

Богоутдинов Наиль Шамильевич

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

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Государственном научном учреждении
Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт
Российской академии сельскохозяйственных наук

Научные руководители: доктор ветеринарных наук, старший научный сотрудник
Ласкавый Владислав Николаевич

доктор медицинских наук, профессор
Федорова Валентина Анатольевна

Официальные оппоненты: **Плотников Олег Петрович,**
доктор медицинских наук, старший научный сотрудник,
ФКУЗ Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
заведующий лабораторией коллекционных штаммов
Государственной коллекции патогенных бактерий

Ильясов Павел Владимирович,
кандидат биологических наук,
ГНУ Самарская научно-исследовательская
ветеринарная станция РАСХН
заместитель директора по науке

Ведущая организация: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности

Защита состоится «09» октября 2014 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.04 на базе ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» и на сайте: www.sgau.ru.

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2014 г.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная пл., 1, ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», ученому секретарю диссертационного совета.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Карпунина Лидия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

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

Широта распространения актиномикоза в различных странах мира, и, следовательно, необходимость сохранения поголовья животных от вынужденного убоя, определяет актуальность разработки эффективных методов лечения и профилактики этого заболевания (Спесивцева, 1964; Аскеров, 1977). За последние 5 лет заболеваемость КРС актиномикозом в Казахстане и Средней Азии официально определялась в пределах 3,57%. В среднем в хозяйствах Украины зарегистрировано от 0,9 до 2,9% случаев этого заболевания. По результатам информационно-аналитического центра Россельхознадзора при содействии ФГУ «Центр ветеринарии» и «Роспотребнадзора» в РФ заболеваемость актиномикозом КРС за 2010 год составляла до 0,35 % от общего числа инфекционных заболеваний, за 2011 год - около 0,24 % (Дудников и др., 2010, 2012), а в отдельных регионах достигла 10,3 - 41,4% (Ильченко и др., 2009).

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

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

Известно, что традиционные вакцины хорошо зарекомендовали себя и широко используются в животноводстве для профилактики ряда инфекционных заболеваний, но, однако, не обладают при этом лечебным эффектом. Вместе с тем в последние годы сообщается о появлении нового направления в биотехнологии – создании терапевтических вакцин, которые могут эффективно применяться как для лечения, так и для профилактики заболеваний. В первую очередь, это химические вакцины на основе компонентов, извлеченных из микробной клетки и обладающих иммуногенной активностью (Глик, Пастернак, 2002; Crawford, Clark, 1986; Hunter et al., 1990; Ding et al., 1998; Nolte et al., 2001; Gröschel et al., 2014). Следует отметить, что разработка эффективных профилактических и терапевтических вакцинных препаратов для лечения и профилактики инфекционных заболеваний относится к приоритетным направлениям развития науки в РФ и входит в перечень критических технологий (Указ Президента Российской Федерации № 899). Показано, что эффективность терапевтических вакцин связана с активацией Т-клеточно-опосредованного иммунитета по типу Th1 (Tu et al., 2014; Wengerter et al., 2014). Однако малоизвестно о влиянии таких вакцин на основные показатели гомеостаза макроорганизма.

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

Задачи исследования:

1. Отобрать штамм-продуцент, пригодный для дальнейшего приготовления экспериментальной серии терапевтической вакцины, из клинических изолятов культур *A. bovis*, выделенных из патологического материала КРС, больных актиномикозом.
2. Разработать и оптимизировать основные биотехнологические этапы получения протективного антигена из биомассы штамма *A. bovis* – продуцента экспериментальной актиномикозной терапевтической вакцины.
3. Разработать оптимальные способы приготовления экспериментальной серии терапевтической вакцины из биомассы штамма-продуцента *A. bovis* с применением методов замораживания-оттаивания и дезинтеграции ультразвуком.
4. Определить биохимический состав экспериментальной серии терапевтической вакцины против актиномикоза КРС, в частности, количество белка и липидов (холестерина и триглицеридов).
5. Оценить лечебные и профилактические свойства разработанного препарата на биомоделях и сельскохозяйственных животных, а также обосновать перспективу его использования в качестве экспериментальной вакцины против актиномикоза КРС.
6. Исследовать биохимические и иммунологические показатели крови у лабораторных и сельскохозяйственных животных после введения экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины.
7. Оценить экономическую эффективность экспериментальной серии препарата в комплексе ветеринарно-санитарных мероприятий в производственных условиях.

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

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

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

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

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

Практическая значимость работы. Разработана биотехнология приготовления экспериментальной терапевтической вакцины против актиномикоза сельскохозяйственных животных, которая обладает терапевтическим и профилактическим эффектом в отношении телят и нетелей с актиномикозом не более 12 см, является удобной в применении, не требует длительных сроков лечения, не вызывает побочных эффектов и повышает резистентность животных к возбудителю актиномикоза. Экспериментальная серия вакцины была успешно испытана в колхозе «Победа» Красноармейского района и СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области, что подтверждается актом об эффективности ее применения от 10 ноября 2010 г. Получен патент на изобретение № 2378001 («Средство для лечения актиномикоза крупного рогатого скота»). Экспериментальная серия вакцины технологична (может быть приготовлена на биофабриках), предохраняет от заболевания актиномикозом в неблагополучных хозяйствах и не менее чем на 85% снижает выбытие животных, находящихся на первой и в начале второй стадии развития болезни. В результате комплексного изучения безвредности, иммунологических и биохимических показателей крови лабораторных и сельскохозяйственных животных, обработанных ЭС-42 вакцины, и визуальных наблюдений за КРС обоснована перспектива использования штамма *A. bovis* NV-01 в качестве продуцента экспериментальной актиномикозной терапевтической вакцины.

По материалам диссертационной работы разработаны «Методические рекомендации по применению лечебно-профилактического препарата из культуры *Actinomyces bovis* против актиномикоза крупного рогатого скота» (в соавторстве с Ласкавым В.Н., Панферовым В.И., 2012), которые одобрены Ученым советом ГНУ

Саратовский НИВИ Россельхозакадемии № 3 от 18.10.2011 г. и утверждены 18.11.2011 г.).

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

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны основные этапы биотехнологии приготовления экспериментальной терапевтической вакцины против актиномикоза КРС.
2. Штамм-продуцент из клинических изолятов культур *A. bovis* NV-01, выделенный из патологического материала КРС, больных актиномикозом, является пригодным для приготовления экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины.
3. Разработаны оптимальные способы получения протективных компонентов из штамма-продуцента *A. bovis* NV-01 методом замораживания-оттаивания и ультразвуковой дезинтеграции.
4. Биохимический состав экспериментальной серии терапевтической актиномикозной вакцины представлен белками (1,1-1,3 мг/мл) и липидами (холестерин и триглицериды, 0,25-0,3 мМ/л и 0,9-1,0 мМ/л, соответственно).
5. Введение экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины с лечебной и профилактической целью приводит к гармонизации биохимических и иммунологических показателей в организме лабораторных и сельскохозяйственных животных.
6. Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий после введения экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины (ЭС-42) КРС в производственных условиях позволяет сохранить денежные средства на каждый рубль ветеринарных затрат в размере 5,7 рубля.

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

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

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

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

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

Структура и объем диссертации. Работа состоит из: введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих описание объектов, материалов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 158 страницах, содержит 17 таблиц и 17 рисунков. Список литературы включает 271 работ, в том числе 211 отечественных и 60 иностранных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты, материалы и методы исследований

Объекты исследования

В качестве объекта исследования использовали ЭС терапевтической актиномикозной вакцины на основе протективных компонентов штамма-продуцента *A. bovis* NV-01, выделенного нами из патологического материала больной актиномикозом коровы.

Испытания препарата проводили на морских свинках (24 шт.) весом 250-300 г в возрасте 4-5 месяцев, кроликах породы Шиншилла (8 голов) весом 2,5-3 кг, белых аутбредных мышях весом 16-18 г (5 шт.) и КРС красно-пестрой голштинизированной породы (872 головы) разной весовой категории.

Экспериментальное моделирование актиномикоза осуществляли путем введения морским свинкам штамма *A. bovis* NV-01, полученного после культивирования на МПБ с 1% глюкозы в течение 42 суток. Заражение осуществляли парентерально (подкожно и внутримышечно) в дозе 1 мл. Затем животным вводили ЭС-42 однократно внутримышечно по 1 мл/гол.

Материалы и методы исследований

Для отбора штамма-продуцента экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины проводили изоляцию абсцедированной ткани из актиномикотической гранулемы области нижней челюсти больной актиномикозом коровы. Обнаруженные в гное друзы были отобраны и промыты физиологическим раствором по общепринятому плану исследования, согласно рекомендациям авторов (Спесивцева, 1964; Баринов, 1982; Колычев, Ощепков, 2001), с последующим посевом их на стандартные жидкие и плотные питательные среды и культивированием в аэробных условиях при температуре 37 °С в течение 3-42 суток. Для посева на плотные и жидкие питательные среды исследуемый материал (гной с друзами) предварительно измельчали в ступке с физиологическим раствором и центрифугировали при 268,32 g в течение 20 мин. Осадок отмывали физраствором и одновременно засеивали в пробирки с полужидким агаром под вазелиновым маслом, в МПБ или МПА с 1% глюкозой. Макроскопическое и микроскопическое исследование посевов проводили на 3, 7, 14, 20, 42 дни с учетом рекомендаций ряда авторов (Розанов, 1952; Коленько, 1963; Спесивцева, 1964; Берджи, 1980, 1997; Сидоров и др., 1995; Колычев, Ощепков, 2001; Васильев, 2000). Мазки, приготовленные из культур *A. bovis* и окрашенные по Граму, просматривали под иммерсией в световой микроскоп Minimed-5021 (Россия). После окончания исследований, оставшийся патматериал был утилизирован в крематории.

Морфологические, культуральные и биохимические свойства трех выделенных нами штаммов исследовали общепринятым способом, как указано (Берджи, 1980, 1997; Сидоров и др., 1995). Выращивание одного из них, обозначенного как *A. bovis* NV-01, в качестве штамма-продуцента двух экспериментальных серий (ЭС) терапевтической вакцины против актиномикоза КРС осуществляли на МПБ с 1% глюкозы в объеме 15 литров каждая.

Получение протективных компонентов первой ЭС проводили методом замораживания-оттаивания культуры штамма-продуцента *A. bovis* NV-01 после 42 дней роста (ЭС-42) с использованием морозильной камеры комбинированного холодильника INDESIT (Россия). Для разрушения внешней мембраны и клеточной стенки бактерий надосадочную жидкость из колбы с выращенной культурой сливали, а полученный осадок подвергали 20-кратному замораживанию и оттаиванию путем воздействия низкой температуры (–18 °С и ниже) в соответствии с рекомендациями (Шах Махмуд, Филимонова, 2010).

Параллельно проводили взятие образцов выращенной культуры того же штамма-продуцента второй ЭС на 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40 и 42 дни культивирования, каждый из которых подвергали ультразвуковой дезинтеграции на аппарате УЗДН–1 (Россия) в пределах 20 кГц и длительностью воздействия (экспозиции) до 60 мин как предложено ранее (Ласкавый и др., 2005). Иммуногенность полученных дезинтегрантов указанных тринадцати серий (обозначены, соответственно, ЭС-7, ЭС-10, ЭС-13, ЭС-16, ЭС-19, ЭС-22, ЭС-25, ЭС-28, ЭС-31, ЭС-34, ЭС-37, ЭС-40 и ЭС-42 (УЗ)) предварительно оценивали в реакции агломерации лейкоцитов (РАЛ), как указано (Ласкавый и др., 2000, 2001, 2005; Агольцов и др., 2001, 2003). Для постановки реакции использовали: 1) испытуемую ЭС вакцины; 2) цитратную кровь кролика-донора; 3) комплемент морской свинки; 4) изотонический раствор NaCl; 5) метанол; 6) 0,1% раствор метиленового синего. Окрашенные мазки просматривали под микроскопом при увеличении $\times 45$, выбирая для анализа

100 лейкоцитов с последующим определением среди них количества склеенных лейкоцитов и предварительной оценкой иммуногенности по величине индекса агломерации, как отношения числа склеенных в общем числе выбранных для анализа лейкоцитов. Антиген считали иммуногенным при величине индекса агломерации 6-15 %.

Для очистки каждой ЭС вакцины от примесей поврежденных компонентов актиномицетов (стенок и целых клеток штамма-продуцента *A. bovis* NV-01) использовали мембранные фильтры типа «Владипор -МФА № 3» с размером пор 0,25-0,35 мкм (Россия) и вакуум-аппарата марки ВН ПД 10 У (Россия) согласно методическим рекомендациям (Ласкавый и др., 2005).

Полное обеззараживание проводили добавлением в каждую серию ЭС вакцины раствор формальдегида до конечной концентрации 0,4 % в соответствии с рекомендациями (Walker 1957, 1964) с последующим контрольным высевом на твердые питательные среды для подтверждения отсутствия роста культуры в течение 21 дня. Хранение ЭС-42 проводили при температуре +4 °С в течение полутора лет (срок наблюдения).

Молекулярную массу белков ЭС-42 вакцины определяли методом электрофореза в 20% ПААГ-SDS по методу K. Laemmli (1970).

Сыворотку крови экспериментальных животных получали по общепринятой методике (Предтеченский, 1950; Винников, 2000) за сутки до и через 21 день после введения препарата.

Биохимические исследования сывороток крови (определение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), креатинкиназы (КК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), количество общего холестерина (Охс)) проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Sinnowa BS 3000 P (Китай) с использованием стандартных коммерческих наборов реагентов. Для определения активности АСТ использовали метод Karmen (1955) без применения пиридоксальфосфата; АЛТ – кинетический спектрофотометрический метод без применения 5-фосфопиридоксала; ЛДГ – метод La Due et al. (1956); КК – ферментативный метод Oliver (1981); Охс определяли колориметрическим методом Trinder (1969) (Камышников, 2000). Содержание глюкозы в сыворотке крови экспериментальных животных исследовали унифицированным глюкозооксидазным методом Asp et al. (1967) (Камышников, 2000), концентрацию общего белка – методом осаждения сульфосалициловой кислотой (Пупкова, Прасолова, 2005; Малинин, 2008; Лелевич и др., 2013).

Для изучения иммунного статуса у животных опытной группы определяли лейкоцитарную формулу крови, включая количество лейкоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов (Тх), Т-супрессоров (Тс), Тх/Тс, В-лимфоцитов и L_0 (Байд, 1951; Фримель, 1987; Ледванов, Киричук, 1996; Винников, 2000). Содержание Т- и В-лимфоцитов определяли в реакции спонтанного розеткообразования в присутствии теофиллина (Борисов, 2005; Резяпкин, 2001).

Статистический анализ результатов проводили по стандартным методикам (Ашмарин, Воробьев, 1962).

Результаты исследований и их обсуждение

Биотехнологические особенности выделения и культивирования штамма-продуцента экспериментальной серии вакцины против актиномикоза крупного рогатого скота

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

Среди осмотренного поголовья в колхозе «Красавский» было выбрано два нетеля (обозначенных как № 1 и № 2) с множественными (Рисунок 1 А) или единичными обширными (Рисунок 1 Б) актиномикозными поражениями как подходящие потенциальные доноры с наиболее выраженными изменениями, характерными для этого заболевания. Животное № 2 было убито на бойне хозяйства, а патматериал (голова с актиномикомой) доставлен в лабораторию ГНУ Саратовского НИВИ Россельхозакадемии для выделения возбудителя актиномикоза.

Аналогичным образом проводили выделение бактериальных штаммов от больных животных из другого хозяйства - колхоза «Победа». В этом случае культуры изолированы из актиномиком с использованием сходного патматериала (голов КРС) от нетелей № 3 и 4.

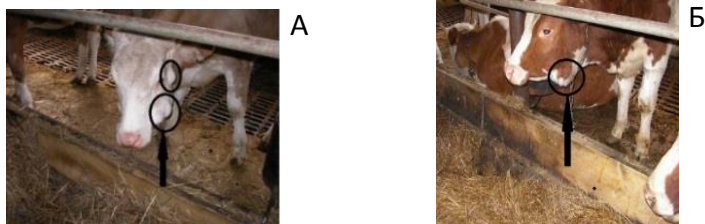


Рисунок 1 – Животные (нетели) с множественными (А) или единичными (Б) актиномикозными поражениями на лицевой части головы

Для выделения штамма-продуцента, пригодного к дальнейшему приготовлению экспериментальной серии терапевтической вакцины, проводили визуальный осмотр патологического материала (Рисунок 2 А), иссекали актиномикому (Рисунок 2 Б), из которой изолировали абсцедированную ткань в стерильную посуду (Рисунок 2 В) с последующим выделением из гнойной ткани актиномикозных друз (Г).

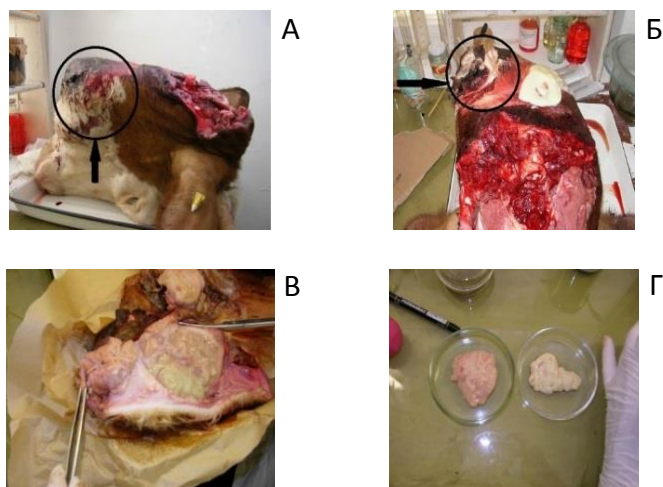


Рисунок 2 – Схема выделения друз *A. bovis* из нетеля № 2 СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района: (А) - актиномикома в области нижней челюсти КРС (нетель); (Б) - иссечение актиномикомы из патматериала; (В) - отделение абсцедированной ткани из актиномикомы; (Г) – фрагмент гноя из актиномикомы для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

Через три дня после посева при бактериоскопии в мазках обнаруживались короткие и длинные грамположительные палочки дифтероидного типа (Рисунок 3 А), характерные для *A. bovis* (Берджи, 1980, 1997). Через семь дней – грамположительные цельные ветвящиеся нити (Рисунок 3 Б), типичные для возбудителя актиномикоза.



Рисунок 3 – Микроскопическое исследование чистой культуры, выделенной из патматериала нетеля № 2: А - после трехдневного роста на МПБ с 1% глюкозы, мазки окрашены по Граму с последующей микроскопией под иммерсионным объективом $\times 90$; Б - после семидневного роста на МПБ с 1% глюкозы

Через четырнадцать дней культивирования в жидких питательных средах на поверхности появилась морщинистая пленка, а на дне - хорошо выраженный осадок (Рисунок 4 А). На твердых питательных средах наблюдался бактериальный рост в виде типичных для актиномицетов макроколоний (Рисунок 4 Б). Для подтверждения принадлежности данной культуры к *A. bovis* с жидких и твердых питательных сред нами были приготовлены мазки с последующей окраской по Граму. При бактериоскопии в мазках визуализировались характерные для *A. bovis* грамположительные ветвящиеся нити различной длины в виде сегментированных цепочек (Рисунок 4 В) и тонких, слегка изогнутых, неподвижных грамположительных палочек, расположенных одиночно или в виде V-, и Y-образной формы (Рисунок 4 Г).

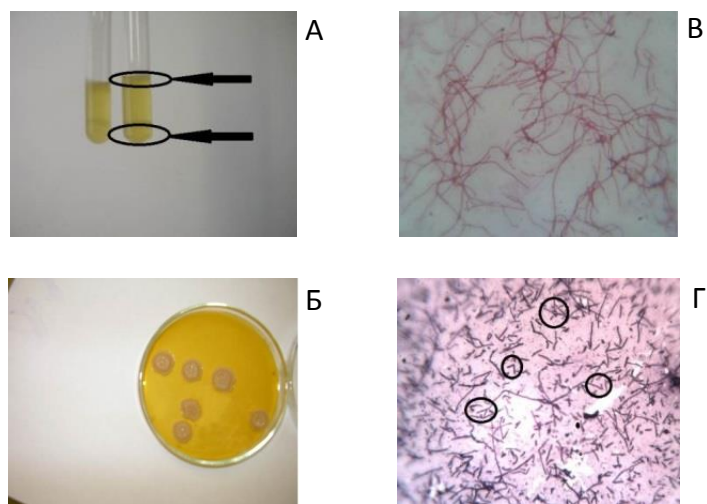


Рисунок 4 – Макроскопическое (А, Б) и микроскопическое (В, Г) исследование культуры из актиномикомы нетеля № 2, выделенной после 14 дневного роста на МПБ с 1% глюкозы (А, В, Г) или на МПА с 1% глюкозы (Б). Мазки окрашены по Граму с последующей микроскопией под иммерсионным объективом $\times 90$

После двадцати дней культивирования на твердых и жидких питательных средах, нити, состоящие из сегментированных палочек, распались в результате деления путем фрагментации на отдельные части, которые представляли собой тонкие, слегка изогнутые неподвижные грамположительные палочки, располагающиеся одиночно, парами или в виде букв «V», «Y» (Рисунок 5 А). На 42 сутки выращивания культуры нами отмечено просветление бульона, хотя осадок и морщинистая пленка сохранились. На твердых питательных средах наблюдались округлые с коричневым оттенком колонии (Рисунок 4 Б). В мазках было видно множество отдельных длинных и коротких грамположительных палочек (Рисунок 5 Б).



Рисунок 5 – Микроскопическое исследование чистой культуры, выделенной из патматериала нетеля № 2: А - на 20-е сутки, Б - на 42-е сутки роста, окрашенные по Граму с последующей микроскопией под иммерсионным объективом $\times 90$

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

После выращивания в аналогичном штамму NV-01 режиме (в аэробных условиях при температуре 37 °С в течение 3-42 сут.), нам удалось выделить еще две культуры, которые по морфологическим, культуральным и тинкториальным свойствам были также идентифицированы как *A. bovis*. Данные культуры мы обозначили *A. bovis* NV-02 и *A. bovis* NV-03.

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

Таблица 1 – Изучение основных биохимических свойств штаммов *A. bovis* NV-01, *A. bovis* 02 и *A. bovis* 03

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

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

Штамм *A. bovis* NV-01 был отобран нами для дальнейшей работы в качестве штамма-продуцента экспериментальной актиномикозной терапевтической вакцины.

Разработка биотехнологических режимов выращивания штамма – продуцента *A. bovis* NV-01 и приготовления эффективной антигенной композиции экспериментальных серий терапевтической вакцины против актиномикоза крупного рогатого скота

Целью настоящего раздела явился подбор оптимального режима выращивания штамма *A. bovis* NV-01, разработка метода приготовления ЭС вакцины и проверка ее эффективности на лабораторных и сельскохозяйственных животных.

Разработка способа получения эффективной антигенной композиции экспериментальной серии терапевтической актиномикозной вакцины методом замораживания-оттаивания

После получения биомассы штамма-продуцента экспериментальной серии терапевтической актиномикозной вакцины и выделения цитоплазматической фракции бактерий *A. bovis* NV-01 нами была приготовлена ЭС-42. Результаты изучения ее биохимического состава приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Биохимический состав ЭС-42 актиномикозной терапевтической вакцины

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

Биохимические исследования препарата позволили выявить в нём преимущественное содержание белков и триглицеридов, соответствующих по составу цитоплазматической фракции бактерий (Шах Махмуд, Филимонова, 2010).

По результатам электрофореза (Рисунок 6) в ЭС-42 обнаружена доминантная полипептидная полоса с молекулярной массой 20 кДа, а также несколько минорных белков с молекулярной массой от 60 до 90 кДа.

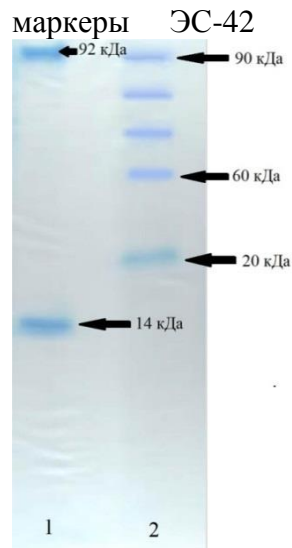


Рисунок 6 – Электрофорез препарата ЭС-42 в 20% ПААГ-SDS; 1 – маркеры; 2 – ЭС-42

Разработка способа получения эффективной антигенной композиции экспериментальной серии терапевтической актиномикозной вакцины методом ультразвуковой дезинтеграции

Аналогично предыдущим экспериментам, мы делали высеv штамма *A. bovis* NV-01 на МПБ с 1% глюкозой и выдерживали в термостате при температуре 37 °С в течение 42 суток. Затем, с 7 по 42 день роста, брали образцы культуры через каждые 3 дня выращивания. В результате отобрано 13 образцов культуральной жидкости *A. bovis* NV-01, обозначенных нами, соответственно, в зависимости от сроков выращивания штамма-продуцента как ЭС-7, ЭС-10, ЭС-13, ЭС-16, ЭС-19, ЭС-22, ЭС-25, ЭС-28, ЭС-31, ЭС-34, ЭС-37, ЭС-40 и ЭС-42 (УЗ). Каждую ЭС подвергали ультразвуковой дезинтеграции для разрушения структуры клеточной стенки бактерии *A. bovis* и исследовали в РАЛ.

Судя по результатам РАЛ, для изготовления ЭС вакцины наиболее подходящими следовало считать серии ЭС-13, ЭС-28, ЭС-34, ЭС-37, ЭС-40, ЭС-42 (УЗ), поскольку у них отмечалась средняя агломеративная активность с индексом агломерации в диапазоне 6 – 15 %, что, как правило, соотносится с относительно высокой иммуногенностью (Ласкавый и др., 2000, 2001, 2005). Вместе с тем, для получения препаративного количества штамма-продуцента ЭС вакцины наиболее подходящим, на наш взгляд, следовало считать ЭС-42 (УЗ), которая и была нами выбрана для дальнейших исследований.

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

Изучение лечебного действия экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины на животных в производственных условиях

Проверку лечебных свойств ЭС-42 (УЗ) вакцины мы начали с исследований в колхозе «Победа» Красноармейского района. Для этого была сформирована группа КРС - телят 6-8 месячного возраста (12 голов), телок случного возраста (10 голов) и коров (8 голов) с характерными признаками актиномикоза и различной степенью выраженности актиномикомы.

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

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

Затем ЭС-42 была проверена на сельскохозяйственных животных в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района Саратовской области. Хозяйство считалось неблагополучным по актиномикозу предыдущие 2 года. С апреля по октябрь 2008 года в нем было выявлено 84 головы (нетели, первотелки, коровы) с

актиномикозными поражениями разной степени в области нижней и верхней челюсти. Для контроля было отобрано 10 голов (заведомо здоровые животные) и два нетеля с выраженными актиномикозными поражениями – для взятия патматериала. Препарат вводили животным внутримышечно в область средней трети шеи по той же схеме.

В целом введение препарата больным актиномикозом нетелям привело к выздоровлению большего (72 голов, 85,71%) по сравнению с ЭС-42 (УЗ) количества животных на первой и в начале второй стадии развития заболевания с актиномикомой в диаметре до 5 см и 10-12 см, соответственно. Однако сроки редукции актиномикомы варьировали. На рисунке 7 представлена динамика редукции актиномикомы у нетеля с актиномикомой в диаметре 10-12 см (Рисунок 7 А). При обследовании больных животных (нетели) через две недели после введения ЭС-42 установлено, что плотный актиномикозный фокус уменьшался в размере примерно на 4-5 см (Рисунок 7 Б). За последующие 3-4 недели у животных этой группы актиномикома размягчалась с последующим ее вскрытием и образованием фистулы (Рисунок 7 Б). Полное выздоровление наступало в течение 1-1,5 месяца и сопровождалось выделением гноя, после этого наружные отверстия фистулезных ходов заживали с образованием рубца (Рисунок 7 В, Г). В дальнейшем выздоровление наблюдалось (в течение двух месяцев после проведенного лечения) у всех подвергавшихся лечению животных (100%).

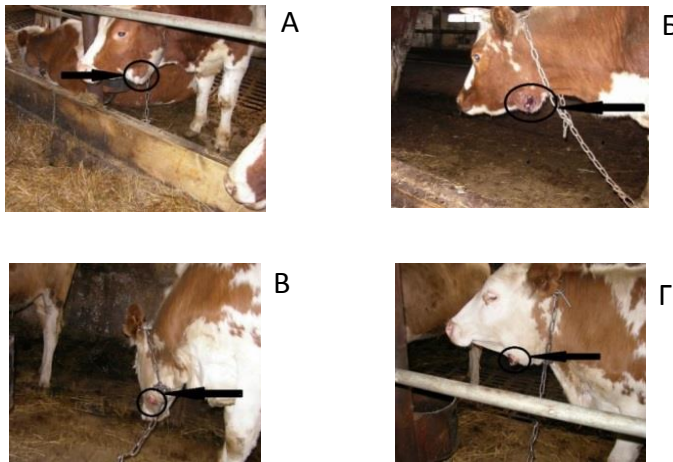


Рисунок 7 – Нетель до (А) и после (Б, В, Г) введения ЭС-42 в СПК колхоз «Красавский» Лысогорского района: (А) - актиномикома в области нижней челюсти; (Б) - размягчение опухоли с последующим ее вскрытием и образованием фистулы; (В) - заживание наружных отверстий фистулезных ходов с образованием рубца (вид сбоку); (Г) - заживание наружных отверстий фистулезных ходов с образованием рубца (вид снизу)

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

Изучение профилактического действия экспериментальной серии актиномикозной терапевтической вакцины на крупном рогатом скоте

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

Последующее обследование обработанных ЭС-42 вакцины животных спустя год (в ноябре 2010 г.) не выявило ни одной головы с актиномикозным поражением.

При дальнейшем наблюдении в течение последующих трех лет в указанном хозяйстве у КРС также не было зарегистрировано ни одного случая этого заболевания.

Изучение влияния ЭС-42 вакцины на биохимические и иммунологические показатели сывороток крови морских свинок

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

Достоверное повышение содержания глюкозы и холестерина у обработанных ЭС-42 зараженных животных, вероятно, указывало на активизацию у морских свинок глюконеогенеза и увеличение интеграции липидного и углеводного обмена. В данном случае увеличение активности АЛТ, сопровождающееся также достоверным возрастанием активности АСТ и свидетельствующее, по мнению ряда авторов (Овчинников, 1981; Кнорре, Мызина, 2000), об активизации гепатоцитов и повышении нейтрализующей функции печени, в свою очередь, коррелировало с проявлением аналогичных изменений в организме биомоделей по отношению к возбудителю актиномикоза. Увеличение активности ЛДГ на фоне повышенного по сравнению с контролем значения активности АСТ и АЛТ, а также увеличения коэффициента Де Ритиса, указывало на активизацию аэробных кислородзависимых катаболических процессов и увеличение неспецифической резистентности организма животных (Рослый, 2002).

При изучении показателей иммунного статуса морских свинок при моделировании экспериментальной актиномикозной инфекции путем введения штамма *A. bovis* NV-01 с последующей обработкой ЭС-42 вакцины, наблюдалась тенденция к повышению количества В-лимфоцитов и общего числа лимфоцитов с восстановлением их процентного соотношения до нормальных значений (Таблица 3).

Таблица 3 – Изучение влияния ЭС-42 вакцины на иммунологические показатели сывороток крови морских свинок при экспериментальном актиномикозе

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

Примечание - *Л₀ – нулевые лимфоциты.

Вместе с тем количество L_0 и их процентное соотношение в группе обработанных животных снизилось почти до нормальных значений (Таблица 3). Так, нами отмечалось почти двукратное повышение процентного соотношения В-лимфоцитов, которое сопровождалось определенным изменением их абсолютного количества. Мы также регистрировали некоторое повышение как общего числа лимфоцитов, так и количества L_0 , при снижении их процентного соотношения.

Изучение влияния ЭС-42 вакцины на биохимические и иммунологические показатели сывороток крови крупного рогатого скота

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

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

Достоверное снижение глюкозы в данной группе животных свидетельствовало о повышении интенсивности энергетического обмена.

При исследовании взаимосвязи между выраженными профилактическими свойствами ЭС вакцины и изменениями биохимических параметров сывороток крови КРС, нами было установлено достоверное ($p < 0,05$) возрастание таких показателей как активность АСТ, АЛТ, КК, а также концентрации глюкозы. Зарегистрирована тенденция к повышению активности ЛДГ и содержания общего холестерина. Напротив, наблюдалось снижение концентрации общего белка и коэффициента Де Ритиса. Это указывало на более высокий уровень энергетического обмена у нетелей экспериментальной группы после введения ЭС-42 вакцины по сравнению с контрольными животными (Рослый, 2002).

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

Исследование иммунологических параметров сывороток крови больных актиномикозом нетелей, обработанных ЭС-42, показало некоторое повышение соотношения T_x/T_c в основном за счет увеличения T_x и T_c , что характерно для острой фазы различных воспалительных заболеваний (Лебедев, Понякина, 1990; Федоров, 2005). Мы также регистрировали некоторое повышение относительного процентного соотношения и абсолютного количества L_0 у больных животных и снижение указанных параметров к норме после введения ЭС-42 вакцины.

У интактных животных, иммунизированных ЭС-42 вакцины для профилактики актиномикоза, нами зарегистрировано повышение, т.е. восстановление значений

Тх/Тс по сравнению с той же группой животных до введения препарата (Таблица 4). На наш взгляд, в данном случае изменения также могли происходить в основном за счет увеличения Тх и Тс, что характерно для формирования адаптивного специфического иммунитета (Лебедев, Понякина, 1990).

Таблица 4 – Изучение влияния ЭС-42 вакцины на иммунологические показатели сывороток крови интактных и больных актиномикозом нетелей

№ п/ п	Параметр	Единица измерения	Показатели сыворотки крови нетелей в группах				
			Больных актиномикозом (терапевтический эффект)			Интактных животных (профилактический эффект)	
			Контрольная*	Больные актиномикозом	Больные актиномикозом после обработки ЭС-42	до введения ЭС-42	после введения ЭС-42
1	Тх	%	61,4±2,5	54,8±1,58	58,4±1,10	49,5±1,4	56,6±1,9
2	лимфоциты	абс.	1513±239,3	2403±837,13	1431±61,92	1522,0±133,1	1658,3±151,4
3	Тс	%	8,4±5,4	7,7±1,13	5,9±0,76	8,2±1,0	9,2±0,6
4	лимфоциты	абс.	955±112,8	1867±644,74	1025±59,72	1559,0±132,3	1280,0±130,4
5	Тх/Тс	%	1,6±0,2	1,3±0,06	1,4±0,07	1,0±0,1	1,3±0,1
6	В лимфоциты	%	8,2±0,4	12±0,60	11,12±0,53	9,1±0,6	9,2±0,5
7		абс.	285±30,6	531±84,47	408±21,39	517,0±39,5	413,5±44,5
8	L ₀ лимфоциты	%	22±2,3	26±1,76	23±1,38	33,8±2,5	21,7±2,3
9		абс.	798±128,04	1085±109,98	872,7±98,07	1616,0±242,7	1180,0±175,6

Примечание - * (относительная норма клинически здоровых КРС в СПК колхоз «Красавский»).

У интактных КРС до введения ЭС-42 отмечалось почти двукратное повышение абсолютного количества В-лимфоцитов. После обработки тех же животных указанным препаратом мы регистрировали некоторое снижение этого показателя без видимого влияния на % соотношение данной субпопуляции. В этой же группе (интактных животных) до введения ЭС-42 вакцины отмечалось повышение как общего числа L₀ (почти в два раза), так и их процентного соотношения (в 1,5 раза). После введения ЭС-42 вакцины у КРС наблюдалось снижение данных параметров до нормальных значений.

Таким образом, введение ЭС-42 вакцины сопровождалось нормализацией биохимических и иммунологических показателей как у интактных, так и у больных актиномикозом нетелей.

Экономическая эффективность применения ЭС-42 вакцины

Многообразие объектов ветеринарной деятельности, разные направления ветеринарной работы обусловили разработку системы специальных, экономических показателей, позволяющих выявить эффективность затрат труда ветеринарных специалистов, целесообразность использования тех или иных средств и методов борьбы с различными болезнями животных.

Для характеристики экономической эффективности профилактических и лечебных мероприятий, направленных на предотвращение заболеваний, падежа животных, потерь продуктов животноводства, нами была использована система сле-

дующих показателей: фактический и предотвращенный экономический ущерб от заболевания; затраты на проведение ветеринарных мероприятий; экономический эффект, полученный в результате проведения ветеринарных мероприятий; экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на рубль затрат (Шатохин и др., 1997). Полученные данные об экономической эффективности проведенных ветеринарных мероприятий в колхозе «Красавский» приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий в СПК колхоз «Красавский» после введения ЭС-42 для профилактики актиномикоза КРС

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

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

Выводы

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

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

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

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

5. Разработанный экспериментальный препарат обладал выраженным терапевтическим эффектом в отношении животных с актиномикозом, не превышающей в диаметре 12 см (т.е. на начальной стадии болезни) и был менее эффективным при лечении КРС с актиномикозом большего диаметра (более 25 см). Проведенные профилактические мероприятия против актиномикоза крупного рогатого скота, основанные на двукратном введении животным препарата из выделенного нами штамма *A. bovis* NV-01, обеспечивают 100% эффективность.

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

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах

1. Богоутдинов Н.Ш. Биотехнологические аспекты изучения влияния лечебного действия лечебно-профилактического препарата на биохимический статус крови крупного рогатого скота / Н.Ш. Богоутдинов, В.Н. Ласкавый // Ветеринарная патология. – 2012. – №2 (40). – С. 41-43.

2. Богоутдинов Н.Ш. Влияния профилактического актиномикозного препарата на биохимические параметры сыворотки крови крупного рогатого скота / Н.Ш. Богоутдинов // Ветеринарный врач. – 2013. – №2. – С. 18-20.

Патент

3. Средство для лечения актиномикоза крупного рогатого скота: Патент 2378001 РФ / В.Н. Ласкавый, Н.Ш. Богоутдинов // Патентообладатель: Государственное научное учреждение Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук. Опубликовано 10.01.2010. Бюл. №1.

Публикации в других изданиях

4. Богоутдинов Н.Ш. Опыт дифференциальной диагностики актиномикоза от актинобациллеза крупного рогатого скота / Н.Ш. Богоутдинов, П.М. Караблин // Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития: сб. материалов Всерос. науч. - практ. конф. – Саратов, 2007. – С. 54-58.

5. Богоутдинов Н.Ш. Изменения биохимических показателей крови у морских свинок при введении актиномикозного препарата / Н.Ш. Богоутдинов, В.Н. Ласкавый, М.Л. Малинин // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы на основе инновационных достижений: сб. материалов Всерос. науч. - практ. конф. – Новочеркасск, 2009. – С. 122-124.

6. Богоутдинов Н.Ш. Лечение и профилактика актиномикоза крупного рогатого скота / Н.Ш. Богоутдинов, В.Н. Ласкавый, М.Л. Малинин // Актуальные проблемы ветеринарии и животноводства: сб. материалов Межрегиональной науч. - практ. конф. – Самара, 2010. – С. 59-63.

7. Богоутдинов Н.Ш. Изменения биохимических показателей крови у кроликов при введении лечебно-профилактического препарата против актиномикоза свиней / Н.Ш. Богоутдинов, В.Н. Ласкавый, М.Л. Малинин // Современные проблемы диагностики, лечения и профилактики болезней животных и птиц: сб. науч. тр. ведущих ученых России и Зарубежья. – Екатеринбург, 2010. – Вып. 3. – С. 75-78.

8. Богоутдинов Н.Ш. Определение потенциальной активности и лечебно-профилактической эффективности препарата из культуры *A. bovis* / Н.Ш. Богоут-

динов, В.Н. Ласкавый // Достижения современной науки и практики в области охраны здоровья животных и человека: сб. тр. регион. науч. - практ. межвузовской конф. – Самара, 2011. – С. 30-32.

9. Богоутдинов Н.Ш. Результаты биохимических исследований крови и профилактическая эффективность препарата против актиномикоза крупного рогатого скота / Н.Ш. Богоутдинов, М.Л. Малинин, В.Н. Ласкавый // Актуальные проблемы современной ветеринарии: сб. тр. межд. науч. - практ. конф. – Краснодар, 2011. – С. 30-33.

10. Богоутдинов Н.Ш. Биотехнологические аспекты изучения влияния препарата от актиномикоза / Н.Ш. Богоутдинов, В.Н. Ласкавый // Современные проблемы и инновационные подходы к диагностике, лечению и профилактике болезней животных и птиц: сб. тр. межд. науч. - практ. конф. – Екатеринбург, 2012. – Том 1. – С. 18-20.

11. Богоутдинов Н.Ш. Биотехнологические аспекты воздействия актиномикозного препарата на биохимические показатели морских свинок / Н.Ш. Богоутдинов // Проблемы ветеринарной медицины в условиях реформирования сельскохозяйственного производства: сб. тр. межд. науч. - практ. конф. – Махачкала, 2012. – С. 23-27.

12. Ласкавый В.Н. Методические наставления по применению лечебно-профилактического препарата из *Actinomyces bovis* против актиномикоза крупного рогатого скота / В.Н. Ласкавый, В.И. Панферов, Н.Ш. Богоутдинов // Сборник рекомендаций Государственного научного учреждения Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук за 2002-2012 годы. – М., 2012. – С. 141-149. ISBN 978-5-85941-455-0.