин.

Готовая инактивированная вакцина против мыта прозрачная, светло-желтого цвета, характерен придонный осадок на дне флакона, которая при встряхивании легко разбивается в гомогенную взвесь.

2.7.1 Изучение параметров инаktivации формалином в различной концентрации

В качестве инактиватора нами выбран формалин, т.к. формалин обладает выраженным противомикробным действием, обусловленным способностью присоединяться к аминок группам белковых молекул. Таким образом, он сохраняет иммуногенные свойства возбудителя.

Для выполнения данной задачи в сырье из штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1» с концентрацией 2×10^9 микробных клеток в 1 см^3 начали вносить раствор формалина с концентрацией 0,2; 0,3; 0,4 и 0,5 % из расчета $0,4 \text{ см}^3$ раствора формалина на 200 см^3 сырья. Наблюдение за инаktivацией проводили в течение 10 суток при температурном режиме $+37^\circ\text{C}$, осуществляя периодическое помешивание. Изучение полноты инаktivации формалином в различных концентрациях провели на МПА и в МПБ. В таблице 8 представлены полученные результаты.

Таблица 8 – Подбор концентрации формалина для инаktivации штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1»

Инаktivирующее вещество	Концентрация формалина, %	Температурный режим, $^\circ\text{C}$	Длительность инаktivации, суток									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Формальдегид	0,2	$+37^\circ\text{C}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,3	$+37^\circ\text{C}$	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	0,4	$+37^\circ\text{C}$	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	$+37^\circ\text{C}$	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: где «+» - наличие роста на питательной среде; «-» - отсутствие роста.

Согласно данным таблицы 8, при концентрации формалина равной 0,4% полная инаktivация происходит за 48 часов, а 0,5% концентрацией – 24 часа.

Исходя из проведенных исследований по инаktivации штамма *Str. equi* «Н-5/1», нами выбрана для инаktivации бактериальной массы концентрация равная 0,4%. В готовой продукции процент содержания 0,4% формалина будет составлять 0,2% из 100%, что является безопасным для организма животного.

2.8 Доклинические испытания новой инаktivированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором

2.8.1 Определение стабильности вакцины

Для определения стабильности были отобраны 55 флаконов из трех серий препарата (№1, 2, 3) с вакциной, которые хранились в течение 24 месяцев при 8°C в холодильнике и в течение 30 дней при температуре 25°C в термостате.

При хранении в течение 24 месяцев при температуре 8°C каждые 3 месяца отбирали по 5 флаконам и определяли внешний вид, стерильность, безвредность и иммуногенность (Таблица 9).

Таблица 9 – Определение стабильности вакцины против мыта при хранении при 8°C в течение 24 месяцев

	Показатели	Сроки исследования (месяцы)							
		3	6	9	12	15	18	21	24
1	Внешний вид	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Стерильность	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Безвредность	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Иммуногенность (%)	90	90	90	90	70	60	50	50

Примечание: (-) – нет изменений, нарушений, (+) – есть изменения, нарушения.

Определение стабильности вакцины при хранении при 25°C (предусмотренных в условиях транспортировки) проводилось в течение 30 дней, через каждые 10 дней по 5 отобраным флаконам также определяли внешний вид, стерильность, безвредность и иммуногенность (Таблица 10).

Таблица 10 – Определение стабильности вакцины против мыта при хранении при 25°C в течение 30 дней

	Показатели	Сроки исследования (30 дней)		
		10	20	30
1	Внешний вид	-	-	-
2	Стерильность	-	-	-
3	Безвредность	-	-	-
4	Иммуногенность (%)	90	90	90

Примечание: (-) – нет изменений, нарушений, (+) – есть изменения, нарушения.

Таким образом, вакцина против мыта лошадей инактивированная сохраняется без изменения внешнего вида, стерильности, безвредности в течение 24 месяцев и иммуногенности в течение 12 месяцев при хранении при температуре 8°C. При температуре, предусмотренной в условиях транспортировки (25°C), сохраняет все свои свойства в течение 30 дней.

2.8.2 Определение внешнего вида и стерильности

Флаконы с препаратом просматривали в проходящем свете с целью выявления механических примесей, плесени, трещин флаконов и прочности укупорки.

Внешний вид и содержимое флаконов в течение 24 месяцев оставались без изменений.

Стерильность установлена в соответствии с ГОСТ28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности».

Стерильность определена методом бактериологического контроля, заключающийся в выявлении наличия бактерий, грибов и микоплазм в посевах лекарственных средств на питательные среды. Использовались следующие питательные среды с целью определения бактериологической чистоты: мясопептонный бульон (МПБ); мясопептонный агар (МПА); 1% мясопептонный бульон с добавлением глюкозы и сыворотки крови лошади (1% МПБ); 1%

мясопептонный агар с добавлением глюкозы и сыворотки крови лошади (1% МПА). Отсутствие плесневых грибов устанавливалась путем посева вакцины на среду Чапека.

При хранении в течение 24 месяцев при температуре 4°C, а также в течение 30 дней при температуре 25°C нарушение стерильности не установлено.

2.8.3 Определение безвредности

Степень безвредности вакцинного штамма оценивалась по величине максимально переносимой дозы для лабораторных животных. Исследование проведено на белых мышах с массой тела 18-20 г. Для этого приготовили смешанную пробу вакцины из 3 флаконов. Вакцину ввели подкожно в область спины в дозе 1,0 см³ трем белым мышам, согласно ГОСТ31926-2013 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности». Срок наблюдения 10 дней.

Во все сроки исследования в течение 10 суток наблюдения вакцина не вызвала гибели белых мышей. После омертвления по истечению срока наблюдения, не были обнаружены патолого-анатомические изменения во внутренних органах, характерных для мытной инфекции.

2.8.4 Изучение острой токсичности вакцины против мыта

Производимые иммунобиологические препараты для животных полностью обязаны соответствовать национальным и международным стандартам. Только безопасные вакцины могут применяться в практике, как прошедшие все этапы проверки в лабораторных условиях (стерильность, безвредность, иммуногенность). Вакцина не менее, чем на 80% должна предохранять животных от заболевания. Также при производстве иммунобиологических препаратов должен проводиться контроль по качеству каждой серии.

Изучение безопасности и острой токсичности вакцины против мыта лошадей при однократном внутрижелудочном введении проводилось на белых

беспородных мышах массой тела 16-18 г. Патоморфологические исследования осуществлены по общепринятым методикам.

До начала опытов за белыми мышами установлено наблюдение в течение 2 дней для исключения слабых. Животных разделили на две группы по три головы. Вакцину вводили в максимально допустимой дозе внутрижелудочно утром натощак:

1 группа: Белым мышам однократно ввели вакцину против мыта лошадей в дозе 1см^3 внутрижелудочно (2×10^9 КОЭ).

2 группа: Белым мышам контрольной группы однократно ввели дистиллированную воду в дозе 1 см^3 .

В течение 7 дней после введения препаратов вели клиническое наблюдение за белыми мышами. При этом каждый день учитывали прирост массы тела (Таблица 15). Состояние подопытных мышей в целом за время проведенного опыта было признано удовлетворительным, их двигательная активность, реакция на внешние раздражители сохранились, аппетит не нарушился, шерстный покров также оставался гладким. Изменения в консистенции кала у белых мышей не обнаружено. К завершению опыта наблюдался прирост массы тела на 0,6 г у белых мышей 1 группы, 2 группы – 0,5 г. (Таблица 11).

Таблица 11 – Учет массы тела белых лабораторных мышей

Группы	Дни наблюдения / масса тела, г.						
	1	2	3	4	5	6	7
1	17,2±1,34	17,4±0,56	17,4±1,06	17,6±0,91	17,7±0,63	17,8±0,77	17,8±0,28
2	17,1±0,77	17,1±0,35	17,4±0,70	18,1±0,70	17,7±0,56	17,5±1,2	17,6±0,77

Примечание: 1 группа – опытная; 2 группа – контрольная.

По истечении срока наблюдения животных умертвили спирт-эфиром.

Таким образом, по результатам клинического наблюдения установлено, что в изучаемых дозах вакцина против мыта лошадей на общее состояние животных отрицательно не влияет, аллергизирующими свойствами не обладает, судорожных реакций не вызывает, координацию движений не нарушает, токсического действия на организм лабораторных животных не оказывает.

Во внутренних органах патоморфологических изменения не установлены.

2.8.5 Изучение пирогенности вакцины против мыта лошадей

Опыты по определению пирогенности вакцины против мыта лошадей проводились согласно ГОСТ31926-2013 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности».

Испытание на пирогенность проводили на 2 группах по 3 головы здоровых кроликов мужского пола с массой тела 1,5-1,6 кг.

В течение трех суток перед испытанием препарата у кроликов утром ежедневно измеряли температуру тела до дачи корма при помощи медицинского ртутного термометра. Термометр вводили ректально на 5 мин. Результаты измерения температуры сразу фиксировали.

Кроликов за 18 часов до начала испытания отлучили от корма, прием воды не ограничивался. Во время самого опыта кроликов не кормили и не поили.

Непосредственно перед началом опытом: дважды, с интервалом не менее 30 минут, измеряли температуру тела у каждого кролика.

Перед инъекцией уши кроликов обработали 70%-ным спиртом. Вакцину против мыта (1 группа) вводили в ушную вену кроликов в дозе 0,1 см³. В качестве контроля (2 группа) 0,9% физиологический раствор вводили в аналогичной дозе. После введения препарата температуру тела измеряли с интервалом не более 30 минут на протяжении 3 часов. Результаты испытания вакцины на пирогенность приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Определение пирогенности вакцины против мыта лошадей

1 группа	2 группа
----------	----------

(3 головы) Вакцина против мыта лошадей	(3 головы) 0,9% физ.раствор
1 день (до) $38,6 \pm 0,77$	1 день (до) $38,7 \pm 0,42$
2 день (до) $38,5 \pm 0,84$	2 день (до) $38,3 \pm 0,35$
3 день (до) $38,8 \pm 0,63$	3 день (до) $38,8 \pm 0,21$
До инъекции	
$38,5 \pm 0,49$	$38,5 \pm 0,21$
За 30 мин до инъекции	
$38,2 \pm 0,35$	$38,5 \pm 0,14$
Через 30 минут после инъекции	
$37,9 \pm 0,91$	$38,6 \pm 0,21$
Через 1 час после инъекции	
$38,1 \pm 0,35$	$38,4 \pm 0,42$
через 1,5 часа после инъекции	
$38,4 \pm 0,49$	$38,5 \pm 0,14$
Через 2 часа после инъекции	
$38,5 \pm 0,56$	$38,5 \pm 0,07$
Через 2,5 часа после инъекции	
$38,7 \pm 0,14$	$38,7 \pm 0,35$
Через 3 часа после инъекции	
$38,8 \pm 0,56$	$38,7 \pm 0,07$
$+0,3$	$+0,2$

Приведенные в таблице 12 данные показывают незначительное кратковременное повышение температуры тела у животных обеих групп на протяжении 3 часов. В то же время при клиническом осмотре кроликов обеих групп не наблюдались какие-либо признаки заболевания, общее состояние оставалось в норме, слизистые оболочки бледно-розового цвета, отсутствовали истечения из носа и глаз. Таким образом, незначительное повышение температуры тела интерпретировали, как стрессовое состояние из-за многократных ректальных измерений температуры тела. Вакцина апиногенна.

2.8.6 Иммунобиологические свойства вакцины против мыта лошадей

Данная работа проведена с соблюдением всех правил и норм по контролю иммуногенных лекарственных средств, предназначенных для использования в ветеринарии.

Изучения иммунобиологических свойств вакцины проводились на белых мышах. В начале была определена средняя летальная доза LD₅₀ вирулентного штамма *Str. equi* «Н-5/1» путем титрования на белых мышах.

Для определения иммунобиологических свойств использовали свежевыращенную культуру штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1». После пересева на кровяной МПА культуру доводили до необходимой концентрации (2×10^9 микробных тел в 1 см³). Далее были подготовлены серийные разведения на стерильном 0,9% физиологическом растворе со следующими концентрациями микробных клеток в 1 см³: 2×10^8 , 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 .

Подкожно в область спины разведенной культурой в дозе 0,2 см³ заражали по четыре белой мыши из каждой пробирки. С целью контроля четырем мышам вводилось по 0,2 см³ стерильного физраствора. В течение 15 дней проводились наблюдения. В таблице 13 приведены результаты заражения белых мышей разными дозами мытного стрептококка.

Таблица 13 – Определение летальной дозы (LD₅₀) штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1»

1 группа по 4 гол. белых мышек	2 группа по 4 гол. белых мышек	3 группа по 4 гол. белых мышек	4 группа по 4 гол. белых мышек	5 группа по 4 гол. белых мышек	6 группа по 4 гол. белых мышек	7 группа по 4 гол. белых мышек
1'-200млн м.т.	2'-20 млн м.т.	3'-2млн м.т.	4'-200 тыс м.т.	5'-20 тыс м.т.	6'-2 тыс м.т.	7'-200 м.т.
Пало, гол. (наблюдение в течение 15 суток)						

4	3	3	2	1	-	-
Процент заражения, %						
100	75	75	50	25	0	0

Примечание: «м.т.» - микробные тела

Как показывают данные таблицы 13, летальная доза, которая вызывает гибель всех белых мышей в группе (абсолютная летальная доза) составляет 2×10^8 (200 млн.) микробных тел в 1 см³. Средняя смертельная доза (LD₅₀), которая убивает 50 % животных в группе – 2×10^5 (200 тыс.) микробных тел в 1 см³.

Следующим исследованием стало определение иммунизирующей дозы (ИмД) вакцины против мыта лошадей.

Исследования проводились на 60 белых мышах массой 16-18 г. Были сформированы 6 групп по 10 голов, одна из которой – контрольная группа (без вакцинации). Испытаны следующие дозы: 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 и 0,1 мл.

Готовую вакцину ввели подкожно 50 белым мышам с массой тела 16-18 г в область спины. Через 10 дней после иммунизации мышам опытной и контрольной группы ввели в область спины подкожно вирулентный штамм *Str. equi* «Н-5/1» в дозе LD₅₀. Ранее предварительно на лабораторных животных определена летальная доза производственного штамма *Str. equi* «Н-5/1». (LD₅₀), который депонирован в коллекции микроорганизмов в ФГБУ «ВГНКИ» (регистрационный номер ВКШМ-Б141П от 22.05.2018 г.). В таблице 14 представлены полученные результаты.

Таблица 14 – Определение иммунизирующей дозы вакцины против мыта лошадей инактивированной с иммуномудяторм на лабораторных животных

№	Название препарата	Иммун изиру ющая	Коли честв о	Коли честв о	Штамм, концентрац ия м.т. / см ³	Результаты	
						пало	выжило

						Кол-во животных	%	Кол-во животных	%
1	Вакцина против мыта лошадей инактивированная с иммуномодулятором	0,5	1000	10	<i>Str. equi</i> «Н-5/1», 200 тыс. м.т.	2	20	8	80
2		0,4	800	10		1	10	9	90
3		0,3	600	10		1	10	9	90
4		0,2	400	10		1	10	9	90
5		0,1	200	10		5	50	5	50
6	Контроль (без вакцинации)	-		10		9	90	1	10

В течение всех 10 дней наблюдения не выявлены признаки реактогенности и токсичности вакцины. За 10 дней наблюдения из 1 группы заболели и погибли 2 гол.; из 2, 3 и 4 группы по 1 гол.; из 5 группы – 5 гол. и из 6 группы (контроль) – 9 гол.

В результате проведенного исследования по определению иммунизирующей дозы вакцины против мыта на белых мышах установлено, что доза, содержащая 4×10^8 микробных клеток при однократном введении содействует созданию 90% защиты вакцинированных белых мышей от патогенного штамма *Str. equi* «Н-5/1», при фиксации гибели 90% не вакцинированных мышей (контрольная группа). Средняя иммунизирующая доза (ИД50), которая вызывает иммунитет у 50% иммунизированных мышей после заражения вирулентным штаммом составила 2×10^8 м.т.

Таким образом, в результате доклинических испытаний доказано, что вакцина против мыта лошадей является безвредной, стерильной, апиrogenной, ареактогенной и высокоиммуногенной.

2.9 Клинические испытания вакцины против мыта лошадей на целевых животных и экономическая эффективность

Клинические испытания новой инактивированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором проводились в коневодческих хозяйствах

Хангаласского, Намского улусов и пригороде г. Якутска Республики Саха (Якутия). Эти хозяйства являются стационарно неблагополучными по мыту лошадей. Места проведения иммунизации согласованы с Департаментом ветеринарии РС (Я).

Для проведения испытаний изготовлены несколько серий вакцины против мыта лошадей по разработанной методике. Каждая серия вакцины проходила ряд контрольных испытаний по стерильности, иммуногенности и безвредности на лабораторных животных. Состав включает в себя инаktivированную культуру штамма бактерий *Str. equi* Н-5/1, депонированный во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве ФГБУ ВГНКИ (рег. № ВКШМ Б-141П, справка о депонировании от 31 мая 2018 г.) и иммуномодулятор – культуральная жидкость из штамма бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3, который также депонирован в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ (рег. № РСАМ04759 от 15.12.2017 г.).

Вакцину использовали по назначению согласно временному наставлению «Временное наставление по применению инаktivированной вакцины с иммуномодулятором против мыта лошадей» от 02.07.2018 г. (Утверждено директором Якутского НИИ сельского хозяйства). В каждом хозяйстве был иммунизирован молодняк лошадей до одного года. Иммунизация проведена после отъема жеребят от матерей, то есть в первой и второй декадах ноября. Применение вакцины производилось однократно путем внутримышечного введения в область верхней трети шеи в дозе 3,0 см³. Предварительно за 10-14 дней до вакцинации проведена дегельминтизация препаратом «Ивермек» согласно инструкции по применению. Клиническое состояние животных проконтролировано в течение 6-7 месяцев. Результаты производственных испытаний приведены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты производственных испытаний вакцины против мыта инактивированной с иммуномодулятором

№ п/п	Наименование улусов/хозяйств	Иммунизировано голов	Из них		Эффективн ость, %
			Заболело	Здоровых	
1	Хангаласский (ЛПХ с.Техтюр)	21	-	21	100
2	Хангаласский (частные сектора с. Немюгюнцы)	13	-	13	100
3	Хангаласский (ООО Конезавод «Берте»)	28	1	27	96,4
4	Намский (частные сектора с. Партизан, с. 1-Хомустах)	6	-	6	100
5	г. Якутск (частный сектор)	18	-	18	100
6	г. Якутск, местность «Ус-Хатын»	27	2	25	92,5
7	Тулагино- Кильдямский наслег (частные сектора)	15	-	15	100
Итого		128	3	125	97,6

Всего иммунизировано за год (2018-2019 гг.) 128 голов молодняка лошадей 6-8-месячного возраста. Наблюдение за иммунизированными животными осуществлялось постоянно. У всех животных до иммунизации температура тела фиксировалась в пределах физиологической нормы, аппетит был сохранен, угнетения не наблюдались.

После введения препарата не наблюдалось нарушения аппетита, угнетенного состояния.

Следовательно, полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии инактивированной вакцины против мыта на целевых животных. Из 128 иммунизированных животных заболели 3 головы. Эффективность иммунизации составила 97,6%. Предварительно установлено, что иммунизация вакциной против мыта предохраняет до 90% белых мышей от экспериментального заражения патогенным штаммом мытного стрептококка. Проведенный опыт по

производственному испытанию подтвердил высокую иммуногенность инактивированной вакцины против мыта.

Для изучения влияния инактивированной вакцины против мыта на физиологическое состояние целевых животных оценивался морфологический и биохимический состав крови.

Как известно, кровь снабжает все органы и ткани организма кислородом и всеми необходимыми питательными веществами. Состав и свойства крови отражает изменения, происходящие в организме в целом, поэтому исследования крови считаются важнейшими методами диагностики.

Исследование динамики морфологического состава крови осуществлялось на жеребятках до и после вакцинации против мыта лошадей в хозяйствах с. Техтюр Хангаласского района (Таблица 16).

Животных разделили на 2 группы, чтобы в каждой группе было по 10 голов молодняка 7-8-месячного возраста. Животных держали в подворье под постоянным наблюдением. Кровь для исследования брали до и после вакцинации через 3-4 месяца из яремной вены с соблюдением всех правил асептики и антисептики.

Морфологическое исследование включало определение содержания гемоглобина коллометрическим способом, эритроцита и лейкоцита в камере Горяева.

Таблица 16 – Динамика морфологических показателей крови молодняка лошадей до и после иммунизации

Группы	До иммунизации		
	Гемоглобин, г %	Эритроциты, млн. в 1 м ³	Лейкоциты, млн. в 1 м ³
Контрольная	13,6±0,42	5,5±0,40	10,2±0,87
Опытная	13,7±0,64	5,4±0,54	10,6±0,28
<i>в % к контрольной</i>	100,5	98,2	103,9

<i>P</i>	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Группы	Через 3 месяца после иммунизации опытной группы		
	Гемоглобин, г %	Эритроциты, млн. в 1 м³	Лейкоциты, млн. в 1 м³
Контрольная	12,6±0,63	5,8±0,29	11,8±0,35
Опытная	12,7±0,12	6,7±0,31	11,3±0,45
в % к контрольной	100,8	115,5	95,7
<i>P</i>	P>0,05	P<0,01	P<0,05

Гемоглобин в крови животных является основным дыхательным пигментом, а также главным компонентом эритроцита, который выполняет перенос кислорода из легких в ткани и углекислого газа из тканей в легкие. В литературных данных написано, что у лошадей физиологическая норма концентрации гемоглобина в крови составляет 80-140 г/л или 8,0-14,0 г %. В наших исследованиях, как показано в таблице 20, содержание гемоглобина в крови до и после иммунизации спустя 3 месяца у обеих групп оставалось в пределах физиологической нормы. Так, у животных обеих групп после повторного взятия крови наблюдается снижение гемоглобина по сравнению с началом опыта, которое не переходит физиологическую норму (рисунок 7).

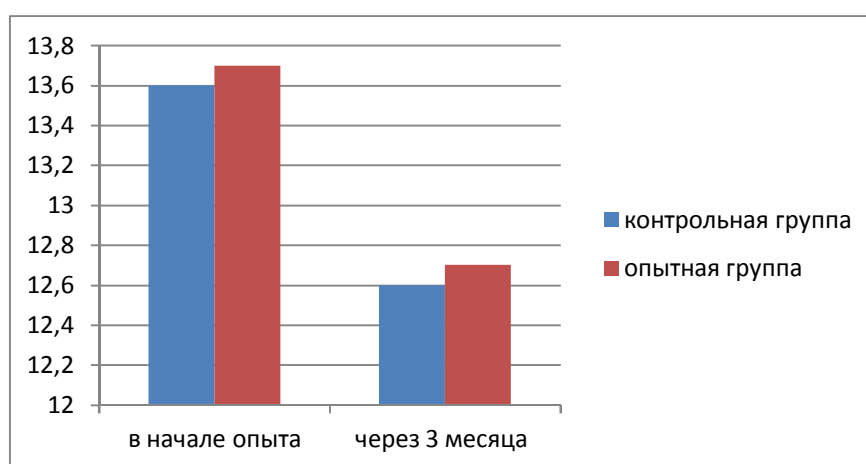


Рисунок 7 - Изменение содержания гемоглобина в крови животных, г %

Эритроциты – красные кровяные клетки, которые составляют главную массу клеток крови. Они выполняют ряд важных функций: дыхательную функцию; участвуют в реакции кислотно-щелочного равновесия (рН крови) благодаря наличию гемоглобина; транспортировку питательных веществ; участвуют в процессах иммунитета, так как у них в строении находятся антигены, которые распознают попадание чужеродных антигенов. Физиологическая норма содержания эритроцита в крови у лошадей колеблется от 6,0 до 9,0 млн. в 1 м^3

В момент повторного взятия крови наблюдается увеличение концентрации эритроцитов у животных контрольной группы на 0,3 млн. в 1 м^3 , а у опытной – 1,3 млн. в 1 м^3 . Таким образом, к концу опыта животные опытной группы превосходили животных контрольной группы по содержанию эритроцитов на 0,9 млн. в 1 м^3 или 15,5% ($P < 0,01$) (рисунок 8).

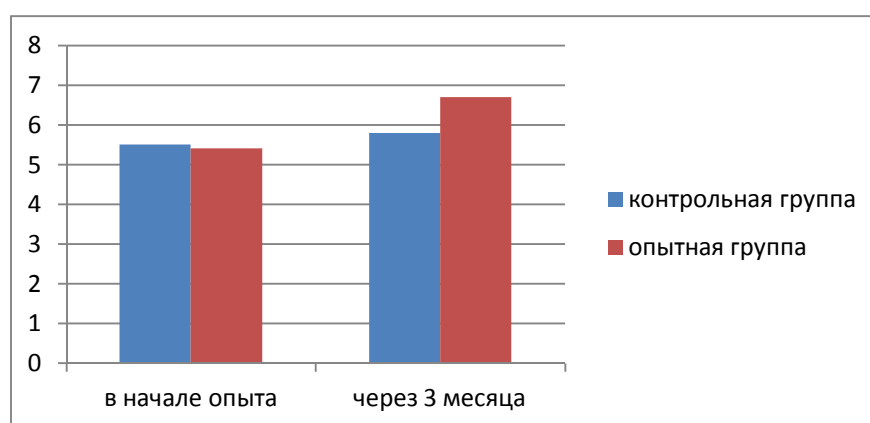


Рисунок 8. Изменение количества эритроцитов в крови животных, млн. в 1 м^3

Лейкоциты – это белые кровяные клетки, которые выполняют в организме защитную функцию от паразитарных инвазий, бактериальных и вирусных инфекций, а также поддерживают тканевой гомеостаз и участвуют в регенерации тканей. В норме у лошадей лейкоцитов в крови должно быть 7-12 млн. в 1 м^3 . Из литературных источников известно, что концентрация всех форменных элементов крови зависит от породы, возраста и условий содержания и кормления животных (Ю.Г. Быковченко, К.У. Уракунова, Р.С. Салыков и др., 2017).

Анализируя результаты исследования крови на содержание лейкоцитов можно констатировать, что в начале опыта (до вакцинации) у опытной группы

концентрация лейкоцитов было на 0,4 млн. в 1 м³ или 3,9 % выше, чем у контрольной. К окончанию опыта (через 3 месяца после вакцинации) у опытной группы содержание лейкоцита крови ниже на 0,5 млн. в 1 м³ или 4,4 %, чем у контрольной группы, разница достоверна при $P < 0,05$ (рисунок 9).

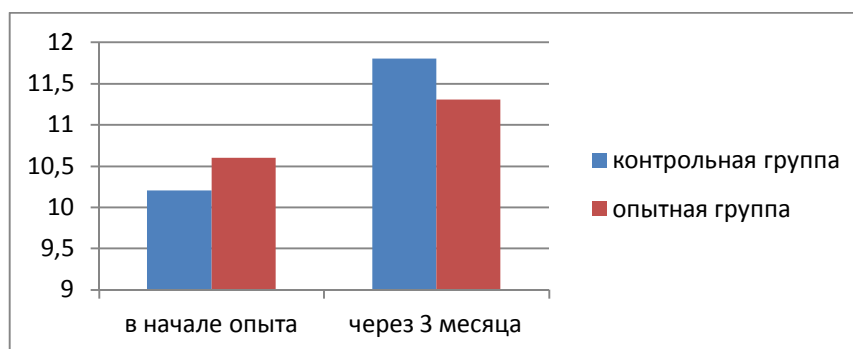


Рисунок 9. Содержание лейкоцитов в крови животных, млн. в 1 м³

Следует отметить, что морфологические показатели крови у всех животных на протяжении всего опыта находились в пределах физиологической нормы.

Биохимические исследования сыворотки крови животных выполнены на инфракрасном анализаторе «SpectraStar 2200». Изучение динамики биохимических показателей включало определение содержания общего белка, а также его фракций (таблица 17).

Одними из самых важных составных частей сыворотки крови являются белки и его фракции. Они выполняют ряд главных функций: поддержание рН и осмотического давления в крови; транспортировка углеводов, липидов, гормонов, витаминов, неорганических ионов и т.д., а также играют важную роль в образовании иммунитета.

Следовательно, целесообразно было исследовать в сыворотке крови у подопытных животных концентрацию общего белка и его фракций.

Данные таблицы 17 показывают, что спустя 3 месяца после иммунизации в крови у животных обеих групп (контрольная, опытная) отмечено снижение общего белка и его фракций примерно на одинаковом уровне. Мы предполагаем, что это может быть связано с сезонностью, так как повторное взятие крови

совпадает с весенним периодом. Молодняк в это время недополучает с кормом необходимые питательные вещества, из-за этого происходит перестройка обменных процессов, направленная на потребление резервных веществ. Однако в течение всего периода у обеих групп показатели общего белка и его фракций выявлены в пределах физиологической нормы.

Таблица 17 – Содержание общего белка и его фракций в крови молодняка лошадей до и после иммунизации

Группы	Общий белок, г/л	Албумины, г/л	Глобулины, г/л		
			Альфа	бета	гамма
До иммунизации					
Контрольная	70,5±0,23	28,9±0,28	11,9±0,13	16,8±0,17	15,5±0,16
Опытная	71,9±0,25	30,5±0,33	12,7±0,13	17,8±0,18	16,5±0,18
в % к контрольной	101,9	105,5	106,7	105,9	106,4
P	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
Через 3 месяца после иммунизации опытной группы					
Контрольная	68,4±0,32	26,5±0,36	10,9±0,16	15,4±0,22	14,07±0,22
Опытная	69,8±0,15	28,07±0,17	11,6±0,07	16,3±0,1	15,03±0,1
в % к контрольной	102,0	105,9	106,4	105,8	106,8
P	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001

На основе клинических исследований изучена напряженность иммунитета и эпизоотическая эффективность на целевых животных.

Согласно принятой методике определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий, одобренной МСХ и продовольствия РФ и утвержденной Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ (1997 г.) произведен расчет экономической эффективности.

Расчет эффективности проводили при 100 гол. молодняка в целях повышения информативности.

Наши исследования, проведенные в 2016-2020 гг. в центральной группе улусов, где сосредоточено около 50% поголовья лошадей, показывают значительную распространенность мыта жеребят. Так, в отдельные годы в хозяйствах Намского, Хангаласского, Усть-Алданского и Мегино-Кангаласского улусов мыт регистрируется ежегодно и охватывает до 65% поголовья жеребят.

Болезнь регистрируется в летний, осенний и зимний периоды. Учитывая вышеизложенное, процент заболеваемости можно принять равным 65%, а летальность – 5% (по отчетным данным).

Для выявления экономического ущерба от падежа и вынужденного убоя (Y_v) использовалась формула:

$$Y_1 = M \times Ж \times Ц - C_{ср}, \text{ где} \quad (1)$$

M – число павших и вынужденно убитых животных, голов;

$Ж$ – средняя живая масса одного жеребенка 6-8-месячного возраста, кг;

$Ц$ – закупочная цена 1 кг живой массы, тыс. руб. (принятая 2018-2020 гг.);

$C_{ср}$ – выручка от реализации продуктов убоя и трупного сырья, тыс. руб.

Средняя живая масса жеребят в период отъема составляет 204,3 кг (по данным Н.Д. Алексеева и Н.П. Андреева, 1982). Выручку от реализации продуктов убоя или трупного сырья 1 головы можно принять за 2 тыс. рублей. Закупочная цена 1 кг живой массы – 250 рублей.

$$Y_1 = 1 \times 204,3 \times 0,25 - 2 = 49,13 \text{ тыс. руб.}$$

$$Y_1 = 5 \times 204,3 \times 0,25 - 10 = 245,65 \text{ тыс. руб.}$$

Таким образом, 49,13 тыс.руб. составит ущерб от падежа или вынужденного убоя 1 гол. жеребенка вследствие заболевания мытом. Следовательно, при 5 гол. падежа – 245,65 тыс. рублей.

Ущерб вследствие снижения продуктивности животных из-за их заболевания (U_2) определялся по формуле:

$$U_2 = M_3 \times (B_3 - B_6) \times T \times Ц, \text{ где} \quad (2)$$

M_3 – число заболевших животных, голов;

B_3 и B_6 – среднесуточные привесы здоровых и больных жеребят в расчете на 1 голову, кг;

T – средняя продолжительность заболевания, дни;

$Ц$ – закупочная цена 1 кг живой массы, тыс. руб. (принятая в 2018-2020 гг.).

Известно, что в условиях Якутии при выделении на 1 голову менее 14 ц сена и 2 ц овса на период зимнего содержания жеребят, масса тела не повышается или увеличивается незначительно и к 12-месячному возрасту молодняк в абсолютном большинстве имеет почти точно такую же массу, что и полгода назад (в 6-месячном возрасте). Иногда в этот период молодняк сильно худеет и дает отвесы (Н.Д. Алексеева, Н.П. Андреева, 1982). Исходя из этого среднесуточные привесы (B_3) принимали равными нулю (0). Ранее установлено, что у больных мытом жеребят живая масса ежесуточно снижается на 0,3 кг по сравнению со здоровыми.

$$U_2 = 65 \times (0 - (-0,3)) \times 25 \times 0,25 = 121,88 \text{ тыс. руб.}$$

$$U_2 = 1 \times (0 - (-0,3)) \times 25 \times 0,25 = 1,88 \text{ тыс. руб.}$$

Следовательно, общий ущерб ($U_0=U_1+U_2$):

$$U_0 = 245,65 + 121,88 = 367,53 \text{ тыс. руб.}$$

Делением полученной общей суммы экономического ущерба на количество заболевших животных выявлена удельная величина экономического ущерба (K_y), причиняемого данным заболеванием.

$$K_y = 367,53 \div 65 = 5,65 \text{ тыс. руб.,}$$

иными словами, экономический ущерб на одного заболевшего жеребенка 6-12-месячного возраста составит 5,65 тыс.руб.

При внедрении вакцины против мыта заболеваемость снизилась до 3% при отсутствии летальности. Ущерб в денежном выражении составит:

$$Y_2 = 3 \times (0 - (-0,3)) \times 25 \times 0,25 = 5,63 \text{ тыс. руб.}$$

Экономический ущерб на 100 голов снизится:

$$367,53 \div 5,63 = 65,28 \text{ раз.}$$

А на одну голову:

$$5,65 \div 1,88 = 3 \text{ раза.}$$

На основе базисных коэффициентов заболеваемости, удельных сумм экономического ущерба, затрат на ветмероприятия, а также потерь продукции в денежном выражении исчисляется экономическая эффективность ветеринарных мероприятий. Расчет производится на одно животное с вычитанием из полученных сумм соответствующих показателей нового варианта.

Для вычисления экономического эффекта (Э) от внедрения используемых препаратов и методов (вакцин и др. биопрепаратов), защищающих животных от болезней, рекомендуется использовать следующую формулу:

$$\text{Э} = [(C_6 + Y_6) - (C_n + Y_n)] \times A_n, \text{ где} \quad (3)$$

C_6 и C_n – себестоимости обработки одного животного при базовом и новом вариантах;

Y_n и Y_6 – удельные суммы экономического ущерба, причиненного данной болезнью, при новом и базовом вариантах;

A_n – количество животных, обработанных данным препаратом.

Затраты на ветеринарные мероприятия при однократном введении вакцины составят 0,6 тыс. руб. (на 1 голову вакцина 300 руб, услуги 300 руб.). Для профилактики и лечения мыта в базовом варианте используется бициллин - 5. Его стоимость при двукратном введении равняется 0,32 тыс. руб. Услуги ветеринарного специалиста – 500 руб.

Экономический эффект при внедрении на 100 голов жеребят составит:

$$\mathcal{E} = [(0,82 + 5,65) - (0,6 + 1,88)] \times 100 = 6,47 - 2,48 \times 100 = 3,99 \times 100 = 399,0 \text{ тыс. руб}$$

А при иммунизации 50% поголовья по республике, оставляемого на воспроизводство, будет получен экономический эффект на общую сумму 49 млн. 356 тыс. рублей.

$$(\mathcal{E} = 3,99 \times 12370 = 49356,3)$$

Экономический эффект на 1 рубль затрат – 6,65 рублей,

$$([(399 \div (0,6 \times 100))] = 399 \div 60 = 6,65),$$

на 1 голову – 3,99 тыс. руб., $(399 \div 100)$.

Фактический экономический эффект от внедрения метода профилактики мыта в 2018-2019 гг. равнялся:

$$\mathcal{E} = (0,82 + 5,65) - (0,6 + 1,88) \times 128 = 6,47 - 2,48 \times 128 = 3,99 \times 128 = 510,72 \text{ тыс. руб.}$$

На 1 рубль затрат – 6,65 руб. $(0,6 \times 128 = 76,8 \text{ тыс. руб.}, 510,72 \text{ тыс. руб.} \div 76,8 = 6,65 \text{ руб.}).$

Также и по данной формуле можно определить экономический эффект, полученный в результате осуществления профилактических и лечебных мероприятий ($\mathcal{E}$):

$$\mathcal{E}_в = \Pi_y + Д_c + \mathcal{E}_з - З_в, \text{ где} \quad (4)$$

Π_y – экономический ущерб, который предотвращен в результате проведения ветеринарных мероприятий, тыс. рублей;

$Д_c$ – стоимость, которая дополнительно получена за счет увеличения количества и повышения качества продукции, тыс. рублей;

$\mathcal{E}_з$ – экономия трудовых и материальных затрат вследствие применения более эффективных средств и методов проведения ветмероприятий;

$З_в$ – затраты на ветеринарные мероприятия, руб.

Денежное выражение вероятных потерь продукции животноводства, недопущенных в результате проведения комплекса ветеринарных мероприятий, обеспечивающих предупреждение возникновения болезней, ограничение их

распространения и сокращение заболеваемости и падежа животных в совокупности определяется как предотвращенный экономический ущерб.

Экономический ущерб, который предотвращен в результате проведенных профилактических мероприятий при инфекционных болезнях животных, реально определить как в отдельном хозяйстве, так и в отдельных улусах или в целом по территории республики.

С целью определения предотвращенного ущерба (P_y) в каждом отдельном хозяйстве на 100 голов используется формула:

$$P_y = M_o \times K_z \times K_y - Y, \text{ где} \quad (5)$$

M_o – общее поголовье восприимчивых животных, голов;

K_z – коэффициент возможной заболеваемости животных в неблагополучных звеньях;

K_y – удельная величина экономического ущерба, в расчете на одно заболевшее животное;

Y – фактический экономический ущерб в хозяйстве, тыс. рублей;

$$P_y = 100 \times 0,7 \times 5,65 - 5,63 = 389,87$$

Экономический эффект:

$$Э_v = P_y - Z_v = 389,87 - 60 = 329,87 \text{ тыс. рублей.}$$

На 1 рубль затрат:

$$329,87 \div 60 = 5,49 \text{ рублей.}$$

Рассчитанные двумя формулами (3) и (4) суммы экономического эффекта существенной и ощутимой разницы не имеют. То есть, для определения эффективности ветеринарных мероприятий при инфекционных болезнях возможно использовать обе формулы.

Внедряя разработки по отдельным хозяйствам, получим экономический эффект, который на 1 голову составит 3,99 тыс. рублей, на 1 рубль затрат – 6,65 рублей. В целом по республике экономический эффект получится на сумму 49 млн. 356 тыс. рублей.

Следовательно, разработанный нами метод специфической профилактики мыта лошадей является экономически эффективным и эпизоотически

обоснованным, его следует представить для рассмотрения в Россельхознадзор и ВГНКИ ветеринарных препаратов.

2.10 Разработка досье на вакцину. Утверждение в Россельхознадзоре

Нами подготовлено регистрационное досье для экспертизы и регистрации лекарственного препарата «Вакцина против мыта лошадей инактивированная» в Россельхознадзоре.

Досье на вакцину против мыта складывалось из следующих документов: заявление, копия лицензии на производство, проект нормативного документа, информация о фармацевтической субстанции, отчет о результатах доклинических исследований, отчет о результатах клинических исследований, проект инструкции лекарственного препарата для ветеринарного применения, проекты макетов первичной упаковки и вторичной (потребительской) упаковки лекарственного препарата для ветеринарного применения, сведения о лекарственном препарате, информация об отсутствии фактов регистрации препарата за пределами Российской Федерации и документы по уплате государственной пошлины за экспертизу и за выдачу регистрационного удостоверения лекарственного препарата.

Проект нормативного документа (Вакцина против мыта лошадей инактивированная «НД» - ООО НПЦ «Хоту-Бакт» 1 - 2021) состоит из титульного листа и имеет следующие разделы: область применения; технические требования и методы контроля качества; требования безопасности; правила приемки, методы исследований; условия хранения, транспортировки и срок хранения; указания к применению; гарантии изготовителя. Нормативный документ утвержден директором ООО НПЦ «Хоту-Бакт» и согласован Заместителем руководителя Россельхознадзора.

В документе о фармацевтических субстанциях, которые входят в состав вакцины против мыта лошадей подробно изложены все имеющиеся сведения о штаммах бактерий *Streptococcus equi* Н-5/1 и *Bacillus subtilis* ТНП-3 (место и способы выделения, культурально-морфологические свойства, молекулярно-

генетические характеристики штамма (идентификация), биологические характеристики, форма и условия хранения штамма, место депонирования, способы освежения). Кроме того, этот документ включает в себя сведения о технологии производства с описанием всех стадий производства и методов контроля на стадиях производства с предоставлением блок-схемы технологического процесса.

В *отчетах доклинических и клинических испытаний* приведены результаты исследований, проведенных на лабораторных и целевых животных (определение острой токсичности, пирогенности, иммуногенности на лабораторных животных; определение переносимости, изучение напряженности иммунитета и эпизоотической эффективности вакцины против мыта в производственных условиях).

Проект инструкции по применению лекарственного препарата для ветеринарного применения «Вакцина против мыта лошадей инактивированная» составлен с учетом всех проведенных исследований, входящих в рамках доклинических и клинических испытаний. Проект инструкции по применению включает в себя следующие пункты: общие сведения, биологические свойства и порядок применения.

В документе *«Сведения о лекарственном препарате»* собраны следующие данные: описание и состав лекарственного препарата; описание фармацевтической разработки (обоснование выбора состава лекарственного препарата, первичной упаковки, в том числе типа материалов, способа укупорки, открывания); микробиологические характеристики; сведения о материальном балансе для производства серии готового продукта; описание процесса производства и его контроля с указанием технологии производства с описанием стадий производства; описание контроля критических стадий производства; описание характеристик и свойств упаковочных материалов и укупорочных средств; документальное подтверждение (валидация) процессов и (или) их оценка; аналитические методики, используемые при осуществлении контроля качества и их валидация и т.д.

Научно-техническая документация и вакцина против мыта успешно прошли экспертизу ВГНКИ ветеринарных препаратов. Вакцина зарегистрирована в реестре лекарственных средств для ветеринарного применения (Россельхознадзор РФ) под регистрационным номером № 71-1-27.21-4828 № ПВР-1-27.21/03691 от 08.12.2021 г. (приложение Г).

ГЛАВА 3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Заболеваемость мытом лошадей остается одной из серьезных проблем табунного коневодства. Данная болезнь имеет распространение по всему миру, в том числе и в Российской Федерации.

В Республике Саха (Якутия) заболевание регистрируется во всех районах. Нами проведен анализ отчетных данных Департамента ветеринарии МСХ РС(Я) с 1985 по 2020 годы. По нему заболеваемость в среднем составляет – 0,9% от общего поголовья молодняка лошадей, а летальность в среднем – 5,5%. Однако, по нашим наблюдениям и исследованиям, заболеваемость мытом в Республике Саха (Якутия) остается высокой.

По нашему мнению, отчетные данные ветеринарной службы республики не могут отразить настоящую эпизоотическую картину по мыту по следующим причинам:

- ✓ атипичная форма мыта трудно диагностируется;
- ✓ в хозяйствах плохо организован учет заболеваемости и падежа лошадей;
- ✓ отчетные данные отражают данные только текущего года, а мыт отмечается в осенний, зимний и весенний периоды;
- ✓ отсутствие эффективных методов экспресс диагностики и дифференциации.

Особенно неблагополучным были 2016 и 2017 гг. Болезнь регистрировалась с летнего периода в Хангаласском, Мегино-Кангаласском, Усть-Алданском и Намском улусах.

М.П. Неустроев (1997) указывает, что возникновению и распространению мыта лошадей в нашей республике способствует системное ослабление естественной резистентности организма животных из-за неблагоприятных факторов внешней среды. Такие, как неполноценное белково-витаминно-минеральное питание, нережимная подкормка, а также резкие колебания температуры воздуха и длительные перегоны табунов. Поэтому в условиях

Якутии мыт имеет ярко выраженный сезонный характер и периодичность (через 2-3 года). Стационарность мыта лошадей в Монголии также отмечает в своих исследованиях Р.Б. Чысыма (1989).

В Якутии заболеваемость мытом лошадей пика достигает в ноябре. Это объясняется тем, что по принятой технологии ведения коневодства отъем жеребят от матерей проводят в октябре-ноябре, когда суровые погодные условия способствуют снижению резистентности организма жеребят. Также большое скопление поголовья лошадей разных возрастов в момент отъема, среди которых имеются носители инфекции, приводит к пассированию возбудителя мыта из организма в организм, вследствие чего он становится более вирулентным. Не исключается передача возбудителя через корм, почву и инвентарь (М.П. Неустроев, 2000).

Известно, что профилактика является эффективным и менее затратным способом устранения заболеваний. Существуют специфические иммуногены, которые после однократного применения способны защищать от инфекции пожизненно. В современном мире изготавливают и применяют разные виды вакцин (инактивированная, аттенуированная, живая), из них случаев неудачных попыток по изысканию эффективных средств профилактики множество.

Вакцинные препараты, предложенные в ранних исследованиях многих авторов из живых, ослабленных, убитых штаммов мытного стрептококка не нашли практического применения (P.L. Bazelley, 1940, 1942, 1943; П.К. Полищук, 1951; Л.А. Степанова, 1966 и др.). Тем не менее, ученые из разных стран мира продолжают разработку вакцин против мыта лошадей, которые также не нашли широкого практического применения. Так, в Нидерландах из депонированного штамма *Str. equi* TW928 (№CBS 813.95, Centraalbureau voor Schimmelcultures, P.O. box 273, 3740 AG Baam, The Netherlands) разработана живая вакцина против мыта лошадей. Авторы этой вакцины утверждают, что ее можно применить для животных с рождения в различных формах (парентерально, внутримышечно, подкожно, интрадермально, орально,

внутриназально) (O.M. Khartford, T.D. Foster, A.K. Jakobs, 2002). Однако вакцина не имеет регистрации в России.

В настоящее время в США разработаны и применяются живая вакцина из ослабленного штамма, которая вызывает выработку антител в сыворотке крови через 7-10 дней и модифицированная интраназальная вакцина «Pinnacle IN» двукратного применения. Эти вакцины не могут применяться в России, также данные вакцины требуют двух- и трехкратное введение с интервалом в несколько недель, что неудобно на практике (A.G. Boyle, J.F. Timoney, J.R. Newton et al., 2018).

В Великобритании в настоящее время существует многокомпонентная вакцина против мыта лошадей «Strangvac». Данная вакцина применяется внутримышечно. Авторы утверждают, что значительный уровень защиты от мыта достигается после второй или третьей ревакцинации (B.Guss, M.Flock, L.Frykberg et al., 2009; C. Robinson, L. Frykberg, M. Flock et al., 2018, C. Robinson, A.S. Waller, L. Frykberg et al., 2020).

В странах Европы на сегодняшний день существует живая вакцина против мыта «Equilis StepE». Однако установлено, что данная вакцина сохраняет от заболевания мытом только на 3-6 месяцев (A.S. Waller, 2018).

Ученые Казахстана много лет занимаются изысканием вакцины против мыта лошадей. Так, А.Р. Санзысбаев и К.П. Юров (1993) выделили и изучили М-белок мытного стрептококка, а затем разработали метод подбора и селекции производственного штамма, содержащего М-белок в максимальном количестве. Авторы депонировали штамм *Str. equi* ЮС-15, изготовили и испытали субъединичную вакцину из М-белка клеточной оболочки штамма. Защитное действие вакцины в производственных условиях составило 61,3-85%. Вакцина применялась в хозяйствах Казахстана. В 1998 г. А.Х. Байдаров разработал вакцину против мыта «КазНИВИ», которую с профилактической целью применяют однократно. Профилактический эффект от вакцинации составил 90%. А.Б. Бижанов, А.Р. Сансызбаев, Ш.О. Токеев (1994) разработали вакцину против мыта лошадей, включающую в качестве мытного антигена

инактивированную культуру мытного стрептококка и отличающуюся тем, что вакцина содержит Т-активин, бициллин с содержанием 30-40 млн. ЕД, 0,1% раствор этония. Б.Ш. Каратаевым, А.М. Наметом, Г.К. Жусуповым и др. (2011) испытана ассоциированная вакцина против мыта и пастереллеза, которая содержит оптимальное соотношение доз вакцинных штаммов *Str. equi* CM – 1 и *Pasteurella multocida* 626, обеспечивающих формирование сбалансированного иммунного ответа к этим возбудителям. При этом отсутствовали отрицательные явления негенетического взаимодействия бактерий. А.И.Бижанов, Б.Ш. Каратаев, Н.А. Мырзахметулы (2013) разработали новую вакцину против мыта лошадей. Производственные испытания вакцины показали более продолжительный иммунитет (до 12 мес.). Но в связи со снятием с производства отдельных компонентов препарата, которые входили в состав вакцины против мыта лошадей, дальнейшее ее изготовление оказалось невозможным.

Для неспецифической профилактики мыта лошадей А.Р. Санзысбаев (1993) предлагает двукратное внутримышечное введение этобица. При этом отмечается, что подкожная инъекция этобица в форме водно-масляной эмульсии значительно повышает профилактическое действие препарата.

В данное время на территории Республики Казахстан применяется вакцина против мыта лошадей «Акынтай» (А.Б. Бижанов, Б.Ш. Каратаев, Н.А. Мырзахметулы, 2016). Вакцина против мыта лошадей «Акынтай» дополнительно содержит современные компоненты (сульфадимезин, триметропин – антибиотик широкого спектра действия, полиоксидоний в качестве адъюванта и иммуномодулирующего средства), которые позволяют повысить иммуногенность, ускорить сроки выздоровления и исключить поствакцинальные осложнения. Профилактический эффект составил 93,33-100 %. Продолжительность иммунитета 12 мес. Вакцина «Акынтай» в России не применяется, так как не зарегистрирована в реестре Россельхознадзора РФ.

В 1996-2000 гг. в России применялась вакцина против мыта лошадей из инактивированного штамма *Str. equi* Н-34. Однако, из-за сравнительно высокой стоимости отдельных компонентов вакцины, большинство коневодческих

звеньев и хозяйств остались не охваченными специфической профилактикой. Из-за высокой стоимости иммуномодулятора формировалась дороговизна вакцины. В данное время истек срок регистрации данной вакцины, а также иммуномодулятор – полирибонат снят с производства и штамм мытного стрептококка, из которого изготовлена вакцина, утратил свои специфические свойства. Таким образом, в России нет вакцины против мыта лошадей.

В связи с этим для защиты и сохранения коневодства в Российской Федерации, необходимо выделить новый штамм мытного стрептококка, который мог бы применяться в диагностических целях и производстве специфических препаратов.

Нами выделен, идентифицирован и депонирован новый штамм мытного стрептококка *Str. equi* Н-5/1.

Для идентификации чистой культуры применены методы, основанные на изучении тинкториальных, морфологических и культурально-биохимических свойств культур. Всего нами исследовано за период 2017-2018 гг. 63 пробы биоматериала от молодняка лошадей 6-10-месячного возраста: в том числе 45 смыва носовых истечений (от клинически больных мытом жеребят - 27, от клинически здоровых жеребят - 18); содержимого вскрывшегося абсцесса подчелюстных лимфатических узлов - 4 пробы, из паренхиматозных органов павших жеребят - 11 проб.

Прижизненная диагностика мыта лошадей, особенно в суровых условиях Крайнего Севера, является весьма сложной задачей. Мыт лошадей протекает наряду с другими инфекционными болезнями, которые проявляются за счет неблагоприятных факторов окружающей среды. При наступлении низких температур образование устойчивых наледей поверх отавы и сена, которые служат основными источниками корма для тебеневки и стойлового содержания лошадей в зимний период, могут быть главными причинами отвесов и снижения иммунитета лошадей. Установлено, что недоброкачественный и скудный рацион способствует поражению грибами респираторного тракта лошадей, которое протекает совместно с мытом лошадей. Опираясь на это, мы в нашей работе

перед бактериологическими исследованиями применяли предпосевную обработку. В качестве обрабатывающего средства использовали 70⁰С этиловый спирт, далее биологический материал промывали 0,9% физиологическим раствором. В наших исследованиях промывания оказались весьма эффективными для подавления роста сопутствующей микрофлоры, что приводит к облегчению и ускорению срока выделения чистой культуры.

Изучая доступные нам литературные данные, отметили, что предпосевную обработку применяют в своих исследованиях многие авторы (Е.А. Лискова, К.Н. Слина, М.В. Берус и др., 2015; А.Л. Лазовская, З.Г. Воробьева, К.Н. Слина, 2000; Р.А. Нуратинов А.А. Гаргацов, Э.А. Вердиева и др., 2010; А.М. Коваленко, А.Ф. Дорофеев, Е.В. Тарасова, 2013).

В связи с этими данными следует отметить, что предпосевная обработка биологических материалов является важным моментом при выделении чистой культуры.

Путем многократных пересевов нами были выделены 40 изолятов кокковидной формы. Эти изоляты дают характерный рост в МПБ с 10% сывороткой крови лошади и 1% МПА с 10% сывороткой крови. В глюкозо-сывороточном бульоне некоторые культуры растут в виде равномерного помутнения среды с выпадением белого осадка, который поднимается при встряхивании косичкой вверх. Некоторые культуры на 1% МПА с 10% сывороткой крови лошади росли в виде мелких росинчатых колоний, при этом наблюдается рост блестящих с ровными краями белых выпуклых колоний и слившихся матовых выпуклых колоний. На полужидком агаре (ПЖА) культуры растут по всей поверхности хода укола.

При дальнейшей дифференциации 40 изолятов, 3 изолята отнесены к роду *Staphylococcus* и 4 – роду *Enterococcus*. Полученные нами данные по дифференциации кокковых форм микроорганизмов, согласуются с исследованиями А.П. Медведева, С.В. Даровского, В.Н. Алешкевича и др., (2016), в которых применяются методы с использованием каталазной пробы, а также питательных сред с добавлением соли.

Следовательно, проведенные бактериологические исследования позволяют предположить, что причинами мыта лошадей могут стать не только возбудитель мыта – *Str. equi*, но также и его ассоциация с другими видами рода *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, а также плесневыми грибами.

Как ранее было зафиксировано, в наших исследованиях отмечается загрязнение посевных материалов токсигенными и плесневыми грибами рода *Aspergillus* и *Mucor*. Наши исследовательские результаты согласуются с работой J. Danvillier, F.T. Woort, E. Erck-Westergen (2019), отметившими присутствие в дыхательных путях лошадей различных грибов и указавших о необходимости дальнейшего изучения роли грибковых элементов в этиологии болезней органов дыхания у лошадей и человека.

В современной науке с развитием новых технологий при изучении видовой идентификации микроорганизмов все большее место занимают молекулярно-генетические методы исследований. В более ранний исследовательский период перед использованием тех или иных методов видовой идентификации следовало применять различные способы культивирования с целью увеличения численности микроорганизмов. В настоящее время применяется методика, позволяющая идентифицировать видовой состав любого микроорганизма из одной колонии на генном уровне, таким образом увеличивая код ДНК.

Отдельные виды микроорганизмов можно исследовать в исходном образце, к примеру, методом микроскопирования. Однако полученные подобным методом данные недостоверны. С учетом всех сложностей видовой идентификации, в современной науке все чаще применяются методы молекулярной биологии и генетики, которые на уровне молекул нуклеиновых кислот позволяют различать виды и штаммы микроорганизмов.

В своих исследованиях мы использовали молекулярно-генетический метод идентификации микроорганизмов, путем определения наличия нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рПНК. В работе использованы следующие штамм-специфические праймеры на различные участки гена 16S рПНК: Seel-F: 5'-CGGATACGGTGATGTTAAAGA-3' и Seel-R: 5'-

TTCTTCCTCAAAGCCAGA-3'. По результатам проведенных работ нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК *Str. equi* была обнаружена у 6 изолятов. В мировой практике данный метод идентификации применяется многими исследователями (C.R. Sweeney et al., 2005; K.Webb, C.Barker, T.Harrison et al., 2013; G. Cordoni, A. Williams, A. Duram et al., 2015; A.G. Boyle, S.C. Rankin, L. Duffee et al., 2016; A.G. Boyle, D. Stefanovski, S.C. Rankin, 2017; S. Lindahl, 2013; J. Pringle, E. Storm, A. Waller et al., 2020; K. Kasuya, N. Tanaka, F. Oshima et al., 2019; A.R.L. Charbonneau, E. Taylor, C.J. Mitchell et al., 2020; С.Г. Ботанина, М.А. Тренина, Ю.Д. Цыганков и др., 2007) и другие.

Далее 3 изолята («Н-5/1», «Н-12-3», «Н-1 каз») из 6 были направлены на подтверждение в ФГБУ «ВГНКИ». Исследования этих изолятов подтвердили, что нуклеотидная последовательность 100% идентична нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК *Str. equi*. Таким образом, выделены и идентифицированы три перспективных штамма *Str. equi*, которые могут быть использованы для разработки иммунобиологических препаратов.

Из них штамм *Str. equi* «Н-5/1» как самый активный, прошел комиссионные испытания во Всероссийском государственном центре качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ»). Установлено, что культура *Str. equi* «Н-5/1» по показателям культуральных, морфологических и биохимических свойств относится к семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*, виду *Str. equi 55p equi* и соответствует типовым характеристикам представителей этого вида.

Штамм *Str. equi* «Н-5/1» выделен из смыва вскрывшегося подчелюстного лимфоузла больного мытом жеребенка из Хангаласского улуса с. Немюгюнцы. Штамм *Str. equi* «Н-5/1» растет на 1%-ном МПБ с 10% сыворотки крови в виде равномерного помутнения среды с выпадением белого осадка, который поднимается при встряхивании косичкой вверх. На 1%-ном МПА с 10% сыворотки крови растет в виде росинчатых мелких колоний. На ПЖА растет по ходу посева. По биохимическим свойствам штамм *Str. equi* «Н-5/1»

соответствует виду, с образованием кислоты без газа ферментирует мальтозу, глюкозу, сахарозу, а лактозу, маннит, сорбит и дульцит не сбраживает.

По результатам проведенных исследований штамм *Str. equi* «Н-5/1» депонирован в коллекции микроорганизмов в ФГБУ «ВГНКИ» (регистрационный номер ВКШМ-Б141П от 22.05.2018 г.), получен патент на изобретение №2703485 «Штамм бактерий *Str. equi*, используемый для изготовления вакцины против мыта» от 17.10.2019 г.

В центре «Геномика» проведены исследования, подтверждающие наши результаты, а также после секвенирования проведено депонирование в международной базе данных NCBI GenBank нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК изолята Н-5/1.

Таким образом, штамм *Str. equi* «Н-5/1» может использоваться в качестве производственного при изготовлении иммунобиологических препаратов для профилактики мыта лошадей в Российской Федерации, а штамм *Str. equi* «Н-1 каз», выделенный от больной лошади из Республики Казахстан, может быть использован для разработки вакцины, используемой в табунном коневодстве Казахстана.

Производственный штамм микроорганизмов *Str. equi* «Н-5/1» сохраняет все свои основные биологические свойства при хранении в холодильнике (+4°C) в течение 2 месяцев, а в лиофилизированном состоянии в течение 12 месяцев.

На основе депонированного штамма во ВГНКИ *Str. equi* «Н-5/1» нами разработана технология изготовления новой инактивированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором. В качестве иммуномодулятора использовали КЖ штамма микроорганизмов *Bacillus subtilis* ТНП-3, депонированного в ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (RCAM). Справкой о депонировании от 24.12.2017 г. Н.П. Тарабукиной и соавт. (2006) доказано, что одновременное введение инактивированных вакцин с культуральной жидкостью *Bacillus subtilis* ТНП-3 вызывает индукцию интерферона в высоких титрах в организме. Следовательно, штамм бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3 целесообразно

использовать в качестве компонента вакцин для повышения иммунобиологической реактивности и напряженности иммунитета в сочетании с инаktivированными вакцинами. В литературных работах есть данные о том, что *Bacillus subtilis* продуцирует ферменты, витамины, аминокислоты, а также обладает иммуномодулирующими свойствами (С.Р. Резник, 1982; С.В. Олишевский, В.В. Козак, О.В. Мазур и др., 2007; А.В. Савустьяненко, 2016) и др.

Разработанная нами новая вакцина успешно прошла доклинические испытания в лабораторных условиях, доказана ее стабильность, стерильность, безвредность и апиrogenность. Установлено, что в изучаемых дозах вакцина на общее состояние животных отрицательно не влияет, аллергизирующими свойствами не обладает, судорожных реакций не вызывает, координацию движений не нарушает и токсичностью в отношении лабораторных животных не обладает.

По результатам проведенных исследований установлена иммунизирующая доза (ИмД) вакцины против мыта лошадей в отношении белых лабораторных мышей. Доза, способствующая созданию 90% защиты от патогенного штамма *Str. equi* «Н-5/1» вакцинированных белых мышей, при гибели 90% не вакцинированных мышей при однократном введении составила 4×10^5 микробных клеток. Средняя иммунизирующая доза (ИД50), которая вызывает иммунитет у 50% иммунизированных мышей после заражения вирулентным штаммом, составила 2×10^5 м.т.

Следует отметить, что доклинические испытания проведены согласно приказу Министерства сельского хозяйства РФ №1 от 6 марта 2018 г. «Об утверждении правил проведения доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения».

Производственные испытания новой инаktivированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором проводились в коневодческих хозяйствах

Хангаласского, Намского, Амгинского, Мегино-Кангаласского улусов и пригороде г. Якутска Республики Саха (Якутия).

Для проведения испытаний изготовлены несколько серий вакцины против мыта лошадей по разработанной методике. Каждая серия вакцины проходила ряд контрольных испытаний по стерильности, иммуногенности и безвредности на лабораторных животных. Готовая вакцина представляет собой прозрачную суспензию светло-желтого цвета с осадком, которая при встряхивании легко разбивается. Состав включает в себя инаktivированную культуру штамма бактерий *Str. equi* Н-5/1, депонированный во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве ФГБУ «ВГНКИ» (рег. № ВКШМ Б-141П, справка о депонировании от 31 мая 2018 г.) и иммуномодулятор – культуральная жидкость из штамма бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3, который также депонирован в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ (рег. № РСМ04759 от 15.12.2017г.).

Вакцина применялась в соответствии с временным наставлением «Временное наставление по применению инаktivированной вакцины с иммуномодулятором против мыта лошадей» от 02.07.2018 г. В каждом хозяйстве иммунизирован молодняк лошадей (до одного года) в первой и второй декадах ноября после отъема от матерей. Вакцину применяли путем однократного внутримышечного введения в дозе 3,0 см³ в область верхней трети шеи. Клиническое состояние животных контролировали в течение 6-7 месяцев.

По результатам производственных испытаний установлена эффективность 97,6%, т.е. вакцина предохраняет от заражения 97,6% жеребят от 128 голов.

Ущерб от снижения продуктивности при 65% заболеваемости составит на 1 голову больного молодняка 5,65 тыс. рублей. Общий экономический ущерб при 100 головах будет 367,53 тыс. рублей.

При внедрении вакцинопрофилактики ущерб на 1 голову снизится до 1,88 тыс. рублей. Общий экономический ущерб снизится в 65,28 раза (5,63 тыс.

рублей). Экономический эффект ожидаемо составит 399,0 тыс. рублей на 100 гол.

На 1 голову – 3,99 тыс. рублей, на 1 рубль затрат – 6,65 рублей.

Иммунизация 50% полученного приплода по Республике Саха (Якутия) позволит получить экономический эффект на сумму 49 млн. 356 тыс. рублей ежегодно.

Таким образом, разработанный способ специфической профилактики вакциной против мыта лошадей является эпизоотически обоснованным со значительной экономической эффективностью.

Вакцина для специфической профилактики мыта лошадей утверждена Россельхознадзором, включена в реестр иммунобиологических препаратов и будет применяться в России и странах Евразии.

По результатам научных исследований разработана база данных «Мыт лошадей», которая зарегистрирована в Роспатенте (Свидетельство № 2018621835 от 20 ноября 2018 г. (приложение Д).

Материалы диссертационной работы вошли в методические пособия «Система ведения сельского хозяйства в Республике Саха (Якутия) на период 2021 – 2025 годы», Белгород, 2021 г. (утв. Ученым советом Якутского НИИСХ имени М.Г. Сафронова ФГБУН ФИЦ ЯНЦ СО РАН), предложенные для производственного внедрения (приложение Ж).

Изданы методические пособия на якутском языке «Хабарҕаһыт (мыт) ыарыыны эмтииргэ уонна сэрэтэргэ сүбэлэр» (приложение И).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы:

1. Мыт молодняка лошадей имеет значительное распространение в мире, Российской Федерации и на территории Республики Саха (Якутия). Распространению мыта способствует отсутствие специфических средств профилактики, зарегистрированных в России.

2. По результатам морфологических, культуральных, ферментативных и молекулярно-генетических исследований из 63 биологических проб идентифицированы 6 штаммов бактерий, которые относятся к семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*, виду *Str. equi* 55p *equi*: *Str. equi* «Н-5/1», *Str. equi* «7-3», *Str. equi* «12-3», *Str. equi* «П1», *Str. equi* «П2», *Str. equi* «1 каз». Наиболее чувствительный и специфический метод идентификации мытного стрептококка – ПЦР анализ.

3. Штамм бактерий *Str. equi* «Н-5/1» депонирован во Всероссийской государственной коллекции микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве (ФГБУ «ВГНКИ») под номером ВКШМ-Б141П.

4. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1» депонирована в международной базе данных NCBI GenBank (MW486609).

5. Получен патент на изобретение «Штамм бактерий *Str. equi*, используемый для изготовления вакцины против мыта» №2703485 от 17.10.2019г.

6. На основе депонированного штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1» ВКШМ-Б141П, разработана технология изготовления новой инактивированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором. Доклиническими испытаниями установлены стабильность, стерильность, безвредность и апиrogenность вакцины. Иммуногенность на белых мышах составляет 90%.

7. Однократное внутримышечное введение вакцины индуцирует иммунитет высокой напряженности у 97,6% иммунизированного молодняка

лошадей. Экономическая эффективность на 1 рубль затрат составляет 6,65 рублей, на 1 голову – 3,99 тыс. рублей.

8. Разработана научно-техническая документация (досье) на вакцину против мыта. Вакцина утверждена Россельхознадзором и зарегистрирована в реестре лекарственных средств. Регистрационный номер № 71-1-27.21-4828 № ПВР-1-27.21/03691 от 08.12.2021 г.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Депонированный штамм *Str. equi* «Н-5/1» (регистрационный номер ВКШМ-Б-141П, справка о депонировании от 31 мая 2018 г.), который может быть использован для разработки диагностических и профилактических препаратов.
2. Получено свидетельство о государственной регистрации базы данных «Мыт лошадей» (№2018621835 от 20 ноября 2018 г.).
3. Получен патент на изобретение РФ «Штамм бактерий *Str. equi* используемый для изготовления вакцины против мыта лошадей» (№2703485 от 17.10.2019 г.).
4. Утверждена и включена в реестр лекарственных средств России вакцина против мыта лошадей инактивированная (Регистрационное удостоверение 71-1-27.21-4828 №ПВР-1-27.21/03691). Инструкция по применению вакцины от 08.12.2021 г.
5. Материалы диссертационной работы вошли в методические пособия «Система ведения сельского хозяйства в Республике Саха (Якутия) на период 2021 – 2025 годы», Белгород, 2021 г. (утв. Ученым советом Якутского НИИСХ имени М.Г. Сафронова ФГБУН ФИЦ ЯНЦ СО РАН), предложенные для внедрения в производство.
6. Изданы методические пособия на якутском языке «Хабарҕаһыт (мыт) ыарыыны эмтииргэ уонна сэрэтэргэ сүбэлэр».
7. Полученные нами результаты исследований могут быть использованы в учебном процессе, при проведении лекционных и практических занятий для студентов, магистрантов, аспирантов по курсу «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология», а также в практике ветеринарных специалистов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВГНКИ – Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов

ВИЭВ – Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко

ДНК – дезоксирибонуклеи́новая кислота

Др. – другие

ИД₅₀ – средняя иммунизирующая доза

ИмД – иммунизирующая доза

ИХБФМ - Институт химической биологии и фундаментальной медицины

КЖ – культуральная жидкость

ЛД₅₀ – средняя летальная доза

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

МСХ – Министерство сельского хозяйства

ПЖА – полужидкий агар

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК - рибосомные рибонуклеиновые кислоты

РС(Я) – Республика Саха (Якутия)

Ч – час

ЯНИИСХ – Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства

ЯРВИЛ – Якутская республиканская ветеринарно-испытательная лаборатория

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

NCBI - National Center for Biotechnology Information (Национальный центр биотехнологической информации)

Str. equi – *Streptococcus equi*

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, Н.Д. Рост и развитие молодняка якутских лошадей / Н.Д. Алексеев, Н.П. Андреев // Повышение мясной продуктивности якутских лошадей: научн. – техн. Бюлл. / РАСХН. Сиб. Отд-ние. НПО «Якутское». Якут. НИИСХ. – Новосибирск, 1982. – Вып. 3. – С. 20-29.
2. Алиев, Б.К. Распространение мытной инфекции в Киргизской ССР / Б.К. Алиев // Новое в изучении болезней сельскохозяйственных животных. - 1976. — С. 103-104.
3. Амелин В.Г. Идентификация и определение токсикантов с использованием стандартной добавки в пищевых продуктах, продовольственном сырье и кормах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения / В.Г. Амелин, А.М. Андоралов, Н.М. Волкова, А.И. Коротков, Т.Б. Никешина, И.И. Сидоров, А.А. Тимофеев // Аналитика и контроль. – 2015. – Т. 19. – № 2. – С. 189–207.
4. Астафьева, В.К. Получение диагностических сывороток для определения групповой принадлежности стрептококков / В.К. Астафьева, Е.П. Цветков // Методы и средства диагностики, профилактики и лечения инфекционных болезней животных: Сб. науч. тр / ВГНКИ. — М., 1985. — С.111-114.
5. Атачкин, Ж.А. Мыт лошадей / Ж.А. Атачкин // Инфекционные и инвазионные болезни сельскохозяйственных животных. — 1974. — Т. 27. — С. 194-198.
6. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. // Медгиз. – 1962. – 180 с.
7. Бадмаева, О.Б. Ретроспективный анализ эпизоотического состояния по инфекционным болезням животных в Забайкалье и Монголии / О.Б. Бадмаева, Б. Баянжаргал, В.Ц. Цыдыпов // Инновации и продовольственная безопасность. – 2017. - № 4 (18). – С. 134-142.

8. Баишев, А.А. Иммунопрофилактика мыта лошадей в Республике Саха (Якутия) [Текст]: автореф. дис... канд. вет. наук / А.А. Баишев.— Якутск: ЯНИИСХ, 2002. - 19 с.
9. Байдаров, А.Х. Противоэпизоотическая эффективность мероприятий против мыта лошадей в коневодческих хозяйствах различного типа: автореф. дис... канд. вет. наук / А.Х. Байдаров. — Москва: ВИЭВ, 1998. - 22 с.
10. Балашенко, С.Г. Иммунные глобулины в ветеринарии / С.Г. Балашенко, В.П. Урбан. — Минск, 1972. — 144 с.
11. Баянжаргал, Б. Эпизоотические аспекты инфекционных болезней в Монголии / Б. Баянжаргал, О.Б. Бадмаева, В.Ц. Цыдыпов // Вестник КрасГАУ. — 2014. - № 3. — С. 156-159.
12. Бессарабов, Б.Ф. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин и др.; под ред. А.А. Сидорчука. — М.: КолосС, 2007. — 671 с.
13. Бижанов, А.Б. Выделение и изучение биологических свойств возбудителя мыта лошадей / А.Б. Бижанов, А.Р. Сансызбай, А.М. Намет, А.Х. Байдаров // Жаршы, НИЦ «Бастау». — 1997. - №6. - С.13-18.
14. Бижанов, А.Б. Роль стрептококков группы С в инфекционной патологии лошадей / А.Б. Бижанов, А.Р. Сансызбаев, Ш.О. Токеев // Вестник с.-х науки Казахстана. — 1994. — №6. — С. 121-123.
15. Ботанина, С.Г. Сравнение генотипических и биохимических характеристик штаммов *Str. thermophilus*, выделенных из кисломолочных продуктов / С.Г. Ботанина, М.А. Тренина, Ю.Д. Цыганков, В.В. Суходолец // Прикладная биохимия и микробиология. — 2007. — Т.43. - №6. — С. 670-676.
16. Брагина, Э.П. Биологические свойства стрептококков, выделенных от больных маститами коров, овцематок, свиноматок, кобыл и верблюдиц / Э.П. Брагина // Науч. тр. Самарканд. СХИ. — 1979. — Т. 42. — С. 53-55.
17. Бреус, А.А. О мытном антивирусе и вакцине / А.А. Бреус // Ветеринария.— 1944.— № 8/9. — С. 6-10.

18. Брико, Н.И. Выделение и идентификация стрептококков / Н.И. Брико, А.С. Ещина, Л.А. Ряпис. – М.: РУДН, 2002. – 187 с.
19. Бронников, В., Славицкий С. Успехи и неудачи при создании вакцин / В. Бронников, С. Славицкий // Ветеринария сельскохозяйственных наук. – 2016. – №7. – С. 55-58.
20. Быковченко, Ю.Г. Вариации биохимических компонентов крови у пород крупного рогатого скота Кыргызстана / Ю.Г. Быковченко, К.У. Уракунова, Р.С. Салыков, К.Т. Жумаканов // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2017. - №8 (154). – С. 141-151.
21. Вакцина против мыта лошадей [Текст]: пат. 23106 Республика Казахстан: МПК А61Р 31/04, А61К 39/09, А61К 39/02 / А.Б. Бижанов, Б.Ш. Каратаев, Н.А. Мырзахметулы; заявитель патентообладатель ТОО «КазНИВИ». - № 2009/1403.1; заявл. 24.11.09; опубл. 15.10.13. Бюл. № 11. – 4 с.
22. Вакцина против мыта лошадей [Электронный ресурс]: пат. 3681 База патентов Казахстана: МПК А61К 39/09 / Бижанов А.Б., Сансымбаев А.Р.; заявитель и патентообладатель Казахский науч.-исслед. вет. институт Казахской академии с/х наук. - № 940539.1; заявл. 16.05.94; опубл. 15.09.96. Бюл. № 3. – 8 с. – Режим доступа: <https://kzpatents.com/8-3681-vakcina-protiv-myta-loshadejj.html>, свободный.
23. Вакцина против мыта лошадей «Акынтай» [Текст]: пат. 31032 Республика Казахстан: МПК А61К 39/09, А61Р 31/04, А61К 39/02 / А.Б. Бижанов, Б.Ш. Каратаев, Н.А. Мырзахметулы.; заявитель патентообладатель ТОО «Акынтай». - № 2015/0516.1; заявл. 09.04.15; опубл. 15.04.16. Бюл. № 4. – 5 с.
24. Власов, Ю.В. Стрептококковое мытоподобное заболевание жеребят-сосунов / Ю.В. Власов // Вет -зоотехн. бюл. — 1948. — № 1/2. — С. 36-37.
25. Воронцов, В. Сыпная форма мыта у лошадей / В. Воронцов // Вестн. обществ ветеринарии. — 1894. — № 10. — С. 294-299.
26. Габричевский, Г.Н. Стрептококковые вакцины и применение их против мыта лошадей / Г.Н. Габричевский // Архив вет. наук. — 1906. — № 4. — С. 233-244.

27. Ганнушкин, М.С. и др. Вакцинация против мыта лошадей / М.С. Ганнушкин, М.Е. Аввакумов // Сб. работ Воен.-вет. акад. Красной Армии. – 1943. – Т. 4. – С. 183.
28. Ганнушкин, М.С. и др. Люгольтерапия мыта лошадей / М.С. Ганнушкин, М.Е. Аввакумов, Т.М. Заболоцкий // Болезни лошадей. — 1947. — С. 258-259.
29. Говорухин, В.П. О противомытных препаратах / В. П. Говорухин // Ветеринария. – 1945. - № 2/3. – С. 14-15.
30. Гонтарев, М.А. К вопросу о стрептококковых заболеваниях и их значении / М.А. Гонтарев // Вестн. обществ, ветеринарии. — 1904. — № 21/22. — С. 1074-1123.
31. Гриценко, Н.М. Влияние иммуноглобулинов молозива на сохранность и рост поросят / Н.М. Гриценко, Д.И. Поливода // Докл. ВАСХНИЛ. — 1977. — № 1. — С. 32-34.
32. Гурвич, Б.М. К вопросу о борьбе с мытом / Б.М. Гурвич // Вестн. современ. ветеринарии. — 1929. — № 2. — С. 48.
33. Гурвич, Б.М. Этюды о мыте / Б.М. Гурвич // Практ. ветеринария. — 1932. — № 1. — С. 18-23.
34. Густокашин, К.А. Модель распространения мыта лошадей в алтайском крае с 1964 по 2011 годы, основанная на эпизоотологическом мониторинге / К.А. Густокашин // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2013. - № 11 (109). – С. 79-80.
35. Гутира, Ф. Мыт лошадей / Ф. Гутира, И. Марек // Частная патология и терапия домашних лошадей. — 1931. — Т. 1. — С. 463-484.
36. Дамдамаев, Ш.Г. Мытная эпизоотия у ослов / Ш.Г. Дамдамаев, М.М. Сантуев // Науч. тр Дагест. СХИ. — 1958. — Т. 10. — С. 134-136.
37. Двужильный, А.Ю. Влияние живого организма на свойства стрептококка / А.Ю. Двужильный // Архив вет. наук. — 1905. — № 2. — С. 13-15.

38. Джетигенов, Э.А. Культурально--морфологические свойства изолятов возбудителя мыта лошадей / Э.А. Джетигенов, А.Б. Бекташев, А.А. Айтбаев // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. – 2016. - 2(37). – С. 190-194.
39. Ерофеева В.В. Проблемы возникновения гельминтозов / В.В. Ерофеева, В.П. Пухлянко // Здоровье населения и среда обитания. – 2013. - №2 (239). – С. 35-36.
40. Ерофеева В.В., Пухлянко Е.В. Оценка качества продуктов питания животного происхождения по наличию антибиотиков из магазинов мегаполисов // 2021.
41. Жирков, А.Д. Фунгицидная активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis* по отношению к токсигенным грибам / А.Д. Жирков, С.С. Татарина, Н.П. Тарабукина, М.П. Неустроев // Аграрный вестник Урала. – 2013. - 7(113). – С. 20-21.
42. Ибрагимов, В.М. К вопросу эпизоотологии мыта / В.М. Ибрагимов // Тр. Казан НИВИ. — 1954. — Вып. 12.— С. 129-132.
43. Иванов, И.С. Ветеринарно-санитарная экспертиза и оценка продуктов убоя якутских лошадей при мыте: автореф. дис. ...канд. вет. наук / И.С. Иванов. – Якутск: ЯГСХА, 2004. – 14 с.
44. Каратаев, Б.Ш. Изучение антигенной и иммуногенной активности *Str. equi* в составе ассоциированной вакцины против мыта и пастереллеза лошадей / Б.Ш. Каратаев, А.М. Намет, Г.К. Жусупов, С.А. Турсункулов, Ж.Ж. Тлегенова, Н.Д. Ахметов // Известия НАН РК. – 2011. - №5. – С. 79-82.
45. Ковалевский, И. Мыт лошадей / И. Ковалевский // Вет. фельдшер. – 1898. - № 11. – С. 321-324.
46. Коляков, Я.Е. Стрептококк – возбудитель мыта / Я.Е. Коляков // Ветеринарная микробиология. – 1965. – С. 167-169.
47. Конопаткин, А.А. Иммунореактивность и особенность иммуногенеза у поросят неонатального возраста при моно- и комплексной

вакцинации против чумы, болезни Ауески и паратифа / А.А. Конопаткин // Тр. ВИЭВ. — 1973. — Т. 41. — С. 285-297.

48. Конопаткин, А.А. Серологическая идентификация возбудителя стрептококкоза нутрий / А.А. Конопаткин, В.А. Есепенок, М.Р. Вашакидзе // — Деп. ВНИИТЭИСХ. — 1989. - № 207-ВС-89. — 6 с.

49. Краевая эпизоотология Республики Саха (Якутия): учеб. пособие для с-х вузов / И.И. Бочкарев и др. — Якутск: ЯФ Изд-ва СО РАН, 2003. — 308 с.

50. Крюков, Н.Н. Ринопневмония / Н.Н. Крюков // Инфекционные и инвазионные болезни лошадей. — М.: Колос, 1976. — С. 90-98.

51. Кудрявцева, А. С. Инновационное развитие предприятий мясной промышленности в условиях совершенствования системы обеспечения качества и безопасности продукции / А.С. Кудрявцева // Вестник науки. — 2018. — Т. 1. — № 8 (8). — С. 222-224.

52. Курочка, Н.Е. Естественная резистентность организма ягнят различных периодов отъема / Н.Е. Курочка // Бюл. ВИЭВ, — 1977. — Вып. 29. — С. 61-63.

53. Луцевич, Ф.Ф. Некоторые вопросы эпизоотологии и борьбы с мытом лошадей / Ф.Ф. Луцевич // СибНИВИ 25 лет. — 1955. — С. 107-109.

54. Максимова, П.Е. Влияние на организм человека остатков антибиотиков в продуктах питания / П.Е. Максимова // Научный электронный журнал «Меридиан». — 2020. - № 9 (43). — С.120-122.

55. Медведев, А.П. Дифференциация кокковых форм микроорганизмов / А.П. Медведев, С.В. Даровских, В.Н. Алешкевич, А.В. Зайцева // Ученые записки УО ВГАВМ. — 2016. — Т.52(1). — С. 67-70.

56. Методика определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий: метод. рекомендации / сост. Ю.Е. Шатохин, И.Н. Никитин, П.А. Чулков, В.Ф. Воскобойнику — М.: МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 1997. — 36 с.

57. Методические рекомендации по тестированию естественной резистентности телят: метод. Рекомендации / сост. П.А. Емельяненко, О.Н. Грызлова, В.Н. Денисенко и др.— М., 1980. — 64 с.
58. Методические указания по лабораторной диагностике мыта: № 10-2-5/1098 – 2007. – Утв. 2007-14-12. – М.: ГУВ МСХ и П РБ, 2007. – 3 с: ил.
59. Мешев, Э.М. Влияние полимеров на свойства *Str. equi subsp. Zooepidemicus*, выделенных от лошадей / Э.М. Мешев, Х.К. Амшонов // Аграрный вестник Урала. – 2013. - №11 (117). – С. 27-29.
60. Москалик, Р.С. Изучение биологических свойств стрептококков / Р.С. Москалик // Материалы научн. конф. по вопросам ветеринарии. – 1971. - №1. – С. 114-115.
61. Москалик, Р.С. Ликвидация мыта / Р.С. Москалик, Р.Ф. Сосов // Коневодство и конный спорт. – 1970. - № 8. – С.33.
62. Москалик, Р.С. Стрептококки серологической группы С и вызываемые ими болезни / Р.С. Москалик // Штиинца. – 1974. – С. 15-29.
63. Мыт [Текст] / И.А. Бакулов, под общ. ред. Р.Ф. Сосова. // Эпизоотология. — М.: Колос, 1969, — С. 186-189.
64. Неустроев, М.П. Вирусные болезни лошадей в Якутии / М.П. Неустроев // АПК Сибири, Монголии и Республики Казахстан в XXI веке: матер. IV междунар. науч.-практ. конф. (Улан-Батор. 9-10 июля 2001 г.). – Новосибирск, 2001. – С.331-332.
65. Неустроев, М.П. Влияние препаратов на основе хонгурина на естественную резистентность жеребят / М.П. Неустроев // Эпизоотология, диагностика, меры профилактики и борьбы с болезнями животных: Сб. научн. тр. / РАСХН. Сиб отд-ние. ИЭВСиДВ.— Новосибирск, 1997. – С. 299-303.
66. Неустроев, М.П. Вопросы профилактики и лечения мыта лошадей / М.П. Неустроев // Эпизоотология и профилактика болезней животных в условиях Якутии: сб. науч. тр. РАСХН. Сиб. отд-ние. Якут. НИИСХ. — Якутск, 1994. — С 23-28.

67. Неустроев, М.П. Выделение изолятов возбудителя мыта лошадей в условиях Крайнего Севера / М.П. Неустроев, С.Г. Петрова, Е.И. Эльбядова, Н.П. Тарабукина, В.А. Алексеев, А.А. Попов // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – т. 56. - № 4. – С. 707-717.
68. Неустроев, М.П. Использование пробиотика Сахабактисубтил при дисбактериозе лошадей / М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, С.Г. Петрова, А.А. Баишев // Российская сельскохозяйственная наука. – 2015. – № 5. – С. 61–64.
69. Неустроев, М.П. Меры профилактики мыта жеребят / М.П. Неустроев, Р.В. Иванов // Сиб. вестн, с.-х. науки. — 1995. — № 3/4. — С. 84-87.
70. Неустроев, М.П. Метод лечения мыта лошадей / М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина // Коневодство и конный спорт. – 2003. - № 2. – С. 18.
71. Неустроев, М.П. Мыт лошадей в Якутии (этиология, эпизоотология, меры борьбы и профилактика): монография. – Новосибирск: Сиб. отд-е РАСХН, 2000. – 141 с.
72. Неустроев, М.П. Мыт лошадей, осложненный плесневыми и токсигенными грибами / М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, С.Г. Петрова, Е.И. Эльбядова // Труды ВИЭВ. – 2018. - 80 (1). – С. 268-272.
73. Неустроев, М.П. Новые средства и методы профилактики инфекционных болезней лошадей табунного содержания / М.П. Неустроев, К.П. Юров // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2006. - №1. – С.54-56.
74. Неустроев, М.П. Пробиотик «Сахабактисубтил» для животноводства / М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, М.П. Федорова // Сб.науч.тр., посвященный 70-летию ДальзНИВИ. – 2005. – С.131-133.
75. Неустроев, М.П. Результаты изучения мыта лошадей в условиях Якутии / М.П. Неустроев // Сельское хозяйство Республики Саха (Якутия) в условиях перехода на рыночные отношения: материалы науч конф. — Новосибирск. – 1993, — С. 138-139.
76. Неустроев, М.П. Санация объектов внешней среды при мыте лошадей / М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина // Методология мероприятий по

профилактике и ликвидации болезней сельскохозяйственных животных: сб. науч. тр. РАСХН Сиб. отд. ИЭВСиДВ. – 1995. – С. 285-288.

77. Новиков, А. Мыт / А. Новиков // Вет, фельдшер — 1902. — № 2. — С. 50-55.

78. Окунцов, И.В. Вакцина против мыта / И.В. Окунцов, Н.Ф. Бельков // Коневодство и конный спорт. — 1976. — № 6. — С. 28.

79. Окунцов, И.В. Мыт жеребят-сосунов / И.В. Окунцов // 25 лет СибНИВИ. — 1955. — С. 118-119.

80. Олейник, Г.В. К течению мыта по данным ФВА / Г.В. Олейник // Тр. 2-й конф. вет. врачей 1-го Белорус. фронта. — 1945. — с. 46-48.

81. Олишевский, С.В. Применение CpG ДНК *Bacillus subtilis* в экспериментальной иммунотерапии опухолей / С.В. Олишевский, В.В. Козак, О.В. Мазур, В.А. Шляховенко // Российский биотерапевтический журнал. 2007. - №3. – Т.6. – С. 19-29.

82. Панин, А.Н. Методика получения диагностических антипневмококковых агглютинирующих сывороток / А.Н. Панин, Е.И. Цветков, Е.С. Бошьян // Разработка, апробация и государственный контроль ветеринарных препаратов: тез. докл. Всесоюз. науч. конф, — М., 1981— С. 107-108.

83. Панин, А.Н. Наставление по применению стрептококковых групповых диагностических сывороток / А.Н. Панин // Ветеринария. — 1983. — № 10. — С. 78.

84. Панин, А.Н. Стрептококкозы свиней / А.Н. Панин // Ветеринария.— 1986. — №5.— С. 42-44.

85. Панин, А.Н. Стрептококкозы свиней: автореф. дис. ... д-ра вет. наук / А.Н. Панин. — М.: ВОЛНИИЭВ, 1992,— 41с.

86. Панин, А.П. Опыт по применению активной иммунизации жеребят против мыта / А.П. Панин // Коневодство. — 1937. — № 9. — С. 39-42.

87. Петров, В. Мыт лошадей и его профилактика. — Минск, 1952. — 7 с.

88. Поддубский, И.В. Инфекционная катарально-гнойная пневмония жеребят / И.В. Поддубский // Сов. ветеринария. — 1938. — № 4/5. — С. 13.
89. Полищук, П.К. Дифференциация мытного стрептококка и некоторые данные о его биологических свойствах / П.К. Полищук // Тр. Башкир. НИВОС. — Уфа, 1951. — Т. 6. — С. 93-101.
90. Потапенко, И. Мыт и его осложнение И. Потапенко // Архив вет, наук. — 1904. — № 5. — С. 381-419.
91. Притулин, П.И. Мыт лошадей / П.И. Притулин // Бюл. ВИЭВ. — 1981. — Вып. 44. — С. 83-85.
92. Протасов, А.И. Мыт лошадей / А.И. Протасов, А.Д. Ледяев. — Л.: Лениздат, 1952. — 24 с.
93. Раимбеков, Д.Р. Эпизоотические особенности мыта лошадей в Чуйской области / Д.Р. Раимбеков, Э.А. Джетигенов, К.А. Карыпов, Арзиев К.А. // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. — 2016. - №2 (38). — С. 48-52.
94. Резник С.Р. Способ лечения и профилактики вирусных и бактериальных заболеваний животных // SU, А.с. N 1311243, опубл. 1982.
95. Розанов, Н.И. Мыт / Н.И. Розанов // Микробиологическая диагностика заболеваний сельскохозяйственных животных. — 1952. — С. 321-324.
96. Рябова, Г.С. Дезинфекция при мыте лошадей / Г.С. Рябова // Ветеринария. — 1956. - № 6. — С. 68-72.
97. Савустьяненко, А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* / А.В. Савустьяненко // Актуальная инфектология. — 2016. - №2 (11). — С. 35-44.
98. Садовский, И.Я. Вакциноterapia мыта, мытный фильтрат бульон-вакцины и дальнейшие наблюдения по лечению гнойных заболеваний у лошадей фильтратами по Безредка / И.Я. Садовский // Практ. ветеринария и коневодство. — 1927. — № 2. — С. 31-35.

99. Сансызбаев, А.Р. и др. Лечение лошадей больных мытом / А.Р. Сансызбаев, У.Н. Керимбаев, А.Б. Бижанов, К.П. Юров // Коневодство и конный спорт. — 1991. — № 11. — С. 10.

100. Сансызбаев, А.Р. Мыт лошадей в Казахстане (распространение, свойства возбудителя, разработка средств специфической профилактики и лечения): автореф. дис.... д-ра вет.наук. — М.: ВИЭВ, 1993. — 41 С.

101. Светлов, Г.И. Гангрена кожи при мыте у лошади / Г.И. Светлов // Архив вет. наук.— 1895.— № 1. — С. 389-392.

102. Способ выявления микобактериальных антигенов: пат. 2147125 Рос. Федерация: МПК G 01 N 33/50, 33/569 / Лазовская А.Л., Воробьева З.Г., Слинина К.Н.; заявитель и патентообладатель НИВИ Нечерноземной зоны РФ. - № 98111806/13; заявл. 15.06.1998; опубл. 27.03.2000. Бюл. № 1. — 5 с.

103. Способ лечения больных мытом лошадей: А.с. № 1537258 СССР / К.П. Юров, А.Р. Сансызбаев, А.Б. Бижанов, Бюл. №3. — 1990.

104. Способ лечения больных мытом лошадей: А.с. № 15372586 KZ / К.П. Юров, А.Р. Сансызбаев, А.Б. Бижанов. — 1989.

105. Способ предпосевной обработки патологического материала для выделения микобактерий: пат. 2542460 Рос. Федерация: МПК G01N 33/569 / Лискова Е.А., Слинина К.Н., Берус М.В., Гришина Н.В.; заявитель и патентообладатель ГНУ НИВИ Нечерноземной зоны РФ РАСХН. - № 2013146113/15; заявл. 15.10.2013; опубл. 20.02.2015. Бюл. № 5. — 7 с.

106. Способ предпосевной обработки патологического материала для выделения L-форм микобактерий: пат. 2473906 Рос. Федерация: МПК G01N 30/50/ Коваленко А.М., Дорофеев А.Ф., Тарасова Е.В.; заявитель патентообладатель ФГБОУ ВПО «Белгородская ГСХА им. В.Я. Горина». - № 2011150969/15; заявл. 14.12.2011; опубл. 27.01.2013. Бюл. № 3. — 5 с.

107. Способ предпосевной обработки проб, снятых с объектов внешней среды, на выявление микобактерий: пат. 2402781 Рос. Федерация: МПК G01N 33/84, Нуралинов Р.А., Гаргацов А.А., Вердиева Э.А., Нажалов М.И.; заявитель и патентообладатель ГНУ Прикаспийский зональный НИВИ

Россельхозакадемии. - № 2009124007/15; заявл. 23.06.2009; опубл. 27.10.2010. Бюл. № 30. – 5 с.

108. Степанова, Л.А. Электронно-микроскопическое исследование мытного стрептококка // Ветеринария. – 1966. - № 9. – С. 21.

109. Сыртланов, М.М. О капсуле, образуемой мытным стрептококком / М.М. Сыртланов, И.В. Окунцов, Б.И. Казанин // Сб. науч. работ СибНИВИ.— 1975.— Вып. 25. — С. 72-75.

110. Тарабукина, Н.П. Эффективный пробиотик для Северного животноводства / Н.П. Тарабукина, М.П. Неустроев // Достижения науки и техники АПК. – 2006. - №5. – С. 18-19.

111. Тарабукина, Н.П., Неустроев М.П. Ветеринарно-санитарные мероприятия при инфекционных болезнях животных в условиях Республики Саха (Якутия): монография. – Якутск: ЯНЦ СО РАН, 2000. – 191 с.

112. Токеев, Ш.О. Лечение больных мытом лошадях изотонией: автореф. дис. ... канд. вет, наук / Ш.О. Токеев. — Алма-Ата, 1994. — 23 с.

113. Третьякова, А.А. Лечение мыта лошадей пенициллином и аутокровью / А.А. Третьяков // Тр Киргиз. НИИЖиВ — 1957, — Вып. 13 — С. 163-168.

114. Федоров, Ю.Н. Иммунокоррекция: применение и механизм действия иммуномодулирующих препаратов / Ю.Н. Федоров // Ветеринария. – 2005. - №2. – С. 3-6.

115. Федоров, Ю.Н. Факторы иммунологической защиты у овец в системе мать - плод— новорожденный: автореф. дис.... д-ра биол. наук / Ю.Н. Федоров. — М., 1984. — 35 с.

116. Федосеев, В.С. Особенности течения мыта у жеребят в различных зонах Казахстана / В.С. Федосеев, Н.А. Уразаев, И.Л. Жалобовский // Тр. Семипалат. зоовет ин-та.— 1971. — Т. 5. — С. 130-132.

117. Хаитов, Р.М. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Стоматологи. – 2000. - №5. – С. 4-7.

118. Хоулт, Д. Г. Определитель бактерий Берджи Том 2 / Д.Г. Хоулт, Н. Криг, П. Смит, Дж. Стейли, С. Уилльямс. – М: Мир, 1997. – 325 с.
119. Цветков, К.И. Дифференциальная диагностика мытного стрептококка / К.И. Цветков // Труды воен.-вет. НИУ РККА. — 1931. — Т. 11. — С. 1-12.
120. Цветков, К.И. О противомытном антивирусе и вакцине / К.И. Цветков // Ветеринария. — 1945. — № 2/3. — С. 12-19.
121. Чекишев, В.М. Пути повышения колост- рапного иммунитета у новорожденных телят / В.М. Чекишев, Т.В. Боидарь, О.А. Колганова // Профилактика и лечение незаразных и инвазионных болезней животных / ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние. ИЭВСиДВ. — Новосибирск, 1985.— С. 31-37.
122. Чоенбаев, З.Н. Особенности течения и вопросы диагностики мыта лошадей / З.Н. Чоенбаев // Информ. Листок КазНИИНТИ. — 1991. — № 23. — 5 с.
123. Чоенбаев, З.Н., Коспаков Ж.К. Особенности эпизоотической ситуации мыта лошадей на юго-востоке Казахстана / З.Н. Чоенбаев, Ж.К. Коспаков // Сб. науч. тр. Казах. НИВИ: Инфекционные и инвазионные болезни сельскохозяйственных животных в Казахстане. — 1980. — Т. 20. — С. 118-120.
124. Чысыма, Р.Б. Эпизоотические особенности и возрастная иммунореактивность жеребят при мыте лошадей: автореф. дис. ... канд. вет. наук / Р.Б. Чысыма. — М., 1989. — 15 с.
125. Шантыр, И, Употребление противострептококковой сыворотки при лечении мыта / И. Шантыр // Архив вет науки. — 1903. — №9. — С. 1003-1004.
126. Штамм и культура штамма Str. equi TW 928 для вакцинации лошадей [Текст]: пат. 2194752 Рос. Федерация: МПК⁷ А 61 К 39/09/ Khartford O.M., Foster T.D., Jakobs A.K.; заявитель и патентообладатель Dze Provost FellousEhNDSkolars of DzeKolledzh of DzeKhOLIAndivajded TRINITI OF KvinEhLIZABET NEAR Dublin (IE). - № 2194752C2; заявл. 24.01.97; опубл. 30.12.02. Бюл. № 35.

127. Щелкунова, Н.М. Некоторые вопросы культурально-биохимических свойств *Str. equi* / Н.М. Щелкунова // Инфекционные и инвазионные болезни сельскохозяйственных животных в Казахстане: Сб. науч. тр. Казах. НИВИ, — 1980. — С. 120-122.
128. Юров, К.П. Грипп / К.П. Юров // Вирусные болезни лошадей. — М., 1972. — С. 65-82.
129. Юров, К.П. Грипп / К.П. Юров // Инфекционные и инвазионные болезни лошадей. — М.: Колос, 1976, — С. 81-90.
130. Юров, К.П. Диагностика респираторных болезней жеребят / К.П. Юров // Ветеринария. — 1980, — № 10, — С. 65-66.
131. Юров, К.П. Инфекционные болезни лошадей / К.П. Юров. — М: Росагропромиздат, 1991 — С. 110-114.
132. Яримпил, Б. Диагностика сапа лошадей / Б. Яримпил, Г.А. Юдин // Ветеринария. — 1971. - №6. — С. 110-112.
133. Ahooja, M.L. Application of modified complement-fixation test for detecting- antibodies in horses vaccinated against strangles / M.L. Ahooja, T.S. Gulrajani // Indian J. Animal Sciences. — 1971. — Vol. 41(10). — P. 954-960.
134. Ahooja, M.L. Studies on the keeping quality of verious mixed (*streptococcus equi*) vaccines / Ahooja M.L., Gulrajani T.S. // Indian J.Anim.Sciences. — 1971. — 41. — P. 1046-1049.
135. Bazelley, P.L. Studies with equine streptococci 1 / P.L. Bazelley, J. Battle // Aust. Vet. J. — 1940. - Vol. 16. — P. 140-146.
136. Bazelley, P.L. Studies with equine streptococci 2; Experimental immunity to sir. Equi / P.L. Bazelley // Aust. Vet. J. — 1940. — Vol. 16. — P. 243-259.
137. Bazelley, P.L. Studies with equine streptococci 3: Vaccination against Strangles / P.L. Bazelley // Aust. Vet. J. — 1942. — Vol. 18 (4). — P. 141-155.
138. Bazelley, P.L. Studies with equine streptococci 4 / P.L. Bazelley // Aust. Vet. J. — 1942. - Vol. 18. — P. 189-194.

139. Bazelley, P.L. Studies with equine streptococci 5 / P.L. Bazelley // Aust. Vet. J. – 1943. - Vol. 19. – P. 62-85.
140. Bergey, D.H. Manual of systematic bacteriology. The william and wilking company / D.H. Bergey // Company. Baltimore. 9. Auflag'e. — 1986. — Vol. 2. — P. 1051.
141. Black, M. Lymph node reactivity / M. Black, F. Speer // Fetal lymph nodes blood.— 1959. — Vol. 14. — P. 848-855.
142. Blood, D.C. Strangles / D.C. Blood, J.A. Henderson // Veterinary Medicine. – Philadelphia: Sea and Febiger. – 1974. – P. 294-296.
143. Boyle, A. G. Horses vaccinated with live attenuated intranasal strangles vaccine seroconvert to SEQ2190 and SeM / A.G. Boyle, C. Mitchel, D. Stefanovski, A.S. Waller // Equine Veterinary Journal. – 2021. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/evj.13443> (дата обращения 24.11.2021).
144. Boyle, A.G. Comparison of nasofaryngeal and guttural pouch specimens to determine the optimal sampling site to detect Str. equi subsp. equi carriers by DNA amplification / A.G. Boyle, D. Stefanovski, S.C. Rankin // BMC Veterinary. Research. – 2017. – 13 (75) URL: <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0989-4> (дата обращения 24.10.2019).
145. Boyle, A.G. Str. equi detection polimerase chain reaction assay for equine nasopharyngeal and guttural pouch wash samples / A.G. Boyle, S.C. Rankin, L. Duffee, R.C. Boston, H. Wheeler-Aceto // Journal of Veterinary Internal Medicine. – 2016. - 30(1). – P. 276-281.
146. Boyle, A.G. Str. equi infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles—revised consensus statement / A.G. Boyle, J.F. Timoney, J.R. Newton, M.T. Hines, A.S. Waller, B.R. Buchanan // Journal of Veterinary Internal Medicine. – 2018. – Vol. 32(2). – P. 633-647.
147. Bryans, J.T. Group C Streptococcal infections of the horse. Streptococci and Streptococcal Diseases / J.T. Bryans, B.O. Moore // New York and London. Academic Press. – 1972. – P. 327-337.

148. Charbonneau, A.R.L. Identification of genes required for the fitness of *Str. equi* subsp. *equi* in whole equine in whole equine blood and hydrogen peroxide / A.R.L. Charbonneau, E. Taylor, C.J. Mitchell, C. Robinson, A.K. Cain, J.A. Leigh, D.J. Maskell, A.S. Waller // *Microb Genom.* – 2020. – 6 (4). – e000362 (doi: 10.1099/mgen.0.000362).
149. Clabough, D. *Str. equi* infection in the horse: A review of clinical and immunological considerations / D. Clabough // *J. Equine Vet. Science.* — 1985. — Vol. 5 (2). — P. 279-283.
150. Cordoni, G. Rapid diagnosis of strangles (*Str. equi* subspecies *equi*) using PCR / G. Cordoni, A. Williams, A. Duram, D. Florio, R.G. Zanoni, R.L. Ragione // *Research in Veterinary Science.* – 2015. – 102. – P. 162-166 (doi: 10.1016/j.rvsc.2015.08.008).
151. Cursons, R. Strangles in horses can be caused by vaccination with Pinnacle IN / R. Cursons, O. Patty, K.F. Steward, A.S. Waller // *Vaccine.* – 2015. – Vol. 33 (30). – P. 3440–3443.
152. Dauvillier, J. Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease / J. Dauvillier, F. Ter Woort, E. van Erck-Westergren // *J Vet Intern Med.* – 2019. – Vol. 33(2). – P. 968-975. doi: 10.1111/jvim.15397. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30576012; PMCID: PMC6430897.
153. Duran, M.C. Equine strangles: An update on disease control and prevention / M.C. Duran, L.S. Goehring // *Austral journal of veterinary sciences.* – 2021. – Vol. 53 (1). – P. 23–31.
154. Ebert, E.F. Some observations on equine strangles / E.F. Ebert // *Vet. Med.* — 1969. — Vol. 64 (1). — P. 71-73.
155. Fernandez, E. *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminants / E. Fernandez, V. Blume, P. Garrido, M. Colins, A. Mateos, L. Dominguez, J. Fernandez-Garayzabal // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2004. – Vol. 54 (6). – P. 2291–2296.

156. Grant, S.T. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Str. equi* / S.T. Grant, A. Efstration, N. Chanter // *Veter. Rec.* — 1993. — Vol. 133 (9). — P. 215-216.
157. Gronin, M.T. The characters of streptococci isolated from the uteri of thoroughbred mares in Ireland / M.T. Gronin // *J. Comp, Path.* — 1952. — Vol. 62. — P. 260.
158. Guss, B. Getting to Grips with Strangles: An Effective Multi-Component Recombinant Vaccine for the Protection of Horses from *Str. equi* Infection / B. Guss, M. Flock, L. Frykberg, A.S. Waller, C. Robinson, K.C. Smith, J. Flock // *PLOS Pathogens.* — 2009. — Vol. 5 (9). — P. e1000584 (1-9).
159. Harrington, D.J. The molecular basis of *Str. equi* infection and disease / D.J. Harrington, I.C. Sutcliffe, N. Chanter // *Microbes Infect.* — 2002. — Vol. 4 (4). — P. 501–510.
160. Harris, S.R. Genome specialization and decay of the strangles pathogen, *Str. equi*, is driven by persistent infection / S.R. Harris, C. Robinson, K.F. Steward, K.S. Webb, R. Pailot // *Genome Res.* — 2015. — Vol. 25 (9). — P. 1360–1371.
161. Hoffman, A.M. Field evaluation of a commercial M-protein vaccine against *Str. equi* infection in foals / A.M. Hoffman, H.R. Staempfli, J.F. Prescott, L. Viel // *Am J Vet Res.* — 1991. — Vol. 52 (4). — P. 589–592.
162. Jacobs, A.A. Investigations towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi* / A.A. Jacobs, D. Goovaerts, P.J. Nuijten, O.M. Hartford, T.J. Foster // *Vet Rec.* — 2000. — Vol. 147 (20). — P. 563–567.
163. Jurkovic, L. Uber einem seltenen fall der druse beim neugeborienen fohlen / L. Jurkovic // *Zagreb.* — 1981. — P. 1-3.
164. Kasuya, K. Genetic analysis of *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from horses imported into Japan / K. Kasuya, N. Tanaka, F. Oshima et al. // *J Vet Med Sci.* — 2019. - Vol. 81(6). — P. 924-927.

165. Kelly, C. Sequence variation of the SeM gene of *Str. equi* allows discrimination of the source of strangles outbreaks / C. Kelly, M. Bugg, C. Robinson, Z. Mitchell, N. Davis-Poynter // *J Clin Microbiol.* – 2006. – Vol. 44 (2). – P. 480–486.
166. Kemp-Symonds J. Modified live *Streptococcus equi* (Strangles) vaccination followed by clinically adverse reactions associated with bacterial replication / J. Kemp-Symonds, T. Kemble, A. Waller // *Equine Vet J.* – 2007. – Vol. 39 (3). – P. 284–286.
167. Kim, J.W. A case of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* infection in a thoroughbred horse / J.W. Kim, J.Y. Jung, K. Lee, H. Lee, H.Y. Kim, S.S. Yoon, B.J. So // *Journal of Comparative Pathology.* – 2018. - Vol. 158. – P. 137.
168. Kust, D. Fortpflanzungstörungen bei den Haustieren / D. Kust, F. Schaetz // *Ferdinand- Enke-Verlag.* — Stuttgart, 1983. — P. 420-431.
169. Lancefield, R.C. Serological differentiation of Human and other groups of hemolytic streptococci / R.C. Lancefield // *J. Exp. Med.* — 1933. — Vol. 57. — P. 571-595.
170. Lee, D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration for optimal dosage of cefquinome against *Streptococcus equi* subsp. *equi* in foals / D. Lee, B.T. Birhanu, E. Lee, S. Lee, N. Bobby, Y. Park, S. Park // *Veterinary Research.* – 2020. – Vol. 51 (1). – P. 131.
171. Libardoni, F. Prevalence of *Streptococcus equi* subsp. in horse and associated risk factors in the State of Rio Grande do Sul, Brazil / F. Libardoni, G. Machado, L.T. Gressler, A.P. Kowalski, G.H. Diehl, L.C. Santos, L.G. Corbellini, A.C. Vargas // *Research in Veterinary Science.* – 2016. - Vol. 104. – P. 53-57.
172. Lindahl, S. *Str. equi* subsp. *equi* and *Str. equi* subsp. *Zooepidemicus*. (Upper respiratory disease in horses and zoonotic transmission to humans) / S. Lindahl. – Uppsala: *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*, 2013. – 75 c.
173. Livengood, J.L. Detection and differentiation of wild-type and a vaccine strain of *Str. equi* ssp. *equi* using pyrosequencing / J.L. Livengood, S. Lanka, C. Maddox, D. Tewari // *Vaccine.* – 2016. – Vol. 34 (34). – P. 3935–3937.

174. Mallicote, M. Update on *Streptococcus equi* subsp *equi* infections / M. Mallicote // *Vet Clin North Am Equine Pract.* – 2015. – Vol. 31 (1). – P. 27–41.
175. Narmat-Allah, A.N.F. Strangles in Arabian horses in Egypt: clinical, epidemiological, hematological, and biochemical aspects / A.N.F. Narmat-Allah, H.M. Damaty // *Vet. World.* – 2016. - Vol. 9(4). – P. 820-826.
176. Newton, J. R. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi* / J.R. Newton, K. Verheyen, N.C. Talbot, J.F. Timoney, J.L. Wood, K.H. Lakhani, N. Chanter // *Equine Vet J.* – 2000. – Vol. 32 (6). – P. 515–526.
177. Newton, J.R. Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi* / J.R. Newton, J.L. Wood, K.A. Dunn, M.N. DeBrauwere, N. Chanter // *Vet Rec.* – 1997. – Vol. 140 (4). – P. 84–90.
178. Norcross, N.L. Comments on antigenicity of group C streptococci / N.L. Norcross // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* — 1969. — Vol. 155. — P. 421-124.
179. Parkinson, N.J. Molecular epidemiology of strangles outbreaks in the UK during / N.J. Parkinson, C. Robin, J.R. Newton, J. Slater, A.S. Waller // *Vet Rec.* – 2010. – 168:666.
180. Pelkonen, S. Transmission of *Streptococcus equi* subspecies zooepidemicus infection from horses to humans / S. Pelkonen, S. Lindahl, P. Suomala, J. Karhukorpi, S. Vuorinen // *Emerg Infect Dis.* – 2013. – Vol. 19 (7). – P. 1041–1048.
181. Piche, C.A. Clinical observations on an outbreak of Strangles / C.A. Piche // *Can. Vet. J.* — 1984 — Vol. 25, № 1. — P. 7-11.
182. Prescott, J.F. et al. A mild form of strangles caused by an atypical *Str. equi* / J.F. Prescott, S.K. Srivastava, R. de Gannes, D.A. uni Barn // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* — 1982. — Vol. 180. — P. 293-294.
183. Pringle, J. Influence of penicillin treatment of horses with strangles on seropositivity to *Str. equi* ssp. *equi* – specific antibodies / J. Pringle, E. Storm, A. Waller, M. Riihimaki // *J. Vet. Intern Med.* – 2020 – Vol. 34(1). – P. 294-299.

184. Proks, C. Epizootic streptokokove chripecs vyskytem akutni iridocyklitidy / C. Proks, P. Sedlacek, V. Vladik // Veterinarstvi. – 1975. – Vol. 25 (1). – P.26-28.
185. Reile, L.J., Geenetzky, R.M. Equine strangles a brief overview / L.J. Reile, R.M. Geenetzky // Iowa state Univ. Vet. – 1983. – Vol. 45, № 1. – P. 16-19.
186. Robinson, C. Intramuscular vaccination with Strangvac is safe and induces protection against equine strangles caused by *Streptococcus equi* / C. Robinson, A.S. Waller, L. Frykberg, M. Flock, O. Zachrisson, B. Guss, J. Flock // Vaccine. – 2020. – Vol. 38 (3) – P. 4561-4868.
187. Robinson, C. Strangvac: A recombinant fusion protein vaccine that protects against strangles, caused by *Streptococcus equi* / C. Robinson, L. Frykberg, M. Flock, B. Guss, A.S. Waller, J. Flock // Vaccine. – 2018. – 36(11). – 1484-1490.
188. Romanowska, D. Antistreptolysin o titer in horses / D. Romanowska, Z. Szykiewicz // Ada Microbiologica Polonica. — 1986. — Vol. 35(1/2). — P. 91-95.
189. Ruffo, G. De medicina equorum [Электронный ресурс]. URL: <https://wellcomecollection.org/works/yg7bw9zr> (дата обращения: 16.12.2020).
190. Srivastava, S.K., Detection of immune response in pony foals vaccinated with M-protein of *Str. equi* / S.K. Srivastava, D.A. Barnum // Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology. – 1981. – Vol. 81. – P.74.
191. Starr, M.P. The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria / M.P. Starr, J.M. Schmidt. – 1981. – P. 15-25. – URL: https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_1 (дата обращения 24.03.2020).
192. Sweeney, C.R. Complications associated whit *Str. equi* infection on a horse farm / C.R. Sweeney, R.H. Whitlock, D.A. Meirs, S.C. Whitehead, S.O. Barningham // J. Am. Vet. Med. Assoc. – 1987.- Vol. 191(11). – P. 1446–1448.
193. Sweeney, C.R. *Str. equi* infections in horses: guidelines for treatment, control and prevention of strangles / C.R. Sweeney, J.F. Timoney, J.R. Newton, M.T. Hines // Journal of Veterinary Internal Medicine. – 2005. – 19. – P. 123-134 (doi: 10.1111/j.1939-1676.2005.tb02671.x).

194. Thalhammer, J.G. Effect of the B cell activators lipid A and dextran sulphate on the antibody response to sheep red blood cells in piglets / J.G. Thalhammer, W. Stoeki, C. Reyere // *Immunology*. — 1978. — Vol. 35(5). — P. 793-799.
195. Timoney, J.F. Early pathogenesis of equine *Streptococcus equi* infection (strangles) / J.F. Timoney, P. Kumar // *Equine Vet J*. — 2008. — Vol. 40 (7). — P. 637–642.
196. Timoney, J.F. Strangles / J.F. Timoney // *Vet Clin North Am Equine Pract*. — 1993. — Vol. 9 (2). — P. 365–374.
197. Timoney, J.F. The antiphagocytic activity of SeM of *Streptococcus equi* requires capsule / J.F. Timoney, P. Suther, S. Velineni, C. Artiushin // *J. Equine Sci.* — 2014. — 25. — 53–56.
198. Timoney, J.F. The pathogenic equine streptococci / J.F. Timoney // *Vet. Res.* — 2004. — Vol. 35(4). — P. 397-409.
199. Vaissaire, J. La gourme Données actuelles / J. Vaissaire, E. Plateau, M. Laroche, G. Mirial // *Bull. Acad. Veter. Fr.* — 1984. — Vol. 57 (3). — P. 287-292.
200. Verheyen, K. Elimination of guttural pouch infection and inflammation in asymptomatic carriers of *Streptococcus equi* / K. Verheyen, J.R. Newton, N.C. Talbot, M.N. de Brauwere, N. Chanter // *Equine Vet. J.* — 2000. — 32 (6). — P. 527-532.
201. Walker, J.A. Construction of a stable non-mucoid deletion mutant of the *Str. equi* Pinnacle vaccine strain / J.A. Walker, J.F. Timoney // *Vet Microbiol.* — 2002. — Vol. 89 (4). — P. 311–321.
202. Waller, A.S. Getting a grip on strangles: recent progress towards improved diagnostics and vaccines / A.S. Waller, K.A. Jolley // *Veterinary Journal*. — 2007. — Vol. 173 (3) — P. 492-501.
203. Waller, A.S. New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses / A.S. Waller // *Vet Clin North Am Equine Pract*. — 2014. — Vol. 30 (3). — P. 591–607.
204. Waller, A.S. *Streptococcus equi*: breaking its strangles-hold / A.S. Waller // *Vet Rec*. — 2018. — Vol. 182 (11). — P. 316–318.

205. Webb, K. Detection of *Str. equi* using a triplex qPCR assay / K. Webb, C. Barker, T. Harrison, Z. Heather, K.F. Steward, C. Robinson, J.R. Newton, A.S. Waller // *Veterinary Journal*. – 2013. - 195 (3). – P. 300-304.
206. Wilson, W.D. *Str. equi* infection strangles in horses / W.D. Wilson // *Irish. Veterinary News*. — 1987. — Vol. 9 (10). — P 23-29.
207. Woolcock, J.B. Studies in atypical *Str. equi* / J.B. Woolcock // *Res. Vet. Sci*. – 1975. – Vol.19. – P. 115-119.
208. Zadeh, F.N. Epizootiological investigation of strangles in the equine stables in Tehran / F.N. Zadeh, F.G.A. Pour, S.M. Khajeh-Nasiri // *J. Equine Veter. Sci*, — 1992, — Vol. 12(6). — P. 401-402.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)



ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И
ЗАКАВКАЗЬЯ

№ 184/н от 31 МАЙ 2018

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

«Всероссийская государственная коллекция штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве» ФГБУ «ВГНКИ» приняла на депонирование по форме «национальное патентное депонирование» штамм:

название штамма: род – *Streptococcus* вид - *equi*
(*Streptococcus equi* «Н-5/1»)

Дата депонирования: 22.05.2018г.

Депозитор: Общество с ограниченной ответственностью
«Научно-производственный центр «Хоту-Бакт» (ООО
НПЦ «Хоту Бакт»)

Назначение штамма: может быть использован в качестве
производственного штамма при изготовлении
биологических препаратов для последующего
применения в ветеринарии.

Регистрационный номер: ВКШМ – Б – 141П

Директор

Киш Л.К.

Streptococcus equi strain H 5/1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MW486609.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

LOCUS MW486609 1422 bp DNA linear BCT 23-JAN-2021

DEFINITION Streptococcus equi strain H 5/1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION MW486609

VERSION MW486609.1

KEYWORDS .

SOURCE Streptococcus equi

ORGANISM [Streptococcus equi](#)
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; Streptococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1422)

AUTHORS Kabilov,M., Baturina,O., Petrova,S., Elbyadova,E., Popov,A. and Neustroev,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-JAN-2021) SB RAS Genomics Core Facility, ICBFM SB RAS, Lavrentyev av.8, Novosibirsk 630090, Russia

COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1422
/organism="Streptococcus equi"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="H 5/1"
/db_xref="taxon:1336"

rRNA
.....
<1..>1422
/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1  tgcaagtgga  acgcacagat  gatacgtagc  ttgctacaat  tatctgtgag  tcgcaaacgg
61  gtgagtaacg  cgtaggtaac  ctacgttata  gcgggggata  actattggaa  acgatagcta
121  ataccgcata  aaagtgggtg  acccatgtta  accattttaa  aggagcaaca  gctccactat
181  gagatggacc  tgcgttgtat  tagctagtgt  gtagggtaaa  ggcctaccaa  ggcgacgata
241  catagccgac  ctgagagggt  gaacggccac  actgggactg  agacacggcc  cagactccta
301  cgggagcgag  cagtagggaa  tcttcggcaa  tggggggaac  cctgaccgaa  caacgccgcg
361  tgagtgaaga  aggttttcgg  atcgtaaagc  tctgttgtta  gagaagaaca  gtgatgggag
421  tggaaaagtc  atcatgtgac  ggtaactaac  cagaaaggga  cggctaacta  cgtgccagca
481  gccgcggtaa  tacgtaggtc  ccgagcgttg  tccggattta  ttgggcgtaa  agcgagcgca
541  ggcgggttga  taagtctgaa  gttaaaaggc  gtggcttaac  cattgtatgc  ttggaaact
601  gttaaacttg  agtcagaag  gggagagtgg  aattccatgt  gtagcggtag  aatgcgtaga
661  tatatggagg  aacaccgggt  gcgaaagcgg  ctctctggtc  tgtaactgac  gctgaggctc
721  gaaagcgtgg  ggagcaaaac  ggattagata  ccctggtagt  ccacgccgta  aacgctgagt
781  gctaggtgtt  aggcccttct  cggggcttag  tgccggagct  aacgcattaa  gcactccgcc
841  tggggagtac  gaccgcaagg  ttgaaactca  aaggaattga  cggggggccc  cacaagcggg
901  ggagcatgtg  gtttaattcg  aagcaacgcg  aagaacctta  ccaggtcttg  acatcccgat
961  gctattctta  gagataagaa  gttacttcgg  tacattggag  acaggtgggtg  catggtgtgc
1021  gtcagctcgt  gtcgtgagat  gttgggttaa  gtcccgaac  gagcgcaacc  cttattgtta
1081  gttgccatca  ttaagtggg  cactctagcg  agactgccgg  taataaacgg  gaggaagggtg
1141  gggatgacgt  caaatcatca  tgccccttat  gacctgggct  acacacgtgc  tacaatgggt
1201  ggtacaacga  gtcgcaagcc  ggtgacggca  agctaattct  tgaaagctaa  tctcagttcg
1261  gattgtaggc  tgcaactcgc  ctacatgaag  tcggaatcgc  tagtaatcgc  ggatcagcac
1321  gccgcggtag  atacgttccc  gggccttgta  cacaccgcc  gtcacaccac  gagagtttgt
1381  aacacccgaa  gtcggtgagg  taaccgttaa  ggagccagcc  gc

```

//

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MW486609.1>



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11)

2 703 485⁽¹³⁾ C1

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(52) СПК

C12N 1/20 (2019.05); A61K 39/092 (2019.05); C12R 1/46 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018129833, 15.08.2018

(24) Дата начала отчета срока действия патента:
15.08.2018Дата регистрации:
17.10.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.08.2018

(45) Опубликовано: 17.10.2019 Бюл. № 29

Адрес для переписки:

677001, г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского,
23/1, ФГБУН ФИЦ "ЯНЦ СО РАН"
обособленное подразделение "Якутский
научно-исследовательский институт сельского
хозяйства имени М.Г. Сафронова"

(72) Автор(ы):

Неустроев Михаил Петрович (RU),
Тарабукина Надежда Петровна (RU),
Петрова Саргылана Гурьевна (RU),
Эльбядова Евдокия Игнатьевна (RU),
Попов Андриан Афанасьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Федеральный
исследовательский центр "Якутский научный
центр Сибирского отделения Российской
академии наук" (RU),
Общество с ограниченной ответственностью
Научно-производственный центр
"Хоту-Бакт" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ЕА 29938 В1, 31.05.2018. RU 2080381
C1, 27.05.1997. RU 94021201 А1, 10.08.1996. KZ
29272 А4, 15.12.2014. RU 2122428 C1, 27.11.1998.

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ STREPTOCOCCUS EQUI, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ МЫТА ЛОШАДЕЙ

(57) Формула изобретения

Штамм бактерий Streptococcus equi, депонированный в ФГБУ «ВГНКИ» под
регистрационным номером ВКШМ-Б-141П, для изготовления вакцины против мыта
лошадей.

Приложение Г



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВETERИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ

**Регистрационное удостоверение
лекарственного препарата для ветеринарного применения**

№ 006158

Номер регистрационного удостоверения: _____

71-1-27.21-4828 № ПВР-1-27.21/03691

Дата государственной регистрации: « 08 » _____ декабря 20 21 г.

Наименование и адрес держателя или владельца регистрационного удостоверения
лекарственного препарата: ООО "Научно-производственный центр "Хоту-Бакт"
677001, г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, 23, корпус 1

Наименование и адрес юридического лица - разработчика лекарственного препарата:
ООО "Научно-производственный центр "Хоту-Бакт" 677001, г. Якутск, ул.
Бестужева-Марлинского, 23, корпус 1

Торговое наименование лекарственного препарата: Вакцина против мьта лошадей
инактивированная

Международное непатентованное, или группировочное, или химическое
наименование лекарственного препарата: Вакцина против мьта лошадей
инактивированная

Лекарственная форма: суспензия для инъекций

Дозировка: 18 см³ (6 доз), 96 см³ (32 дозы)

Регистрационное удостоверение выдано бессрочно, со сроком действия 5 лет
(нужное подчеркнуть)

Заместитель Руководителя _____
(должность)



К.А. Савенков
(Ф.И.О.)

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2018621835

«Мыт лошадей»

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени М.Г. Сафронова» (RU)*

Авторы: *Неустроев Михаил Петрович (RU), Тарабукина Надежда Петровна (RU), Петрова Саргылана Гурьевна (RU), Эльбядова Евдокия Игнатьевна (RU), Попов Андриан Афанасьевич (RU)*



Заявка № 2018621640

Дата поступления 12 ноября 2018 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 20 ноября 2018 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивалиев

Приложение Е



ИНСТРУКЦИЯ

по ветеринарному применению лекарственного препарата
Вакцина против мыта лошадей инактивированная

(Организация-разработчик: Общество с ограниченной ответственностью
«Научно-производственный центр «Хоту-Бакт», 677001, г. Якутск, ул.
Бестужева-Марлинского, 23, корпус 1)

Номер регистрационного удостоверения:

№1-Р-24.21-4828 N ПБР-1-84.21/03691

I. Общие сведения

1. Торговое наименование – Вакцина против мыта лошадей инактивированная.

Международная непатентованное название - Вакцина против мыта лошадей инактивированная.

2. Лекарственная форма: суспензия для инъекций.

Вакцина изготовлена из культуры штамма *Streptococcus equi* H-5/1, инактивированного формалином, с добавлением в качестве адъюванта гидроокиси алюминия и иммуномодулятора фильтрата культуры бактерий *Bacillus subtilis* «ТНП-3».

3. По внешнему виду вакцина представляет собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета со светлым осадком, который при взбалтывании легко гомогенизируется. Срок годности вакцины 12 месяцев с даты выпуска при соблюдении условий хранения и транспортирования. По истечении срока годности вакцина к применению не пригодна.

4. Вакцина расфасована по 18, 96 см³ (6 и 32 доз) в стеклянные флаконы соответствующей вместимости, укупоренные резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками. Флаконы с вакциной упакованы в коробки. В каждую коробку вложена инструкция по применению вакцины. Коробки с вакциной упакованы в ящики.

5. Вакцину хранят в темном месте при температуре от 2°C до 10°C. Допускается транспортировка при температуре до 25°C в течение 15 суток.

6. Вакцину следует хранить в местах недоступных для детей.

7. Вакцину во флаконы без маркировки, с нарушением целостности и/или герметичности укупорки, с измененным внешним видом, подвергшуюся замораживанию, с истекшим сроком годности, не использованную в течение 6 часов после вскрытия флаконов бракуют, обеззараживают путем кипячения или 2%-ным раствором щелочи или 5%-ным раствором хлорамина (1:1) в течение 30 минут и утилизируют. Утилизация обеззараженной вакцины не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

8. Отпускается без рецепта.

II. Биологические свойства

9. Иммунобиологический лекарственный препарат.

10. Вакцина вызывает формирование иммунного ответа у лошадей к возбудителю мыта через 14 суток после однократного применения продолжительностью не менее 12 месяцев.

В одной иммунизирующей дозе вакцины содержится не менее 6 млрд. микробных клеток инактивированного вакцинного штамма *Streptococcus equi* H-5/1.

Вакцина безвредна, лечебными свойствами не обладает.

III. Порядок применения

11. Вакцина предназначена для иммунизации молодняка лошадей в угрожаемых и неблагополучных по мыту лошадей хозяйствах.

12. Запрещается вакцинировать клинически больных и/или ослабленных животных.

13. При работе с вакциной следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными средствами для ветеринарного применения.

Все лица, участвующие в проведении вакцинации должны быть обеспечены спецодеждой и очками закрытого типа. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

При попадании препарата на кожу и/или слизистые оболочки их необходимо промыть большим количеством чистой воды. При случайном введении вакцины человеку, место инъекции необходимо обработать 5%-ным раствором йода или 70%-ным раствором этилового спирта и обратиться в медицинское учреждение.

14. Вакцинации подлежат молодняк лошадей с 6-ти месячного возраста

15. Вакцину вводят животным однократно внутримышечно, в верхнюю треть шеи в объеме 3 см³.

Перед применением флаконы с вакциной встряхивают. При проведении вакцинации соблюдают правила асептики и антисептики. Используют стерильные шприцы и иглы. Место введения вакцины обрабатывают 70%-ным этиловым спиртом или другим дезинфицирующим раствором.

16. При применении вакцины в соответствии с настоящей инструкцией побочных явлений и осложнений, как правило, не отмечается. У отдельных вакцинированных животных на месте введения вакцины может образоваться умеренно выраженная припухлость, исчезающая в течение 14 суток.

17. Симптомов проявления мьта лошадей или других патологических признаков при передозировке вакцины не установлено.

18. Запрещается использовать вакцину против мьта лошадей инаktivированную совместно с другими иммунобиологическими препаратами,

а также применять вакцины против лептоспироза и ринопневмонии лошадей в течение 14 суток после иммунизации.

19. Особенности поствакцинальной реакции при введении вакцины не установлено.

20. Следует избегать нарушений схемы вакцинации, поскольку это может привести к снижению эффективности иммунопрофилактики.

В случае пропуска очередного введения вакцины необходимо провести иммунизацию как можно скорее.

21. Продукты убоя от вакцинированных животных реализуют без ограничения независимо от сроков вакцинации.

Наименование и адрес производственных площадок производителя лекарственного препарата для ветеринарного применения	Общество с ограниченной ответственностью «Научно- производственный центр «Хоту- Бакт», 677001, г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского 23, корп.1
---	--

Наименование, адрес организации, уполномоченной держателем или владельцем регистрационного удостоверения лекарственного препарата на принятие претензий от потребителя.	Общество с ограниченной ответственностью «Научно- производственный центр «Хоту- Бакт», 677001, г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского 23, корп. 1.
---	--

Директор ООО НПЦ «Хоту-Бакт»,

д.в.н., профессор



М.П. Неустроев

Приложение Ж

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ЯКУТСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
«ЯКУТСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА им. М.Г. САФРОНОВА»

СИСТЕМА ВЕДЕНИЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ) НА ПЕРИОД 2021-2025 ГОДЫ

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОСОБИЯ

Издательство Сангалава К.Ю.
Белгород, 2021

УДК 63(571.56)
ББК 42Рос.Яку
441

ISBN 978-5-6046091-8-7

Редакционный совет

Атахов А.П. (Министерство сельского хозяйства РС (Я)), Осипов Т.М. (Министерство сельского хозяйства РС (Я)),
Афанасов Н.С. (Министерство сельского хозяйства РС (Я)), Афанасов В.В. (Министерство сельского хозяйства РС (Я)),
Николаев П.Р. (Министерство сельского хозяйства РС (Я)), Владимирова Л.Н. (ЯНИИСХ), Артемьев А.Е.
(Ассоциация крестьянских (фермерских) хозяйств и кооперативов РС (Я)), Коренькольд Б.М. (Академия наук РС (Я)).

Редакционная коллегия

Владимиров Л.Н., д-р биол. наук, профессор, член-корреспондент РАН (главный редактор), Маматхуров Г.Н., канд. биол.
наук, Нестуров М.П., д-р тех. наук, профессор, Осипова П.П., д-р с.-х. наук, Иванов Р.В., д-р с.-х. наук, Давыдова Г.Н.,
канд. с.-х. наук, доцент, Павлова С.А., канд. с.-х. наук, доцент, Чугунов А.В., д-р с.-х. наук, профессор

Авторский коллектив

Глава 1. Природно-климатическая характеристика территории Республики Саха (Якутия)

Павлова С.А., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Пестерева Е.С., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Захарова Г.Е., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Федоров А.Н.,
к.х.н. (ИМ СО РАН), Попова А.С., PhD (ЯНИИСХ), [Евдокимов А.П.] д.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Николаев Л.С., к.х.н. (ЯНИИСХ)

Глава 2. Организационно-экономические основы системы ведения сельского хозяйства Республики Саха (Якутия)

Давыдова Г.Н., к.х.н. (ЯНИИСХ), Егорова И.К., к.х.н. (ЯНИИСХ), Протопопова Л.Д. (ЯНИИСХ), Крылова А.Н. (ЯНИИСХ),
Навоткина Н.Н. (ЯНИИСХ), Осипова Т.М. (МСХ РС (Я)), Попова И.В. (МСХ РС(Я)), Туруева А.М. (МСХ РС(Я)),
Пастухов С.И. (ГКУ «ДРО АПК»), Филиппов Д.А. (ГКУ «ДРО АПК»), Колесников А.Д. (МСХ РС(Я)), Горюнов А.П.
(ГКУ «ДРО АПК»), Антонова У.А. (МСХ РС (Я)), Хатанова Ф.Д. (МСХ РС (Я)), Попова Т.Р. (МСХ РС (Я)), Мамышева В.Л.
(МСХ РС (Я)), Ковалева Н.Е. (МСХ РС (Я)), Багланова М.Ф. (МСХ РС (Я)), Попов Н.Н. (МСХ РС (Я)), Тимофеева М.С.
(ИТ по созданию агроэкотерапии)

Глава 3. Система земледелия, растениеводства

Евдокимов А.П., д-р с.-х.н. (ЯНИИСХ), Осипова П.П., д.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Алексеева В.И., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ),
Федоров А.Н., к.с.-х.н. (ИМ СО РАН), Попова А.С., PhD (ЯНИИСХ), Павлова С.А., к.с.-х.н., доцент (ЯНИИСХ), Пестерева Е.С.,
к.с.-х.н., доцент (ЯНИИСХ), Захарова Г.Е., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Винокуров В.С. (ГБУ РС(Я) «Служба земледелия РС (Я)»),
Борисова Л.В. (ЯНИИСХ), Алексеева А.В. (ГБУ РС (Я) «Служба земледелия РС (Я)»), Алексеева А.В. (ГБУ РС (Я) «Служба
земледелия РС (Я)»), Яковлева М.Т., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Максимов Х.И., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Николаев В.С. (ЯНИИСХ),
Нестуров А.Н., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), [Пестерева Е.С.] (ГБУ «Управление по мелиорации земель и сельскохозяйственного
мелиоративного хозяйства»), Полатинский С.И. (ГБУ «Управление по мелиорации земель и сельскохозяйственного мелиоративного»),
Бордакоров А.В. (Верхне-Витимский филиал ГБУ «Управление по мелиорации земель и сельскохозяйственного мелиоративного»),
Лескин М.И., к.х.н. (ГБУ «Управление по мелиорации земель и сельскохозяйственного мелиоративного»),
Владимирова Е.С. (ЯНИИСХ), Петрова Л.В., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Табишова Н.С., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Яковлев Н.С.
(ЯНИИСХ), Ефремов С.П. (ЯНИИСХ), Осипова М.И. (ЯНИИСХ), Гавриленко В.В. (МСХ РС (Я)), Ушаков Е.С. (МСХ
РС (Я)), Арзамасова Ю.В. (МСХ РС(Я)), Корнилов В.М. (ЯНИИСХ), Бардас Н.Ф. (ЯНИИСХ), Самсонова М.С., к.с.-х.н.
(ЯНИИСХ), Протопопова А.В. (ЯНИИСХ), Давыдова А.С. (филиал ФГБУ «Россельхозцентр по РС (Я)»), Петров Н.Н.
(филиал ФГБУ «Россельхозцентр по РС (Я)»), Протопопов А.Н. (филиал ФГБУ «Россельхозцентр по РС (Я)»), Лукин В.Н.
(ЯНИИСХ), Марин Н.И. (МСХ РС (Я)), Александров Н.П., к.х.н. (ФГБОУ ВО АГАТУ)

Глава 4. Кормопроизводство

Павлова С.А., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Пестерева Е.С., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Захарова Г.Е., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Максимов Х.И.,
к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Николаев В.С. (ЯНИИСХ), Кузнецова А.В., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Гавриленко В.В. (МСХ РС (Я)),
Харитонов Д.Н. (МСХ РС (Я)), Жирова Н.Н. (ЯНИИСХ), Ахитов Н.Н. (ЯНИИСХ), Филалова З.М. (ЯНИИСХ),
Винокуров А.Н. (ЯНИИСХ), Лукин В.Н. (ЯНИИСХ), Марин И.И. (МСХ РС(Я)), Александров Н.П., к.х.н. (ФГБОУ ВО
АГАТУ), Попов Н.Т., д.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Баранкова Н.В., д.с.-х.н. (ИНИК СО РАН), Ченгичарова В.В., к.с.-х.н. (МСХ
РС(Я))

Глава 5. Зональная система ведения животноводства

Владимиров Л.Н., д.б.н., профессор, член-корр. РАН (ЯНИИСХ), Маматхуров Г.Н., к.б.н. (ЯНИИСХ), Иванов Р.В., д.с.-х.н.
(ЯНИИСХ), Ромашова В.В., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Николаева Н.А., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Алексеева И.М., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ),
Борисова П.Н., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Маматхурова В.А., к.б.н. (ЯНИИСХ), Черноградская Н.М., к.с.-х.н. (ФГБОУ ВО
АГАТУ), Никаноров М.И. (ЯНИИСХ), Перемышля Т.Ф., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Хомолдасова У.В., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ),
Осипов В.Г., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Тар М.И. (ЯНИИСХ), Федоров И.Н., к.х.н. (ЯНИИСХ), Винокуров Н.В., д.х.н. (ЯНИИСХ),
Слепнев Е.С., д.х.н. (ЯНИИСХ), Балашов И.М. (Государственного комитета РС (Я) по делам Арктики), Осипова Г.Н., к.с.-
х.н. (МСХ РС (Я)), Григорьев И.Н., к.х.н. (ЯНИИСХ), Жирнов А.Д., к.х.н. (ГБУ РС(Я) «Сахаароплемя»), Сисоевцева В.В.
(ФГБОУ ВО АГАТУ), Черкашина А.Г., д.с.-х.н. (ФГБОУ ВО АГАТУ), Шарина Я.Д., к.х.н. (ЯНИИСХ), Нуруева С.Д. (МСХ
РС (Я)), Чугунов А.В., д.с.-х.н. (ФГБОУ ВО АГАТУ), Писельский Е.И. (МСХ РС(Я)), Семин И.К. (МСХ РС(Я)), Лукин В.Н.
(ЯНИИСХ), Матвеев И.И., к.х.н. (ФГБОУ ВО АГАТУ), Александров Н.П., к.х.н. (ФГБОУ ВО АГАТУ), Егоров А.С. (МСХ
РС(Я)), Миронян С.М. (ОАД «Печенобыдземель»), Сыроватский В.Д. (МСХ РС (Я)), Рыбак Н.С., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ),
Балашов И.М. (Государственный комитет РС(Я) по делам Арктики), Ефимова М.М. (Государственный комитет РС(Я) по
делам Арктики)

Глава 6. Рыболовство и рыболовство

Артamon П.П. (ФГКУ «Бурятия» управление по рыболовству и сохранению водных биологических ресурсов «Якутия»),
Иванов Е.В., к.б.н. (НИИ прикладной зоологии Севера), Соломонов Н.М. (НИИ прикладной зоологии Севера)

Глава 7. Пчеловодство

Слепнев Е.С., д.х.н., профессор (ЯНИИСХ), Залкин М.Р. (МБОУ Ойетская агрошкола), Статнова Л.В. (МСХ РС(Я))

Глава 8. Ветеринарное обеспечение отраслей животноводства

Нестуров М.П., д.х.н., профессор (ЯНИИСХ), Тарбукина Н.П., д.х.н., профессор (ЯНИИСХ), Роговников А.Д., д.х.н.,
профессор (ЯНИИСХ), Баранкова А.Н., д.б.н. (ЯНИИСХ), Степанова А.М., к.х.н. (ЯНИИСХ), Обоина Н.А., к.х.н. (ЯНИИСХ),
Замыслов И.Д., к.х.н. (Россельхозцентр), Петров П.Л. (Департамент ветеринарии), [Детисев Т.Т.] к.х.н. (ЯНИИСХ),
Скрибин М.П., к.х.н. (ЯНИИСХ), Баталова А.А., к.х.н. (ЯНИИСХ), Дулова С.В. (ЯНИИСХ), Ушбаева Е.Н. (ЯНИИСХ),
Слепнев Е.С., д.х.н. (ЯНИИСХ), Ковалева Л.М., д.х.н. (ЯНИИСХ), Винокуров Н.В., д.х.н. (ЯНИИСХ), Гавриленко Л.Ю.,
к.х.н. (ЯНИИСХ), Павлова А.Н., д.х.н. (ЯГСА), Махрова Л.И., к.х.н. (Департамент ветеринарии РС(Я)), Старова А.И.
(Россельхозцентр по РС(Я)), Павлова С.П. (Департамент ветеринарии РС(Я)), Платонов Т.А., к.х.н. (ФГБОУ ВО АГАТУ)

Глава 9. Переработка, хранение и реализация (обор) сельскохозяйственной продукции

Ефимова А.А., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Прудачева М.В. (ЯНИИСХ), Васильева В.Т., к.с.-х.н. (ЯНИИСХ), Елисеева Л.И. (ФГБОУ
ВО АГАТУ), Слепнева Т.В. (ЯНИИСХ), Исаев А.П., д.б.н. (ИНИК СО РАН), Васильев Е.Д. (МСХ РС (Я)), Колосова Ю.Н.
(МСХ РС (Я)), Афанасьева Л.Р. (МСХ РС (Я)), Егорова В.Р. (МСХ РС (Я)), Егоровая Т.А. (МСХ РС (Я)), Платонов С.И.
(ГКУ «ДРО АПК»)

Глава 10. Экономические и управленческие основы сельскохозяйственного производства

Нестуров М.П., д.х.н., профессор (ЯНИИСХ), Абрамов А.В., д.б.н. (ЯНИИСХ), [Евдокимов А.П.] д.б.н. (академик АН РС(Я)),

Тарбукина Н.П., д.х.н., профессор (ЯНИИСХ), Попова И.В., к.б.н. (ФГБОУ ВО АГАТУ)

Глава 11. Научно-технические и инновационные развитие АПК

Скрибин М.П., к.х.н. (ЯНИИСХ), Навоткина Н.Н. (ЯНИИСХ), Обоина Н.А., к.х.н. (ЯНИИСХ), Егорова И.К., к.х.н. (ЯНИИСХ)

Глава 12. Каровая политика в сельском хозяйстве

Владимиров Л.Н., д.б.н., профессор, член-корр. РАН (ЯНИИСХ), Пузан А.Г., к.ф.н. (ЯНИИСХ)

Фото на обложке: Слепнев С.С. (саша.ia)

Разработка в целях реализации Закона Республики Саха (Якутия) «О развитии сельского хозяйства в Республике Саха
(Якутия)», Государственной программы Республики Саха (Якутия) «Развитие сельского хозяйства и регулирование рынка
сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия на 2020-2024 годы», является основой для формирования в ре-
спублике перспективных планов развития сельскохозяйственных организаций различных форм хозяйствования и собствен-
ности и предусматривает перевод сельскохозяйственного производства на инновационный путь с использованием достижений
науки и передового опыта.

С41

Система ведения сельского хозяйства в республике Саха (Якутия) на период 2021-2025 годы: методические пособия / Министерство
сельского хозяйства республики Саха (Якутия); Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федерального
исследовательского центра «Якутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», «Якутский научно-
исследовательский институт сельского хозяйства им. М.Г. Сафронова», Л.Н. Владимирова (главный редактор) – Белгород : Издательство
Сангалава К.Ю. 2021. – 592 с. : ил.

ISBN 978-5-6046091-8-7

УДК 63(571.56)
ББК 42Рос.Яку

ISBN 978-5-6046091-8-7

© Министерство сельского хозяйства РС (Я), 2021
© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр «Якутский научный
центр Сибирского отделения Российской академии наук»,
«Якутский научно-исследовательский институт сельского
хозяйства им. М.Г. Сафронова», 2021
© ИП Сангалава К.Ю., 2021

Приложение И

ТҮҮА ХАҢААЙЫСТЫБАТЫН САХА СИРИНЭЭБИ НАУЧНАЙ-ЧИНЧИЙЭР ИНСТИТУТА
ТҮҮА ХАҢААЙЫСТЫБАТЫН САХА СИРИНЭЭБИ АКАДЕМИЯТА
ХОТУ-БАКТ НАУЧНАЙ-ПРОИЗВОДСТВЕННАЙ ЦЕНТР

**ХАБАРБАҢЫТ (МЫТ) ЫАРЫНЫ
ЭМТЭЭҢИН УОННА СЭРЭТИИ
(методический пособия)**



ДЬОКУУСКАЙ 2019

ХАБАРБАҢЫТ (МЫТ) ЫАРЫНЫ
ЭМТЭЭҢИН УОННА СЭРЭТИИ
(методический пособия)

Тираж 300 экз.

Отпечатано в типографии
Государственного казенного учреждения Республики Саха (Якутия)
«ЦЕНТР ИНФОРМАЦИОННО-КОНСУЛЬТАЦИОННОГО
ОБЕСПЕЧЕНИЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА»
г. Якутск, ул. Курашова, 28, тел/ факс: 42-40-60

ТҮҮА ХАҢААЙЫСТЫБАТЫН САХА СИРИНЭЭБИ
НАУЧНАЙ-ЧИНЧИЙЭР ИНСТИТУТА
ТҮҮА ХАҢААЙЫСТЫБАТЫН САХА СИРИНЭЭБИ
АКАДЕМИЯТА
ХОТУ-БАКТ НАУЧНАЙ-ПРОИЗВОДСТВЕННАЙ ЦЕНТР

**ХАБАРБАҢЫТ (МЫТ) ЫАРЫНЫ
ЭМТЭЭҢИН УОННА СЭРЭТИИ
(методический пособия)**

ДЬОКУУСКАЙ 2019

УДК 619:616.9:636.1

Рецензент:
А.Ф. Абрамов, биологическая наука, доктор, профессор,
Саха Сири наукаларын үтүөлөөх үлэһитэ.
Этикеттир редактор:
М.П. Неустров, ветеринарий наука, доктор, профессор,
Россия уонна Саха Сири наукаларын үтүөлөөх үлэһитэ.
**Хабарбаҥыт (Мыт) ыарыны эмтээҥин уонна
сэрэтин/ ГХССНЧН. – Дьоккуускай, 2019. – 16 с.**
Бу үлэҕэ Саха сиригэр эрдук тарҕаммыт сылгы
сыстыгыаннаах хабарбаҥыт ыарыны сэрэтэргэ уонна
эмтииргэ субэлэр киллэринилэр.
Субэлэр ветеринарий специалистарга, үрдүк үөрэх
уонна техникум студенттарыгар, хаһаайыстыба
салайааччыларыгар, сылгыһыттарыга, чааһынай бас
билээччилэргэ туһалаах буюуохтарын соп.
Субэлэри М.П. Неустров, ветеринарий наука
доктора, профессора, С.Г. Петрова, ветеринарий наука
кандидата, Е.И. Эльбадова, А.А. Попов онордулар.
ТүҮА хаһаайыстыбатын Саха сиригэр научнай-
чинчийэр институтун учуонай сөбүтүгэр (боротоккул № 3
2019 сыл тохсунуу 31 күнүгэр) баччааҥ тахсарга
бингэрэтилиннэ.



2

Государственное автономное
учреждение Республики Саха
(Якутия)
«Технопарк «Якутия»



«Саха Сирэ» технопарка»
Саха Өрөспүүбүлүкэтин
судаарыстыбаннай
автономнай тэрилтэтэ

ул.Дзержинского, 76 г. Якутск, 677009 телефон: приемная 8 (4112) 40-20-75
e-mail: Technopark_14@mail.ru

Протокол испытаний № 1 от 04.12.2017

Исследуемые образцы: Изоляты бактерий *Streptococcus equi*, выделенные от больных мытом жеребят в коневодческих хозяйствах Республики Саха (Якутия).

Заказчик: Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственный центр «Хоту-Бакт» (Адрес: 677001, Российская Федерация, Республика Саха (Якутия), г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского д. 23, корп. 1).

Основание для проведения лабораторных исследований: на основании договора.

Количество проб: 40 изолятов бактерий *Streptococcus equi*.

Дата поступления: 10.11.2017 г.

Даты проведения испытания: 10.11.2017-04.12.2017.

Фактическое место проведения испытаний: Российская Федерация, Республика Саха (Якутия), г. Якутск, ул. Труда, д. 1, Биотехнологическая лаборатория ГАУ «Технопарк «Якутия».

Цель исследования: молекулярно-генетическое типирование изолятов бактерий *Streptococcus equi*.

Задачи исследования: идентифицировать на молекулярно-генетическом уровне изоляты бактерий *Streptococcus equi*, выделенных из патологических материалов, отобранных от жеребят с клиническими признаками стрептококковой инфекции (мыта) лошадей с использованием методов экстракции ДНК, ПЦР и электрофореза в агарозном геле.

Норматив: *Streptococcus equi*

Метод испытания: ПЦР с использованием штамм-специфичных праймеров

Применяемое оборудование:

№ п/п	Наименование оборудования
1.	Микробиологический инкубатор/термостат с естественной конвекцией BD53 BINDER
2.	Центрифуга многофункциональная 5804R Eppendorf
3.	Мульти-вортекс V-32 BioSan
4.	Центрифуга 5418 Eppendorf
5.	Спектрофотометр NanoPhotometer™ P 330 Implen
6.	Термоциклер T100™ Bio-Rad
7.	Камера для горизонтального электрофореза SE-2 Helicon
8.	Система гель-документации BDAdigital System 20 Biometra
9.	Бокс для стерильных работ UVT-S-AR BioSan

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ:**I. Бактериологический посев и подготовка бульонной культуры к исследованию:**

1. Бактериологический посев изолятов бактерий *Streptococcus equi* на 1% МПБ с 10% сыворотки крови лошади. Инкубировали в течение 18 часов при 37°C в термостате.
2. 3,5 мл суспензии из суточной бульонной культуры переносили в центрифужную пробирку объемом 15 мл.
3. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 об./мин. в течение 5 мин.
4. Супернатант сливали аккуратно, стараясь не затрагивать осадок из клеток.
5. К полученному осадку добавляли 600 мкл лизирующего раствора (TE + 10% SDS).
6. Перемешивали и вортиксовали до гомогенного состояния.
7. Лизаты переносили в пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл.
8. Инкубировали лизаты в термостате при 37°C в течение 1 часа.

II. Выделение ДНК:

1. К лизатам добавляли равный объем фенола (300мкл) и хлороформа (300мкл). Перемешивали до полного соединения фаз, с соблюдением техники безопасности при работе с химическими веществами.
2. Центрифугировали при максимальной скорости (14 тыс. об./мин.) в течение 5 минут.
3. Аккуратно переносили верхнюю фазу в чистые пробирки.
4. Добавляли 2-3 объема холодного 96% этанола к содержимому пробирки. Перемешивали переворачиванием пробирки 3-4 раза.
5. Пробирки с ДНК помещали в морозильник на 30 и более минут для осаждения ДНК.
6. Центрифугировали в течение 5 минут при 14 тыс. об./мин.
7. Этанол сливали одним движением, затем остатки этанола убирали, наклонив пробирку на бумажную салфетку. Открытую пробирку оставляли при комнатной температуре до полного испарения спирта (15-30 мин.).
8. ДНК растворяли в 30мкл TE-буфера
9. Для полного растворения ДНК пробирки вортиксовали в течение 10 мин.
10. Качество и концентрация выделенной ДНК проверяли на наноспектрофотометре.

III. Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР):

1. [В боксе для стерильных работ] Подготовить реакционную смесь:

Состав	25 мкл	21х
qPCR-mix-HS LowRox (Евроген)	5,0 мкл	105,0 мкл
SeeI-F: primer	0,5 мкл	10,5 мкл
SeeI-R: primer	0,5 мкл	10,5 мкл
H ₂ O деионизированная	18,0 мкл	378,0 мкл

2. 1 мкл ДНК исследуемых образцов было добавлено в каждую реакционную смесь.
3. Условия амплификации:

95°C	5 мин.	40 циклов
95°C	30 сек.	
50°C	30 сек.	
30°C	30 сек.	
68°C	45 сек.	
4°C	∞	

4. Состав праймеров:

SeeI-F: 5'-CGGATACGGTGATGTAAAGA-3'

SeeI-R: 5'-TTCCTTCCTCAAAGCCAGA-3'

IV. Анализ продуктов ПЦР методом электрофореза в 3% агарозном геле:

1. В продукты ПЦР добавляли по 5 мкл 6х красителя для загрузки образцов (6x Orange DNA Loading Dye) и перемешивали пипетированием.
2. В камеру для электрофореза заливали достаточное количество 1x TAE буфера, для полного погружения геля.
3. В лунки геля помещали по 15 мкл каждого образца с красителем.
4. После подключения камеры на электроды подавалось напряжение 150В в течение 30 минут.
5. По окончании электрофореза, гель просматривали в ультрафиолетовом свете при помощи УФ-транслюминатора. Амплификаты проявлялись в виде светящихся полос.

Приготовление 3% агарозного геля:

1. Взвесить 3 г агарозы, добавить 100 мл 1x TAE буфера.
2. Растворить агарозу в буфере путем помещения колбы в микроволновку в течение 2-3 мин. Если агароза полностью не растворилась, процесс повторяем до полного ее растворения.
3. После остывания раствора агарозы до 60°C, добавить 5-15 мкл бромистого этидия. Агарозу перелить в форму и фиксировать луночные гребенки. Дать гелю остыть.
4. После того как гель полностью сформируется, аккуратно удалить гребенки и поместить гель в электрофоретическую камеру.

V. Результаты анализа продуктов ПЦР, разделенных методом электрофореза по показателю «Молекулярно-генетическое типирование штамма *Streptococcus equi*»:

№ п/п	Номера изолятов бактерий <i>Streptococcus</i> <i>equi</i>	Результат испытаний
1.	П1	<i>Streptococcus equi</i>
2.	П2	
3.	1 каз	<i>Streptococcus equi</i>
4.	2-1 мказ	
5.	2-4 мказ	
6.	4-2	
7.	4-1	
8.	20-1	
9.	11-3	
10.	6-2	
11.	6-1	
12.	12-1	
13.	2-2	
14.	7-2	

16.	16-1	
17.	5-1	<i>Streptococcus equi</i>
18.	13-2	
19.	9-3	
20.	17	
21.	Str.2ПС	
22.	15-1	
23.	H-34	
24.	6-3	
25.	3-2	
26.	Моск.	
27.	1 каз.	<i>Streptococcus equi</i>
28.	2П	
29.	3-1	
30.	12-3	<i>Streptococcus equi</i>
31.	Ю	
32.	20-3	
33.	12-2	
34.	П1	<i>Streptococcus equi</i>
35.	2-4 мказ	
36.	1-3	<i>Streptococcus equi</i>
37.	8-3	
38.	7-3	<i>Streptococcus equi</i>
39.	2-1 мказ	
40.	5-1	<i>Streptococcus equi</i>

Заключение: на основании проведения молекулярно-генетического типирования 40 изолятов бактерий *Streptococcus equi*, выделенных из патологических материалов больных мытом жеребят, нуклеотидная последовательность гена 16S рНК *Streptococcus equi* обнаружено у изолятов № «П1»; «1каз»; «5-1»; «12-3»; «1-3»; «7-3».

Исполнители:

Зав. лаб. лаборатории ветеринарной биотехнологии
ФГБНУ ЯНИИСХ, д.в.н, профессор

Заместитель руководителя отдела регионального
центра инжиниринга ГАУ «Технопарк «Якутия»

С.н.с. лаборатории ветеринарной биотехнологии
ФГБНУ ЯНИИСХ, к.в.н

М.н.с. лаборатории ветеринарной биотехнологии
ФГБНУ ЯНИИСХ, аспирант

Аспирант



М.П. Неустроев



В.А. Алексеев



С.Г. Петрова



Е.И. Эльбядова



А.А. Попов

РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ» (ФГБУ «ВГНКИ»)ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5, тел./факс 8 (495) 982-50-84, e.mail: kano@vgnki.ru
ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФГБУ «ВГНКИ»

«Утверждаю»

Заместитель Руководителя
Испытательного центра

Е.Г. Титова

«27» 12. 2017 г.

Протокол испытаний № 2413-А-17-10010-Д от 27.12.2017

При исследовании образца: Штаммы \ Штаммы бактериальные, штамм Streptococcus equi "H-5/1"
принадлежащего: ОБЩЕСТВА С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
"ХОТУ-БАКТ", 677001, Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, Бестужева-Марлинского ул., д. 23,
стр. 1
заказчик: ОБЩЕСТВА С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР "ХОТУ-
БАКТ", 677001, Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, Бестужева-Марлинского ул., д. 23, стр. 1
основание для проведения лабораторных исследований: на основании договора
место отбора проб: Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, д. 23/1,
лаборатория ООО НПЦ "Хоту-Бакт"
акт отбора проб: № 1 от 10.12.2017 г.
производство: ОБЩЕСТВА С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
"ХОТУ-БАКТ", 677001, Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, Бестужева-Марлинского ул., д. 23,
стр. 1
срок годности: -
количество проб: 1 проба
дата поступления: 14.12.2017
даты проведения испытаний: 14.12.2017 - 27.12.2017
фактическое место проведения испытаний: г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, строение 1
на соответствие требованиям: -
примечание: -
получен следующий результат:

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Результат испытаний	Погрешность (неопределенность)	Норматив	ИД на метод испытаний
Бактериальные болезни						
1	Молекулярно-генетическое подтверждение штамма Streptococcus equi "H-5/1"	-	Анализируемая нуклеотидная последовательность штамма 100% идентична нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК Streptococcus equi	-	Штамм Streptococcus equi	Методические рекомендации "Генетическая идентификация бактерий на основе проведения анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК" ФГБУ "ВГНКИ", 2015

Применяемое оборудование:

№ п/п	Наименование оборудования	Дата поверки/аттестации
1	Бокс асептической воздушной среды БАН-01-"Ламинор-С"-1,2 №	
2	Генетический анализатор ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer	
3	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (10...100)мкл	19.05.2017
4	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (100...1000)мкл	04.10.2017
5	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (100...1000)мкл	19.05.2017
6	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (2...20)мкл	04.10.2017
7	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (2...20)мкл	19.05.2017
8	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (2...20)мкл	19.05.2017
9	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (20...200) мкл	04.10.2017
10	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (20...200)мкл	04.10.2017

11	Дозатор шипеточный с двойным термостатированным цветным корпусом с переменным объемом доз одноканальный Колор ДПОП-1-20-200 (20...200) мл	04.10.2017
12	Дозатор шипеточный с двойным термостатированным цветным корпусом с переменным объемом доз одноканальный Колор ДПОП-1-5-50 (5...50) мл	04.10.2017
13	Источник питания 400 В	
14	Камера для горизонтального электрофореза SE-2	
15	Лабораторная центрифуга Biofuge Pico 17	
16	Лабораторная центрифуга Biofuge Pico 17	
17	Льдоставный шкаф II класса защиты Holten Safe 2010 1.2	
18	Льдоставный шкаф II класса защиты Holten Safe 2010 1.2	
19	Микроволновая печь Delonghi MW-311	
20	Микроцентрифуга/встряхиватель ТЭТА 2	
21	Морозильная камера «Атлант»	
22	Отсепаратор медицинский OM-1	
23	Система гели-документирования Infinity 1500/36M Xpress	
24	Термостат твердотельный "Термол"	22.08.2017
25	Термостат твердотельный "Термол"	22.08.2017
26	Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный MXM-1700-00	
27	Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный MXM-1733-01	
28	Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный MXM-1804-21	
29	Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный XM-6026-080	
30	Центрифуга-миксер CM-70M	
31	Центрифуга-миксер CM-70M	
32	Центрифуга-миксер CM-70M	
33	Центрифуга-миксер CM-70M.07	

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА ОТБОР ПРОБ

ИНФОРМАЦИЯ РАСПРОСТРАНЯЕТСЯ ТОЛЬКО НА ОБРАЗЦЫ, ПОДВЕРГНУТЫЕ ИСПЫТАНИЯМ

ПРОТОКОЛ НЕ МОЖЕТ БЫТЬ РАСПЕЧАТАН ИЛИ ЧАСТИЧНО ВОСПРОИЗВЕДЕН БЕЗ ПИСЬМЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ ФГБУ «ВНИИОИ»

Подписи испытателей
(ответственных за испытания)


(подпись)


(ФИО)

(подпись)

(ФИО)

(подпись)

(ФИО)

(подпись)

(ФИО)

(подпись)

(ФИО)

(подпись)

(ФИО)

(подпись)

(ФИО)

Заведующий отделом/лабораторией


(подпись)

ЯЦЕНТЮК СЕ
(ФИО)

27.12.2017

Ответственный за оформление протокола: Кирилочкин Г.Г.



РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ» (ФГБУ «ВГНКИ»)ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЗБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5, тел./факс 8 (495) 982-50-84, e-mail: kanc@vgnki.ru
ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФГБУ «ВГНКИ»

«Утверждаю»

Заместитель Руководителя

Испытательного центра

Е.Г. Титова

«27» 12 2017 г.

Протокол испытаний № 2413-А-17-10011-Д от 27.12.2017

При исследовании образца: Штаммы / Штаммы бактериальные, штамм *Streptococcus equi* "H-12/3"
принадлежащего: ОБЩЕСТВА С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
"ХОТУ-БАКТ", 677001, Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, Бестужева-Марлинского ул., д. 23,
стр. 1
заказчик: ОБЩЕСТВА С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР "ХОТУ-
БАКТ", 677001, Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, Бестужева-Марлинского ул., д. 23, стр. 1
основание для проведения лабораторных исследований: на основании договора
место отбора проб: Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, д. 23/1,
лаборатория ООО НПЦ "Хоту-Бакт"
акт отбора проб: № 2 от 10.12.2017 г.
производство: ОБЩЕСТВА С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
"ХОТУ-БАКТ", 677001, Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, Бестужева-Марлинского ул., д. 23,
стр. 1
срок годности: -
количество проб: 1 проба
дата поступления: 14.12.2017
даты проведения испытаний: 14.12.2017 - 27.12.2017
фактическое место проведения испытаний: г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, строение 1
из соответствие требованиям: -
примечание: -
получен следующий результат:

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Результат испытаний	Всего проб (количество)	Норматив	ИД на метод испытаний
Бактериальные болезни						
1	Молекулярно-генетическое титрование штамма <i>Streptococcus equi</i> "H-12/3"	-	Анализаторская конструкция последовательности штамма 100%, идентична нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК <i>Streptococcus equi</i> .	-	Штамм <i>Streptococcus equi</i>	Методические рекомендации "Генетическая идентификация бактерий на основе проведения анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК" ФГБУ "ВГНКИ", 2015

Применяемое оборудование:

№ п/п	Наименование оборудования	Дата поверки/аттестации
1	Бокс биобезопасной воздушной среды BABN-01-"Ламинир-С"-1,2 №	
2	Генетический анализатор ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer	
3	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (10...100)мкл	19.05.2017
4	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (100...1000)мкл	04.10.2017
5	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (100...1000)мкл	19.05.2017
6	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (2...20)мкл	04.10.2017
7	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (2...20)мкл	19.05.2017
8	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (2...20)мкл	19.05.2017
9	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (20...200)мкл	04.10.2017
10	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (20...200)мкл	04.10.2017

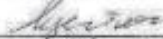
11	Дозатор эпиточный с двойным термостатированным цистым корпусом с переменным объемом доз одноканальный Колор ДПОП-1-20-200 (20...200) мл	04.10.2017
12	Дозатор эпиточный с двойным термостатированным цистым корпусом с переменным объемом доз одноканальный Колор ДПОП-1-5-50 (5...50) мл	04.10.2017
13	Безопасный аппарат 400 В	
14	Камера для горизонтального электрофореза SE42	
15	Лабораторная центрифуга BioRig Pico 17	
16	Лабораторная центрифуга BioRig Pico 17	
17	Ламинированный шкаф II класса защиты Holten Safe 2010 1.2	
18	Ламинированный шкаф II класса защиты Holten Safe 2010 1.2	
19	Микроволновая печь DeLonghi MW-311	
20	Микроцентрифуга/термостат TTA 2	
21	Морозильная камера «Атлант»	
22	Откалыватель медицинской OM-3	
23	Система геля-документирования Infinity 1500/36M Xpress	
24	Термостат перчаточный "Термат"	22.08.2017
25	Термостат перчаточный "Термат"	22.08.2017
26	Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный MXM-1700-00	
27	Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный MXM-1733-01	
28	Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный MXM-1804-21	
29	Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный XM-6026-080	
30	Центрифуга-миксер CM-70M	
31	Центрифуга-миксер CM-70M	
32	Центрифуга-миксер CM-70M	
33	Центрифуга-миксер CM-70M.07	

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА ОТСОБ ПРОВ

ИНФОРМАЦИЯ РАСПРОСТРАНЯЕТСЯ ТОЛЬКО НА ОБРАТЦЫ, ПОДПИСАННЫЕ ИСПЫТАТЕЛЕМ

ПРОТОКОЛ НЕ МОЖЕТ БЫТЬ РАСПЕЧАТАН ИЛИ ЧАСТИЧНО ВОСПРОИЗВЕДЕН БЕЗ ПОСЛЕДНЕГО РАЗРЕШЕНИЯ ФГУ «ВНИИ»

Подписи испытателей
(ответственных за испытания)


(подпись)

(подпись)
(подпись)
(подпись)
(подпись)
(подпись)
(подпись)


(подпись)

(подпись)
(подпись)
(подпись)
(подпись)
(подпись)
(подпись)

Заведующий отделом/лабораторией


(подпись)

АЦЕНТОВ СБ
(подпись)

27.12.2017

Ответственный за оформление протокола: Кирилочкин Г.Г.



РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ» (ФГБУ «ВГНКИ»)ЦЕНТР ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЖИВОТНЫХ (МЗБ) ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
ДИАГНОСТИКЕ И БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ, ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ И ЗАКАВКАЗЬЯ123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5, тел./факс 8 (495) 982-50-84, e-mail: kanc@vgnki.ru
ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФГБУ «ВГНКИ»

«Утверждаю»
Заместитель Руководителя
Испытательного центра
Е.Г. Титова
27.12.2017 г.

Протокол испытаний № 2413-А-17-10012-Д от 27.12.2017

При исследовании образца: Штаммы \ Штаммы бактериальные, штамм *Streptococcus equi* "Н-1/к"
принадлежащего: ОБЩЕСТВА С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
"ХОТУ-БАКТ", 677001, Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, Бестужева-Марлинского ул., д. 23,
стр. 1
заказчик: ОБЩЕСТВА С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР "ХОТУ-
БАКТ", 677001, Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, Бестужева-Марлинского ул., д. 23, стр. 1
основание для проведения лабораторных исследований: на основании договора
место отбора проб: Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, д. 23/1,
лаборатория ООО НПЦ "Хоту-Бакт"
лист отбора проб: № 3 от 10.12.2017 г.
производство: ОБЩЕСТВА С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР
"ХОТУ-БАКТ", 677001, Российская Федерация, Республика Саха /Якутия/, г. Якутск, Бестужева-Марлинского ул., д. 23,
стр. 1
срок годности: -
количество проб: 1 проба
дата поступления: 14.12.2017
даты проведения испытаний: 14.12.2017 - 27.12.2017
фактическое место проведения испытаний: г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, строение 1
на соответствие требованиям: -
примечание: -
получен следующий результат:

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Результат испытаний	Погрешность (неопределенность)	Норматив	НД на метод испытаний
Бактериальные болезни						
1	Молекулярно-генетическое определение штамма <i>Streptococcus</i> <i>equi</i> "Н-1/к"	-	Анализируемая нуклеотидная последовательность штамма 100% идентична нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S rРНК <i>Streptococcus equi</i>	-	Штамм <i>Streptococcus</i> <i>equi</i>	Методические рекомендации "Генетическая идентификация бактерий на основе проведения анализа нуклеотидной последовательности гена 16S rРНК" ФГБУ "ВГНКИ", 2015

Используемое оборудование:

№ п/п	Наименование оборудования	Дата поверки/аттестации
1	Бокс биобезопасной воздушной среды БАВм-01-"Лавенер-с"-1,2 №	
2	Генетический анализатор ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer	
3	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (10...100)мкл	19.05.2017
4	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (100...1000)мкл	04.10.2017
5	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (100...1000)мкл	19.05.2017
6	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (2...20)мкл	04.10.2017
7	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (2...20)мкл	19.05.2017
8	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (2...20)мкл	19.05.2017
9	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (20...200)мкл	04.10.2017
10	Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus одноканальный с переменным объемом дозирования (20...200)мкл	04.10.2017

Дозатор пипеточный с двойным термостатированным шестым корпусом с переменным объемом доз одноканальный Колор ДПСИ-1-20-200 (20...200) мкл	04.10.2017
Дозатор пипеточный с двойным термостатированным шестым корпусом с переменным объемом доз одноканальный Колор ДПСИ-1-5-50 (5...50)мкл	04.10.2017
Источник питания 400 В	
Камера для горизонтального электрофореза SE-2	
Лабораторная центрифуга Biofuge Pico 17	
Лабораторная центрифуга Biofuge Pico 17	
Лабораторный шкаф II класса защиты Holten Safe 2010 1.2	
Лабораторный шкаф II класса защиты Holten Safe 2010 1.2	
Микроволновая печь De'Longhi MW-311	
Микроанализатор/вспарыватель ТЭТА 2	
Морозильная камера «Атлант»	
Откачиватель медицинский OM-1	
Система гели-документирования Infinity 1500/36M Xpress	
Термостат твердотельный "Термаст"	22.08.2017
Термостат твердотельный "Термаст"	22.08.2017
Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный MXM-1700-00	
Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный MXM-1733-01	
Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный MXM-1804-21	
Холодильник двухкамерный двухкомпрессорный XM-6026-080	
Центрифуга-миксер CM-70M	
Центрифуга-миксер CM-70M	
Центрифуга-миксер CM-70M	
Центрифуга-миксер CM-70M.07	

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА ОТБОР ПРОБ

ИНФОРМАЦИЯ РАСПРОСТРАНЯЕТСЯ ТОЛЬКО НА ОБРАЗЦЫ, ПОДВЕРГНУТЫЕ ИСПЫТАНИЮ

ПРОТОКОЛ НЕ МОЖЕТ БЫТЬ РАСПЕЧАТАН ИЛИ ЧАСТИЧНО ВОСПРОИЗВЕДЕН БЕЗ ПИСЬМЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ ФГБУ «ВНИИ»

Подписи испытателей
(ответственных за испытания)


(подпись)

(подпись)

(подпись)

(подпись)

(подпись)

(подпись)

(подпись)


(ФИО)

(ФИО)

(ФИО)

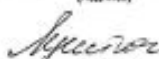
(ФИО)

(ФИО)

(ФИО)

(ФИО)

Заведующий отделом/лабораторией


(подпись)

ИВЕНТОВ СЕ
(ФИО)

12.2017

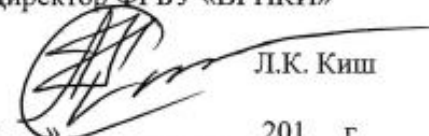
Ответственный за оформление протокола: Кирилочкин Г.Г.



Приложение М

Утверждаю

Директор ФГБУ «ВГНКИ»


Л.К. Киш

« » 201 г.

АКТ

от «25» июня 2018 г.

о проведении комиссионных испытаний по депонированию штамма

Streptococcus equi «Н-5/1»

В период с 12 февраля по 25 июня 2018 года согласно утвержденной программе проведения испытаний, комиссия в составе:

В.Н. Сазонкин – заведующий отделением качества и стандартизации иммунобиологических лекарственных средств Научно-производственной базы (председатель комиссии);

Ю.Н. Шурахова – заведующий отделом «Всероссийская коллекция штаммов микроорганизмов» (заместитель председателя комиссии);

Е.В. Малик – ведущий научный сотрудник лаборатории качества и стандартизации пробиотических препаратов;

И.А. Гулейчик – ведущий научный сотрудник лаборатории качества и стандартизации пробиотических препаратов;

И.А. Русанов – ведущий научный сотрудник лаборатории качества и стандартизации пробиотических препаратов;

провела испытания свойств штамма стрептококков *Streptococcus equi* «Н-5/1».

Проверке подлежала представленная на депонирование нативная культура стрептококков, с приложением паспорта штамма по показателям: определение видовой принадлежности стрептококков по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам, а также вирулентной активности (средней летальной дозы) депонируемого штамма стрептококков.

Для комиссионных испытаний были представлены следующие материалы:

- нативная культура штамма (5 флаконов);
- паспорт штамма.

Результаты испытаний

1. Культурально-морфологические свойства штамма стрептококка *S. equi* «Н-5/1».

При микроскопии мазков, изготовленных из бульонной и агаровой культуры стрептококков, обнаруживают типичные грамположительные бактериальные клетки шаровидной или овальной формы, расположенные попарно или в виде цепочек разной длины. На поверхности плотной питательной среды (Колумбийский агар с добавлением 5-% взвеси эритроцитов барана), штамм образует мелкие полупрозрачные «росинчатые» колонии S-формы, окруженные зоной β -гемолиза. На жидкой питательной среде (Триптон-соевый бульон) растет с образованием придонного осадка, оставляя среду прозрачной. Неподвижны, каталазоотрицательны.

2. Биохимические свойства штамма стрептококков *S. equi* «Н-5/1»

Штамм стрептококков *S. equi* продуцирует ферменты: β -глюкозидазу; β -глюкоронидазу и лейцинариламидазу. Ферментирует с образованием кислоты без газа эскулин, крахмал и гликоген. Аргинин, рибозу, арабинозу, маннит, сорбит, лактозу, трегалозу, инулин и раффинозу не сбраживает. Штамм стрептококков не образует ацетон и не гидролизует гиппурат.

(Идентификация штамма стрептококков проводилась с использованием стрипа «API 20 Strep» тест системы «API®» bioMérieux (Франция))

3. Вирулентная активность культуры стрептококков *S. equi* штамм «Н-5/1».

Вирулентная активность LD_{50} (50% летальная доза) штамма *S. equi* «Н-5/1» для мышей составляет - 1×10^2 микробных клеток (КОЕ) при парентеральном введении.

Заключение

Комиссия установила, что на основании проведенной идентификации культуры *Streptococcus equi* «Н-5/1» по показателям культуральных, морфологических и биохимических свойств, штамм относится к семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus* виду *Streptococcus equi ssp equi* и соответствует типовым характеристикам представителей этого вида. На основании проведенных исследований оформлен паспорт и составлен акт о депонировании данного микроорганизма. Штамм обладает вирулентными свойствами для белых мышей.

Предложения

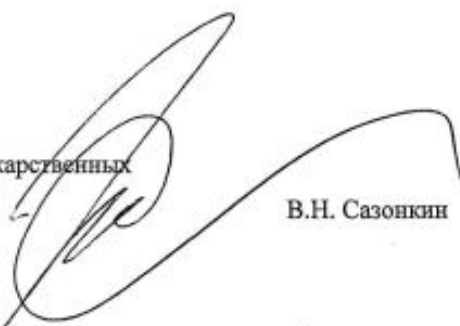
Комиссия рекомендует:

1. Депонировать штамм стрептококков *Streptococcus equi* «Н-5/1» в коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВГНКИ».
2. Штамм *Streptococcus equi* «Н-5/1» может быть использован в качестве производственного при изготовлении иммунобиологических лекарственных препаратов для профилактики стрептококковых инфекций у животных.
- 3. Местом хранения штаммов определить коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВГНКИ».

Подписи

Председатель комиссии:

Заведующий отделением качества и
стандартизации иммунобиологических лекарственных
средств Научно-производственной базы


В.Н. Сазонкин

Члены комиссии:

Заведующий отделом «Всероссийская коллекция
штаммов микроорганизмов»


Ю.Н. Шурахова

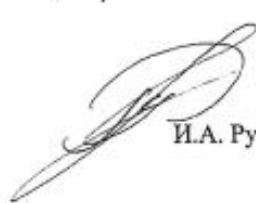
• Ведущий научный сотрудник лаборатории
качества и стандартизации пробиотических
препаратов


Е.В. Малик

Ведущий научный сотрудник лаборатории
качества и стандартизации пробиотических
препаратов


И.А. Гулейчик

Ведущий научный сотрудник лаборатории
качества и стандартизации пробиотических
препаратов


И.А. Русанов