

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Якутск 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр» «Якутский научный центр сибирского отделения Российской Академии наук» «Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. М.Г. Сафронова».

**Научный
руководитель:**

Неустроев Михаил Петрович
доктор ветеринарных наук, профессор,
главный научный сотрудник ФГБУН ФИЦ «ЯНЦ
СО РАН» «Якутский научно-исследовательский
институт сельского хозяйства им. М.Г.
Сафронова»

**Официальные
оппоненты:**

Спиридонов Геннадий Николаевич
доктор биологических наук, заведующий
лабораторией бактериальных патологий
животных, ФГБНУ «Федеральный центр
токсикологической, радиационной и
биологической безопасности»

Панова Наталья Евгеньевна
кандидат ветеринарных наук, старший научный
сотрудник, Сибирский федеральный научный
центр агробиотехнологий РАН (СФНЦА РАН)

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный
университет имени П.А. Столыпина»

Защита диссертации состоится «24» мая__2022 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 999.215.02 при ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет» по адресу: 630039, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, зал заседаний ученого совета. Тел./факс: 8(383) 267-09-07, e-mail: nsau999.215.02@mail.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет» и на официальном сайте: <http://www.nsau.edu.ru>

Автореферат разослан «__»_____2022 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета

Лазарева Марина Викторовна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. 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 – *Sreptococcus 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 (О.М. Khartford, Т.Д. Foster, А.К. Jakobs, 2002), Арабской Республике Египта (А.N.F. 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).

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.

Задачи исследования.

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.). Нуклеотидная последовательность ампликонов штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1» депонирована в международной базе данных NCBI GenBank (MW486609).

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

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.

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

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 вакцины против мыта лошадей инактивированной.

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 (MW486609) и 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 утверждение Россельхознадзором вакцины «Вакцина против мыта лошадей инактивированной». Регистрационное удостоверение №71-1-27.21-4828 №ПВР-1-27.21/03691 от 08.12.2021 г. Инструкция по применению вакцины будет способствовать эффективной профилактике мыта лошадей в России и странах Евразии.

Материалы диссертации вошли в методические пособия «Система ведения сельского хозяйства в Республике Саха (Якутия) на период 2021 – 2025 годы» (утв. Ученым советом Якутского НИИСХ имени М.Г. Сафронова ФГБУН ФИЦ ЯНЦ СО РАН), которые предложены для внедрения в производство.

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

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 исследования. 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-специфичные праймеры Seel-F 5'-CGGATACGGTGATGTTAAAGA-3' и Seel-R: 5'-TTCCTTCCTCAAAGCCAGA-3' (амплификатор «BIO-RAD T100, США) и набор qPCRmix-HS LowROX («Evrogen», Россия).

Секвенирование гена 16S рРНК проводилось в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск).

Депонирование штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1» проведены 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 Российской Федерации № 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 (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 идентификацию 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 инаktivированной вакцины против мыта лошадей. Разработка досье и утверждение в Россельхознадзоре.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность полученных результатов подтверждена достаточным объемом исследований с использованием общепринятых, молекулярно-генетических методов, разработкой технологии изготовления инаktivированной 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.).

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.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Эпизоотическая обстановка по мыту лошадей в Республике Саха (Якутия)

Как показывает анализ отчетных данных Департамента ветеринарии МСХ Республики Саха (Якутия), мыт лошадей распространен в основном в центральной и вилюйской группах улусов республики, где находится наибольшее количество лошадей (Мегино-Кангаласский, Усть-Алданский, Намский, Чурапчинский, Верхне-Вилюйский, Вилюйский, Нюрбинский и Сунтарский улусы).

Наибольшее число неблагополучных пунктов и случаев заболеваемости зарегистрированы с 1985 по 2003 гг. Начиная с 1985 по 1991 гг. среднее количество неблагополучных пунктов ежегодно составляло 26,1 единиц. В период с 2000-2011 гг. каждый год регистрировались от 9 до 31 неблагополучных

пунктов по мыту, а с 2012 г. наблюдается спад заболевания, в среднем от 1 до 10 неблагополучных пунктов.

Заболеваемость мытом в хозяйствах по данным Департамента ветеринарии с 1985 по 2016 гг., в среднем составляет – 0,3 % от общего поголовья, а от поголовья молодняка – 0,9%. Летальность в среднем составляет 5,5 %. Однако, по нашим наблюдениям и исследованиям заболеваемость мытом остается высокой – до 65 %, а летальность – 4-22 % ежегодно. Особенно неблагополучным был 2016 г. и 2017 г. В эти годы болезнь регистрировалась с летнего периода в Хангаласском, Мегино-Кангаласском, Усть-Алданском и Намском улусах.

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 животных, отчетные данные отражают данные только текущего года, а мыт отмечается в осенний, зимний и весенний периоды, отсутствие эффективных методов экспресс диагностики и дифференциации.

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

Выделение и идентификация возбудителя мыта лошадей

Всего нами исследовано с 2017 по 2018 г. 63 пробы биологического материала от молодняка лошадей, 6-10 месячного возраста. Из них 45 смыва носовых истечений (27 – от клинически больных мытом жеребят, 18 – от клинически здоровых жеребят); 4 пробы содержимого вскрывшегося абсцесса подчелюстных лимфатических узлов и 11 пробы паренхиматозных органов от павших жеребят. Патологические материалы собраны в коневодческих хозяйствах Намского, Хангаласского, Амгинского, Мегино-Кангаласского улусов, 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. Для этого смывы с зонд-тампонами, кусочки органов и гной из лимфоузлов были погружены в течение 5 минут в 0,9% стерильный физраствор, затем обработаны 70⁰С спиртом с последующим промыванием их 2–3 раза в 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 условиях Крайнего Севера, остается сложной задачей. Нами установлено, что недоброкачественный и скудный рацион способствует поражению грибами респираторного тракта животных, которое протекает совместно с мытом. Нами в 11 пробах была обнаружена контаминированность токсигенными и плесневыми грибами 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.

В результате первичных бактериологических исследований биологических материалов от клинически больных мытом лошадях отобрано 40 культур, схожих с мытным стрептококком по культуральным, тинкториальным, ферментативным и гемолитическим свойствам.

Все выделенные культуры были предварительно отнесены к роду *Streptococcus*. В 1% МПБ с 10% сывороткой крови лошади некоторые культуры давали рост в виде равномерного помутнения среды с выпадением белого осадка, поднимающегося при встряхивании косичкой вверх, что характерно для мытного стрептококка. На 1 % МПА с 10% сывороткой крови лошади некоторые культуры давали рост в виде мелких росинчатых колоний, также наблюдался рост выпуклых блестящих белых колоний с ровными краями и слившихся матовых выпуклых колоний.

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 была отмечена повышенная биохимическая активность. Некоторые изоляты ферментировали с образованием кислоты без газа следующие углеводы: глюкозу, лактозу, маннит, мальтозу, сахарозу, сорбит, 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.

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

Остальные изоляты стрептококков от больных мытом жеребят в жидкой питательной среде характеризовались легким помутнением бульона, пристеночным ростом с образованием белого хлопьевидного осадка. На плотной питательной среде они имели вид росинчатых полупрозрачных мелких колоний. На кровяном агаре давали β -гемолиз. Изоляты не росли на питательных средах с добавлением желчи и натрия хлорида, ферментировали с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу и сахарозу, не сбраживали лактозу, маннит, сорбит, дульцит. В мазках из суточной бульонной культуры, окрашенных по Граму, при микроскопии были видны длинные извитые цепочки из грамположительных кокков, а из агаровой культуры — короткие цепочки или парные и одиночные кокки. Морфологические и культурально-биохимические свойства этих изолятов были характерны для мытного стрептококка.

Таким образом, при исследовании 63 проб биологического материала от клинически больных и здоровых, 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 1.

У 11 необработанных проб микробиологическими исследованиями выделены токсигенные и плесневые грибы родов *Aspergillus* и *Mucor*. Следовательно, можно утверждать, что результаты проведенных бактериологических исследований позволяют предположить, что причинами мыта лошадей могут быть не только возбудитель мыта – *Str. equi*, но и его ассоциация с другими видами рода *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, а также плесневыми грибами. Для дальнейшей идентификации следует провести молекулярно-генетические исследования.

Таблица 1 – Результаты дифференциации стрептококков биохимическими методами

Изолят	Биохимические свойства									
	Среды Гисса							40% Ж.А.	6,5% С.А.	Тест на каталазу
	Г	Л	М	Мл	С	СБ	Д			
1 каз	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
1 П	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
1-3	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Н 5-1	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
7-3	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
12-3	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
8-3	+	+	+	+	н	-	н	+	+	-
20-3	+	+	+	+	н	-	н	+	+	-
3-1	+	-	+	+	н	-	н	+	+	-
9-3	+	+	+	+	н	-	н	+	+	-
46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: «Г» - глюкоза; «Л» - лактоза; «М» - маннит; «Мл» - мальтоза; «С» - сахароза; «СБ» - сорбит; «Д» - дульцит; «Ж.А.» - желчный агар; «С.А.» - солевой агар; «+» - положительный результат; «-» - отрицательный результат; «н» - нет данных.

Выделенные изоляты хранятся на полужидком агаре (ПЖА) в течение 2 месяцев с дальнейшими пересевами или в лиофилизированном виде до одного года.

Молекулярно-генетическая идентификация выделенных культур мытного стрептококка методом ПЦР

Молекулярно-генетическую идентификацию проводили в лаборатории биотехнологии ГАУ РС(Я) «Технопарк Якутия» на наличие видоспецифичных генов, потенциально участвующих в формировании вирулентного фенотипа мытного стрептококка, в частности *Str. equi subsp. equi*.

Из 40 исследованных изолятов 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.). Результаты анализа продуктов ПЦР приведены в таблице 2.

Таблица 2 – 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	Н 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	Н 5-1	<i>Str. equi</i>

Дальнейшее молекулярно-генетическое типирование в ФГБУ «ВГНКИ» подтвердило, что анализируемая нуклеотидная последовательность штаммов Н-5/1, Н-12-3, Н-1 каз на 100 % идентична нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК *Streptococcus equi* (протокол испытаний № 2413-Ф-17-10010-Д от 27.12.2017).

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

Штамм бактерий *Streptococcus equi* Н-5/1

Штамм *Streptococcus equi* Н-5/1 как самый перспективный прошел комиссионные испытания во Всероссийском государственном центре качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ»). Штамм *Streptococcus equi* Н-5/1 продуцирует ферменты β-глюкозидазу, β-глюкоронидазу и лейцинариламидазу. Ферментирует с образованием кислоты без газа эскулин, крахмал и гликоген. Не сбраживает

аргинин, рибозу, арабинозу, маннит, сорбит, лактозу, трегалозу, инулин и раффинозу.

Штамм бактерий *Streptococcus equi* «Н-5/1» выделен из смыва, вскрывшего подчелюстного лимфоузла больного мытом жеребенка из с. Немюгюнцы Хангаласского улуса. На 1%-ном МПБ с 10% сыворотки крови растет в виде равномерного помутнения среды с выпадением белого осадка, поднимающегося при встряхивании косичкой верх. На 1%-ном МПА с 10% сыворотки крови растет в виде росинчатых мелких колоний. На ПЖА растет по ходу посева. По биохимическим свойствам соответствует к виду *Str. equi*, ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, сахарозу, не сбраживает лактозу, маннит, сорбит и дульцит.

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

На основании 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.

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» выделенной 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.

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 после секвенирования проведено депонирование в международной базе данных NCBI GenBank нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК изолята Н-5/1.

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, полимераза) с помощью сорбции на магнитных частицах. Секвенограммы всех исследуемых образцов ДНК проанализированы на предмет гомологии/идентичности с помощью программы BLAST базы данных ГенБанк.

Анализ с помощью BLAST показал, что эта последовательность соответствует генам 16S рРНК *Str. equi subsp. equi* двух штаммов — *Str. equi*

subsp. equi strain NCTC9682 genome assembly, chromosome: 1 u Str. equi subsp. equi strain ATCC 39506, complete genome.

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

Разработка технологии изготовления новой инактивированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором

В настоящее время на территории нашей страны не производится выпуск вакцин для специфической профилактики мыта лошадей, хотя ущерб, наносимый этим заболеванием, не вызывает сомнений. В связи с этим, нами были выделены и идентифицированы новые штаммы микроорганизмов *Str. equi* для использования их в производстве вакцины против мыта лошадей. Для изготовления вакцины нами выбран, как самый активный по культурально-биохимическим, патогенным и иммуногенным показателям штамм бактерий *Str. equi* «Н-5/1». Проведен контроль накопления микробных клеток на обогащенном глюкозно-сывороточном бульоне. Накопление клеток составило 10-20 млрд. м.к./см³. Для выращивания бактериального сырья также был выбран обогащенный глюкозно-сывороточный МПБ, вследствие его доступности и низкой себестоимости в сравнении с другими питательными средами. Данная среда позволяет получать оптимальную концентрацию микробных клеток.

Разработанная нами технология изготовления вакцины против мыта лошадей включает в себя 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, обогащенном глюкозой и содержащем 10% сыворотки крови лошади. Через 18 ч культивирования при t+37⁰ С из выросшей бульонной культуры делаем посев на 1% мясопептонный агар с 10% сыворотки крови лошади. Через 18 ч культивирования при t+37⁰ С 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 лошади. Окрашивание микроорганизмов после каждого пересева проводилось по методике Грама.

Далее через 18 ч культивирования проводится выращивание бактериологического сырья. Для этого использовали флаконы объемом 200 мл с обогащенной до 1% концентрации глюкозой и 10% сывороткой крови лошади мясопептонный бульон в количестве 200 мл, pH 7.2-7.4. В питательный бульон вносили культуру возбудителя штамма бактерий *Str. equi* «Н-5/1» с содержанием не менее 2×10⁹ микробных клеток в 1 мл по оптическому стандарту в объеме 2 см³. Флаконы с посевами инкубировали в шейкере-термостате при t+37⁰С. Продолжительность культивации составляла 18-20 часов. После окончания инкубации проводилось окрашивание микроорганизмов по методу Грама.

Следующим этапом для изготовления вакцины стала инаktivация культуры возбудителя. Для того, чтобы провести инаktivацию, в полученное сырье, концентрация которого составляет не менее 2×10^9 микробных клеток в 1 см³, вносили формалин в объеме 0,4 см³, конечная концентрация которого равна 0,4%. Период до наступления полной инаktivации составляет 72 ч. при температуре $t+37^{\circ}\text{C}$. Для контроля полноты инаktivации делали высевы бактериальной массы на различные питательные среды (МПБ, МПА, 1% МПА и МПБ с глюкозой и 10% сывороткой крови, Эндо, Байрд-Паркера и Чапека). Наблюдение проводили в течение 10 суток. Также полноту инаktivации проверяли на белых мышах массой тела 16-18 гр. Наблюдение за животными производилось в течение 10 суток.

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 культивировали при температуре 37°C в течение 5-7 суток. Для отделения культуральной жидкости бактериальную массу, содержащую 1 млрд. микробных клеток в 1 мл центрифугировали при 7000 об/мин в течение 15 мин и пропускали через мембранный фильтр.

Культуральную жидкость штамма бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3 добавляли в соотношении 1:2, т.е. 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 вакцина с КЖ представляет собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета с осадком, который при встряхивании легко разбивается в равномерную взвесь.

Доклинические испытания новой инаktivированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором

В таблице 3 показаны результаты исследований вакцины против мыта на стабильность, стерильность и безвредность.

Таблица 3 – Результаты доклинических испытаний вакцины против мыта лошадей

Наименование показателя	Результаты исследований
Стабильность вакцины	Сохраняется без изменения внешнего вида, стерильности, безвредности в течение 24 месяцев и иммуногенности в течение 12 месяцев при хранении 4°C. При температуре предусмотренных в условиях транспортировки (25°C), сохраняет все свои свойства в течение 30 дней.
Внешний вид	В течение 24 месяцев не установлено изменение внешнего вида.
Стерильность	При хранении в течение 24 месяцев при температуре 8°C, а также в течение 30 дней при температуре 25°C нарушение стерильности не установлено.
Безвредность	Во все сроки исследования в течение 10 суток наблюдения вакцина не вызвала гибели белых мышей. После омертвления по истечению срока наблюдения, не обнаружены паталого-анатомические изменения во внутренних органах, характерных для мытной инфекции.

Изучение острой токсичности вакцины против мыта лошадей

До начала опытов за белыми мышами установлено наблюдение в течение 2 дней для исключения слабых. Животных разделили на 2 группы по 3 головы. Вакцину вводили в максимально допустимой дозе внутрижелудочно утром натощак:

1 группа: Белым мышам однократно ввели вакцину против мыта лошадей в дозе 1 см³ внутрижелудочно (2×10^9 КОЭ).

2 группа: Белым мышам контрольной группы однократно ввели дистиллированную воду в дозе 1 см³.

В течение 7 дней после введения препаратов вели клиническое наблюдение за белыми мышами. При этом учитывали прирост массы тела каждый день. За время опыта общее состояние подопытных мышей было удовлетворительным, двигательная активность и реакция на внешние раздражители сохранились, аппетит не нарушился, шерстный покров оставался гладким. Консистенция кала у белых мышей не изменена. К концу опыта наблюдается прирост массы тела на 0,6 г. у белых мышей 1 группы, 2 группы - 0,5 г. (таблица 4).

Таблица 4 – 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.

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

После омертвления по истечению срока наблюдения, не были обнаружены паталого-анатомические изменения во внутренних органах, характерных для мытной инфекции.

Изучение пирогенности вакцины против мыта лошадей

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.

За 18 часов до испытания кроликов лишили корма без ограничения воды. Во время опыта кроликов не кормили и не поили. Перед опытом, с интервалом не менее 30 минут, у каждого кролика дважды измеряли температуру тела.

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 5.

Таблица 5 – Результаты измерения температуры до и после инъекций

Группы	Температура тела, °С					
	1	2	3	4	5	6
	До инъекции					
	1 измерение			2 измерение		
1	38,5±0,49			38,2±0,35		
2	38,5±0,21			38,5±0,14		
	После инъекции					
	Через 30 мин	Через 1 час	Через 1,5 часа	Через 2 часа	Через 2,5 часа	Через 3 часа
1	37,9±0,91	38,1±0,35	38,4±0,49	38,5±0,56	38,7±0,14	38,8±0,56
2	38,6±0,21	38,4±0,42	38,5±0,14	38,5±0,07	38,7±0,35	38,7±0,07

Приведенные в таблице данные показывают незначительное повышение температуры тела у животных обеих групп на протяжении 3 часов, которое не вызывает угнетение общего состояния кроликов. Таким образом, незначительное повышение температуры тела интерпретировали, как стрессовое состояние из-за многократных ректальных измерений температуры тела. Вакцина апиогенна.

Иммунобиологические свойства вакцины против мыта лошадей

Изучения иммунобиологических свойств вакцины проводились на белых беспородных мышах.

Определение средней летальной дозы (LD_{50}). Для этого свежесывращенную 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 см^3). Далее были подготовлены серийные разведения на стерильном 0,9% физиологическом растворе со следующими концентрациями микробных клеток в 1 см^3 : 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 $0,2 \text{ см}^3$ заражали по четыре белой мыши из каждой пробирки. С целью контроля четверем мышам вводилось по $0,2 \text{ см}^3$ стерильного физраствора. В течение 15 дней проводились наблюдения. Результаты заражения белых мышей различными дозами мытного стрептококка приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Определение летальной дозы (LD_{50}) штамма мытного стрептококка *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 6, летальная доза, которая вызывает гибель всех белых мышей в группе (абсолютная летальная доза) составляет 2×10^8 (200 млн.) микробных тел в 1 см^3 . Средняя смертельная доза (LD_{50}), которая убивает 50 % животных в группе – 2×10^5 (200 тыс.) микробных тел в 1 см^3 .

Определение иммунизирующей дозы (ИмД). Исследования проводились на 60 белых мышах массой 16-18 г. Сформированы 6 групп по 10 гол, 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 гр. 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 LD_{50} . Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Определение иммунизирующей дозы вакцины против мыта лошадей инаktivированной с иммуномодулятором на лабораторных животных

№ группы	Название препарата	Иммунизирующая доза (10 ⁹ м.т.)	Количество микробных тел, млн	Количество животных в группе	Штамм, концентрация м.т. / см ³	Результаты			
						пало		выжило	
						Кол-во животных	%	Кол-во животных	%
1	Вакцина против мыта лошадей инаktivированная 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 результате проведенного исследования по определению иммунизирующей дозы вакцины против мыта на белых мышах, установлено, что доза 4×10^8 микробных клеток при однократном введении, способствует созданию 90% защиты вакцинированных белых мышей от патогенного штамма *Str. equi* «Н-5/1», при гибели 90% не вакцинированных мышей (контрольная группа). Средняя иммунизирующая доза (ИД₅₀), которая вызывает иммунитет у 50% вакцинированных мышей составила 2×10^8 м.т.

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

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

Клинические испытания инаktivированной вакцины против мыта лошадей с иммуномодулятором проводились в коневодческих хозяйствах Хангаласского, Намского улусов и пригороде г. Якутск Республики Саха (Якутия). Хозяйства являются стационарно неблагополучными по мыту лошадей. Места проведения иммунизации согласованы с Департаментом ветеринарии Республики Саха (Якутия).

Вакцину применяли 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 иммунизировали молодняк лошадей до одного года. Иммунизацию проводили после отъема жеребят в первой и второй декадах ноября. Вакцину применяли однократно путем внутримышечного введения в область верхней трети шеи в дозе 3,0 см³. Предварительно за 10-14

дней до вакцинации проводили дегельминтизацию препаратом «Ивермек» согласно инструкции по применению. Клиническое состояние животных контролировали в течение 6-7 месяцев. Результаты производственных испытаний приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты производственных испытаний вакцины против мыта инактивированной с иммуномодулятором

№ п/п	Наименование улусов/хозяйств	Иммунизировано голов	Из них		Эффективность, %
			Заболело	Здоровых	
1	Хангаласский (ЛПХ с.Техтюр)	21	-	21	100
2	Хангаласский (частные сектора с. Немюгюнцы)	13	-	13	100
3	Хангаласский (ОООО 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 находилась в пределах физиологической нормы, аппетит был сохранен, угнетения не наблюдались. После ведения препарата не наблюдалось нарушения аппетита, угнетенного состояния.

В течение 6-7 месяцев наблюдения из 128 иммунизированных животных клинические признаки мыта наблюдались у 3 голов. 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.

Исследование динамики морфологического состава крови до и после вакцинации против мыта лошадей показали повышение содержания эритроцитов в крови у животных контрольной группы на 0,3 млн. в 1 м³, а у опытной – 1,3 млн. в 1 м³. Таким образом, к концу опыта животные опытной группы превосходили животных контрольной группы по содержанию эритроцитов на 0,9 млн. в 1 м³ или

15,5% ($P < 0,01$), но в пределах физиологической нормы. Другие компоненты крови, такие как гемоглобин и лейкоцит до и после иммунизации спустя 3 месяца у обеих групп тоже оставались в пределах физиологической нормы.

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 все показатели общего белка и его фракций у обеих групп находились в пределах физиологической нормы.

Экономическая эффективность применения вакцины против мыта лошадей. При внедрении разработки в отдельном хозяйстве экономический эффект на 1 голову составит 3,99 тыс. рублей, на 1 рубль затрат – 6,65 рублей. В целом по республике будет получен экономический эффект на сумму 49 млн. 356 тыс. рублей.

Следовательно, разработанный способ специфической профилактики мыта лошадей является экономически и эпизоотически обоснованным и его следует представить для рассмотрения в Россельхознадзор и ВГНКИ ветеринарных препаратов.

Разработка досье на вакцину. Утверждение в Россельхознадзоре

Нами подготовлено регистрационное досье для экспертизы и регистрации лекарственного препарата «Вакцина против мыта лошадей инактивированная» в Россельхознадзоре. Научно-техническая документация и вакцина против мыта успешно прошли экспертизу ВГНКИ ветеринарных препаратов. Вакцина зарегистрирована в реестре лекарственных средств для ветеринарного применения Россельхознадзора под регистрационным номером № 71-1-27.21-4828 № ПВР-1-27.21/03691 от 08.12.2021 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных результатов можно сделать следующие 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 17.10.2019 г.
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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, индексируемых в международной базе данных SCOPUS

1. Neustroev M.P. Laboratory tests of the horse strangles vaccine / M. P. Neustroev, S. G. Petrova, E. I. Elbyadova, N. P. Tarabukina // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. International Agro Science Conference (AgroScience-2020). – 2020. – № 604 012002. doi:10.1088/17551315/604/1/012002.
2. Neustroev M.P. Identification of Causative Agent of Horse Strangles in Northern Siberia / M.P. Neustroev, S.G. Petrova, E.I. Elbyadova, N.P. Tarabukina, V.A. Alekseev, A.A. Popov // Annals of the Romanian Society for Cell Biology. – 2021. – Vol. 25. – Issue 3. – P. 516 – 527.

Статьи в научных журналах, индексируемых в базе данных Russian Science Citation Index (RSCI)

1. Степанов А.И. Результаты разработки микробных препаратов в коневодстве / А.И. Степанов, М.П. Неустроев, С.Г. Петрова, Е.И. Эльбядова, А.А. Попов, Н.П. Тарабукина, К.П. Юров // Ветеринария и кормление. – 2018. – № 2. – С. 78-81.
2. 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. doi: 10.15389/agrobiology.2021.4.707rus.

Патент и база данных

1. Штамм бактерий *Streptococcus equi*, используемый для изготовления вакцины против мыта лошадей: пат. 2703485 С1 Рос. Федерация: МПК С12N 1/20, А61К 39/09 С12R 1/46/ Неустроев М.П., Тарабукина Н.П., Петрова С.Г., Эльбядова Е.И., Попов А.А.; заявитель и патентообладатель ФГБУН ФИЦ «ЯНЦ СО РАН», ООО НПЦ «Хоту-Бакт». - № 2018129833; заявл. 15.08.18; опубл. 17.10.19. Бюл. № 29. – 3 с.
2. Мыт лошадей: свид. о регистр. базы данных № 2018621835 Рос. Федерация / Неустроев М.П., Тарабукина Н.П., Петрова С.Г., Эльбядова Е.И., Попов А.А.; правообладатель ФГБУН ЯНИИСХ им. М.Г. Сафронова. - № 2018621640; заявл. 12.11.2018; опубл. 20.11.2018. Бюл. №7. – 2 с.

Статьи и тезисы докладов в других изданиях

1. Неустроев М.П. Лабораторные испытания вакцины против мыта / М.П. Неустроев, С.Г. Петрова, Е.И. Эльбядова, Н.П. Тарабукина // Перспективы развития аграрных наук: матер. Международной научно-практической конференции (10 апреля 2020 г.). – Чебоксары: Чувашская ГСХА, 2020. – С. 129-130.
2. Эльбядова Е.И. Результаты доклинических испытаний вакцины "Табын" для профилактики мыта лошадей / Е.И. Эльбядова, М.П. Неустроев // Аграрная наука - сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии, Казахстана, Беларуси и Болгарии: сборник научных докладов / XXII международной научно-практической конференции, посвященная 50-летию образования Сибирского отделения Российской академии сельскохозяйственных наук и 70-летию Якутского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук (14-15 августа 2019 г.). – Якутск: Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, 2019. – С. 275-276.
3. Неустроев М.П. Морфологические и культурально-биохимические свойства возбудителя мыта / М.П. Неустроев, Е.И. Эльбядова, С.Г. Петрова, Н.П. Тарабукина, А.А. Попов // Аграрная наука: вызовы и перспективы: матер. региональной научно-практической конференции. – Якутск: Якутская государственная сельскохозяйственная академия, 2018. – С. 110-113.
4. Neustroev M.P. Disease of horses «Strangles» in horse breeding / M.P. Neustroev, E.I. Elbyadova, A.A. Popov // Scientific research of the SCO countries: synergy and integration: materials of the International Conference (14-15 июня 2018 г.). – Пекин: Minzu University of China, Scientific publishing house Infinity, 2018. – С. 144-147.
5. Неустроев М.П. Информационная компьютерная база данных «Мыт лошадей» / М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, К.П. Юров, С.Г. Петрова, Е.И. Эльбядова, А.А. Попов, А.И. Павлова // Информационные технологии, системы и приборы в АПК: матер. 7-й Международной научно-практической конференции «Агроинфо-2018» (24–25 октября 2018 г.). – Новосибирская обл., р.п. Краснообск: Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, Сибирский физико-технический институт аграрных проблем и др., 2018. – С. 176-178.

6. Неустроев М.П. Профилактика и лечение ринопневмонии и мыта молодняка лошадей / М.П. Неустроев, С.Г. Петрова, Е.И. Эльбядова, А.А. Попов // Аграрная наука – сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии, Казахстана, Беларуси и Болгарии: сборник докладов XXI международной научно-практической конференции (20-21 сентября 2018 г.). – Улан-Батор: Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Сибирское отделение Российской академии наук, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, Новосибирский государственный аграрный университет и др., 2018. – С. 199-200.

7. Elbyadova E.I. Disease Strangles of horses in Yakutia / E.I. Elbyadova M.P. Neustroev // Emerging Threats for Human Health Impact of Socioeconomic and Climate Change on Zoonotic Diseases: Program and Abstract Book (13 августа 2018 г.): Yakut State Agricultural Academy, Institute of Biological Problems of Cryolithozone SB RAN, North-Eastern Federal University in Yakutsk, University of Hohenheim, Yakut Scientific Research Institute of Agriculture, LLC Scientific & production center „Khotu-Bact“, 2018. – С. 43.

8. Неустроев М.П. Мыт лошадей, осложненный плесневыми и токсигенными грибами / М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, С.Г. Петрова, Е.И. Эльбядова // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. – 2018. – Т. 80. – №1. – С. 268-272.

9. Неустроев М.П. Профилактика и лечение вирусно-бактериальных болезней молодняка лошадей / М.П. Неустроев, С.Г. Петрова, Е.И. Эльбядова, А.А. Попов // Тенденции развития науки и образования. – 2018. – №43-7. – С. 52-54.

10. Неустроев М.П. Особенности эпизоотологии инфекционных абортос у лошадей / М.П. Неустроев, С.Г. Петрова, Е.И. Эльбядова, А.А. Попов // Вестник ДВО РАН. – 2018. - №3 (199). – С. 137-140.

Методические пособия

1. Неустроев М.П. Хабаарҕаһыт ыарыыны (мыт) эмтээһин уонна сэрэтии: методическое пособие / М.П. Неустроев, С.Г. Петрова, Е.И. Эльбядова, А.А. Попов. – Якутск, 2019. – 300 экз. – ISBN: 978-5.

2. «Система ведения сельского хозяйства в Республике Саха (Якутия) на период 2021 – 2025 годы»: методическое пособие / авторский коллектив. – Белгород, 2021. – 500 экз. – ISBN 978-5-6046091-8-7.