ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБНУ «Всероссийский научно – исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко»

На правах рукописи

КАРАЙЧЕНЦЕВ ДАНИЛА ВИКТОРОВИЧ

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННОГО КЕРАТОКОНЪЮНКТИВИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор Субботин В.В.

Москва – 2016

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1. Краткая характеристика инфекционного кератоконъюнктивита	11
2. Питательные среды для изоляции культур Moraxella bovis	15
3. Основные биологические свойства культур Moraxella bovis,	
отличающие их от морфологически сходной и сопутствующей	
микрофлоры	22
4. Чувствительность культур Moraxella bovis и сопутствующей микро-	
флоры к антибактериальным и другим химио-	
терапевтическим препаратам	26
5. Патогенные свойства культур Moraxella bovis	30
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
1. Материалы и методы исследований	38
2. Результаты собственных исследований	47
2.1.Изоляция из патологического материала культур	
Moraxella bovis и сопутствующей микрофлоры на кровяном	
агаре Хоттингера	47
2.2.Определение чувствительности культур Moraxella bovis	
и сопутствующей микрофлоры к антибактериальным	
и другим химиотерапевтическим препаратам	53
2.3. Конструирование плотной селективной питательной среды	
для изоляции и очистки культур Moraxella bovis	58
2.4. Изоляция из патологического материала культур Moraxella bovis	
на плотной селективной питательной среде и	
изучение её эффективности	63
2.5. Изучение биологических свойств культур Moraxella bovis,	
выделенных на плотной селективной питательной среде	69

2.6. Изучение патогенных свойств культур Moraxella bovis,	
изолированных на плотной селективной питательной среде	74
3. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	82
4. ВЫВОДЫ	98
5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	100
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	101
7. ПРИЛОЖЕНИЯ	119

Введение

Актуальность темы. В настоящее время, одной из сложных и актуальных проблем, в современной ветеринарной медицине, сдерживающих успешное развитие молочного и мясного животноводства, является инфекционный кератоконьюнктивит крупного рогатого скота, вызываемый Moraxella bovis. Это острая, контагиозная, быстро распространяющаяся болезнь, характеризующаяся слезотечением, светобоязнью, гиперемией сосудов коньюнктивы, блефароспазмом, иридоспазмом, серозно-слизистым, а затем серозно-гнойным истечением из пораженных глаз, помутнением и изъязвлением роговицы.

При первичном заносе возбудителя в стадо заболевает от 20 - 30 до 75 - 94% поголовья. Болеют животные всех половозрастных групп. В стационарно неблагополучных пунктах болеют преимущественно телята и молодняк до 12-24-месячного возраста, а заболеваемость колеблется в широком диапазоне в зависимости от вирулентности возбудителя и наличия предрасполагающих факторов [137,51,135,93,118].

Экономический ущерб обусловлен тем, что у коров, больных кератоконьюнктивитом, уменьшается молочная продуктивность, у телят - на 25-30% снижаются привесы, ухудшаются нагулы у животных, что является причиной приводящей их к яловости. [118,137,135].

Успех мероприятий, направленных на профилактику и ликвидацию болезни во многом зависит от своевременной диагностики, которая основывается на анализе эпизоотических данных, клиническом обследовании животных с обязательным проведением лабораторных (бактериологических) исследований [129,122,74,118,100,23,47].

Основой лабораторных исследований является бактериологическая диагностика, направленная на выделение чистой культуры возбудителя и ее идентификацию. Однако при бактериологическом исследовании

патматериала кроме Moraxella bovis выделяются стафилококки, диплококки, тетракокки, эшерихии, протей, вирусы, риккетсии, микоплазмы, уреплазмы, другая бактериальная флора, сапрофитные грибы, [40,133,134]. Из исследуемого материала выделяли Mycoplasma bovoculi, Ureaplasma sp. и Moraxella bovis[35].

Большая часть перечисленных микроорганизмов менее требовательна к питательным средам и условиям культивирования, чем Moraxella bovis. Их быстрый рост и размножение на питательных средах ограничивает или основного возбудителя болезни. полностью подавляет развитие большинстве случаев неблагополучных инфекционному даже В ПО кератоконьюнктивиту хозяйствах частота выделения Moraxella bovis из патологического материала не превышает 20% что существенно осложняет болезни, a, следовательно, разработку диагностику И реализацию необходимых лечебно-профилактических мероприятий [73,63,137].

Исходя, из вышеизложенного представляется актуальным разработать плотную селективную питательную среду, которая позволила бы увеличить частоту обнаружения Moraxella bovis в патологическом материале и сократить сроки бактериологической диагностики.

Цель и задачи исследований. Целью настоящих исследований являлась разработка плотной селективной питательной среды для совершенствования лабораторной диагностики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого Moraxella bovis.

Для достижения поставленной цели были определены задачи:

1. Провести бактериологические исследования патологического материала от больного, инфекционным кератоконъюктивитом крупного рогатого скота с целью получения культур Moraxella bovis на кровяном агаре Хоттингера.

- 2. Выделить чистые культуры Moraxella bovis и идентифицировать сопутствующую микрофлору, высеваемую из патологического материала.
- 3. Изучить основные биологические свойства культур Moraxella bovis, выделенных на кровяном агаре Хоттингера.
- 4. Изучить чувствительность к химиотерапевтическим препаратам вновь выделенных культур Moraxella bovis и культур сопутствующих микроорганизмов, выделяемых из патологического материала.
- 5. Разработать рецептуру, изготовить и испытать плотную селективную питательную среду для изоляции из патологического материала Moraxella bovis и выделения чистой культуры возбудителя из смешанных культур.
- 6. Изучить эффективность разработанной плотной селективной питательной среды в условиях неблагополучных хозяйств в сравнении с кровяным агаром Хоттингера, применяемым в настоящее время в нашей стране для изоляции возбудителя из патологического материала.
- 7. Изучить основные биологические свойства культур Moraxella bovis, изолированных на плотной селективной питательной среде.
- 8. Изучить патогенные свойства культур Moraxella bovis, выделенных на плотной селективной питательной среде в опытах на телятах и белых мышах.

Научная Бактериологическими новизна. исследованиями В неблагополучных инфекционному установлено, ЧТО ПО кератоконьюнктивиту крупного рогатого скота хозяйствах Российской Федерации из патологического материала от больных животных кроме основного возбудителя (Moraxella bovis) выделяются Escherichia coli, Salmonella dublin, Staphylococcus aureus, Aspergillus Нигер (23,15%, 21,10%, 38,42% и 2,5% высеваемых культур соответственно). При этом частота обнаружения Moraxella bovis на традиционно используемой в настоящее время плотной питательной среде (кровяной агар Хоттингера) составила 17,32%.

При изучении чувствительности/устойчивости Moraxella bovis и представителей сопутствующей микрофлоры К антимикробным химиотерапевтическим препаратам установлены различия по данным свойствам. Моракселлы проявили высокую чувствительность моксифлоксацину (МПК 0.01 - 0.04 мкг/мл), офлаксоцину (МПК 0.04 - 0.08мкг/мл), левофлоксацину (МПК 0.10 - 0.80 мкг/мл), линкомицину (МПК 0.10-0.40 мкг/мл), пенициллину (МПК 0.25 - 0.50 мкг/мл), гентамицину (МПК 0,25 – 1,0 мкг/мл), и оказались резистентными к спиктиномицину (МПК 75.00 - 90,00 мкг/мл), сульфадимизину, фталазолу, нистатину, резорцину, сульфадиметоксину (МПК более 100,00 мкг/мл). МПК в отношении Moraxella bovis, Escherichia coli, Salmonella dublin, Staphylococcus aureus спиктиномицина, составила соответственно 75,0 - 90,0 мкг/мл (80,25±1,042 мкг/мл); 10,30 - 41,20 мкг/мл ($25,65\pm0,0603$ мкг/мл); 11,20 - 44,80 мкг/мл $(18,60\pm5,668 \text{ мкг/мл}); 11,90 - 47,60 \text{ мкг/мл}(19,90\pm6,00 \text{ мкг/мл}), а резорцина$ более 100,00 мкг/мл. Aspergillus Нигер проявили чувствительность к резорцину (МПК составила 9,80-18,60 мкг/мл ($14,20\pm1,87$ мкг/мл)). МПК спиктиномицина в сочетании с резорцином в отношении вышеуказанных культур составила соответственно 37.6 - 75.2 мкг/мл (56.40 ± 5.54 мкг/мл); 9.70- 38,80 мкг/мл (24,25 \pm 0,0904 мкг/мл); 10,60 - 31,80 мкг/мл (14,13 \pm 4,272 мкг/мл); $11,30 - 33,90 (15,10\pm4,534)$; 9,80-18,60 мкг/мл $(14,20\pm1,87$ мкг/мл).

Выявленные у микроорганизмов различия в чувствительности к сочетанию спиктиномицина и резорцина в ходе данного этапа исследований послужили основой для вновь разработанной рецептуры селективной питательной среды.

На основе разработанной рецептуры изготовлена плотная селективная питательная среда для изоляции из патологического материала Moraxella bovis и выделения чистой культуры возбудителя из смешанных культур. При изучении эффективности ее использования установлено, что данная среда позволяет повысить результативность бактериологических исследований

патологического материала, по сравнению с традиционно используемым в нашей стране для этих целей кровяным агаром Хоттингера в 2,82 раза.

Установлено, что использование вновь разработанной плотной селективной питательной среды не влияет на основные биологические свойства возбудителя, включая патогенность лабораторных ДЛЯ естественно восприимчивых животных, позволяя осуществлять его видовую идентификацию, a полученные при ЭТОМ изоляты/штаммы при необходимости использовать для разработки биологических препаратов.

Практическая значимость. На основании полученных данных разработаны «Методические рекомендации по приготовлению и применению плотной селективной питательной среды для изоляции из патологического материала культур Moraxella bovis — возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогато скота и выделения его чистой культуры», которые рассмотрены и одобрены на заседании секции «Инфекционная патология животных» Отделения ветеринарной медицины РАСХН 15 июля 2014 г., протокол №3.

Разработанная плотная селективная питательная среда позволяет своевременно диагностировать заболевание, более эффективно выявлять больных животных и предупреждать распространение инфекции, повышать эффективность лечебно-профилактических мероприятий в целом.

Данные о чувствительности Moraxella bovis к антимикробным химиотерапевтическим препаратам могут использоваться для лечения больных животных в хозяйствах, в которых проводились наши исследования, в период до получения дополнительных данных об антибиотикочувствительности возбудителя.

Личный вклад соискателя. Весь базовый материал исследования собран и обработан лично исполнителем работы, в результате чего сделаны основные заключения и выводы.

Апробация работы. Основные материалы диссертации доложены на заседаниях и отчетных сессиях Ученого Совета ВИЭВ, на научных

конференциях: на международной научно-практической конференции РГОУ РАМЖ (Московская обл., 2006 г.); на XIV международной научноконференции «Проблемы производственной сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения» (г. Белгород, БГСХА, 2010 г.); на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, пчел», посвященной 50-летию со дня основания лаборатории лейкозологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтомофауны (г. Москва, ГНУ ВИЭВ).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе -3 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и струтура диссетрации. Диссертация изложена на 129 страницах и состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований, обсуждение, выводы, практические предложения, список использованной литературы, приложения. Работа иллюстрирована 9 таблицами, 3 рисунками. В библиографическом списке представлено 142 источника, в том числе 52 отечественных, 90 зарубежных авторов.

Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:

- результаты бактериологических исследований патологического материала, полученного от крупного рогатого скота из хозяйств, неблагополучных по инфекционному кератоконьюнктивиту, вызываемому Moraxella bovis, с использованием кровяного агара Хоттингера;
- основные биологические свойства свежевыделенных на кровяном агаре Хоттингера культур Moraxella bovis, включая свойства, позволяющие дифференцировать их от сопутствующей микрофлоры (т.е. осуществлять видовую идентификацию);

- чувствительность/устойчивость культур Moraxella bovis и сопутствующей микрофлоры к антимикробным химиотерапевтическим препаратам;
- рецептура плотной селективной для Moraxella bovis питательной среды;
- экспериментальные данные об эффективности вновь разработанной плотной селективной питательной среды в сравнении с традиционно используемым при бактериологической диагностике инфекционного кератоконьюнктивита, вызываемого Moraxella bovis, кровяным агаром Хоттингера;
- основные биологические и патогенные свойства культур Moraxella bovis, выделенных с использованием вновь разработанной плотной селективной питательной среды.

1. Обзор литературы

1. Краткая характеристика инфекционного кератоконъюнктивита

Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, вызываемый Moraxella bovis острая, контагиозная, быстро распространяющая болезнь, характеризующаяся слезотечением, светобоязнью, гиперемией сосудов конъюнктивы, блефароспазмом, иридоспазмом, серозно – слизистым, а затем серозно – гнойным истечением из пораженных глаз, помутнением, изъязвлением роговицы с частичной или полной потерей зрения пораженного глаза животного. Данное заболевание, по мнению многих отечественных и иностранных исследователей, занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии крупного рогатого скота [14,36,47,51,83,135,93]. В настоящее время проблема ликвидации инфекционного кератоконъюнктивита, как в мире, так и в Российской Федерации далека от решения. В первую очередь ЭТО связано кератоконъюнктивита, диагностики инфекционного несовершенством включая и лабораторную.

Проведенными многочисленными исследованиями установлено, что возбудителем болезни является бактерия Moraxella bovis, относящаяся к роду Moraxella семейства Neisseriaceae. Это грамотрицательная, полиморфная, чаще короткая и толстая с закругленными краями палочковидная бактерия длинной 1,0 — 1,5 мкм., неподвижная, без жгутиков. Спор не образует. В мазках из свежевыделенных культур выявляется капсула, а клетки распологаются преимущественно попарно или в виде коротких цепочек. Возбудитель некислотоустойчив, обладает аэробным типом дыхания.

Moraxella bovis вырабатывает токсин, который раздражает и разрушает оболочки глаза. Вирулентность различных культур возбудителя варьирует в широких пределах и обусловлена рядом факторов патогенности. Наибольшей вирулентностью обладают культуры моракселл, имеющие фимбрии

(обеспечивают прикрипление моракселл к слизистой оболочке глазного яблока), образующие гемолизин, выявляемый на кровяном агаре и обладающие гемагглютинирующей активностью [47,51,135,93].

Необходимо отметить, что заболевание зарегистрировано в виде энзоотий или эпизоотий как у нас в стране, а также во многих странах мира с развитым мясным и молочным животноводством. Массовые вспышки инфекционного кератоконъюнктивита в основном наблюдаются в весеннее - летний период, но они так же регистрируются в любое время года, среди всех возрастных групп крупного рогатого скота. В зимний период года чаще болеют старые живорные, имеющие пониженную резистентность [114,73,96,108,93].

Источником возбудителя инфекции являются больные животные, а также некоторые здоровые животные - бактерионосители. Возбудителя болезни выделяли из носового и глазного истечений от переболевших животных на протяжениеи более 10 недель. Заболевание встречается среди всех возрастных групп крупного рогатого скота, который перезаражается при контакте здорового и больного скота, в том числе через носовую слизь, содержащую возбудителя, которая при кашле и усиленном дыхании попадает в глаза здоровых восприимчивых животных. Факторами передачи могут служить общие кормушки, поилки, предметы ухода и инструментарий. Так же переносить возбудителя могут комнатные мухи, которые питаются слезной пораженных жидкостью ИЗ глаз, перелетая на здоровых восприимчивых животных и инфицируя их [14,51,83,135].

Исследованиями установлено, что заболеванию крупного рогатого скота инфекционным кератоконъюнктивитом способствуют высокая концентрация животных на небольшой территории, жаркая сухая погода, особенно с ветром и пылью, неудовлетворительный микроклимат помещений, механические травмы роговицы, неполноценное кормление, прежде всего нехватка в рационе каротина, что ведет к недостаточности витамина А, высокая запыленность воздуха и растительности пастбищ, обилие на фермах

мух. Следует отметить, что большую роль в качестве предраспологающих факторов играет избыточное ультрафиолетовое излучение и возможность переноса моракселл насекомыми, которые определяют сезонность, присущую болезни. [73,96,114,108,83].

Эти, способствующие вспышке заболевания факторы, воздействия, угнетающие иммунную систему животного, благоприятствуют быстрому и интенсивному переносу моракселл от животного к животному, его пассажированию и, вследствие этого, усилению вирулентности.

Из инфекционный литературных данных известно, что кератоконъюнктивит одной является экономически значимых ИЗ бактериальных болезней крупного рогатого скота, причиняющих большой ущерб животноводству как у нас в России, а так же во многих странах мира. В настоящее время болезнь зарегистрирована в большинстве стран мира с развитым скотоводством, а также в нашей стране. Она регистрируется на молочно – товарных фермах, в животноводческих комплексах по откорму крупного рогатого скота, а также в частном секторе. В начальной стадии заболевания болеют от 20 - 30 % до 60 - 94% поголовья, болеют животные всех возрастных групп.

В неблагополучных инфекционному кератоконъюнктивиту ПО хозяйствах болеют преимущественно телята и молодняк крупного рогатого скота до 12 – 24 месячного возраста. При этом, заболеваемость может варьировать в широком диапозоне в зависимости от вирулентности возбудителя и наличия упоминавшихся выше предраспологающих факторов. Заболевание, как правило, сопровождается снижением аппетита, угнетенным состоянием и беспокойством животных. Во время болезни, в связи с резким снижением поедаемости кормов, животные, особенно телята, сильно худеют, а после болезни продолжительное время не прибавляют в весе. Заболевание глаз приводит к частичной или полной потере зрения и ведет к значительному снижению продуктивности и потере работоспособности. При заболевании коров уменьшается молочная продуктивность, ухудшаются нагулы у животных, которые являются причиной, приводящей их к яловости. У телят привесы снижаются на 25 – 30% [14,36,51,83].

Описана вспышка инфекционного кератоконъюнктивита на ферме, где содержалось 442 головы взрослого крупного рогатого скота и 90 телят. Телята содержались отдельно от коров. За один день заболело 45 телят, через два дня заболело еще 23 теленка. У многих из них был поражен один глаз и лишь у некоторых оба. У заболевших животных выявили обильное слезотечение, блефарит, конъюнктивит, фотофобию, и отек век. Затем развивались серозно-гнойный конъюнктивит, помутнение роговицы и язвенный кератит. Спустя 7-10 дней у большинства телят наступала слепота, повышалась температура тела, телята постепенно худели и слабели. В последующем заболели 13 коров. От всех больных животных из пораженных глаз были выделены культуры Moraxella bovis, которую авторы считают возбудителем болезни [91].

Литературные данные свидетельствуют о том, что инфекционный кератоконъюнктивит, вызываемый Moraxella bovis. необходимо дифференцировать от сходных по клиническому проявлению заболеваний, наблюдаются протекающих c поражением глаз, которые при кератоконъюнктивитах риккетсиозного, инвазионного генеза, а также болезни глаз авитаминозного происхождения. Заболевание развивается лишь в тех случаях, когда понижается резистентность конъюнктивы и роговицы и создаются условия для развития и проявления патогенных свойств Moraxella bovis. Кроме того, данное заболевание необходимо дифференцировать от кератоконъюнктивитов, которые регистрируются инфекционном при ринотрахеите, парагриппе, пастереллезе, микоплазмозе крупного рогатого скота.

Обобщая данный раздел обзора литературы, можно отметить, что инфекционный кератоконъюнктивит, вызываемый Moraxella bovis весьма распространенное заболевание как у нас в стране, так и в различных странах мира с развитым мясным и молочным животноводством. Оно может

протекать в виде энзоотий или эпизоотий. Заболевание является одной из экономически значимых бактериальных болезней крупного рогатого скота, большой ущерб которое причиняет животноводству. Несмотря значительное число научных работ, опубликованных к настоящему времени отечественными и зарубежными авторами, это недостаточно изученное забалевание, диагностика которого все еще вызывает определенные сложности и требует совершенствования.

2. Питательные среды для изоляции культур Moraxella bovis

литературы Анализ отечественной И иностранной специальной свидетельствует, что выделение культур Moraxella bovis из патологического материала от больных животных (серозно - слизистого, серозно - гнойного истечений из пораженных глаз, соскобов с конъюнктивы век, глазного яблока, из роговицы) представляет большие трудности. Это связано с рядом ростовых потребностей возбудителя из-за чего культивирование Moraxella bovis на питательных средах требует особых условий. Поскольку ростовые потребности находящейся в посевном материале сопутствующей, в том числе и условно-патогенной микрофлоры [диплококки, тетракокки, стафилококки, протей, сапрофитные эшерихии, сальмонеллы, риккетсии, грибы, уреплазмы], часто оказываются менее значительными, рост последних на питательных средах чаще всего опережает poct Moraxella bovis и, в конечном итоге, подавляет их развитие полностью либо не дает возможности обнаружить в смешенной культуре искомого возбудителя и выделить его чистую культуру. Необходимо отметить, что для роста моракселл на питательных средах требуется обогащение их дефибринорованной кровью крупного рогатого скота и дрожжевым экстрактом, что обеспечивает дополнительную интенсификацию роста и сопутствующей микрофлоры. По данным зарубежной литературы основой питательных сред, используемых

для изоляции и выращивания культур Moraxella bovis, является триптиказосоевый агар [137,25,47].

Однако отечественные авторы при проведении исследований с использованием сред из триптиказо-соевого перевара отмечали иногда плохой гидролиз сои, что отрицательно влияло на ростовые качества питательных сред. Поэтому в качестве основы среды и стимуляторов роста при изоляции и культивировании Moraxella bovis в нашей стране чаще используют перевар Хоттингера с обогащением его кровью барана, кролика и крупного рогатого скота [23,25,8,9,36,47].

Выделению из патологического материала и культивированию Moraxella bovis на кровяном агаре Хоттингера посвящено достаточно много работ как зарубежных, так и отечественных авторов. Сообщает, что при исследовании патологического материала с использованием кровяного агара Хоттингера им была изолирована культура Moraxella bovis от 48,2% больных телят с острым течением болезни и 5.9% клинически здоровых животных[124]. При инкубировании Moraxella bovis на различных питательных средах этот же автор установил, что культуры возбудителя хорошо растут на кровяном агаре и триптиказо—соевом бульоне, но не растут на Herelle агаре с содержанием солей желчи. Автор отмечает, что Moraxella bovis дает скудный рост в триптиказо—соевом бульоне, но рост усиливается при добавлении в среду сыворотки крови крупного рогатого скота.

серозно-слизистое, серозно-гнойное стране исследовал истечение из пораженных глаз, соскобы с конъюнктивы век, глазного яблока, переболевшего ИЗ роговицы OT клинически здорового И кератокоъюнктивитом крупного рогатого скота [40]. При этом были выделены на кровяном агаре Хоттингера различные микроорганизмы: стафилококки, стрептококки, диплококки, тетракокки, микрококки, кишечная палочка, протей, сапрофитные грибы и Moraxella bovis.

По сообщению из исследуемого патологического материала (смывы и соскобы с конъюнктивы) больных кератоконъюнктивитом животных на

специальных питательных средах и кровяном агаре они выделяли Mycoplasma bovoculi, Ureplasma sp[133].

При исследовании патологического материала от больных инфекционным кератоконъюнктивитом телят и клинически здоровых животных выделил культуру Moraxella bovis на кровяном агаре [73,74].

При бактериологическом исследовании патологического материала от 48,2% и 5,9% клинически здоровых телят выделили культуры Moraxella bovis на кровяном агаре [63,80].

Провели бактериологическое и вирусологическое исследования 807 образцов материалов (мазков с конъюнктивы) 613 клинически здоровых и 194 больных инфекционным кератоконъюнктивитом телят и выделили от больных животных на кровяном агаре культуры Moraxella bovis, которые в условиях эксперимента вызывали кератоконъюнктивит [63,80].

Сообщает, что культуры Moraxella bovis не растут на простых питательных средах, а требуют добавления 5-10% крови или сыворотки крови крупного рогатого скота [8].

По данным наиболее эффективными питательными средами для выделения и культивирования возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита являются: Колумбия бульон Difco, Шэндлера бульон Difco, Тиогликоливый бульон Difco и кровяной агар [8].

О выделении и культивировании на кровяном агаре культур Moraxella bovis сообщают:[114,91,88,118,54,23,25,51]. О необходимости добавлять 10% крови крупного рогатого скота в питательные среды для культивирования Moraxella bovis сообщают [71,77]. К аналогичному выводу пришли выделившие культуру Moraxella bovis на кровяном агаре от больного инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота [77].

Исследовали 257 проб патологического материала из глаз на наличие Moraxella bovis [137]. При этом 100 проб были взяты от клинически здоровых животных в возрасте от 1-го месяца до 2-х лет, 31 проба отобрана из здоровых глаз животных в неблагополучных стадах. Moraxella bovis удалось

выделить из 23 проб, или в 18,36% случаев, в том числе от 13 телят до 6-ти месячного возраста и от 10 животных в возрасте от 6-ти до 12-ти месяцев.

Исследовал 3823 пробы патологического материала от больных кератоконъюнктивитом коров, телок и телят и выделил на кровяном агаре Хоттингера 659 культур Moraxella bovis [23,25]. Из 841 пробы серозногнойного истечения из глаз коров, автором было выделено 142 культуры Moraxella bovis (16,91%), при исследовании 917 проб аналогичного материала от телок было выделено 136 культур возбудителя (14,87%). Из 689 проб серозно—гнойного истечения из глаз телят массой 190 - 230 кг им было выделено 119 культур Moraxella bovis (17,36%), при исследовании 1323 проб патологического материала от телят массой 90 – 130 кг было выделено 262 культуры возбудителя (19,11%). В итоге из 3823 проб зкссудата из пораженных глаз крупного рогатого скота разного возраста выделено 659 культур Moraxella bovis (17,24%).

Установили, что основным этиологическим агентом инфекционного кератоконъюнктивита является Moraxella bovis, в ассоциации с риккетсиями, пастереллами и кокковой микрофлорой[36].

Пришли к выводу, что инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота протекает нередко в виде энзоотий и эпизоотий и охватывает от 50 до 80 % всего поголовья. Авторы провели бактериологические исследования патологоанатомического материала и выдели на питательных средах культуру Moraxella bovis [51].

Провели бактериологические исследования патологоанатомического материала от больных коров инфекционным кератоконъюнктивитом[135]. Из 100 глазных проб на питательных средах были выделены: стафилококки-26,4%, кишечная палочка- 24.8%. золотистый стафилококк- 19%, Moraxella bovis-9,9%, стрептококки - 8,3%, синегнойная палочка- 8.3%. протей- 3,3%.

В 2013 году изучили этиологию инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Кубани [7]. В результате проведенных бактериологических исследований были выделены

на питательных средах бактерии Moraxella bovis, а также сопутствующая микрофлора (стрептококки, стафилококки, диплококки).

Провела бактериологические исследования смывов из конъюнктивальных мешков пораженных глаз телят[51]. Автором были выделены на питательных средах гемолитические и негемолитические культуры Moraxella bovis.

В 2014 году провели выделение на питательных средах из патологоанатомического материала культур Moraxella bovis, Moraxella bovucoli, Moraxella ovis, а затем провели дифференциацию на мультиплексе ПЦР [93]. Всего было исследовано 57 чистых культур 45 слезных мазков. На основании проведенных исследований установили, что все штаммы были правильно идентифицированы, а данный метод был чувствительный при анализе культур.

При больных исследовании патологического материала OT инфекционным кератоконъюнктивитом животных, кроме моракселл на питательных средах выделяются И сопутствующие микроорганизмы. Культуральные свойства сопутствующей микрофлоры характеризуются следующими свойствами.

Эшерихии хорошо растут на обычных питательных средах (МПБ, МПА). На поверхности мясо-пептонного агара эшерихии формируют колонии, которые обнаруживаются визуально, круглой формы, сочные, блестящие, выпуклые, гладкие, с ровными краями. На среде Эндо культуры эшерихии образуют колонии круглой формы, сочные, блестящие, выпуклые, гладкие с ровными краями, розового или малинового цвета. На среде Левина аналогичные по форме колонии имеют темно-фиолетовый или черный цвет. На жидких средах рост эшерихий сопровождается интенсивным помутнением среды, образованием осадка или пленки и кольца на стенке пробирки.

Большинство сальмонелл растет на обычных питательных средах (МПБ, МПА). На поверхности мясо-пептонного агара сальмонеллы формируют колонии, которые обнаруживаются визуально, где образуют серовато-белые

с голубоватым оттенком колонии, гладки, блестящие, куполообразные с ровными (реже — неровными) краями. На среде Эндо они растут в виде прозрачных, слегка голубоватых нежных колоний, иногда слегка розоватых. На мясопептонном бульоне культуры рода Salmonella вызывают интенсивное помутнение среды с образованием осадка на дне пробирки, на поверхности среды формируется нежная, разбивающаяся при встряхивании пленка.

Стафилококки хорошо растут на обычных питательных средах (МПБ, МПА). На поверхности мясопептонного агара культуры Staphylococcus aureus образуют круглые, слегка возвышающиеся над поверхностью агара колонии с ровными краями диаметром 2-5 мм. На мясопептонным бульоне вначале обнаруживают диффузное помутнение с последующим выпадением рыхлого хлопьевидного осадка [52,29,34,14,5,2,36].

Резюмируя данный раздел обзора литературы, считаем необходимым отметить, что в нашей стране при бактериологической диагностике многих инфекционных заболеваний разработаны и применяются в ветеринарной практике плотные селективные питательные среды. В лабораторной диагностике сальмонеллеза животных используют элективные питательные среды (Плоскирева, висмут - сульфатный агар), которые подавляют рост кишечных сапрофитов. При выделении возбудителя метрита лошадей в шоколадный агар добавляют стрептомицин. Для бактериологической диагностики микоплазмоза животных в питательные среды добавляют такие ингибиторы нежелательной бактериальной микрофлоры, как уксуснокислый таллий и пенициллин, а для лабораторной диагностики кампилобактериоза крупного рогатого скота в питательные среды добавляют сафранин и новобиоцин. При первичном выделении термофильных кампилобактерий в питательные среды для придания им селективных всойств добавляют рифампицин, полимиксин и нистатин.

Изоляция из патологического материала Moraxella bovis - возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита - на кровяном агаре и иных средах, не обладающих селективными свойствами, представляет значительные

трудности, так как рост разнообразной сопутствующей, в том числе и условно - патогенной микрофлоры опережает рост моракселл и, в конечном счете, часто подавляет их развитие, снижая частоту обнаружения возбудителя и удлинняя сроки выделения искомых культур. Большинству авторов, использовавших для целей обнаружения в патологическом материале Moraxella bovis, удается это сделать лишь в 14 – 19% случаев от числа исследуемых образцов.

Обращает на себя внимание и тот факт, что в доступной нам литературе не удалось обнаружить сведений о наличии и применении в отечественной или зарубежной лабораторной практике бактериологической диагностики инфекционного кератоконъюнктивита селективных для Moraxella bovis питательных сред. Очевидно, что их наличие и применение позволит сократить временные и материальные издержки при постановке диагноза и, как следствие, повысить эффективность противоэпизоотических мероприятий, проводимых при данном заболевании.

3. Основные биологические свойства культур Moraxella bovis, отличающие их от морфологически сходной и сопутствующей микрофлоры

Сложности диагностики инфекционного кератоконьюнктивита связаны не только с их требовательностью к питательным средам, на которых кроме основного возбудителя активно растет посторонняя микрофлора, но и с тем, что группа сходных с моракселлами грамотрицательных палочковидных бактерий и кокков весьма обширна. К их числу, прежде всего, относят представиттелей родов Pseudomonas, Alcaligenes, Achromobacter, Acinetobacter, Flavobacterium.

От них бактерии рода Moraxella отличают, прежде всего, основываясь на том, что моракселлы в этой группе представляют единственный род, бактерии которого не растут на простом агаре. Кроме того, учитывают

пигментообразование, присущее представителям рода Flavobacterium и большей части псевдомонад, подвижность, свойственную бактериям родов Pseudomonas, Alcaligenes, Achromobacter и оксидазную активность, которая варьирует у псевдомонад и отсутствует у бактерий рода Acinetobacter.

Следует отметить, что род Moraxella подразделяется на подроды Moraxella и Branhamella. Дифференциация бактерий на этом уровне затруднений не вызывает, поскольку к первому относятся виды, имеющие палочковидную форму с тенденцией к образованию кокков, ко второму виды, представленные исключительно кокковыми клетками. Moraxella bovis внутри подрода Moraxella от других видов дифференцируют по гемолитической, желатиназной, оксидазной, каталазной, фенилаланиндезаминазной, уреазной активности, способности к росту на агаре Мак-Конки.

Изучил биохимические свойства Moraxella bovis и установил, что данные бактерии не утилизировали ацетат, не восстанавливали нитраты, не ферментировали углеводы, не образовывали индол и не обладали подвижностью, но вызывали гемолиз на кровяном агаре, пептонизировали и свертывали лакмусовое молоко, разжижали желатин и обладали каталазной активностью [127].

На основании проведенных биохимических исследований пришли к выводу, что культуры Moraxella bovis с фенотипом пилиобразования на кровяном агаре не росли на средах: с 6% натрия хлорида, Мак-Конки, с желчными солями [124].

Изучила биохимические свойства музейных и клинических культур рода Moraxella традиционными методами, рекомендованными Международным подкомитетом по изучению Moraxella и сходных микроорганизмов с помощью биохимической панели API20 NE с оценкой её диагностической эффективности [8,9]. Автор представила материал по морфологии клеток, характеру роста на простых и сложных питательных средах при разных условиях инкубирования, определила наличие цитохромоксидазы, каталазы,

образования индола, сероводорода, изучила способность редуцировать нитраты в нитриты, разжижать желатин, продуцировать уреазу, фенилаланиндеаминазу, утилизировать нитрат, изучила сахаролитическую, липолитическую активность.

Сообщает, что все изученные им культуры Moraxella bovis не образовывали индол, не утилизировали ацетат, не ферментировали углеводы, не восстанавливали нитраты и не обладали подвижностью, но обладали каталазной активностью, вызывали гемолиз на кровяном агаре, разжижали желатин, пептонизировали и свертывали лакмусовое молоко [63,80].

Проведя бактериологическое исследование глазного секрета от больных телочек и нетелей, больных инфекционным кератоконъюнктивитом, установили, что выделенные ими более 100 культур моракселл обладали гемолитической и адгезивной активностью и характерными биохимическими свойствами [63]. У 91,6% выделенных культур выявлено наличие фимбрий (пилей). Аналогичные данные были получены при бактериологических исследованиях патологического материала, отобранного от больных нетелей и телок [79].

По мнению для культур Moraxella bovis наиболее характерными свойствами при биохимической типизации являются гемолиз на кровяном агаре, пептонизация, свертывание лакмусового молока, разжижение желатина, каталазная активность, рост на среде с 5% натрия хлорида, образование индола [98,71]. Изученные авторами штаммы не утилизировали ацетат, не восстанавливали нитраты, не ферментировали углеводы, не обладали подвижностью, не росли на средах с 6% натрия хлорида, среде Мак – Конки, с желчными солями.

Об изучении культурально-морфологических свойств свежевыделенных из патологического материала (истечений из глаз больного инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота) моракселл сообщают [77]. По данным авторов изученные ими штаммы возбудителя обладали гемолитическими свойствами, они образовывали на плотных питательных

средах сухие рыхлые, слабо прикрепленные к агару (вдавленные в агар) колонии, диаметр, которых был около 1 мм. Бактерии были грамотрицательными, в мазках располагались попарно или одиночно, обладали оксидазной и каталазной активностью, редуцировали нитраты, не разжижали желатину и сыворотку крови, не утилизировали полисахариды.

Изучая культуральные и биологические свойства культур Moraxella bovis, выделенных от больного и переболевшего кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота установил, что не все они продуцировали гемолизин [59]. При этом как гемолитические, так и не обладающие гемолитической активностью культуры свертывали и пептонизировали лакмусовое молоко, а слезная жидкость ингибировала их рост на питательных средах.

По данным все выделенные ими Moraxella bovis обладали гемолитическими свойствами, а по лишь некоторые из изученных ими [102,123]. При этом обе группы авторов отмечают, что все моракселлы свертывали и пептонизировали лакмусовое молоко, а слезная жидкость подавляла их рост на питательных средах.

При исследовании патологического материала, отобранного от больного инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота выделили культуры Moraxella bovis, которые обладали гемолитическими свойствами, были грамотрицательными, обладали оксидазной и каталазной активностью, редуцировали нитраты, не разжижали желатин и сыворотку крови, не обладали сахаролитической активностью [111].

Изучил биохимические свойства выделенных культур Moraxella bovis и установил, что бактерии не утилизировали ацетат натрия, не восстанавливали нитраты до нитритов, не ферментировали углеводы, не образовывали индол и не обладали подвижностью [23,25]. Все изученные им моракселлы разжижали желатин, обладали каталазной активностью, вызывали гемолиз на кровяном агаре, сворачивали и пептонизировали лакмусовое молоко.

По данным для Moraxella bovis характерно наличие гемолитической активности, оксидазы, желатиназы (инкубация 7-14 суток), пептонизация

лакмусового молока, чувствительность к пенициллину, образование каталазы и редукция нитратов приблизительно у 14% штаммов, отсутствие образования кислоты из Д-глюкозы, Д-ксилозы, Д-маннита, лактозы, сахарозы, мальтозы, фенилаланиндезаминазы, уреазы на среде Кристенсена, утилизации цитрата на среде Симмонса, образования индола [49]. Возбудитель образует H₂S, что выявляется в тесте с бумагой, пропитанной ацетатом свинца, но отсутствует выделение H₂S при посеве в столбик TSI. Возбудитель не растет на среде Мак-Конки.

Изучил некоторые биохимические свойства выделенных культур Moraxella bovis. Автором установлено, что Moraxella bovis обладает гемолизом, вырабатывает токсин, фибринолизин, аминопептидазу, не растет на агаре Мак-Конки [65].

Изучая дифференциальные признаки на уровне подрода Moraxella, установил, что Moraxella bovis, Moraxella lacunata, Moraxella nonliguenfaciens, Moraxella phenylpyruvica и Moraxella osloensis не утилизировали ацететат, не ферментировали углеводы, не образовывали индол, не обладали подвижностью, но они обладали каталазной активностью [23,25]. Moraxella bovis и Moraxella lacunata разжижали желатин, а остальные – не разжижали. Штаммы Moraxella bovis не восстанавливали нитраты, вызывали гемолиз на кровяном агаре, a Moraxella lacunata, Moraxella nonliguenfaciens, Moraxella phenylpyruvica и Moraxella osloensis восстанавливали нитраты и не вызывали гемолиза на кровяном агаре. Следует подчеркнуть, что Moraxella bovis пептонизировала И свертывала лакмусовое молоко, Moraxella nonliguenfaciens не пептонизировала и не свертывала лакмусовое молоко.

Этот же автор при проведении бактериологических исследований патологического материала, отобранного от больных инфекционным кератоконъюнктивитом животных, на мясопептонном агаре выделял сопутствующую микрофлору - Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella dublin. Им были изучены биохимические свойства выделенных культур и установлено, что Escherichia coli не утилизировали цитраты, не

желатину, не расщепляли мочевину, не образовали разжижажали сероводород, образовали индол, ферментировали лактозу Staphylococcus aureus ферментировали с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, фруктозу, сахарозу, ксилозу, глицерин, маннит и не разлагали дульцит, салицин, инулин, раффинозу. Выделяли аммиак и сероводород, не образовывали индол, восстанавливали нитраты в нитриты; продуцировали каталазу, фосфатазу, уреазу; обладали гемолитическими свойствами. При внутрикожном введении кролику вызывает некроз на месте инъекции. Свертывали и пептонизировали молоко, разжижали желатин, иногда свернутую сыворотку крови. Salmonella dublin не ферментировали сахарозу, не разлагали индол, не расщепляли салицин, не разлагали лактозу, не образовывали индол, не расщепляли мочевину, давали положительную реакцию с метиловым красным, глюкозу ферментировали с образованием газа, ферментировали манит. Эти данные не противоречат сообщениям [52,29,14,5].

Таким образом, следует учитывать, что результаты прямого микроскопического обнаружения возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита в препаратах, окрашенных по Граму, имеют только ориентировочное значение. К виду Moraxella bovis относят культуры бактерий, имеющие не только описанные выше типичние культуральноморфологические свойства, образующие НО И не пигмент, фенилаланиндезаминазу, чувствительные к уреазу, пенициллину, растущие на простом МПА, агаре Мак-Конки. Достаточно характерен рост возбудителя в лакмусовом молоке, при этом верхняя щелочная часть среды приобретает синий цвет, казеин пептонизируется.

4. Чувствительность культур Moraxella bovis и сопутствующей микрофлоры к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам

Многие отечественные и зарубежные авторы провели исследования по изучению чувствительности Moraxella bovis к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам и посвятили значительное количество работ этой теме.

Изучил чувствительность патогенных штаммов Moraxella bovis к пенициллину и установил, что ни один из штаммов возбудителя не может расти в присутствии в питательной среде одной ЕД/мл пенициллина[129].

Исследуя чувствительность моракселл, выделенных из серозно – слизистых, серозно-гнойных истечений из глаз больного крупного рогатого скота к антибактериальным химиотирапевтическим препаратам, установили, что все штаммы были чувствительны к ампициллину, гентамицину, фурадонину, канамицину, хлорамфениколу, бацитрацину, аминозидину [88,82]. О чувствительности Moraxella bovis к хлорамфениколу и тетрациклину сообщают [91].

Результаты исследований свидетельствуют, что возбудитель инфекционного кератоконьюнктивита был чувствителен к ряду антибиотиков и сульфаниламидных препаратов (пенициллин, стрептомицин, фурадонин) [88,82].

Исследовали чувствительность к антибиотикам Moraxella bovis, выделенных от больного крупного рогатого скота [47]. Авторы установили, что бактерии были чувствительны к окситетрациклину, тетрациклину, эритромицину. Экспериментами продемонстрирована чувствительность возбудителя к пенициллину, стрептомицину, тетрациклину, эритромицину, хлорамфениколу [118].

Данные, представленные свидетельствуют о высокой чувствительности изолированных от молодняка крупного рогатого скота моракселл к канамицину и тетрациклину и устойчивости к ряду других антибиотиков, использовавшихся в исследованиях [87,89].

При определении чувствительности патогенных Moraxella bovis к ряду антибактериальных препаратов установили, что они оказались

чувствительными гентамицину, тетрациклину, хлорамфениколу, К M, сульфаниламидным препаратам, полимиксину К НО проявили резистентность К пенициллину, спектиномицину, ампициллину, стрептомицину, неомицину [77].

Определение антибиотикочувствительности Moraxella bovis, проведенное показало, что минимальная подавляющая концентрация к ряду антибактериальных препаратов составила: гентамицин - 0,25 мкг/мл; ампициллин - 0,75 мкг/мл; цефалоспорин - 1,5 мкг/мл; стрептомицин - 0,05 мкг/мл; неомицин - 8-32 мкг/мл; нитрофуродонин - 0,75-6 мкг/мл; рифампицин -1,5 мкг/мл; тетрациклин - 8-32 мкг/мл; эритромицин - 1-4 мкг/мл [82].

Провели исследования чувствительности 30 штаммов Moraxella bovis, выделенных от крупного рогатого скота [58]. Авторы установили, что все они были чувствительны: к канамицину (МПК - 1,6 - 4,0 мкг/мл); эритромицину (МПК - 0,6 - 1,0 мкг/мл); нитрофурантонину (МПК - 14,7 - 16,0 мкг/мл); неомицину (МПК - 1,11 - 2,0 мкг/мл); тетрациклину (МПК - 0,89 - 2,0 мкг/мл) и стрептомицину (МПК - 2,56 - 6,0 мкг/мл). Эти штаммы были резистентны к линкомицину и новобиоцину.

По сообщению выделенные ими от больного крупного рогатого скота моракселлы были чувствительны к гентамицину, тетрациклину, левомицетину [14].

О широком спектре устойчивости Moraxella bovis к антибиотикам и сульфаниламидным препаратам сообщает [10].

Изучили чувствительность выделенных штаммов Escherichia coli и установили их высокую чувствительность к ципрофлоксацину [78].

Провели исследования чувствительности Escherichia coli к антибактериальным препаратам и установили, что соответственно 84,2% из 86 выделенных штаммов были чувствительны к ципрофлоксацину [25].

Провели изучение антибактериальной активности ципрофлоксацина к кишечной палочке и установили, что МПК препарата составляет 0.06 - 0.12 мкг/мл [1].

Похожие результаты, но в отношении стафилококков, были получены сообщивших, что МПК ципрофлоксацина для штаммов Staphylococcus aureus колебалась в диапазоне 0,12 -1 мкг/мл[37].

По данным минимальная подавляющая концентрация ципрофлоксацина для свежеизолированных Staphylococcus aureus была в пределах 0,5 – 1 мкг/мл [90].

Результаты исследований свидетельствуют, что Staphylococcus aureus был чувствителен к ванкомицину и устойчивым к широкому спектру антибиотиков (тетрациклину, гентамицину. хлорамфениколу, оксациллину) [33].

При определении чувствительности патогенных штаммов стафилококков к ряду антибактериальных препаратов получила данные, что Staphylococcus aureus оказался чувствительным к фторхинолам, рифампицину, анкомицину и проявлял резистентность к канамицину, фурагину, эритромицину, тетрациклину, оксацилину [23].

При изучении чувствительности сальмонелл, изолированных от животных, не выявили устойчивых штаммов к ципрофлоксацину [48]. Было установлено, что 10,5% выделенных штаммов были устойчивы к тетрациклину, 9,9% - к хлорамфениколу и 5,3% - к аминогликозидам.

Исследовали чувствительность к антибиотикам сальмонелл, выделенных от больного крупного рогатого скота [49]. Авторы установили, что выделенные бактерии были чувствительны к полимиксину, клафорану и резистентны к макролидам, пенициллинам, тетрациклинам.

Результаты исследований, проведенных, свидетельствуют о высокой чувствительности изолированных сальмонел к аминогликозидам, фторхинолам и их устойчивости к ампициллину, рифампицину, тетрациклину [111].

Определили чувствителность культур Moraxella bovis к антибиотикам. На основании исследований авторы установили, что испытуемые культуры проявили высокую чувствительность к тетрациклину, фторхинолам[83].

Изучил чувствительность выделенных культур Moraxella bovis к химиотерапевтическим препаратам и сообщает об их высокой чувствительности к прокаин-пенициллину, окситетрациклину, флорфениколу[65].

Представленные в этом разделе обзора литературы данные свидетельствуют о том, что в различных исследованиях и Moraxella bovis и представители сопутствующей микрофоры проявляли различные спектры чувствительности к антимикробным химиотерапевтическим препаратам. Понимая природу и механизмы развития устойчивсти у бактерий к антибактериальным средствам, очевидно, что:

- эти показатели вариабельны, требуют регулярных мониторинговых исследований;
- различия в спектрах устойчивости к антибактериальным средствам у Moraxella bovis и представителей сопутствующей микрофоры дают возможность подобрать соответствующие ингредиенты для конструирования селективной для Moraxella bovis плотной питательной среды.

5. Патогенные свойства культур Moraxella bovis

По мнению ряда исследователей, инфекционный кератоконьюнктивит развивается лишь в тех случаях, когда моракселлы воздействуют на животное с ослабленным иммунитетом или если они попадают на травмированные коньюнктиву или роговицу. Без этого болезнь не развивается, либо протекает в стертой форме в виде слабо выраженного коньюнктивита, не приводящего животного к слепоте. Такая точка зрения базируется, в том числе, и на следующих экспериментальных данных. сообщают, что при заражении путем инсталлирования больших доз культуры

Могахеlla bovis на слизистую оболочку глаза здоровым коровам развивался лишь слабовыраженный кератоконъюнктивит [92,84,142]. При введении возбудителя в сочетании с содержанием животных в зоне действия ультрафиолетовых лучей, развивалась тяжелая форма кератоконъюнктивита, который не отличался от спонтанных случаев заболевания. Авторы считают, что Moraxella bovis проявляет свои патогенные свойства в случаях понижения резистентности конъюнктивы и роговицы, а также снижения антибактериальных свойств секрета слезной железы. По сути это означает мнение данной группы исследователей о том, что Moraxella bovis является условно-патогенной бактерией.

Вместе с тем экспериментально воспроизвели инфекционный кератоконъюнктивит у телят введением в глаз только культуруы Moraxella bovis, без воздействия УФЛ [55]. Клинические признаки заболевания были аналогичны наблюдаемым в естественных условиях. Основной признак заболевания - слезотечение, блефароспазм, иридоспазм, конъюнктивит. Авторы наблюдали помутнение роговицы, образование язв, атрофию капилляров. Возбудитель был реизолирован из всех пораженных глаз.

Исследования последних лет доказывают ошибочность представления о Moraxella bovis как об условно-патогенном микроорганизме, поскольку установлено, что возбудитель имеет целый ряд факторов патогенности, благодаря которым и реализуется его болезнетворный потенциал.

К их числу относят фимбрии или пили, обеспечивающие адгезию моракселл к эпителию роговицы и конъюнктивы, и питтин – фактор, способствующий проникновению возбудителя в клетки роговицы.

Так, исследования, проведенные показали, что у Moraxella bovis имеется по крайней мере два фактора вирулентности: фимбрии, обеспечивающие адгезию бактерий к эпителию роговицы и конъюнктивы и питтин - фактор для пенетрации (проникновения) в клетки роговицы, где возбудитель вызывал кариоретис, приводя их к гибели [69,121,106,107]. Последний вызывает также депрессию клеток роговицы. Авторы установили, что

шероховатые колонии Moraxella bovis (R — форма) на кровяном агаре преимущественно содержат микробные клетки с фимбриями. Они считают, что образование фимбрий представляет одну из фаз развития бактериальной клетки. Авторы пришли к выводу, что бактерии гладких колоний возбудителя не содержат фимбрии (пили).

В общей сложности провели бактериологические и вирусологические исследования 807 материалов (мазков с конъюнктивы) 613 здоровых и 194 больных инфекционным кератоконъюнктивитом телят [57,63,66,116]. От больных телят были выделены культуры Moraxella bovis, которые в условиях эксперимента вызывали кератоконъюнктивит. При ультраструктурных исследованиях было установлено, что на мембране у моракселл имеются фимбрии, облегчающие прикрепление возбудителя к эпителию слизистой оболочки глаз. Авторы также изучали роль фимбрий в прикреплении клеток Moraxella bovis к клеткам роговицы глаза теленка. Установлено, что бактерии, не образующие пили, адгезивную способность в условиях эксперимента не проявляли. Авторы считают феномен пилеобразования ведущим фактором вирулентности и иммуногенности Moraxella bovis.

Изучили гемагглютинирующие и антигенные свойства моракселл, изолированных при кератоконъюнктивитах телят в хозяйствах Венгрии [90]. По их данным, Moraxella bovis обладает гемагглютинирующей активностью. Было установлено, что агглютинация эритроцитов цыплят ингибировалась 1%-ным раствораом маннозы или нагреванием суспензии бактерий при температуре 60°C в течение 30 минут. По их данным гемагглютинация у культур Moraxella bovis связана с наличием у бактериальных клеток фимбрий (пилей).

При определении вирулентности культур Moraxella bovis, выделенных из патологического материала от больного крупного рогатого скота установили, что к факторам патогенности Moraxella bovis следует отнести эндотоксин и фимбрии [51]. Авторы считают, что фимбрии способствуют

прикреплению моракселл к поверхности слизистой, колонизации и возникновению восполительного процесса.

Патогенный потенциал моракселл реализуется и посредством таких факторов инвазии возбудителя, как продуцируемые ими гемолизин и различные гидролазы, включая гиалуронидазу, фибринолизин, аминопептидазу и фосфотазу. Такой вывод, в частности содержится в работах [124,85,119]. Эти авторы пришли к выводу, что механизм инвазии Moraxella bovis не расшифрован, но патогенные штаммы продуцируют гемолизин и различные гидролазы, включая перечисленные выше. Наличие этих свойств, степень их выраженности и определяют патогенность и вирулентность конкретной популяции моракселл.

Испытана патогенность гемолитических и негемолитических культур Moraxella bovis [60]. Установлено, что гемолитические культуры возбудителя вызывают гибель более 88% белых мышей спустя 1-3 дня после подкожного заражения, а негемолитические штаммы вызывали гибель лишь 25% мышей. Гемолитические штаммы при введении в мошонку кролику вызывали восполительную реакцию и некроз ткани.

В ряде работ представлены данные о влиянии Moraxella bovis и фильтратов её культур на нейтрофилы крупного рогатого скота [132,91,100]. Цитотоксическое действие достигало наибольшего проявления через 30 минут после внесения в культуры нейтрофилов культур возбудителя. Семь испытанных гемолитических культур Moraxella bovis были цитотоксичными для нейтрофилов крупного рогатого скота, а 4 негемолитических изолята возбудителя цитотоксичностью по отношению к нейтрофилам крупного рогатого скота не обладали.

Изучали патогенность для молодняка крупного рогатого скота культур Moraxella bovis в фазе пилеобразования и без пилей [92,60]. При нанесении телятам на конъюнктиву глаза Moraxella bovis в фазе пилеобразования у зараженных животных развивался кератоконъюнктивит, при заражении телят культурой возбудителя без пилей заболевание сопровождалось слабыми

патологическими явлениями. Авторы установили, что гемолитические штаммы Moraxella bovis обнаруживаются при остром течении болезни, а негемолитические выделяются от животных с умеренными формами проявления болезни и при бессимптомном носительстве.

Воспроизвели заболевание у здоровых телят путем заражения патологическим материалом, взятым из глаз больных животных. Авторы пришли к выводу, что некоторые не заболевшие после заражения животные становятся носителями моракселл [62].

Проведенные рядом авторов исследования подтвердили выделение Moraxella bovis из глаз больных животных [57,80,116]. Изолированные штаммы Moraxella bovis обладали гемолитическими и адгезивными свойствами. У большинства из них было установлено наличие фимбрий. Определялась и роль фимбрий в прикреплении бактерий к клеткам роговицы глаза теленка. Было установлено, что Moraxella bovis не образующие пили, адгезивной активностью не обладали.

Пришли к выводу, что штаммы Moraxella bovis с фенотипом пилеобразования на агаре с кровью крупного рогатого скота формируют плоские шероховатые, углубленные в агар колонии, и по такому характерному росту их можно селекционировать [109,87,89]. Было установлено, что патогенные штаммы вызывают гемолиз эритроцитов крупного рогатого скота в кровяном агаре. Авторы установили, что фимбрии Moraxella bovis имеют диаметр 6 nm, а молекулярная масса белка пилей - от 17 до 19 kDa. Они так же показали, что имеющие пили штаммы обладают гемагглютинирующими свойствами и аутоагглютинационной активностью.

С помощью световой, сканирующей и трансмиссивной электронной микроскопии установили цитопатическое действие Moraxella bovis, вызываемое в культурах клеток нейтрофилов и роговицы глаза крупного рогатого скота [136,91,100]. Спустя 2 минуты после внесения возбудителя в нейтрофилах появилась вакуолизация, отек и исчезновение складок наружной цитоплазматической мембраны. В течение 10 минут большая часть

нейтрофилов лизировалась. Живые культуры возбудителя лизировали культуру эпителиальных клеток роговицы глаза крупного рогатого скота. В культурах эпителиальных клеток роговицы животных под действием Moraxella bovis развилась вакуолизация и отделение клеток друг от друга, а также образовывались углубления на поверхности клеток. Вышеуказанные данные являются доказательством патогенного действия бактерий на клетки крови и роговицы.

Провел исследования ПО экспериментальному воспроизведению инфекционного кератоконъюнктивита на телятах патогенными для белых мышей, продуцирующими гемолизин штаммами Moraxella bovis [23,25]. Наблюдаемые автором клинические признаки искусственно инфицированных были телят аналогичны таковым У естественно инфицируемых телят.

Провела экспериментальное воспроизведение инфекционного кератоконъюнктивита на телятах гемолитическими штаммами Moraxella bovis [4]. У зараженых телят развивались поражения конъюнктивы характерные для естественных случаев заболевания [помутнение роговицы, образование эрозий и язв, усиление гиперемии и разрастание сосудистой сети]. В сыворотке крови у зараженных телят были обнаружены специфические антитела в титрах 1:320 – 1:2560. Также были проведены лабораторных исследования ПО заражению животных выделенными моракселлами, обладающими гемолитическими свойствами. У зараженных белых мышей и морских свинок развивались поражения конъюнктивы, некроз ткани на месте инъекции, токсический шок, после чего следовала гибель животных. При внутриглазном введении аналогичного материала кроликам наблюдались конъюнктивит, гиперемия сосудов по окружности роговицы и полное помутнение последней, а введение культур возбудителя в мошоночный мешок вело к некрозу тканей.

Резюмируя обзор литературы, следует отметить, что инфекционный кератоконьюнктивит широко распространенная в нашей стране и за рубежем

болезнь крупного рогатого скота, наносящая отрасли существенный экономический ущерб.

Установлено, что Moraxella bovis является причиной заболевания крупного рогатого скота инфекционным кератоконьюнктивитом. В настоящее время это не вызывает сомнений, поскольку в многочисленных опытах разными исследователями была неоднократно воспроизведена триада Генле-Коха. Важнейшими факторами патогенности возбудителя являются фимбрии или пили, питтин, гемолизин и различные гидролазы. Тем не менее, уже на ранних стадиях болезни к основному возбудителю присоединяется разнообразная сопутствующая микрофлора, существенно отягощающая ее течение.

Поскольку инфекционный кератоконьюнктивит, вызываемый Moraxella bovis, следует дифференцировать от сходных по клиническому проявлению поражений глаз, которые ΜΟΓΥΤ развиваться при инвазионном, риккетсиозном кератоконьюнктивитах, поражениях глаз А-авитаминозного происхождения, кератоконъюнктивитах, которые регистрируются инфекционном ринотрахеите, парагриппе, пастереллезе, микоплазмозе крупного рогатого скота, решающее значение при комплексной диагностике болезни имеет бактериологическое исследование с целью обнаружения возбудителя и выделения его чистой культуры.

Эта задача осложняется упоминавшейся выше сопутствующей микрофлорой, а ее решение возможно путем использования селективных для Moraxella bovis питательных сред. В доступной нам литературе не удалось найти сведений о наличии и применении в зарубежной или отечественной лабораторной практике таких сред.

Таким образом, представляется актуальным разработать плотную селективную питательную среду, которая позволила бы увеличить частоту обнаружения Moraxella bovis в патологическом материале, сократить сроки бактериологической диагностики и повысить эффективность лечебно-

профилактических мероприятий. Именно это и явилось основной целью наших исследований.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Материалы и методы исследований

Научные исследования проводили в период с 2008 по 2011 год на базе Федерального Государственного бюджетного научного учреждения Всероссийского научно – исследовательского института экспериментальной Я.Р.Коваленко, Белгородской Государственной ветеринарии имени сельскохозяйственной академии имени В. Я. Горина и в животноводческих хозяйствах Белгородской (ООО «Источник», «Агро-Белагорье»), Курской («Авангард»), Тамбовской (СХПК «Борец», ФГУ ППЗ «Пригородный»), Брянской (ООО ЖК «Немерь»), Московской (ООО совхоз им. «Кирова») областей

За период исследований в указанных неблагополучных по инфекционному кератоконъюнктивиту хозяйствах провели клинический осмотр 1297 голов крупного рогатого скота. От животных с клиническими признаками инфекционного кератоконьюнктивита в общей сложности было отобрано и происследовано 703 пробы патологического материала (серозно – слизистые, серозно – гнойные истечения из глаз).

В опытах по изучению патогенности Moraxella bovis, выделенных на вновь разработанной селективной питательной среде использовали 72 клинически здоровых теленка и 104 головы белых беспородных мышей живой массой 14-16 г.

Диагноз на инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота ставили на основании анализа эпизоотических данных, клинических признаков болезни, с обязательным учетом результатов бактериологического исследования.

При проведении эпизоотологического анализа учитывали возраст заболевших животных, стационарность, массовость поражения, а также были

использованы статистические материалы районных станций по борьбе с болезнями животных и управлений ветеринарии Белгородской, Курской, Тамбовской, Брянской, Московской областей.

При клиническом исследовании крупного рогатого скота на инфекционный кератоконъюнктивит обращали внимание на их общее состояние, наличие (отсутствие) слезотечения, светобоязни, гиперемии сосудов конъюнктивы, блефароспазма, иридоспазма, серозно – слизистых или серозно – гнойных истечений из глаз, помутнения и (или) изъязвления роговицы. При наличии перечисленных выше признаков поражения глаз от животных отбирали материал для лабораторных (бактериологических) исследований.

Пробы патологического материала от животных с клиническими признаками кератоконьюктивита брали с поверхности третьего века пораженного глаза стерильными ватными тампонами, которые сразу помещали в пробирку с простым МПА, помещали в термос со льдом и доставляли в лабораторию для дальнейшего исследования.

Лабораторные исследования проводили «Методическим согласно лабораторной инфекционного рекомендациям ПО диагностике кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого Moraxella bovis», Бюро Отделения утвержденным ветеринарной медицины Россельхозакадемии [2005].

С этой целью из каждой пробы патологического материала готовили мазки, окрашивали по Граму и просматривали под микроскопом с иммерсионной системой, отмечая наличие или отсутствие в них морфологически схожих с Moraxella bovis микроорганизмов. Затем делали высев материалов на кровяной (с 10% дефибринированной крови крупного рогатого скота) агар Хоттингера с аминным азотом 220-230 мг%. Результаты посевов учитывали через 24-48 часов инкубирования при 37°С, пересевая типичные для моракселл и другие типы колоний на свежие питательные

среды для выделения чистых культур и идентификации высеваемых микроорганизмов.

Культуральные, морфологические, тинкториальные свойства микроорганизмов изучали общепринятыми в микробиологии методами. Подвижность определяли в препаратах «раздавленная капля».

Изучение ферментативных свойств.

Для определения утилизации ацетата предварительно ГОТОВИЛИ минеральную среду с ацетатом и солями аммония. Для этого в 1 литре дистиллированной воды растворяли 0.2 г. MgSO₄ *7 H₂O, 5. NH₄H₂PO₄, 1 г К₂HPO₄, 0,75 г натрия ацетата, добавляли 16 г промышленного агар – агара, нагревали смесь до его расплавления, фильтровали в горячем состоянии через слой ваты, охлаждали до 60°C, устанавливали рН 6,5. Среду разливали в пробирки по 5 – 6 мл, стерилизовали автоклавированием и перед употреблением скашивали. Посевы на среду с ацетатом и солями аммония проводили бактериологической петлей. Культивировали в течение 24 – 48 часов при температуре 42°C после чего просматривали посевы на наличие роста.

Для изучения способности восстанавливать нитраты до нитритов, агаровую культуру Moraxella bovis засевали в бульон Хоттингера с 5% сыворотки крови крупного рогатого скота и 1% калия нитрата. Спустя 24 часа инкубации при температуре 37°С в пробирки вносили по 0,3 – 0,5 мл 0,5% - ных растворов крахмала и калия йодистого. После перемешивания добавляли одну каплю 5% - ного раствора серной кислоты и снова взбалтывали. При наличии нитрата калия бульон окрашивался в темно – синий цвет, а при отсутствии нитрата цвет не менялся или становился голубоватым. Для контроля использовали три пробирки с нитратным бульоном Хоттингера испытуемой серии, которые до постановки опыта проверяли той же пробой. Среда не изменяла цвет.

Протеолитическую активность определяли двумя методами:

- первый - по разжижению желатина. С этой целью готовили 0,5% - ный желатин, среду стерилизовали и перед посевом добавляли 5% сыворотки крови крупного рогатого скота. Посев в столбик желатина делали глубоким уколом. Посевы инкубировали при комнатной температуре (20°C - 22°C) и ежедневно в течение семи суток учитывали результат. Если испытуемый микроб не разжижает желатину, то среда сохраняет плотную консистенцию как в контроле без посевов, а при наличии желатиназы среда разжижается;

- второй — следующим методом. Смывали свежевыросшую культуру Moraxella bovis с 5% - ного сывороточного агара Хоттингера физиологическим раствором. Затем в пробирку с круглым кусочком фотопленки (засвеченная, проявленная) добавляли 0,5 мл смыва культуры. При наличии желатиназы у микроба фотопленка становится светлой и на дне пробирки образуется черный осадок. При отсутствии желатиназы цвет фотопленки не изменяется.

Тест с лакмусовым молоком проводили в обезжиренном молоке с лакмусовой настойкой. Для приготовления лакмусовой настойки брали 5 г сухого лакмуса, растирали в ступке в порошок, переносили в колбу емкостью 100 мл и заливали 50 мл этилового спирта, который ежедневно меняли. На четвертые сутки спирт сливали, лакмус высушивали в термостате, помещали в колбу, растворяли в 50 мл дистиллированной воды при подогревании и фильтровали через бумагу. Затем готовили лакмусовую среду с молоком. К обезжиренному молоку добавляли 5 – 10% лакмусовой настойки и такое же количество 10% - ного раствора натрия двууглекислого. Приготовленную среду разливали в пробирки и автоклавировали текучем паром по 30 минут в течение трех дней или при 0,5 ати 30 минут. Лакмусовое молоко засевали петлей испытуемыми бактериями.

Для определения способности сворачивать лакмусовое молоко посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 48 – 72 часов, а для целей определения способности пептонизировать сгусток - семь суток при комнатной температуре (20-22°C), после чего учитывали результаты.

Ферментацию углеводов изучали путем высева по 2 – 3 капли бульонной культуры Moraxella bovis в пробирки с 5% - ным сывороточным бульоном Хоттингера и 0,5% углеводов: арабинозой, глюкозой, мальтозой, рамнозой, маннитом, сахарозой, раффинозой, галактозой, сорбитом и дульцитом. Посевы инкубировали при температуре 37°С в течение 24 часов.

Тест на каталазную активность осуществляли путем нанесения пипеткой 0,1 - 0,3 мл свежеприготовленной 3% - ной перекиси водорода на колонии, выросшие на кровяном агаре Хоттингера в течение суток. Образование пены расценивали как положительный тест на каталазную активность.

Для определения способности образовывать индол под пробку засеянной пробирки с сывороточным бульоном Хоттингера помещали фильтровальную бумагу, пропитанную насыщенным водным раствором щавелевой кислоты. Фильтровальную бумагу располагали от поверхности среды на 1,0 - 1,5 см. При наличии индола спустя 24 часа культивирования при температуре 37°С нижний конец бумажки на 0,3 – 0,5 см окрашивается в синий или в сиреневый цвет, при его отсутствии - цвет не изменяется.

Гемолитическую активность и психрофильные свойства Moraxella bovis изучали посевом на кровяной агар Хоттингера. Для его приготовления к 100 мл расплавленного и охлажденного до 45°C агара Хоттингера с рН 7,2 – 7,4 добавляли 5-10 мл стерильной дефибринированной крови крупного рогатого скота, осторожно перемешивали и разливали в чашки Петри. Часть посевов инкубировали при температуре 37°C, а часть при температуре 6°C в течение 24-48 часов.

Для определения способности испытуемых бактерий расти при 6%-ной концентрации натрия хлорида высевали их на кровяной агар Хоттингера с 6% натрия хлорида. Инкубировали посевы в течение 24 – 48 часов при температуре 37°C.

Для определения способности Moraxella bovis расти на агаре Мак-Конки, предварительно готовили данную среду. Для этого в 1 литре дистиллированной воды растворяли 20 г пептона, 5 г NaCl, 2,5 г натрия таурохолата, 10 г лактозы, 0,1 г нейтрального красного, добавляли 20 г агарагара, нагревали полученную смесь до расплавления агар-агара, фильтровали, устанавливали рН 7,2-7,4 и стерилизовали при 0,5 атм. Засев агара Мак-Конки проводили бактериологической петлей. Инкубировали посевы в течение 24-48 часов при температуре 37°C.

Для изучения роста культур Moraxella bovis на желчно-солевом агаре предварительно готовили эту среду. К 3%-му сывороточному агару Хоттингера добавляли 0,5% натрия хлорида, 0,5% натрия таурохолата, 10% желчи и стерилизовали. Посевы на агар проводили бактериологической петлей. Инкубировали их в течение 24-48 часов при температуре 37°C.

Основные биологические свойства Moraxella bovis и сопутствующей микрофлоры [Escherichia coli, Salmonella dublin, Staphylococcus aureus Aspergillus Нигер] изучали при проведении бактериологических исследований патологического материала и идентификации высеваемых при этом микроорганизмов, а также при сравнении свойств изолятов моракселл, полученных на разных питательных средах. В этих экспериментах было использовано чистых культур: моракселл - 409 (включая 23 ранее изолированных в неблагополучных по инфекциооному кератоконьюнктивиту хозяйствах и хранившихся в лабораторных условиях, в камере бытового холодильника при температуре $+4C - +6^{\circ}C$ штамма); стафилококков – 358; эшерихий — 223; сальмонелл — 199, Aspergillus Нигер — 3.

Определение чувствительности Moraxella bovis, Escherichia coli, Salmonella dublin, Staphylococcus aureus, Aspergillus Нигер к 43-м антибактериальным химиотерапевтическим препаратам и их сочетаниям согласно «Методическим указаниям ПО определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных» [Утверждены Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР, 1971]. С этой целью готовили основные растворы стандартов того или иного антибактериального химиотерапевтического препарата на фосфатных буферных растворах. В боксе на торсионных весах в стерильных бюксах взвешивали 20-25 мг стандарта того или иного антибактериального химиотерапевтического препарата и разводили для получения их основных растворов стерильным фосфатным буфером в соответствии с инструкциями (например, пенициллин активностью 600 ЕД/мг, ампициллин - 846 мкг/мл на буфере с рН 6,8 – 7,2; стрептомицин – 760 ЕД/мг на буфере с рН – 6,0 – 6,2 и т.д.). Основные растворы хранили в стеклянной посуде с притертой пробкой при температуре 2 – 8°С в течение сроков, указанных в инструкции для каждого препарата. Рабочие растворы препаратов готовили из основного непосредственно перед опытом путем серийных двукратных разведений в сывороточном бульоне Хоттингера с рН 7,2-7,4.

Для постановки опыта брали 10 пробирок с сывороточным бульоном Хоттингера в объеме 2 мл. В первую пробирку добавляли 2 мл точно оттитрованного рабочего раствора антибиотика и содержимое её тщательно перемешивали. Затем из первой пробирки 2 мл среды с испытуемым препаратом переносили во вторую, из второй – в третью и так до 9 – й пробирки, из которой после перемешивания 2 мл среды удаляли. Десятая пробирка служила контролем. В пробирки с питательной средой, содержащей различные концентрации препаратов, вносили по 0,2 мл суточной бульонной культуры Moraxella bovis, что соответствовало по бактериальному стандарту 100 тысячам микробных клеток на 1 мл среды и содержимое пробирок тщательно перемешивали. Учет результатов проводили через двое суток инкубирования при температуре 37°C. Аналогичным образом засевали и инкубировали другие испытуемые виды бактерий.

Учитывали пробирку, в которой отсутствует рост микроорганизмов, и концентрацию антибиотика в ней складывали с концентрацией препарата в последующей пробирке, где отмечен рост культуры. Выводили среднее арифметическое число (концентрацию), показывающее чувствительность микроорганизма к испытуемому антибактериальному препарату.

Для изучения чувствительности к антибактериальным химиотерапевтическим средствам отбирали по 3 штамма моракселл, выделенных в каждом из обследовавшихся хозяйств, плюс 3 ранее выделенных штамма (всего 24 штамма), по 11 штаммов стафилококков, эшерихий и сальмонелл, а также 3 штамма Aspergillus Нигер выделенных в обследовавшихся хозяйствах.

Данные этой серии опытов служили основой для конструирования селективной для Moraxella bovis плотной питательной среды.

Базовым компонентом плотной селективной среды служил перевар Хоттингера с амминным азотом 220-230 мг%. Также, в качестве основы вышеуказанной питательной среды испытали мясо – пептонный агар, сухой питательный агар из гидролизата кильки и триптиказо-соевый агар. Было изучено влияние рост моракселл плотной на на среде дифосфопиридиннуклеотида, гемина, аутолизата пекарских дрожжей, сыворотки крови крупного рогатого скота.

Эффективность вновь разработанной плотной селективной питательной среды определили путем параллельных высевов патологического материала (серозно – слизистые, серозно – гнойные истечения из глаз) на эту среду и на кровяной агар Хоттингера. Посевы культивировали в термостате при температуре 37°C - 38°C в течение 24 – 48 часов, после чего учитывали результаты посевов.

У выделенных культур изучали тинкториальные, морфологические и биохимические свойства с целью их видовой идентификации как это было описано выше. При этом указанные свойства Moraxella bovis, выделенных на селективной питательной среде, определяли в сравнении с таковыми у ранее изолированных с использованием кровяного агара Хоттингера штамов.

Кроме того, провели сравнительное изучение биохимических свойств выделенных на селективной питательной среде Moraxella bovis со свойствами других представителей данного рода: Moraxella lacunata, Moraxella nonligutnfaciens, Moraxella phenylpuruvica, Moraxella osloen.

Для изучения патогенности изолированных от больных животных Moraxella bovis использовали штаммы, обладающие гемолитическисми свойствами.

Патогенность больного инфекционным выделенных ОТ кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота моракселл определяли в опытах на 104 белых беспородных мышах, живой массой 14 – 16 г. Были сформированы 8 групп по 13 голов в каждой, которые содержались в одном помещении. Для заражения использовали 4 выделенных нами в различных хозяйствах Белгородской, Курской и Тамбовской областей штаммов Moraxella bovis. Культуры возбудителя выращивали на кровяном агаре Хоттингера с дрожжевым экстрактом при температуре 37°C в течение 24 часов. Затем выросшие культуры с поверхности агара смывали стерильным физиологическим раствором и по оптическому стандарту мутности готовили суспензию концентрацией 5 млрд. микробных клеток в 1 см³. Мышам опытных групп (52 головы) ввели по 0,5 см³ суспензии культуры моракселл подкожно. Контрольных мышей (52 головы) не заражали. После заражения за опытными и контрольными животными вели наблюдение, отмечая их общее состояние и учитывая число павших в каждой из групп.

 \mathbf{C} целью заражения хозяйствах, благополучных телят В ПО инфекционному кератоконъюнктивиту, было отобрано 72 теленка 2-3месячного возраста. Перед заражением телят в течение 14 дней выдерживали в карантине, вели за ними клинические наблюдения, отмечая наличие или отсутствие признаков, характерных инфекционного ДЛЯ кератоконьюнктивита, проводили микроскопию мазков, бактериологические исследования содержимого конъюнктивальных мешков и серологические исследования сыворотки крови. Все отобранные для опыта животные в период карантина оставались клинически здоровыми, возбудитель инфекционного кератоконьюнкитита от них не выделен. В реакции непрямой гемагглютинации антитела к Moraxella bovis в сыворотке крови телят не были обнаружены.

Для заражения Moraxella bovis выращивали на кровяном агаре Хоттингера при температуре 37°C в течение 24 часов. Затем выросшую культуру с поверхности агара смывали стерильным физиологическим раствором и по оптическому стандарту мутности готовили суспензию бакрий концентрацией 10 млрд микробных клеток в 1 см³. Телятам опытных групп (4 группы по 9 голов в каждой) вводили по 0,5 см³ суспензии моракселл в нижний конъюнктивальный мешок левого глаза. Контрольных телят (36 голов) не заражали. За животными наблюдали в течение 30 дней, отмечая их общее состояние, наличие признаков кератоконьюнктивита, время их появления.

Среднюю арифметическую (М) и стандартную ошибку (m) определяли по методикам, описанным И.П. Ашмариным и И.А. Ворбьёвым [1962]. Достоверность разницы двух сравниваемых показателей определяли по таблице Стьюдента. Статистическую обработку и анализ проводили с использованием программы Excel для Windows. Значение критерия достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала. Вероятность различий считалась существенной при P < 0.05.

2. Результаты собственных исследований

2.1.Изоляция из патологического материала культур Moraxella bovis и сопутствующей микрофлоры на кровяном агаре Хоттингера

Для постановки диагноза на инфекционный кератоконъюнктивит в хозяйствах Белгородской (ООО «Источник», «Агро-Белагорье»), Курской («Авангард»), Тамбовской (СХПК «Борец», ФГУ ППЗ «Пригородный»), Брянской (ООО ЖК «Немерь»), Московской (ООО совхоз им. «Кирова») областей, проводили отбор патологического материала от крупного рогатого скота с клиническими признаками кератоконъюнктивита, который брали путем погружения стерильных ватных тампонов в серозно — слизистый или

серозно — гнойный экссудат под третьим веком пораженных глаз и сразу помещали в пробирку с бульоном и в термосе со льдом доставляли в лабораторию, где из проб делали высевы на кровяной агар Хоттингера. Посевы инкубировали при 37°C в течение 24-48 часов, после чего учитывали результаты.

Прежде всего, обращали внимание на наличие на кровяном агаре Хоттингенра плоских, круглых, вдавленных в среду, серо – белого цвета, диаметром 1-3 мм колоний, имеющих рыхлую консистенцию и окруженных в большинстве случаев узкой (0,5-1,0 мм) зоной полного гемолиза (бетагемолиза). Такие колонии характерны для Moraxella bovis, поэтому из 2-3 таких колоний делали мазки, которые окрашивали по Грамму и микроскопировали.

При наличии в мазках грамотрицательных, полиморфных, коротких вплоть до кокков, толстых с закругленными краями бактерий, распологающихся одиночно, парами или в виде коротких цеопочек из указанных колоний делали посевы на сывороточный бульон Хоттингера.

После 24-28 часов культивирования изучали рост на данном бульоне, окрашивали по Грамму и микроскопировали. Отнесенные в дальнейшем к виду Moraxella bovis бактерии на указанной среде росли в виде помутнения среды (от незначительного до интенсивного) с образованием осадка серобелого цвета, который при встряхивании разбивался, образуя равномерную мелкозернистую суспензию. Морфология клеток в мазках, окрашенных по Граму, была аналогична таковой в мазках, приготовленных из колоний с кровяного агара Хоттингера.

К виду Moraxella bovis относили бактерии, с описанными выше морфологическими и тинкториальными свойствами и при условии, что они не обладали подвижностью, не росли на простом агаре и бульоне, на средах с 6% натрия хлорида, Мак — Конки, с желчными солями и при температуре 6°С, не утилизировали натрия ацетат, не восстанавливали нитраты до нитритов, не ферментировали углеводы, не образовывали индол, разжижали

желатин, обладали каталазной активностью, вызывали характерные для возбудителя изменения в лакмусовом молоке: в условиях аэробиоза вызывали защелачивание, а в условиях анаэробиоза — пептонизацию и закисление молока. В результате такой избирательности поведения бактерий верхний слой лакмусового молока высотой до 0,5 — 1 см окрашивался в темно-синий цвет, средний слой - в светло-синий, а нижний слой - в белый с крупинками пептонизированного молока.

При проведении бактериологических исследований из патологического материала, кроме Moraxella bovis, выделяли и сопутствующую микрофлору (Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella dublin, Aspergillus Нигер).

К виду Escherichia coli относили микроорганизмы, давшие на кровяном агаре Хоттингра рост в виде сочных, блестящих, выпуклых, гладких, с ровными краями колоний круглой формы, а на агаре Эндо - в виде сочных, блестящих, выпуклых, гладких, с ровными краями колоний круглой формы, окрашенных в красный или малиновый цвет (т.е. были лактозопозитивны). В сывороточном бульоне Хоттигнера и в простом МПБ посевной материал из таких колоний давал рост в виде интенсивного помутнения среды и образования осадка. В мазках, приготовленных из колоний на агаризованных средах и из жидких культур и окрашенных по Граму, выявляли мелкие (1,0- $3,0\times0,5-0,8$ бактерии мкм), грамотрицательные палочковидные закругленными концами, без спор и капсул, располагавшиеся в поле зрения одиночно. Бактерии с перечисленными свойствами хорошо росли на простых питательных средах и обладали следующими ферментативными свойствами: не утилизировали цитраты, не разжижали желатину, не расщепляли мочевину, не образовали сероводород, образовывали индол, ферментировали лактозу и манит.

Для отнесения выросших на кровяном агаре Хоттигнера бактерий к Staphylococcus aureus служили следующие критерии. Как правило, рост стафилококков на этой среде отмечали через 24 часа. При этом наблюдали круглые, слегка возвышающиеся над поверхностью агара колонии с ровными

краями диаметром 2-5 мм, окрашенные в желтый или золотистый цвет и имевшие зону гемолиза. В мазках, приготовленных из таких колоний и окрашенных по Граму, наблюдались грамположительные кокки, которые располагались одиночно, парами, но чаще - в виде отдельных скоплений неправильной формы, напоминающих гроздь винограда. Стафилококки были неподвижны, не образовывали спор и капсул. Жгутиков не имели, были неподвижны.

На сывороточном бульоне Хоттигера культуры Staphylococcus aureus вначале вызывали диффузное помутнение с последующим выпадением рыхлого хлопьевидного осадка. Необходимо отметить, что выделенные обычных стафилококки хорошо росли на питательных средах (мясопептонный агар - МПА, мясопептонный бульон – МПБ). Они ферментировали с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, фруктозу, сахарозу, ксилозу, глицерин, маннит и не разлагали дульцит, салицин, инулин, раффинозу. Выделяли аммиак и сероводород, образовывали индол, восстанавливали нитраты в нитриты; продуцировали каталазу, фосфатазу, уреазу. Свертывали и пептонизировали молоко, разжижали желатин, иногда свернутую сыворотку крови.

Рост в столбике желатина был достаточно характерным. Через 24-26 часов наряду с обильным ростом по уколу намечалось начальное разжижение среды, которое затем увеличивалось, и к 4-5-му дню по ходу укола образовывалась воронка с жидким содержимым.

Бактерии, отнесенные нами в последующем к сальмонеллам на кровяном агаре Хоттингера росли в виде серовато-белых с голубоватым оттенком колоний, были гладкими, блестящими, имели куполообразный профиль, ровные края. На среде Эндо образовывали прозрачные, слегка розоватые нежные колонии (т.е. не ферментировали лактозу или были лактозонегативны), иногда с голубоватым оттенком.

В сывороточном бульоне Хоттингера сальмонеллы вызывали интенсивное помутнение среды с образованием осадка на дне пробирки.

Морфологические свойства были типичными для рода Salmonella. Бактерии в мазках, окрашенных по Граму, были представлены грамотрицательными палочками, длинной 1,0-4,0 мкм, шириной 0,5мкм, не образовывали спор и капсул. Обладали подвижностью, хорошо росли на обычных питательных средах (мясопептонный агар - МПА, мясопептонный бульон — МПБ). Характеризовались следующими ферментативными свойствами: не ферментировали сахарозу, не разлогали индол, не расщепляли салицин, не разлагали лактозу, не расшепляли мочевину, давали положительную реакцию с метиловым красным, глюкозу ферментировали с образованием газа, ферментировали манит.

Серологическую идентификацию культур сальмонелл проводили в РА на стекле при помощи сывороток сальмонеллёзных О-комплексных и монорецепторных О- и Н- агглютинирующих (ФГУП «Курская биофабрика – фирма «Биок»). Все выделенные сальмонеллы были отнесены нами к сероварианту Salmonella dublin.

Грибы рода Aspergillus Нигер выделили из патологического материала Сабуро. характеризуется агаре Культура гриба на следующими биохимическими свойствами: усваивает глюкозу, сахарозу, фруктозу, мальтозу, в меньшей степени манит, галактозу, сорбит, усваивает азот органических соединений (белок, пептон, аминокислоты, дрожжевой автолизат, нитраты). Результаты проведенных исследований, представлены в таблице 1.

Как видно из представленных в таблице 1 данных, из патологического материала, полученного от крупного рогатого скота с клиническими признаками инфекционного кератоконьюнктивита, с использованием кровяного агара Хоттингера возбудитель удалось выделить в 23 случаях из 120 исследованных материалов. Средняя частота обнаружения Moraxella bovis, таким образом, составила 19,2%, а в различных хозяйствах этот показатель варьировал в пределах от 16,7% до 22,2%.

Таблица 1
Результаты бактериологических исследований
патологического материала от телят с клиническими
признаками инфекционного кератоконьюнктивита

	T.C.	Виды и количество выделенных микроорганизмов										
Наименование хозяйств	Кол-во исследован-	M.bovis		Staph. aureus		E.coli		S.dublin		Aspergillus H.		
ХОЗИИСТЬ	образцов	все- го	%	все-	%	все-	%	все-	%	все- го	%	
«Источник»	15	3	20,0	6	40,0	3	20,0	3	20,0	1	6,6	
«Агро-Белагорье»	21	4	19,1	10	47,6	5	23,8	2	9,5	1	4,7	
«Авангард»	17	3	17,7	5	29,4	4	23,5	5	29,4	-	-	
«Борец»	18	3	16,7	8	44,4	5	27,8	2	11,1	1	5,5	
«Пригородный»	16	3	18,8	8	50,0	3	18,8	2	12,5	-	-	
«Немерь»	15	3	20,0	5	33,3	4	26,7	3	20,0	-	-	
«Кирова»	18	4	22,2	5	27,8	3	16,7	6	33,3	-	-	
ИТОГО	120	23	19,2	47	39,1	27	22,5	23	19,2	3	2,4	

В 47 материалах выявлены Staphylococcus aureus. Средняя частота обнаружения составила 39,1% и варьировала в пределах от 27,8% до 50%. Escherichia coli выделили из 27 проб патологического материала или в среднем в 22,5% случаев при колебании показателя в пределах от 16,7% до 27,8%. В 23 образцах исследуемого материала нами были обнаружены сальмонеллы, отнесенные к серовару Salmonella dublin. Средняя частота обнаружения — 19,2%, колебание показателя в пределах от 9,5% до 33,3%. Aspergillus Нигер выделили на среде Сабуро в 3-х случаях из 120 проб патологического материала (в трех обследуемых хозяйствах из семи, по одному случаю обнаружения в каждом из хозяйств). Средняя частота обнаружения Aspergillus Нигер составила 2,4% при колебании показателя от 0 до 6,6%.

Таким образом, бактериологических при использовании ДЛЯ исследований c целью инфекционный постановки диагноза на вызываемый Moraxella bovis, кровяного кератоконьюнктивит, Хоттингера возбудитель нам удалось обнаружить и выделить его чистую культуру только в 16,7-22,2 % случаев. Питательная среда вполне обеспечивает ростовые потребности данного вида моракселл, a незначительный процент обнаружения возбудителя связан с тем, что патологический материал контаминирован посторонней микрофлорой, имеющей менее значительные ростовые потребности, которая растет и размножается более интенсивно и способна подавлять рост и размножение Moraxella bovis.

Для целей конструирования плотной селективной для Moraxella bovis питательной среды в дальнейших экспериментах изучили чувствительность к антимикробным химиотерапевтическим препаратам возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита и представителей сопутствующей мирофлоры, которые выявлялись в наших исследованиях.

2.2. Определение чувствительности культур Moraxella bovis и сопутствующей микрофлоры к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам

Исследования по определению чувствительности Moraxella bovis, Escherichia coli, Salmonella dublin, Staphylococcus aureus, Aspergillus Нигер к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам проводили методом серийных разведений на сывороточном бульоне Хоттингера.

Определение чувствительности выше перечисленных видов (сероварианта сальмонелл) является необходимым условием для реализации задачи по конструированию плотной селективной для Moraxella bovis питательной среды. Необходимо отметить, ИЗ что одним основных компонентов плотной селективной питательной среды, являются антибактериальные химиотерапевтические препараты, которые должны отличаться специфичностью действия В отношении изучаемых микроорганизмов. Это необходимо для того, чтобы выбрать наиболее эффективные препараты, которые бы избирательно подавляли на среде рост посторонней микрофлоры и в тоже время не угнетали развитие моракселл на этой питательной среде.

Для определения чувствительности К антибактериальным химиотерапевтическим препаратам использовали 21 культуру моракселл, которые были выделенны из серозно - слизистого и серозно - гнойного истечений пораженных рогатого больного глаз крупного скота, инфекционным кератоконъюнктивитом, в хозяйствах Белгородской)ООО «Источник», «Агро-Белагорье»), Курской («Авангард»), Тамбовской (СХПК «Борец», ФГУ ППЗ «Пригородный»), Брянской (ООО ЖК «Немерь»), Московской (ООО совхоз им. «Кирова») областей и 3 музейные культуры возбудителя.

Все они по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам были отнесены к виду Moraxella bovis, как это описано в предыдущем разделе нашей диссертационной работы.

Результаты определения чувствительности культур Moraxella bovis к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам представлены в таблице 2.

Анализ данных исследований, приведенных в таблице 2, свидетельствует о том, что Moraxella bovis проявили высокую чувствительность к

Таблица 2 Чувствительность Moraxella bovis (n=24] к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам (МПК, мкг/мл)

No No	Наименование антибактериальных	Разброс	Среднее		
	1	величин	значение		
п/п	химиотерапевтических препаратов	МПК, мкг/мл	МПК, М±т		
1	Моксифлоксацин	0,01-0,04	0,0125±0,0057		
2	Офлаксоцин	0,04 - 0,08	$0,06\pm0,003$		
3	Норфлоксацин	0,10-0,40	0,16±0,037		
4	Левофлоксацин	0,10-0,80	$0,30\pm0,060$		
5	Линкомицин	0,10-0,40	0,160±0,037		
6	Пенициллин	0,25-0,50	0,375±0,002		
7	Гентамицин	0,25 - 1,00	0,416±0,087		

8	Амоксициклин	0,35 - 1,40	0,583±0,121
9	Бициллин	0,55-1,10	0,82±0,089
10	Ампициллин	0,51-2,04	1,275±0,018
11	Цефотаксим	0,50 - 2,00	0,833±0,173
12	Стрептомицин	0,55-1,10	0,82±0,089
13	Аугментин	0,70 - 2,80	1,166±0,243
14	Центриаксон	1,20 – 4,80	2,00±0,417
15	Номицин	1,90 – 7,60	3,16±0,660
16	Рифампицин	1,50 - 6,00	2,50±0,521
17	Банеоцин	2,25-4,50	3,30±0,031
18	Тетрациклин	3,20 - 6,40	4,80±0,083
19	Грамицидин	3,60-7,20	3,60±0,750
20	Азитромицин	3,70 – 14,40	9,05±0,531
21	Кларитромицин	3,70 – 7,40	3,70±0,771
22	Ванкомицин	3,90 - 7,80	3,90±0,813
23	Фузидин	3,90 - 15,60	6,50±1,355
24	Оксацилин	4,50 – 9,00	4,50-1,876
25	Абактал	4,50 – 18,00	7.50±1,563
26	Оксамп-натрий	4,50 – 36,00	13,50±2,814
27	Рокситромицин	5,80 – 11,60	5,80±1,167
28	Фармазин	5,80 - 23,20	9,60±2,043
29	Спиромицин	7,20 - 28,80	12,0±2,668
30	Доксициклин	9,25 - 18,50	13,80±0,031
31	Спиктиномицин	75,00 – 90,00	80,25±1,042
32	Сульфадемизин	> 100,00	-
33	Сульфадиметоксин	> 100,00	-
34	Фталазол	> 100,00	-
35	Нистатин	> 100,00	-
36	Резорцин	> 100,00	-
37	Биопаг	> 100,00	-
38	Спиктиномицин+Резорцин	37,60 –75,20	56,40±5,54
39	Пенициллин+Стрептомицин+ Тетрациклин	3,70 – 29,60	11,0±2,314
40	Пенициллин+Стрептомицин	7,50 – 30,00	12,50±2,606
41	Стрептомицин+тетрациклин	7,50 - 30,00	12,50±2,606
42	Пенициллин+Тетрациклин	7,50 – 60,00	37,75±1,668
43	Неомицин+Полимиксин+Нистатин	9,40 - 37,60	15,60±3,294

моксифлоксацину (МПК 0,01 - 0,04 мкг/мл, М \pm m -0,0125 \pm 0,0057), офлаксоцину (0,04 - 0,08 мкг/мл, М \pm m - 0,06 \pm 0,003) норфлоксацину (0,10 - 0,40 мкг/мл, М \pm m - 0,16 \pm 0,037), левофлоксацину (0,10 - 0,80 мкг/мл, М \pm m -

 0.30 ± 0.060), линкомицину (0.10 - 0.40 мкг/мл, $M\pm m - 0.160\pm0.037$), пенициллину $(0.25 - 0.50 \text{ мкг/мл}, \text{ M}\pm\text{m} - 0.375\pm0.0020)$, гентамицину $(0.25 - 0.50 \text{ мкг/мл}, \text{ M}\pm\text{m} - 0.375\pm0.0020)$ 1,00 мкг/мл, $M\pm m$ -0,416 $\pm 0,087$), бициллину (0,55 - 1,10 мкг/мл, $M\pm m$ возбудитель 0.82 ± 0.089). При этом, оказался резистентным К спиктиномицину (МПК-75,00-90,00 мкг/мл, $M\pm m$ – 80.25 ± 1.042), сульфадимизину, фталазолу, нистатину, резорцину, сульфадиметоксину (МПК более 100,00 мкг/мл).

Из изученных комбинаций антимикробных химиотерапевтических препаратов рост моракселл в наименьшей степени подавлялся спиктиномицином в сочетании с резорцином (МПК- 37,60-75,20 мкг/мл, $M\pm m-56,40\pm 5,54$).

Полученные данные использовали для выбора антибактериальных химиотерапевтических препаратов при изучении чувствительности к ним сопутствующей микрофлоры.

В следующей серии опытов определяли чувтвительность к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам сопутствующей микрофлоры [Escherichia coli, Salmonella dublin, Staphylococcus aureus, Aspergillus Hurep].

С этой целью использовали по 11 культур каждого из испытуемых микроорганизмов, которые были выделены из патологического материала, (серозно - слизистое, серозно - гнойное истечения из пораженных глаз) больного инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скота в хозяйствах Белгородской (ООО «Источник», «Агро-Белагорье»), Курской («Авангард»), Тамбовской (СХПК «Борец», ФГУ ППЗ «Пригородный»), Брянской (ООО ЖК «Немерь»), Московской (ООО совхоз им. «Кирова») областей (за исключением Aspergillus Нигер. В опытах использовали 3 культуры данного микроорганизма).

Изучали их чувствительность к спиктиномицину и резорцину, учитывая, что это одни из препаратов к которым моракселы оказались устойчивыми.

Как и в предыдущих опытах для решения задачи использовали метод серийных разведений препаратов в сывороточном бульоне Хоттингера. Результаты этих опытов представлены в таблице 3.

Данные, представленные в таблице 3 свидетельствуют о том, что культуры Escherichia coli, Salmonella dublin, Staphylococcus aureus, материала от патологического больных выделенные ИЗ животных инфекционным кератоконьюнктивитом качестве сопутствующей основному возбудителю болезни микрофлоры были чувствительными к спиктиномицину. МПК (M±m) при этом составили, 25,65±0,0603 мкг/мл; $18,60\pm5,668$ мкг/мл и $19,90\pm6,00$ мкг/мл соответственно, а культуры Aspergillus Нигер - к резорцину $14,20\pm1,87$ мкг/мл.

Таблица № 3

Чувствительность культур Moraxella bovis (n=24]
и сопутствующей микрофлоры (n=11] к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам (МПК, мкг/мл]

		Спикти	номицин	Резо	рцин	Спиктиномицин + резорцин			
№ п/п	Культуры	Разброс величин МПК, мкг/мл	Среднее значение МПК, М±т	чение величин значение К, МПК, МПК,		Разброс величин МПК, мкг/мл	Среднее значение МПК, М±т		
1	Moraxella bovis	75,00 – 90,00	80,25± 1,042	>100,00	-	37,60 - 75,20	56,40± 5,54		
2	Escherichia coli	10,30- 41,20	25,65± 0,0603	>100,00	-	9,70-38,80	24,25± 0,0904		
3	Salmonella dublin	11,20- 44,80	18,60± 5,668	>100,00	-	10,60- 31,80	14,13± 4,272		
4	Staphylococcus aureus	11,90- 47,60	19,90± 6,00	>100,00	-	11,30- 33,90	15,10± 4,534		
5	Aspergillus Нигер*	-	-	9,80- 18,60	14,20± 1,87	9,80-18,60	14,20± 1,87		

^{* -} n=3

Близкие по значениям результаты получили и при испльзовании спектиномицина в сочетании с резорцином. МПК (M±m) для культур Escherichia coli, Salmonella dublin, Staphylococcus aureus, Aspergillus Нигер составили 24,25±0,0904 мкг/мл; 14,13±4,272 мкг/мл; 15,10±4,534 мкг/мл и

14,20±1,87 мкг/мл соответственно, что свидетельствует об их чувствительности к этой комбинации антимикробных химиотерапевтических препаратов.

Таким образом, данная серия опытов позволила нам выбрать из значительного числа антимикробных химиотерапевтических препаратов такие, которые в наименьшей степени препятствуют росту и размножению на питательной среде Moraxella bovis, выделенных в различных регионах страны и, в тоже время, подавляют процессы роста и размножения наиболее часто выделяемой из патологического материала при данной болезни сопутствующей микрофлоры. Результаты этих исследований использовались нами в дальнейших исследованиях.

2.3. Конструирование плотной селективной питательной среды для изоляции и очистки культур Moraxella bovis

Для конструирования селективной питательной среды нам было необходимо решить следующие основные задачи:

- подобрать основу для селективной среды, которая бы в наибольшей степени удовлетворяла ростовым потребностям возбудителя;
- подобрать компоненты питательной среды, стимулирующие рост и размножение моракселл, поскольку они плохо растут или вовсе не растут на обычных питательных средах;
- подобрать антимикробные химиотерапевтические препараты, которые, будучи внесенными в питательную среду, избирательно подавляли бы рост и размножение основных видов сопутствующей микрофлоры. Установить необходимую конечную концентрацию таких препаратов в среде для достижения поставленной цели.

Последняя из перечисленных выше задач в части подбора антимикробных химиотерапевтических препаратов была нами решена в ходе исследований, описанных в разделе 2.2. нашей работы. Используя данные о

чувствительности (устойчивости) моракселл и основных представителей сопутствующей микрофлоры, в состав селективной среды мы ввели комбинацию спиктиномицина с резорцином.

Поскольку разброс величин МПК для спиктиномицина в отношении сопутствующей бактериальной микрофлоры был существенным наименьшие ее значения в наших опытах составляли 10 – 12 мкг/мл, мы решили испытать эффективность данного препарата в селективной питательной среде в концентрации, близкой к наименьшим значениям МПК, а именно в конечной концентрации в среде 10 мкг/мл. При необходимости (неудовлетворительных результатах испытаний) данная концентрация может быть увеличена как минимум в 2 – 2,5 раза до средних значений МПК, полученных в наших опытах и, в то же время, при таком подходе остается определенный резерв для возможного увеличения концентрации препарата в питательной среде в случае необходимости ее использования в тех хозйствах, где сопутствующая бактериальная микрофлора окажется более устойчивой к спиктиномицину, чем культуры, использовавшиеся в наших опытах.

Как видно из наших исследований, представленных выше, к числу сопутствующих микроорганизмов относится и грибковая микрофлора, а именно - Aspergillus Нигер. Эффективным препаратом для подавления роста и размножения этого микроорганизма оказался резорцин (МПК (М±т)) при этом составила 14,20±1,87 мкг/мл). Учитывая незначительное число культур данного гриба, которое нам удалось выделить из патологического материала и соответственно протестировать их на чувствительность (устойчивость) к резорцину (три культуры), а также высокую устойчивость к нему как моракселл, так и сопутствующей бактериальной микрофлоры, мы сочли возможным испытать резорцин в составе селективной питательной среды в концентрации, превышающей среднее значение МПК, а именно в конечной концентрации в среде 25 мкг/мл.

При решении вопроса в отношении основы селективной питательной среды учитывали следующее:

- анализ иностранных литературных данных по изоляции и культивированию Moraxella bovis на питательных средах свидетельствует о том, что первичные посевы из патологического материала в большинстве стран мира проводят на плотные питательные среды, а использование жидких сред удлиняет сроки исследований и не всегда дает положительные результаты, так как в смешанных культурах моракселлы не выдерживают конкурентной борьбы и быстро погибают;

- во многих странах мира в качестве основы плотной питательной среды для изоляции и культивирования Moraxella bovis используют триптиказо – соевый агар. Анализ результатов исследований, проведенных в нашей стране с использованием этой среды показывает, что нередко отмечается плохой гидролиз соевого белка, что негативно сказывается на качестве питательной среды и отрицательно влияет на ее ростовые свойства [8,9,10,56,47].

Руководствуясь этими данными мы в своих исследованиях в качестве основы плотной селективной питательной среды испытали мясо — пептонный агар, сухой питательный агар из гидролизата кильки и перевар Хоттингера.

В качестве компонентов питательной среды, стимулирующих рост и размножение моракселл испытаны: дефибринированная кровь барана, кролика и крупного рогатого скота; сыворотка крови крупного рогатого скота; дифосфоперидиннуклеотид; гемин; экстракт пекарских дрожжей (в качестве источника дифосфоперидиннуклеотида, гемина, ряда витаминов).

Используя различные комбинации перечисленных выше компонентов в составе испытуемых основ питательных сред экспериментально установили, что ростовым потребностям Moraxella bovis в наибольшей степени удовлетворяет перевар Хоттингера с аминным азотом 220-230 мг% (основа селективной питательной среды) с добавлением к нему 10% по объему дефибринированной крови крупного рогатого скота и 10% по объему экстракта пекарских дрожжей.

Как отмечали выше, для придания питательной среде селективных в отношении Moraxella bovis свойств, в нее добавляли спиктиномицин до конечной концентрации в среде 10 мкг/мл и резорцин до конечной концентрации в среде 25 мкг/мл.

Исходя из изложенного выше, процесс приготовления плотной селективной питательной среды выглядит следующим образом.

1. Приготовление компонентов питательной среды.

1.1. Приготовление перевара Хоттингера.

качестве основы плотной селективной питательной среды используют перевар Хоттингера. Его получают путем панкреатического гидролиза белков мяса говядины. Для этого мясо освобождают от жира, фасций и сухожилий, разрезают на небольшие кусочки (1-2 cм³), которые опускают небольшими порциями в емкость с двойным по объему количеством кипящей водопроводной воды и кипят 10-15 минут, пока мясо не станет серым, что указывает на то, что белки свернулись. Обработанное указанным выше способом мясо пропускают через мясорубку и фарш переносят в полученный мясной бульон, устанавливают рН содержимого емкости на уровне 8,0, после чего его охлаждают до 40°C и этой смесью заполняют стеклянные бутыли на 1/3 объема. Затем в бутыли вносят измельченную поджелудочную железу крупного рогатого скота из расчета 40 -80 г на 1 литр смеси (или 10% по объему к объему взятой смеси) либо 5 - 10г (0,5%) панкреатина. Полученную в бутылях смесь снова подщелачивают 0.4% - ным раствором натра едкого до рН 7.8 - 8.0, встряхивают и, при необходимости, повторяют такое подщелачивание через 30 – 40 минут. Для консервирования смеси в бутыли добавляют хлороформ из расчета 10 мл на 1 литр смеси (1 – 3%), плотно закрывают их резиновой пробкой и выдерживают при температуре 37°C в течение 10 суток. В первые 3 – 4 дня ферментации смесь в бутылях 3 раза в день встряхивают, приоткрывают бутыль, проверяют рН и, при необходимости, доводят величину рН до 7,8 -

- 8,0. В дальнейшем эту процедуру проводят один раз в день Последние 2 3 дня до окончания ферментации перемешивание прекращают, дают жидкости отстояться до просветления и образования осадка. Завершение ферментации белков определяют реакцией на триптофан. С этой целью в две пробирки наливают по 3-4 мл профильтрованного через бумагу гидролизата, затем в одну из пробирок вносят 3-4 капли бромной воды. При наличии триптофана перевар Хоттингера принимает розово-фиолетовый цвет, а в контрольной пробирке цвет не изменяется, остается желтым.
- 1.2. Приготовление растворов антибактериальных химиотерапевтических препаратов.

В отдельных темных стерильных флаконах готовят следующие растворы:

- водный (на дистиллированной стерильной воде) 0,2%-ный раствор спиктиномицина (10 мкг препарата на 1 мл воды);
- водный (на дистиллированной стерильной воде) 0,5%-ный раствор резорцина (25 мкг препарата на 1 мл воды).

Растворы хранят в холодильнике при температуре 4 - 6°C. Срок хранения - один месяц.

2. Приготовление питательной среды.

- 2.1. Берут 790 мл перевара Хоттингера с амминным азотом 220-230 мг% и добавляют в него 10 г пептона, 5 г натрия хлорида, 20 г агар-агара. Нагревают до расплавления агар-агара.
- 2.2. Среду фильтруют, разливают во флаконы, или колбы, или матры и стерилизуют автоклавированием при 0,8 атм. в течение 25 минут. После автоклавирования pH среды должна составлять 6,8 7,0.
- 2.3. Стерильную среду хранят при комнатной температуре в темном месте в течение двух недель или в холодильнике в течение месяца.
- 2.4. Перед употреблением среду расплавляют в водяной бане, охлаждают до температуры 45 50°C, добавляют в неё по 5 мл 0,2%-го

раствора спиктиномицина и 0,5%-го раствора резоцина, приготовленных и хранившихся по п. 1.2, а также 10% дефибринированной крови крупного рогатого скота и 10% экстракта пекарских дрожжей. Приготовленную таким образом селективную питательную среду разливают в чашки Петри по 15 - 20 мл, дают агару застыть и используют для посевов.

2.4. Изоляция из патологического материала культур Moraxella bovis на плотной селективной питательной среде и изучение её эффективности

В начале данного этапа исследований испытали эффективность предлагаемой селективной питательной среды для целей выделения чистой культуры Moraxella bovis из смешанных культур. С этой целью приготовили 18 смешанных культур, состоящих из равного по объему количества суточных бульонных культур моракселл, стафилококков, эшерихий и сальмонелл, а также смыва с агара Сабуро культуры Aspergillus Нигер. Для посевов готовили разведение этих культур 1:10 на физиологическом растворе. Посев разведенной смеси культур на плотную селективную питаельную среду проводили методом Дригальского: в чашку Петри вносили 1-2 капли посевного материала, тщательно растирали шпателем и этим же шпателем засевали вторую и третью чашки. Дальнейший ход исследования (обнаружение и идентификация моракселл) проходил так же, как и при выделении моракселл из патологоанатомического материала. Во всех 18-ти случаях на второй или третьей чашках Петри удавалось получить рост моракселл либо в виде чистой культуры (в 13 случаях, что составило 72,2%), либо в виде колоний моракселл, изолированных от колоний посторонних микроорганизмов (в 5 случаях, что составило 27,8%).

Эти данные позволили сделать нам предварительное заключение о том, что предлагаемый состав плотной питательной среды обладает ингибирующими свойствами для посторонней микрофлоры, наиболее часто

высевающейся из патологического материала при инфекционном кератоконьюнктивите и не препятствует росту возбудителя болезни (Moraxella bovis), т.е. среда обладает селективными в отношении Moraxella bovis свойствами.

Задачей дальнейших исследований было определение эффективности предлагаемой питательной среды в сравнении со средой, которая в настоящее время наиболее часто используется в лабораторной практике в нашей стране для обнаружения и выделения возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита (кровяной агар Хоттингера).

Для решения этой задачи в хозяйствах, чье неблагополучие по инфекционному кератоконьюнктивиту ранее было установлено и подтверждено нашими бактериологическими исследованиями, от животных с клиническими признаками поражения глаз отбирали пробы патологического материала и высевали одновременно на обе испытуемые питательные среды.

Материал отбирали только от тех животных, которые не подвергались лечению антимикробными препаратами. Для этого погружали стерильные ватные тампоны в серозно — гнойный экссудат под третьим веком пораженного глаза, сразу помещали в пробирку с мясо — пептонным бульоном и в термосе со льдом доставляли в лабораторию. В течение 10 — 15 часов из проб делали высев на плотную селективную питательную среду и на кровяной агар Хоттингера. При этом 3 — 4 капли посевного материала наносили на поверхность плотной питательной среды и тщательно растирали их шпателем. Затем этим же шпателем проводили посев второй и третьей чашек. Чашки с посевами помещали в термостат и инкубировали при 37°С в течение 24 — 48 часов.

Учет посевов и идентификацию высеваемых микроорганизмов осуществляли аналогично тому, как описано выше (раздел 2.1. диссертации). В общей сложности было подвергнуто бактериологическому исследованию 583 образца патологического материала. Данные, характеризующие частоту обнаружения Moraxella bovis и сопутствующей микрофлоры в одних и тех же

материалах, но на разных питательных средах, представлены в таблице 4 и на рисунках 1, 2 и 3.

Таблица 4
Эффективность различных питательных сред для изоляции
Могахеlla bovis из патологического материала

No	Среды	Исследовано	Выделено культур*					
п/п	Среды	проб	кол-во	%				
	N	Moraxella bovis						
1	плотная селективная питательная среда	583	285	48,89				
2	кровянной агар Хоттингера	583	101	17,32				
	Stap	hylococcus aure	eus					
1	плотная селективная питательная среда	583	134	22,98				
2	кровянной агар Хоттингера	383 ///						
	Escherichia coli							
1	плотная селективная питательная среда	583	88	15,09				
2	кровянной агар Хоттингера	583	135	23,15				
	Sa	almonella dublin						
1	плотная селективная питательная среда	583	76	13,04				
2	кровянной агар Хоттингера	583	123	21,10				
Aspergillus Нигер								
1	плотная селективная питательная среда	583	0	0				
2	кровянной агар Хоттингера	583	18	3,1				

^{* -} в единичных случаях выделялась и другая бактериальная микрофлора.

Данные таблицы 4 и рисунков 1, 2 и 3 свидетельствуют о том, что использование для бактериологических исследований вновь разработанной

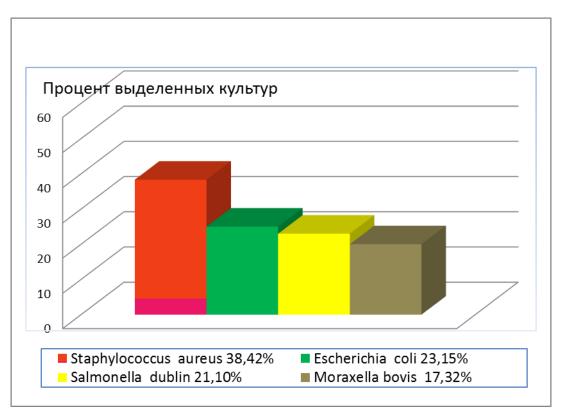


Рис. 1. Частота обнаружения Moraxella bovis и сопутствующей микрофлоры на кровяном агаре Хоттингера

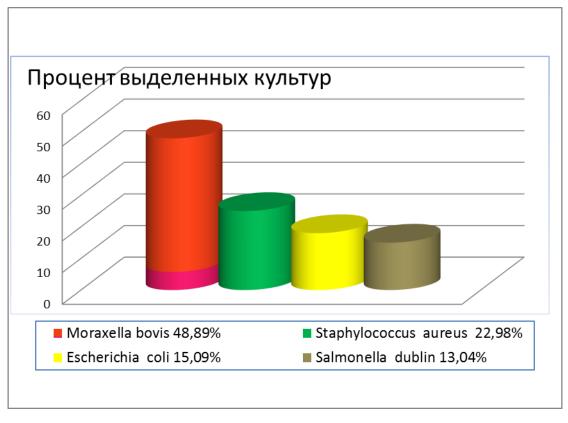


Рис. 2. Частота обнаружения Moraxella bovis и сопутствующей микрофлоры на плотной селективной питательной среде

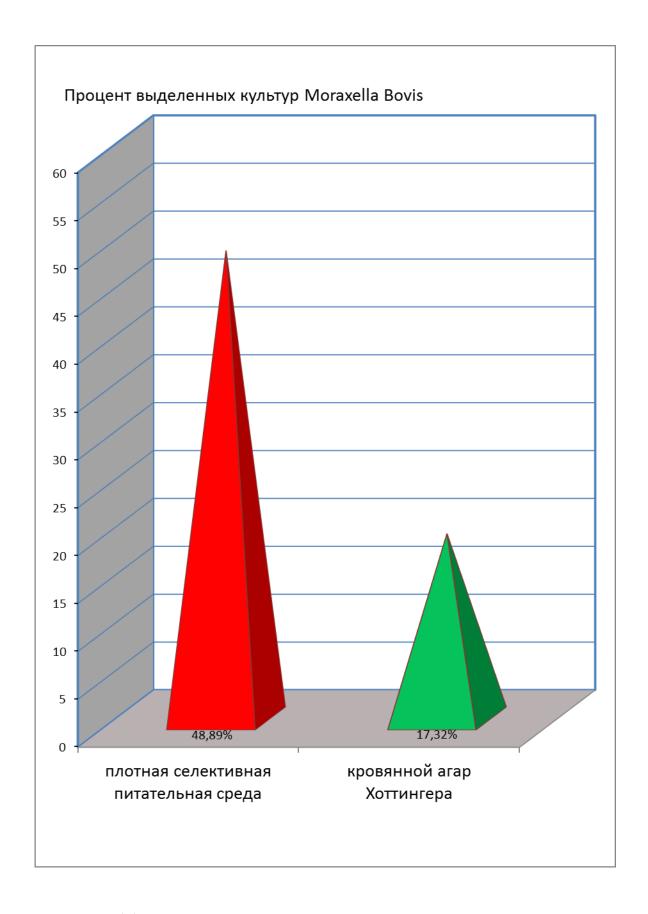


Рис. 3. Эффективность различных питательных сред для изоляции культур Moraxella bovis из патологического материала

плотной селективной питательной среды позволяет существенно повысить результативность диагностических исследований с целью обнаружения и выделения возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита.

Так, при посевах 583 проб патологическго материала на используемый традиционно для этих целей кровянной агар Хоттингера, Moraxella bovis удалось выделить и идентифицировать только в 101 случае, что составило 17,32% от числа исследованных проб. При исследовании тех же самых проб, но уже с использованием предлагаемой селективной питательной среды, возбудитель болезни был выделен и идентифицирован уже в 285 образцах патологического материала или в 48,89% случаев. Таким образом установлено, что применение предлагаемой селективной питательной среды обеспечивает увеличение частоты обнаружения возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота в 2,82 раза.

Одновременно следует отметить и тот факт, что на селективной питательной среде в сравнении с кровяным агаром Хоттингера снизилось число высевов из тех же образцов представителей основных сопутствующих микроорганизмов: стафилококков с 224-х до 134-х культур (с 38,42% до22,98% случаев) или в 1,67 раза; эшерихий со 135-ти до 88-ми культур (с 23,15% до 15,09% случаев) или в 1,53 раза; сальмонелл со 123-х до 76-ти культур (с 21,10% до 13,04% случаев] или в 1,62 раза. Aspergillus Нигер на селективной среде не выявляли, тогда как на кровяном агаре Хоттингера он был обнаружен в 18 образцах патологического материала (3,1% случаев). По нашему мнению, именно это и является причиной увеличения частоты обнаружения в патологическом материале основного возбудителя болезни.

Таким образом показано, что вновь разработанная плотная питательная среда обладает селективными в отношении Moraxella bovis свойствами и использование этой питательной среды в условиях неблагополучных по инфекционному кератоконъюнктивиту крупного рогатого скота хозяйств позволяет увеличить частоту обнаружения возбудителя болезни в 2,82 раза. Поскольку основой лабораторных исследований при постановке диагноза на

инфекционный кератоконьюнктивит крупного рогатого скота является бактериологическая диагностика, направленная на выделение культуры возбудителя и ее идентификацию, использование плотной селективной питательной среды для этих целей позволит значительно постановку сократить время на диагноза, организацию противоэпизоотических мероприятий, образом повысив таким эффективность борьбы с болезнью и снизив при этом связанные с ней экономические потери.

2.5.Изучение биологических свойств культур Moraxella bovis, выделенных на плотной селективной питательной среде

Учитывая тот факт, ЧТО антимикробные химиотерапевтические препараты могут оказывать влияние на основные биологические свойства микроорганизмов (например, из-за потенциального мутагенного эффекта), представлялось важным изучить основные биологические свойства моракселл, выделенных с использованием вновь разработанной селективной питательной среды, содержащей в своем составе спиктиномицин и резорцин. Практически важным на этом этапе исследований было выяснение возможности достоверной видовой идентификации возбудителя болезни.

Решение этой задачи включало изучение совокупности признаков: морфологии клеток, характера роста моракселл на различных средах, способов получения энергии, потребности соединениях В ДЛЯ конструктивного обмена, отношение к факторам внешней среды, продуктов метаболизма сопоставлением данных, полученных ДЛЯ выделенных на плотной селективной питательной среде, для культур, выделенных использованием кровяного агара Хоттингера И c соответствующими литературными источниками.

Культуральные, ферментативные (таблица 5), морфологические и тинкториальные свойства Moraxella bovis, выделенных с использованием

кровяного агара Хоттингера и плотной селективной питательной среды различий не имели и характеризовались следующим.

Таблица 5
 Основные биологические свойства Moraxella bovis, выделенных с использованием кровяного агара Хоттингера и плотной селективной питательной среды

		Moraxella bovis выделенные с использованием:															
№№ π/π	Свойства	кровяного агара Хоттингера			плотной селективной питательной среды												
11/11		K-	K- 2	К- 3	Д- 1	Д- 2	Д- 3	B- 1	B- 2	B-	3- 1	3- 2	3- 3	P- 1	P- 2	P- 3	Л- 1
1	Утилизация ацетата	-	-	-	-	-	-	-	_	_	-	-	-	-	-	-	-
2	Восстановление нитратов	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Разжиженния желатины	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Гемолиз на кровяном агаре	ı	+	+	+	+	ı	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
5	Свертывание лакмусового молока	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Пептонизация лакмусового молока	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Ферментация углеводов	ı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Каталазная активность	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	Образования индола	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Подвижность	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Рост на средах с 6% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Рост на среде Мак-Конки	-	_	_	-	_	-	-	_	_	-	-	-	-	_	_	-
13	Рост на средах с желчными солями	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	_	-

^{«+» -} признак положительный; «-» - признак отрицательный.

На кровяном агаре Хоттингенра отмечали наличие плоских, круглых, вдавленных в среду, серо – белого цвета, диаметром 1-3 мм колоний, имеющих рыхлую консистенцию и окруженных в большинстве случаев узкой (0,5-1,0 мм) зоной полного гемолиза (бета-гемолиза). В мазках, приготовленных из таких колоний и окрашенных по Грамму обнаруживали грамотрицательные, полиморфные, короткие вплоть до кокков, толстые с закругленными краями бактерии, располагающиеся одиночно, парами или в виде коротких цепочек.

24-28 Ha бульоне Хоттингера сывороточном после часов культивирования рост возбудителя характеризовался помутнением среды (от незначительного до интенсивного) с образованием осадка серо-белого цвета, встряхивании разбивался, образуя который равномерную мелкозернистую суспензию. Морфология клеток в мазках, окрашенных по Граму, была аналогична таковой в мазках, приготовленных из колоний с кровяного агара Хоттингера.

Могахеllа bovis как в одном, так и в другом случае не обладали подвижностью, не росли на простом агаре и бульоне, на средах с 6% натрия хлорида, Мак — Конки, с желчными солями и при температуре 6°С, не утилизировали натрия ацетат, не восстанавливали нитраты до нитритов, не ферментировали углеводы, не образовывали индол, разжижали желатин, обладали каталазной активностью, вызывали характерные для возбудителя изменения в лакмусовом молоке: в условиях аэробиоза вызывали защелачивание, а в условиях анаэробиоза — пептонизацию и закисление молока. В результате такой избирательности поведения бактерий верхний слой лакмусового молока высотой до 0,5 — 1 см окрашивался в темно-синий цвет, средний слой - в светло-синий, а нижний слой - в белый с крупинками пептонизированного молока.

Сравнение собственных экспериментальных данных об основных биологических свойствах Moraxella bovis, выделенных с использованием

плотной селективной питательной среды с литературными данными представлено в таблицах 6 и 7.

Данные таблицы 6 свидетельствуют о том, что изученные нами основные биологические свойства Moraxella bovis, выделенных с использованием плотной селективной питательной среды, идентичны таковым, представленным в литературных источниках.

Таблица 6

Сравнение основных биологических свойств Moraxella bovis,
выделенных с использованием плотной селективной питательной среды
с соответствующими литературными данными

<u>№№</u> п/п	Свойства	Собственные данные	Берги (1980]	Quinn P.I., et. al. (1998]
1	Утилизация ацетата	-	-	-
2	Восстановление нитратов	-	-	-
3	Разжиженния желатины	+	+	+
4	Гемолиз на кровяном агаре	土	±	±
5	Свертывание лакмусового молока	+	+	+
6	Пептонизация лакмусового молока	+	+	+
7	Каталазная активность	+	+	+
8	Образования индола	-	-	-
9	Подвижность	-	-	-
10	Рост на средах с 6% NaCl	-	-	-
11	Рост на среде Мак-Конки	-	-	-
12	Рост на средах с желчными солями	-	-	-
13	Ферментация: арабиноы	-	-	-
14	ГЛЮКОЗЫ	-	-	-
15	мальтозы	-	-	-
16	рамнозы	-	-	-
17	маннита	-	-	-
18	сахарозы	-	-	-
19	раффинозы	-	-	-
20	галактозы	_	-	-
21	сорбита	-	-	-

^{«+» -} признак положительный; «-» - признак отрицательный; «±» - признак варьирует.

В лабораторной практике важной задачей является дифференциация Moraxella bovis от других представителей рода Moraxella. Основные тесты, позволяющие решить эту задачу, представлены в таблице 7.

Из данных, представленных в таблице 7 видно, что бактерии ни одного из видов рода Moraxella не утилизируют ацететат, не образуют индол, не

обладают подвижностью, но все они обладают каталазной активностью и, следовательно, данные тесты не могут использоваться для внутриродовой дифференциации моракселл. Moraxella bovis и Moraxella lacunata разжижают желатин, а представители иных видов этого рода данной способностью не обладают. Необходимо отметить, что Moraxella bovis не восстанавливают нитраты и в большинстве случаев вызывают гемолиз на кровяном агаре, что отличает их по этим свойствам от видов Moraxella lacunata, Moraxella nonliguenfaciens, Moraxella phenylpyruvica и Moraxella osloensis. Кроме того, в качестве дифференциального теста может использоваться способность Moraxella bovis пептонизировать и сворачивать лакмусовое молоко в отличие от бактерий вида Moraxella nonliguenfaciens, которые такой способностью не обладают.

Таблица 7 Дифференциально-диагностические признаки бактерий рода Moraxella

No No	Дифференциаль-	Виды рода Moraxella					
п/п	ные тесты	bovis	lacunata	nonliguenfaciens	phenylpyruvica	osloensis	
1	Утилизация ацетата	-	-	-	-	-	
2	Восстановление нитратов	-	+	+	+	+	
3	Разжиженния желатины	+	+	-	-	-	
4	Гемолиз на кровяном агаре	±	-	-	-	-	
5	Свертывание лакмусового молока	+	нд	-	нд	нд	
6	Пептонизация лакмусового молока	+	нд	-	нд	нд	
7	Каталазная активность	+	+	+	+	+	
8	Образования индола	-	-	-	-	-	
9	Подвижность	-	-	-	-	-	

^{«+» -} признак положительный; «-» - признак отрицательный;

^{«±» -} признак варьирует; «нд» - нет данных.

Таким образом, установлено, что применение для обнаружения в патологическом материале Moraxella bovis плотной селективной для возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота питательной среды, содержащей в своем составе спиктиномицин и резорцин, не влечет за собой изменения его (возбудителя) основных биологических свойств, что позволяет осуществлять достоверную видовую идентификацию Moraxella bovis.

2.6. Изучение патогенных свойств культур Moraxella bovis, изолированных на плотной селективной питательной среде

Возбудитель инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота Moraxella bovis обладает фенотипическими признаками факторов вирулентности наиболее существенными из них являются: гемолизин, фимбрии (пили] и биологические активные вещества, выделяемые бактериями.

Дальнейшие исследования заключались в изучении патогенных свойств выделенных на плотной селективной питательной среде гемолитических культур Moraxella bovis для телят 2 – 3-месячного возраста и белых мышей.

Для изучения патогенных свойств изолированных гемолитических культур Moraxella bovis, были сформированы восемь групп телят по 9 голов в каждой, 2 – 3-месячного возраста, которые находились в одном помещении. Из них четыре группы были опытными и четыре контрольными. Предварительно все животные в группах были обследованы клинически (на отсутствие таких признаков, как слезотечение, светобоязнь, гиперемия сосудов конъюнктивы, блефароспазм, иридоспазм, серозно – слизистые или серозно – гнойные истечения из глаз, помутнение и/или изъязвление роговицы), а затем бактериологически (посев, культивирование, учет роста плотной селективной питательной среде на целью возможного обнаружения Moraxella bovis) на инфекционный кератоконъюнктивит. В

результате проведенных исследований было установлено, что все животные в группах были здоровыми.

Научными работами ряда отечественных и зарубежных исследователей установлено, что для экспериментального воспроизведения инфекционного кератоконъюнктивита следует использовать моракселлы, обладающие гемолитической активностью. При этом для заражения животных живой массой более 180 кг рекомендуется использовать суспензию культуры возбудителя, концентрацией 22 - 24 млрд. микробных клеток в 1 см³, а для животных живой массой менее 180 кг – концентрацией 9 - 10 млрд. микробных клеток в 1 см³. Отобранные для опыта телята 2-3-месячного возраста имели живую массу менее 180 кг, в связи с чем для их заражения готовили суспензию моракселл концентрацией 9 - 10 млрд. микробных клеток в 1 см³. Для заражения белых беспородных мышей по данным литературы следует использовать суспензию концентрацией 4 – 5 млрд. микробных клеток в 1 см³. Поэтому вышеуказанную дозу использовали для заражения белых мышей.

Для заражения телят использовали 4 изолированных нами в различных хозяйствах гемолитические культуры Moraxella bovis, которые хранились в лабораторных условиях путем периодических пересевов на кровяном агаре Хоттингера. С этой целью культуры возбудителя выращивали на кровяном агаре Хоттингера с дрожжевым экстрактом при температуре +37°C в течение 24 часов. Затем выросшие культуры Moraxella bovis с поверхности агара смывали стерильным физиологическим раствором и с использованием стандарта мутности готовили оптического суспензию моракселл концентрацией 9-10 млрд. микробных клеток в 1 см³. Приготовленными суспензиями суточных культур возбудителя заражали опытных телят путем введения в нижний конъюнктивальный мешок левого глаза 0,5 см³ суспензии культуры соответствующего изолята Moraxella bovis.

Телятам контрольных групп в нижний конъюнктивальный мешок левого глаза ввели по 0,5 см³ стерильного физиологического раствора.

После заражения за опытными и контрольными телятами в группах вели тщательное наблюдение на предмет появления и динамики развития клинических признаков заболевания инфекционным кератоконъюнктивитом. При наличии клинических признаков болезни у животных отбирали патологический материал (серозные или серозно-гнойные истечения из пораженных глаз) для бактериологического исследования. Результаты заражения телят представлены в таблице 8.

Таблица 8 Результаты экспериментального воспроизведения инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота на телятах

Группы	Кол-во	Условное Результаты за			аражения	
живот-	телят в	обозначение	заболело		не заболело	
ных	группе	изолята	голов	%	голов	%
1 опыт	9	Д-1	6	66,7	3	33,3
2 контроль	9	-	0	0	9	100
3 опыт	9	K-1	6	66,7	3	33,3
4 контроль	9	-	0	0	9	100
5 опыт	9	B-1	6	66,7	3	33,3
6 контроль	9	-	0	0	9	100
7 опыт	9	M-2	6	66,7	3	33,3
8 контроль	9	-	0	0	9	100

Из данных, представленных в таблице 8 видно, что в каждой из опытных групп вне зависимости от изолята Moraxella bovis, использовавшегося для заражения заболело по 6 телят (66,7%). Ни у одного из контрольных животных клинических признаков болезни выявлено не было.

Клинические признаки заболевания животных опытных групп кератоконъюнктивитом в большинстве случаев отмечали в период с 8-го по 17-й день и у отдельных животных на 3-й или 21-23-й дни после заражения культурой Moraxella bovis.

У искусственно инфицированных телят заболевание сопровождалось уменьшением аппетита, угнетенным состоянием и беспокойством животного. В первые дни проявления болезни отмечали светобоязнь (блефароспазм) и слезотечение. Температура тела повышалась до 39,8°C - 41,5°C Затем отмечали появление серозного истечения из внутреннего угла глаза, которое постепенно превращалось в серозно-слизистое, а затем и в гнойный экссудат. Через одни сутки после развития коньюнктивита на поверхности роговицы можно было наблюдать развитие помутнения молочно-белого цвета, распространяющееся ПО всей роговице. Одновременно развивалась перикорнеальная инъекция сосудов. На месте скопления экссудата в роговице в ряде случаев отмечали формирование абсцесса. В дальнейшем абсцесс роговицы вскрывался, и его полость зарастала грануляционной тканью, которая в последующем подвергалась рубцеванию.

На этапе развития кератоконъюнктивита с серозно-гнойными истечениями (в большинстве случаев спустя 23-25 дней после заражения) у больных телят стерильными ватными тампонами проводили отбор серозногнойного истечения из глаз для бактериологических исследований. Пробы экссудата в аналогичные сроки отбирали и у телят опытных и контрольных групп не имевших клинических признаков заболевания. Материал высевали на плотную селективную питательную среду.

Moraxella bovis удалось выделить из материала, полученного от всех 36 телят опытных групп, вне зависимости от того развивались или нет клинические признаки болезни к моменту отбора материала для бактериологических исследований.

На плотной селективной питательной среде возбудитель формировал плоские, круглые, мелкие, рыхлой консистенции, вдавленные в среду, серо — белого цвета колонии, окруженные узкой зоной бета — гемолиза. Диаметр колоний не превышал 1 — 3 мм, ширина зоны бета - гемолиза составляла 0,5 - 1,0 мм. В мазках из таких колоний обнаруживали грамотрицательные, неподвижные, короткие и толстые с закругленными концами бактерии (1,0 -

 $1,5 \times 1,5 - 2,5$ мкм) с характерным парным сочленением, некоторые клетки были приближены к кокковидной форме, которые не имели спор и капсул. В мазках бактериальные клетки располагались преимущественно одиночно или в парах, реже - в форме коротких цепочек.

При наличии в мазках бактерий с описанной выше морфологией, из таких колоний делали посевы на сывороточный бульон Хоттингера. После 24 – 48 часов инкубирования при 37°C изучали характер роста в среде, готовили мазки, окрашивали по Грамму и микроскопировали. На сывороточном бульоне Хоттингера изолированные культуры Moraxella bovis вызывали незначительное помутнение среды с образованием осадка на дне пробирки, который при встряхивании образовывал равномерную мелкозернистую суспензию. По морфологическим свойствам бульонные культуры моракселл были аналогичны таковым с плотной питательной среды.

Все выделенные 36 культур Moraxella bovis, не утилизировали ацетат натрия, не восстанавливали нитраты до нитритов, не ферментировали углеводы, не образовывали индол, не обладали подвижностью, не росли на средах с 6% натрия хлорида, Мак — Конки, с желчными солями и при температуре 6°С. Все культуры Moraxella bovis разжижали желатин, обладали каталазной активностью и вызывали гемолиз на кровяном агаре. Они вызывали характерные для Moraxella bovis изменения в лакмусовом молоке: в условиях аэробиоза вызывали защелачивание, а в условиях анаэробиоза — пептонизацию и закисление молока. При этом верхний слой столбика лакмусового молока высотой до 0,5 — 1 см окрашивался в темносиний цвет, средний слой - в светло-синий, а нижний слой - в белый с крупинками пептонизированного сгустка молока.

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что все 36 изолятов Moraxella bovis, реизолированные от экспериментально инфицированных телят, были идентичны первоначальным изолятам возбудителя, использовавшимся для заражения животных.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при заражении Moraxella bovis, изолятами обладающими активностью, в 66,7% случаев удалось воспроизвести болезнь, и при этом были получены клинические признаки инфекционного кератоконъюнктивита которые были крупного рогатого скота, аналогичны симптомам, наблюдаемым при заражении животных в естественных условиях. От всех животных опытных групп удалось реизолировать исходные культуры возбудителя.

Из 36 контольных телят в период наблюдения не заболел ни один теленок.

В дальнейших своих исследованиях изучили патогенность выделенных на плотной селективной питательной среде культур Moraxella bovis для белых беспородных мышей. С этой целью были сформированы восемь групп мышей живой массой 14 – 16 г по 13 голов в каждой группе. Животные в период опыта размещались в одном помешении. Четыре группы были опытными (их заражили возбудителем инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота) и четыре – контрольными (заражению не подвергались). Для заражения животных использовали 4 изолята Moraxella bovis из числа выделенных нами в различных хозяйствах (Белгородской, Тамбовской областей) обладающих Курской И гемолитической активностью.

С этой целью культуры возбудителя выращивали на кровяном агаре Хоттингера с дрожжевым экстрактом при температуре +37°С в течение 24 часов. Затем выросшие культуры Moraxella bovis с поверхности агара смывали стерильным физиологическим раствором и с использованием оптического стандарта мутности готовили суспензию моракселл концентрацией 4-5 млрд. микробных клеток в 1 см³. Приготовленными суспензиями суточных культур возбудителя заражали опытных мышей путем подкожного введения 0,5 см³ суспензии культуры соответствующего изолята Moraxella bovis.

После заражения за опытными и контрольными мышами вели тщательное наблюдение в течение десяти дней, отмечая число заболевших и павших животных в каждой из групп. Результаты данного опыта представлены в таблице 9.

Следует отметить, что первые признаки заболевания животных отмечали уже спустя 10-15 часов после заражения (мыши становились вялыми, отказывались принимать корм, зарывались в опилки, шерсть была взьерошенной). Данные признаки, выраженные в большей или меньшей степени, отмечали у 100% опытных мышей. При этом из данных, представленных в таблице 9, видно, что в каждой из опытных групп пало по 11 мышей из 13 зараженных, что составляет 84,6%. Гибель мышей опытных групп отмечали в период от 24 до 72 часов после заражения. Ни у одной из 52 контрольных мышей клинических проявлений патологии не отмечали и все они остались живыми в течении 10-дневного периода наблюдения.

Таблица 9
Патогенность Moraxella bovis, выделенных с использованием плотной селективной питательной среды для белых беспородных мышей

Группы	Кол-во	Условное	Результаты заражения				
живот-	мышей в	обозначение	пало		опижив		
ных	группе	изолята	голов	%	голов	%	
1 опыт	13	Д-2	11	84,6	2	15,4	
2 контроль	13	-	0	0	13	100	
3 опыт	13	K-1	11	84,6	2	15,4	
4 контроль	13	-	0	0	13	100	
5 опыт	13	B-3	11	84,6	2	15,4	
6 контроль	13	-	0	0	13	100	
7 опыт	13	M-1	11	84,6	2	15,4	
8 контроль	13	-	0	0	13	100	

Таким образом, как при заражении естественно восприимчивых животных (телят 2-3-месячного возраста введением культуры в вентральный коньюнктивальный мешок глаза), так и при заражении лабораторных животных (белых беспородных мышей живой массой 14-16 г подкожной иньекцией культуры] изолятами Moraxella bovis, выделенными от крупного скота c клиническими признаками инфекционного рагатого кератоконьюнктивита, с использованием вновь разработанной плотной Moraxella bovis питательной среды показано, селективной для испытанные изоляты обладают выраженными патогенными свойствами. В период наблюдения за зараженными телятами заболеваемость среди них составила 66,7%. Заболеваемость же зараженных мышей составила 100% при летальности 84,6%.

3. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные отечественной И зарубежной специальной литературы свидетельствуют о том, что инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, вызываемый Moraxella bovis, широко распространенное заболевание крупного рогатого скота, характеризующееся слезотечением, светобоязнью, гиперемией сосудов конъюнктивы, блефароспазмом, иридоспазмом, серозно – слизистым, а затем серозно – гнойным истечением из пораженных глаз, помутнением, изъязвлением роговицы с частичной или полной потерей пораженногоглаза Согласно зрения животного. литературным данным и результатам собственных исследований, это недостаточно изученное заболевание в нашей стране. В России, а также во многих странах мира с развитым молочным и мясным животноводством заболевание зарегистрировано в виде энзоотий или эпизоотий.

Следует отметить, что в неблагополучных по заболеванию животноводческих комплексах по откорму крупного рогатого скота, на молочно-товарных фермах, а также в частном секторе заболеваемость скота может колебаться от 20-30% до 75-94%, что зависит от вирулентности занесенного в стадо возбудителя и от наличия предрасполагающих факторов.

Инфекционный кератоконъюнктивит бактериальной этиологии является одной из экономически значимых болезней крупного рогатого скота, причиняющий большой ущерб животноводству как у нас в стране, а также во многих странах мира. Болезнь у животных сопровождается уменьшением аппетита, угнетенным состоянием и беспокойством. Заболевшие телята, в связи с резким снижением поедаемости корма, сильно худеют, а после болезни продолжительное время не прибавляют в весе. Заболевание глаз у крупного рогатого скота приводит к частичной или полной потере зрения и сопрождается значительным снижением продуктивности. Во время болезни коровы продолжительное время уменьшают молочную продуктивность, а телята - привесы на 25-30%, а также ухудшаются нагулы у животных, что

нередко становится причиной, приводящей их к яловости. Для больных животных необходимо создавать особые условия содержания, кормления, эксплуатации, что вызывает дополнительные расходы и нередко делает их экономически нецелесообразным. Для содержание терапии больного крупного рогатого скота необходимо большое количество лекарственных средств, при этом тратится много времени. Эффективность лечения при данном заболевании невысока, что в значительной мере обусловлено быстрым появлением устойчивых к антибактериальным средствам форм возбудителя. В стране инфекционный нашей кератоконъюнктивит, вызываемый Moraxella bovis изучен недостаточно.

своевременного принятия адекватных ветеринарных мер, болезни направленных на локализацию очага c последующей его ликвидацией, весьма важно своевременно установить диагноз болезни. При этом следует иметь ввиду, что клиническое проявление инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота, особенно на ранних стадиях развития патологического процесса, весьма схоже с клиникой, которую наблюдать инфекционном онжом при ринотрахеите, парагриппе, пастереллезе, микоплазмозе крупного рогатого скота, при кератоконъюнктивитах риккетсиозного, инвазионного генеза, а также при авитаминозного происхождения. болезнях глаз Именно поэтому диагноза наряду с анализом эпизоотических постановке данных клиническим обследованием животных обязательно проводят лабораторные (бактериологические) исследования патологического материала с целью чистой возбудителя идентификации выделения культуры И ee [129,122,73,74,118,101,91,100,23,25].

Проведя работы по диагностике инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах ряда регионов Российской Федерации, являющихся неблагополучными по данному заболеванию и проведя при этом бактериологические исследования патологического материала от крупного рагатого скота с клиническими

признаками инфекционного кератоконьюнктивита (в общей сложности исследовали 120 образцов патологического материала из 7 хозяйств 5 регионов страны), врзбудителя болезни (Moraxella bovis) нам удалось выделить только из 23 образцов или в 19,2% случаев.

О сложностях выделения из патологического материала возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита крпного рогатого скота сообщают многие исследователи как в нашей стане, так и за рубежом [129,84,133,134,66,23,25,51].

Одной из причин этого являются ростовые потребности Moraxella bovis. Возбудитель не растет на обычных питательных средах, а требует их обогащения дефибринорованной сывороткой крови или (преимущественно крупного рогатого скота), никотинамиддинуклеотидом или дрожжевым экстрактом, который служит не только источником НАД (или V-фактора роста), но и ряда витаминов и других веществ, стимулирующих рост бактерий. При этом в качестве основы таких обогащенных питательных сред рекомендуется использовать субстраты, в которых белковая составляющая для большей биодоступности подвергается гидролизному расщеплению той или иной глубины. В качестве таких основ рекомендуется использовать агар Хоттингера, триптиказо-соевый агар [9,47,114,137,71,77].

Другой важной причиной того, что на обогащенных питательных средах, но не обладающих селективными свойствами, выделение моракселл представляет значительные трудности, является то, что отбираемый для бактериологических исследований патологический материал содержит разнообразную сопутствующую, в том числе и условно - патогенную микрофлору. Многочисленные данные литературы свидетельствуют о наличии в пробах, отобранных для бактериологических исследований от c клиническими признаками инфекционного животных кератоконьюнктивита, стафилококков, стрептококков, эшерихий, сальмонелл, псевдомонад, протея, риккетсий, грибковой микрофлоры и

других микроорганизмов [133,135,23,25,42,41,43]. При этом большая часть сопутствующей микрофлоры не столь требовательна к питательноным средам, а потому растет интенсивнее возбудителя болезни, опережает рост моракселл и, в конечном счете, часто подавляет их развитие, снижая частоту обнаружения возбудителя и удлинняя сроки выделения искомых культур. В большинстве случаев сообщается, что по этим причинам Moraxella bovis 14-19% отобранных удается выделить только В образцов, ДЛЯ бактериологических исследований. Приведенные выше результаты наших исследований полностью совпадают в этой части с литературными данными и подтверждают необходимость использования в лабораторной практике селективной для Moraxella bovis питательной среды. Наряду с возбудителем инфекционного кератоконьюнктивита, который нам удалось выделить в 23 случаях из 120 образцов патологического материала, подвергнутых бактериологическим исследованиям (или в 19,2% случаев), нами были выделены стафилококки (39,1% случаев), эшерихии (22,5% случаев), сальмонеллы (19,2% случаев) и грибы рода Aspergillus.

В доступной нам литературе не удалось обнаружить сведения о наличии и применении в отечественной или зарубежной лабораторной практике бактериологической диагностики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота селективных для Moraxella bovis питательных сред, а потому это и явилось целью наших исследований.

Основу селективной питательной среды подбирали, основываясь на многочисленных публикациях, посвященных вопросам культивирования моракселл. Выше упоминалось, ЧТО чаще всего и с наибольшей эффективностью для этих целей используют агар Хоттингера и триптиказосоевый агар. Сообщает, что наиболее эффективными питательными средами культивирования ДЛЯ выделения И возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита являются: Колумбия бульон Difco, Шэндлера бульон Difco, Тиогликоливый бульон Difco и кровяной агар [8]. Учитывая сообщения отечественных исследователей о том, что при использовании сред из триптиказо-соевого перевара нередко отмечается плохой гидролиз сои, что отрицательно влияет на ростовые качества питательных сред, триптиказо-соевый агар в своих исследованиях мы не использовали [23,25,8,9,10,36,47]. В своих исследованиях в качестве основы плотной селективной питательной среды мы испытали мясо — пептонный агар, сухой питательный агар из гидролизата кильки и перевар Хоттингера.

Исследования, направленные на определение оптимального состава и количества ингредиентов для обогащения основы питательной среды компонентами, стимулирующими рост и размножение моракселл, включали испытания для этих целей дефибринированной крови барана, кролика и крупного рогатого скота; сыворотки крови крупного рогатого скота; дифосфоперидиннуклеотида; гемина; экстракта пекарских дрожжей (в качестве источника дифосфоперидиннуклеотида, гемина, ряда витаминов).

Полученные в ходе данных исследований результаты не приотиворечат литературным данным по этому вопросу. Нами показано, что ростовым потребностям Moraxella bovis в наибольшей степени отвечает питательная среда следующего состава: агар Хоттингера на основе перевара Хоттингера с аминным азотом 220-230 мг% с добавлением к нему 10% по объему дефибринированной крови крупного рогатого скота и 10% по объему экстракта пекарских дрожжей. О том, что для выделения из патологического материала (серозно - слизистого, серозно - гнойного истечений из пораженных глаз, соскобов с конъюнктивы век, глазного яблока, из роговицы), полученного с целью бактериологических исследований от крупного рогатого скота с клиническими признаками инфекционного кератоконьюнктивита в наибольшей степени подходит кровяной агар хоттингера сообщают [84,73,74,133,118,66,71,23,25,41,51].

Сообщает, что культуры Moraxella bovis не растут на простых питательных средах, а требуют добавления 5-10% крови или сыворотки крови крупного рогатого скота [8].

Для придания плотной, обогащенной ростовыми добавками питательной среде селективных для Moraxella bovis свойств изучили чувствительность к антимикробным химиотерапевтическим препаратам как возбудителя болезни, так и основных представителей сопутствующей микрофлоры. Все использовавшиеся на этом этапе исследований изоляты микроорганизмов были неблагополучныых инфекционному выделены нами В ПО кератоконьюнктивиту хозяйствах различных регионов страны, что, по нашему мнению, обеспечивало учет различий, которые могли быть выявлены (и были выявлены В ходе выполнения работы) оотношении антибиотикорезистентности изучавшихся микроорганизмов. Потенциальная возможность обнаружения таких антимикробных химиотерапевтических препаратов, которые бы угнетали размножение и/или рост сопутствующей микрофлоры одновременно минимально препятствовали И размножению возбудителя болезни следует из данных литературы различиях в спектрах устойчивости к антибактериальным средствам у Moraxella bovis И представителей сопутствующей микрофоры. устойчивости/чувствительности Moraxella bovis и различных представителей сообщают сопутствующей микрофлоры многие авторы [88,54,73,74,101,77,140,82,58,83,65,1,49,33].

Изучив чувствительность Moraxella bovis и различных представителей сопутствующей микрофлоры к 43 наименованиям антимикробных химиотерапевтических средств (или их комбинациям) установили, что рост моракселл в наименьшей степени подавлялся спиктиномицином в сочетании с резорцином и именно эта комбинация препаратов в наибольшей степени позволяет решить задачу подавления роста и размножения на плотной питательной среде сопутствующей бактериальной и грибковой микрофлоры.

Исходя из средних величин минимальных подавляющих концентраций (МПК] и разброса этих величин, полученных в ходе выполнения исследований для испытуемых микроорганизмов, остановились на следующих количествах антимикробных субстанций для придания плотной

питательной среде селективных для Moraxella bovis свойств: спиктиномицин в конечной концентрации в среде 10 мкг/мл; резорцин в конечной концентрации в среде 25 мкг/мл.

Таким образом, рецептура предложенной нами плотной селективной питательной среды выглядит следующим образом:

```
перевар Хоттингера с амминным азотом 220-230 мг% - 790 см³;
пептон — 10 г;
натрия хлорид — 5 г;
агар-агар — 20 г;
дефибринированная кровь крупного рогатого скота — 10% к объему
```

среды; экстракт пекарских дрожжей – 10% к объему

среды; водный 0,2%-ный раствор спиктиномицина – 5 см³;

водный 0,2%-ный раствор спиктиномицина – 5 см³. водный 0,5%-ный раствор резорцина – 5 см³.

Следующий этап наших исследований заключался в том, чтобы плотную селективную питательную среду с экспериментально обоснованным составом компонентов испытать в лабораторных и производственных условиях.

Для лабораторных испытаний приготовили 18 смешанных культур, состоящих из равного по объему количества суточных бульонных культур моракселл, стафилококков, эшерихий и сальмонелл, а также смыва с агара Сабуро культуры Aspergillus Нигер. В каждом из 18-ти случаев для приготовления смешанных культур использовали различные изоляты как моракселл, так и представителей сопутствующей микрофлоры (за исключением гриба Aspergillus Нигер, который был представлен 3-мя изолятами).

Смешанные культуры в разведении 1:10 на стерильном физиологическом растворе высевали на испытуемую плотную питательную среду методом Дригальского. Посевы инкубировали при 37^{0} С и учитывали

результаты посевов через 24 и 48 часов инкубирования. В итоге в 13 случаях (72,2%) удалось получить рост Moraxella bovis в виде чистой культуры и в 5 случаях (27,8%) в виде смешанных культур с наличием изолированных от посторонней микрофлоры колоний моракселл, пригодных для отсева чистой На основании этих данных пришли к предварительному заключению о том, что предлагаемый состав плотной питательной среды обладает ингибирующими свойствами для посторонней микрофлоры, наиболее часто высевающейся ИЗ патологического материала инфекционном кератоконьюнктивите и не препятствует росту возбудителя болезни, т.е. среда обладает селективными в отношении Moraxella bovis свойствами.

Для испытания эффективности среды в производственных условиях в неблагополучных инфекционному кератоконьюнктивиту ПО рогатого скота хозяйствах различных регионов страны отобрали в общей сложности 583 образца патологического материала от клиническими признаками поражения глаз и которые не подвергались лечению антимикробными препаратами. Из каждой из проб делали высевы методом Дригальского (по три чашки Петри на пробу) на испытуемую плотную селективную питательную среду и параллельно аналогичным образом на кровяной агар Хоттингера. Чашки с посевами помещали в термостат и инкубировали при 37°C, учитывая результаты посевов через 24 и 48 часов.

При посевах проб патологическго материала на традиционно используемый в нашей стране для этих целей кровянной агар Хоттингера, Moraxella bovis удалось выделить из 101-ой пробы или в 17,32% случаев от числа исследованных проб. Этот результат сопоставим с данными, которые мы получили в наших исследованиях на их первичном этапе, когда происследовав 120 образцов патологического материала из неблагополучных по инфекционному кератоконьюнктивиту хозяйств различных регионов

страны, возбудитель болезни на кровяном агаре Хоттингера удалось выделить в 19,2 % случаев.

При бактериологическом исследовании 257 проб патологического материала на наличие Moraxella bovis выделили возбудителя болезни из 23 проб или в 18,36% случаев. Близкие к этому результаты были получены [137,23,25]. Автор, используя кровяной агар Хоттингера, исследовал патологический материал от клинически больного крупного рогатого скота различных возрастных групп и сообщает о следующих результатах: от коров бактериологическим исследованиям была подвергнута 841 проба и Moraxella bovis при этом была выделена из 16,91% образцов; от телок исследовано 917 проб и возбудитель был выделен из 14,87% образцов; от телят живой массой 190-230 кг исследовано 698 проб патологического материала и моракселлы удалось выделить из 17,36% образцов. Сообщают о том, что от коров, больных инфекционным кератоконьюнктивитом моракселлы им удалось выделить только из 9,9 % образцов, отобранных для бактериологических исследований [135]. В доступной нам литературе удалось обнаружить лишь одно сообщение, свидетельствующее о возможности получения более эффективных результатов бактериологических исследований при использовании обычных питательных сред. Сообщает, что при исследовании патологического материала с использованием кровяного агара Хоттингера им была изолирована культура Moraxella bovis от 48,2% больных телят с острым течением болезни и от 5,9% клинически здоровых животных [130].

Таким образом, результаты бактериологических исследований патологического материала от крупного рогатого скота с клиническими признаками инфекционного кератоконьюнктивита, полученные нами при использовании питательной среды не обладающей селективными свойствами, близки к результатам, о которых сообщает большинство авторов.

При посевах техже 583 проб патологическго материала на разработанную нами плотную селективную питательную среду Moraxella

bovis удалось выделить и идентифицировать в 285 образцах или в 48,89% случаев. При этом в сравнении с кровяным агаром Хоттингера снизилось число высевов из тех же образцов представителей основных сопутствующих микроорганизмов: стафилококков с 224-х до 134-х культур (с 38,42% до 22,98% случаев) или в 1,67 раза; эшерихий со 135-ти до 88-ми культур (с 23,15% до 15,09% случаев) или в 1,53 раза; сальмонелл со 123-х до 76-ти культур (с 21,10% до 13,04% случаев) или в 1,62 раза. Aspergillus Нигер на селективной среде не выявляли, тогда как на кровяном агаре Хоттингера он был обнаружен в 18 образцах патологического материала (3,1% случаев).

Таким образом, большом объеме подвергнутого на бактериологическим исследованиям патологического материала нами продемонстрированно, что вновь разработанная плотная питательная среда обладает селективными в отношении Moraxella bovis свойствами и ее использование позволяет увеличить частоту обнаружения возбудителя болезни в 2,82 раза в сравнении с использованием обычно применяемого в таких случаях кровяного агара Хоттингера. Данный эффект обусловлен тем, что входящие в состав предлагаемой среды спиктиномицин и резорцин в значительной степени подавляют рост и размножение сопутствующей микрофлоры и не оказывают существенного влияния на рост и размножение моракселл. Кроме того, в лабораторной практике плотная селективная питательная среда может эффективно использоваться для выделения чистой культуры Moraxella bovis из смешанных культур.

Следующий этап наших исследований преследовал своей целью сравнить основные биологические свойства изолятов Moraxella bovis, которые были выделены нами от животных с клиническими признаками инфекционного кератоконьюнктивита с использованием кровяного агара Хоттингера и с использованием вновь разработанной и предлагаемой нами для бактериологических исследований селективной питательной среды, а также сравнить эти свойства со свойствами данного вида бактерий, которые имеются в литературных источниках.

Изучив культуральные (на плотных и жидких питательных средах), ферментативные, морфологические и тинкториальные свойства различных изолятов, сравнив полученные данные между собой и с данными литературы, мы пришли к выводу, что использование в селективной питательной среде в предложенных концентрациях спиктиномицина и резорцина, не влечет за собой изменения его (возбудителя) основных биологических свойств. Все испытанные изоляты, выделенные на селективной питательной среде Moraxella и сохраняли типичные для рода вида Moraxella bovis морфологические, культуральные, тинкториальные биохимические свойства что позволяет осуществлять достоверную видовую идентификацию возбудителя болезни, включая и внутриродовую дифференциацию Moraxella bovis от других представителей рода Moraxella.

До настоящего времени дискуссионным остается вопрос о том, яляется ли Moraxella bovis условно-патогенным микроорганизмом или этот вид бактерий следует относить к безусловным патогенам.

Первая точка зрения базируется на результатах экспериментов, в которых при заражении путем инсталлирования больших доз культуры Moraxella bovis на слизистую оболочку глаза здоровым коровам развивался лишь слабовыраженный кератоконъюнктивит. При введении же возбудителя в сочетании с содержанием животных в зоне действия ультрафиолетовых лучей, развивалась тяжелая форма кератоконъюнктивита, который не отличался от спонтанных случаев заболевания. Из этих результатов делаются выводы о том, что Moraxella bovis проявляет свои патогенные свойства в случаях понижения резистентности конъюнктивы и роговицы, при снижении антибактериальных свойств секрета слезной железы, а также в случае попадания возбудителя на травмированные коньюнктиву или роговицу [92,130,142]. Устойчивость данной точки зрения, по нашему мнению, связана инфекционном кератоконьюнктивите еще И тем, что при патологического материала помимо моракселл выделяется разнообразная сопутствующая микрофлора, что обсуждалось нами выше.

Иная точка зрения опирается на исследования, связанные с изучением наличия у Moraxella bovis факторов патогенности.

К основным из них большая часть исследователей относит способность возбудителя формировать на поверхности наружной мембраны клетки фимбрии, обеспечивающие адгезию бактерий к эпителию роговицы и конъюнктивы, а также питтин - фактор для пенетрации (проникновения) в клетки роговицы. Он же вызывает и депрессию клеток роговицы. Фимбрии (или пили) экспериментальных условыях выявляют клеток, формирующих на плотных питательных средах (на кровяном агаре) шероховатые (R – формы) колоний [121,69,106,107]. Установлено, что бактерии, не образующие пили, адгезивную способность в условиях эксперимента не проявляют. Считают феномен пилеобразования ведущим фактором вирулентности и иммуногенности Moraxella bovis [57,63,66,116]. В пользу данной точки зрения свидетельтвуют и публикации, которые сообщают, что при нанесении телятам на конъюнктиву глаза Moraxella bovis в фазе пилеобразования у зараженных животных развивалась тяжелая форма кератоконъюнктивита, а при заражении телят культурой возбудителя без пилей заболевание сопровождалось слабыми патологическими явлениями [98,60].

Из работ следует, что патогенный потенциал моракселл реализуется и посредством таких факторов инвазии возбудителя, как продуцируемые ими гемолизин и различные гидролазы, включая гиалуронидазу, фибринолизин, аминопептидазу и фосфотазу, и что наличие этих свойств, степень их выраженности и определяют патогенность и вирулентность конкретной популяции моракселл [77,85,119]. Установлено, что гемолитические штаммы Moraxella течении bovis обнаруживаются при остром болезни, негемолитические выделяются от животных с умеренными формами болезни бессимптомном проявления И при носительстве [124,77,60,102,123,111,23,25]. O наиболее выраженной патогенности моракселл, продуцирующих гемолизин, в том числе и для лабораторных

животных различных видов, о наличии у них цитотоксического действия на нейтрофилы крупного рогатого скота, а также цитопатического действия на культуры клеток нейтрофилов и роговицы глаза крупного рогатого скота сообщают [60,136,132,91,23,25].

Исходя из вышеизложенного практически важным представлялось изучить патогенные свойства выделенных на плотной селективной питательной среде Moraxella bovis.

С этой целью заражали как естественно восприимчивых животных (телят 2 — 3-месячного возраста и живой массой менее 180 кг), так и лабораторных животных (белых беспородных мышей живой массой 14-16 г).

Для заражения тех и других животных использовали различные изоляты выделенных нами моракселл, которые формировали на кровяном агаре Хоттингера R-формы колоний и обладавшие гемолитической активностью.

Телят четырех опытных групп (всего 36 голов) заражали суспензией моракселл концентрацией 9-10 млрд. микробных клеток в 1 см³, которую готовили из суточной культуры, выращенной на кровяном агаре Хоттингера с дрожжевым экстрактом при температуре +37°C. С этой целью указанную суспензию в объеме 0,5 см³ вводили в нижний конъюнктивальный мешок левого глаза заражаемого животного. Телятам контрольных групп (всего 36 голов) в нижний конъюнктивальный мешок левого глаза вводили по 0,5 см³ стерильного физиологического раствора. Заражающую дозу выбирали на основании литературных данных. За животными наблюдали в течение 30 дней после заражения. На этапе развития кератоконъюнктивита с серозногнойными истечениями (в большинстве слусаев спустя 23-25 дней после заражения) у больных телят отбирали серозно-гнойные истечения из глаз для бактериологических исследований. Пробы экссудата в аналогичные сроки отбирали и у телят опытных и контрольных групп не имевших клинических признаков заболевания. Материал высевали на плотную селективную питательную среду с целью реизоляции возбудителя болезни.

В итоге были получены следующие результаты. У 24 опытных телят (в 66,7% случаев) удалось воспроизвести клинически выраженную болезнь, и ЭТОМ были получены клинические признаки инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, которые были аналогичны наблюдаемым при заражении животных в естественных условиях. От всех животных опытных групп, включая телят без клинических признаков болезни, удалось реизолировать исходные культуры возбудителя. Последний факт мы склонны объяснять тем, что эти животные в указанные выше сроки проведения опыта, являлись бактерионосителями. Данное предположение основано на том, что о бессимптомном носительстве Moraxella bovis у инфицированного в естественных условиях крупного рогатого скота сообщают [62,92,60], что из 36 контольных телят в период наблюдения не заболел ни один теленок.

Результаты исследований по изучению патогенности выделенных нами изолятов Moraxella bovis для телят полностью согласуются с многочисленными данными об успешном экспериментальном воспроизведении болезни на крупном рогатом скоте.

Так сообщают, что для заражения телят они использовали культуры, находящиеся в стадии пилеобразования и культуры без пилей [98]. В первом случае y зараженных животных отмечался ярко выраженный кератоконьюнктивит, а во втором случае заболевание сопровождалось слабо явлениями. Сообщают выраженными клиническими об успешном воспроизведении болезни на телятах-гнотобиотах [132]. Об успешном экспериментальном воспроизведении инфекционного кератоконьюнктивита на крупном рогатом скоте свидетельствуют также работы [100,23,25].

Для постановки опыта на мышах были сформированы восемь групп (четыре опытные и четыре контрольные) по 13 голов в каждой группе. Опытных мышей заражали подкожно, путем введения 0,5 см³ суспензии суточной культуры соответствующего изолята Moraxella bovis, полученной на кровяном агаре Хоттингера с дрожжевым экстрактом и концентрацией

возбудителя 4-5 млрд. микробных клеток в 1 см³. Контрольным мышам аналогичным образом вводили по 0,5 см³ стерильного физиологического раствора.

В течение 10-дневного срока наблюдения было установлено, что все 100% опытных мышей (52 головы) заболели, а 44 из них (84,6%) пали в период до 72 часов после заражения. Ни у одной из 52 контрольных мышей клинических проявлений патологии не отмечали и все они остались живыми.

Результаты, полученные нами в данной части исследований, согласуются с сообщениями отечественных и зарубежных авторов о патогенности Moraxella bovis для лабораторных животных.

Сообщает, что при подкожном заражении белых мышей гемолитическими культурами моракселл в течение1-3 дней после заражения отмечалась гибель 88% животных [60]. Гемолитические культуры при введении в мошонку кролику вызывали восполительную реакцию и некроз ткани.

Изучал патогенность гемолитических культур Moraxella bovis для белых беспородных мышей и установил, что при подкожном введении 0,5 см³ суспензии культуры концентрацией 4-5 млрд микробных клеток в 1 см³] в течение 24 – 72 часов погибли 84,2% зараженных животных [23,25].

Провела заражение лабораторных животных выделенными клинически больного крупного рогатого скота гемолитическими культурами Moraxella bovis [4]. У зараженных белых мышей и морских свинок развились поражения конъюнктивы, отмечались некроз ткани на месте инъекции, токсический шок и последующая гибель животных. При внутриглазном введении культур возбудителя кроликам развивался конъюнктивит, гиперемия сосудов по окружности роговицы с полным ее помутнением, а введение моракселл в мошоночный мешок вело к развитию некроза тканей.

Таким образом, как при заражении естественно восприимчивых животных (телят 2-3-месячного возраста), так и при заражении лабораторных животных (белых беспородных мышей живой массой 14-16 г) изолятами

Могахеlla bovis, выделенными от крупного рагатого скота с клиническими признаками инфекционного кератоконьюнктивита, с использованием вновь разработанной плотной селективной для Moraxella bovis питательной среды показано, что испытанные изоляты обладают выраженными патогенными свойствами. В период наблюдения за зараженными телятами заболеваемость среди них составила 66,7%. Заболеваемость же зараженных мышей составила 100% при летальности 84,6%.

Данные, свидетельствующие 0 TOM, ЧТО выделенные ИЗ патологического материала от крупного рогатого скота с клиническими признаками инфекционного кератоконьюнктивита с использованием вновь селективной предложенной плотной питательной среды изоляты возбудителя, сохраняют типичные для рода Moraxella и вида Moraxella bovis культуральные, морфологические, тинкториальные И биохимические свойства, а также тот факт, что по своей патогенности для лабораторных животных (белых мышей) и крупного рогатого скота они не отличаются от бактерий, выделенных с использованием кровяного агара Хоттингера, позволяют нам сделать заключение о возможности использования их для разработки средств специфической профилактики и диагностики болезни.

Представленные в нашей работе экспериментальные данные, их анализ 12и обсуждение с учетом доступной нам отечественной и мировой литературы, прямо или косьвенно касающейся тематики проведенных нами исследований, позволили нам сформулировать представленные ниже выводы и сформировать предложения для практического использования результатов данной работы.

4. ВЫВОДЫ

- 1. Основной средой, применяемой в Российской Федерации для выделения возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, является кровяной агар Хоттингера. Используя эту среду для исследования 120 проб материала от животных с клиническими признаками болезни из неблагополучных по инфекционному кератоконъюнктивиту крупного рогатого скота хозяйств средняя частота обнаружения Moraxella bovis составила 19,2%, а в различных хозяйствах этот показатель варьировал в пределах от 16,7% до 22,2%.
- 2. В патологическом материале от животных с клиническими признаками инфекционного керотоконъюнктивита крупного рогатого скота в 100% случаев кроме возбудителя болезни (Moraxella bovis) выявляется сопутствующая микрофлора. При этом наиболее часто встречаются бактерии родов Staphylococcus, Escherichia и Salmonella.
- 3. Частота обнаружения представителей сопутствующей микрофлоры может превышать частоту обнаружения возбудителя болезни. Так средняя частота обнаружения Staphylococcus aureus составила 39,1% и варьировала в разных хозяйствах в пределах от 27,8% до 50%. Соответствующие показатели составили: для Escherichia coli 22,5% и 16,7% 27,8%; для Salmonella dublin 19,2% и 9,5% 33,3%; для Aspergillus niger 2,5% и 0 6,6%.
- 4. Изучена чувствительность культур Moraxella bovis и сопутствующей микрофлоры к антибактериальным химиотерапевтическим средствам. Установленные в ходе исследований различия в чувствительности к спиктомицину и резорцину позволили испытать их с положительным результатом в качестве компонентов плотной селективной для Moraxella bovis питательной среды.
- 5. Научно обоснован компонентный состав, разработана и апробирована плотная селективная для Moraxella bovis питательная среда для

изоляции из патологического материала и выделения из смешенных культур чистых культур возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Для использования в этих целях в лабораторной практике предложена среда следующего состава: перевар Хоттингера — 790 мл; пептон — 10г; натрия хлорид — 5 г.; агар-агар — 20 г; дефибринированная кровь крупного рогатого скота — 10% к объему среды; экстракт пекарских дрожжей — 10% к объему среды; 0,2% -й раствор спиктиномицина — 5 см³; 0,5-й раствор резорцина — 5 см³.

- 6. При изучении эффективности плотной селективной питательной условиях неблагополучных инфекционному среды ПО кератоконъюнктивиту крупного рогатого скота хозяйств проведено 583 проб патологического материала от клиническими признаками болезни и установлено, что по сравнению с Хоттингера кровяным агаром частота выделения Moraxella увеличивается со 101 –й до 285 культур (с 17,32% до 48,89% случаев) или в 2,82 раза при одновременном снижении частоты обнаружения сопутствующих микроорганизмов: стафилококков с 224-х до 134-х культур (с 38,42% до 22,98% случаев) или в 1,67 раза; эшерихий со 135-ти до 88-ми культур (с 23,15% до 15,09% случаев) или в 1,53 раза; сальмонелл со 123-х до 76-ти культур (с 21,10% до 13,04% случаев) или в 1,62 раза.
- 7. Бактерии, выделенные ИЗ патологического материала c использованием вновь предложенной плотной селективной питательной среды, сохраняют типичные для рода Moraxella и вида Moraxella bovis морфологические, культуральные, тинкториальные биохимические свойства. По своей патогенности для лабораторных животных (белых мышей) и крупного рогатого скота они не отличаются от бактерий, выделенных cиспользованием кровяного агара Хоттингера, что обуславливает возможность их использования для разработки средств специфической профилактики и диагностики болезни.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

- 1. На основании материалов диссертации разработаны:
- «Методические рекомендации по приготовлению и применению плотной селективной питательной среды для изоляции из патологического материала культур Moraxella bovis возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогато скота и выделения его чистой культуры» (приложение № 1), которые рассмотрены и одобрены на заседании секции «Инфекционная патология животных» Отделения ветеринарной медицины РАСХН 15 июля 2014 года. Протокол №3 (приложение №2).
- 2. Результаты экспериментальных исследований, полученные в ходе выполнения работы используются в курсе лекций и при проведении лабораторно-практических занятий студентам факультета ветеринарной медицины Белгородского Государственного аграрного университета имени В. Я. Горина.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоусов, Ю. Б. Выбор антибактериальной терапии при лечении инфекций у лиц пожилого возраста [Текст] / Ю. Б. Белоусов, В. П. Комаров, О. В. Ефременкова // Антибиотики и химиотерапия. 1998. Т. 43, № 10. С. 19-23.
- 2. Бессарабов, Б. Ф. Инфекционные болезни животных [Текст] / Б. Ф. Бессарабов, А. А. Вашутин, Е. С. Воронин ; под ред. А. А. Сидорчука. Москва :КолосС, 2007. 671 с.
- 3. Бриан, Л. Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам [Текст] / Л. Е. Бриан ;пер. с англ. А. Я. Ивлевой. Москва: Медицина, 1984. 270 с. : ил.
- 4. Валебная, Л. В. Биологическая характеристика бактерий Moraxellabovis и клинико-эпизоотологические особенности инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота [Текст] :автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 : 16.00.02 / Л. В. Валебная. Казань, 2007. 26 с. : ил.
- 5. Ветеринарное законодательство [Текст] : Ветеринарный устав Союза ССР, положения, указания, инструкции, наставления, правила по ветеринарному делу: в 4 т. / под ред. А. Д. Третьякова. Москва :Агропромиздат, 1972-1988. Т. 4. Москва, 1988. 672 с.
- б. Дворецкий, Б. М. Способ определения нитратредуктазы у энтеробактерий на плотной питательной среде [Текст] / Б. М. Дворецкий,
 А. И. Блинов // Лабораторное дело. 1991. № 9. С. 71-72.
- 7. Дрожжина, А. С. Этиология конъюнктивокератита в ОАО Агрокомплекс «Гиагинский им. Ю. Х. Тхайцухова» и ОАО ГПЗ «Гулькевичский» [Текст] / А. С. Дрожжина, М. В. Назаров, И. А. Родин // Ветеринария Кубани. 2013. \mathbb{N} 4. С. 5.
- 8. Зубков, М. Н. Биологические особенности бактерий рода Moraxella и их этиологическая роль в патологии человека [Текст] / М. Н. Зубков // Лабораторное дело. 1987. N 9. C. 50-51.

- 9. Зубков, М. Н. Биологические особенности бактерий рода
 Могахеlla и их этиологическая роль в патологии человека [Текст]. Сообщ. 2 /
 М. Н. Зубков // Лабораторное дело. 1988. № 3. С. 15-18.
- Зубков, М. Н. Характеристика серологических свойств бактерий рода Moraxella [Текст] / М. Н. Зубков // Лабораторное дело. 1990. № 7. С. 64-66.
- Иванова, Г. А. Пробактерии стафилококка [Текст] / Г. А. Иванова
 // Медицина. 2005. № 8. С. 36-38.
- 12. Изоляция Moraxellabovis от молодняка крупного рогатого скота с инфекционнымкератоконъюнктивитом [Текст] / В. Н. Карайченцев, Г. В. Дунаев, А. Ф. Русинов [и др.] // Ветеринария. 1992. № 2. С. 26-27.
- 13. Инфекционные болезни животных [Текст] : справ. / сост.: Ю. Ф. Борисович, Л. В. Кириллов ; под ред. Д. Ф. Осидзе. Москва :Агропромиздат, 1987. 288 с.
- 14. Инфекционные кератоконъюнктивиты крупного рогатого скота [Текст] / В. Б. Борисевич, Б. В. Борисевич, П. Д. Солонин [и др.] // Ветеринария. 2006. N 1. С. 18-19.
- 15. Кератоконъюнктивиты крупного рогатого скота [Текст] / В. Б. Борисевич, Б. В. Борисевич [и др.] // Ветеринария. 2004. № 2. С. 21-23.
- 16. Карайченцев, В. Н. Борьба с инфекционным кератоконъюнктивитом крупного рогатого скот резерв увеличения производства продуктов животноводства [Текст] / В. Н.Карайченцев// Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения : материалы VIIмеждунар. науч.-произв. конф., Белгород, 25-28 марта 2003 г. : в 2 ч. / БГСХА. Белгород, 2003. Ч. 1: Агрономия.Ветеринария.Животноводство. С. 162-163.
- 17. Карайченцев, В. Н. Выделение и идентификация возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота [Текст] / В. Н. Карайченцев // Проблемы сельскохозяйственного производства на

- современном этапе и пути их решения : материалы VIIIмеждунар. науч.произв. конф., Белгород, 30 марта-1 апр. 2004 г. / БелГСХА. – С. 54-55.
- 18. Карайченцев, В. Н. Диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого Moraxellabovis [Текст] / В. Н. Карайченцев // Актуальные проблемы эпизоотологии на современном этапе : материалы междунар. науч.-практ. конф., Санкт-Петербург, 15-18 нояб. 2004 г. / Санкт-Петерб. гос. акад. вет. медицины ; отв. ред. А. А. Стекольников. Санкт-Петербург, 2004. С. 48-49.
- 19. Карайченцев, В. Н. Диагностика инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота [Текст] / В. Н. Карайченцев // Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения : материалы VIIмеждунар. науч.-произв. конф., Белгород, 25-28 марта 2003 г. : в 2 ч. / БГСХА. Белгород, 2003. Ч. 1: Агрономия.Ветеринария.Животноводство. С. 163-164.
- 20. Карайченцев, В. Н. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота [Текст] / В. Н. Карайченцев // Животноводство и ветеринария : материалы межвуз. конф., Белгород, 1995 г. / Белгород. ГСХА ; ред. кол.: Г. И. Горшков [и др.]. Белгород, 1995. С. 82-84.
- 21. Карайченцев, В. Н. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, вызываемый Moraxellabovis [Текст] / В. Н. Карайченцев // Возрастная физиология и патология сельскохозяйственных животных : материалы междунар. науч. конф., посвящ. 90-летию проф. В. Р. Филиппова, Улан-Удэ, 25-27 июня 2003 г. : в 2 ч. / Правительство Республики Бурятия, М-во образования и науки РБ, М-во сел.хоз-ва и продовольствия РБ [и др.]. Улан-Удэ, 2003. Ч. 1. С. 117.
- 22. Карайченцев, В. Н. Клинические признаки инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота [Текст] / В. Н. Карайченцев // Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения : материалы VIIмеждунар. науч.-произв. конф., Белгород, 25-28

- марта 2003 г. : в 2 ч. / БГСХА. Белгород, 2003. Ч. 1: Агрономия.Ветеринария.Животноводство. – С. 164-165.
- 23. Карайченцев, В. Н. Лабораторная диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота [Текст] / В. Н. Карайченцев // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2005. № 6. С. 51-52.
- 24. Карайченцев, В. Н. Лабораторная диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота [Текст] / В. Н. Карайченцев // Новые фармакологические средства в ветеринарии : материалы XIVмеждунар. науч.-практ. конф. / СПбГАВМ, НИИ ветеринарной фармации «Эврика» ; отв. ред. В. Д. Соколов. Санкт-Петербург, 2002. С. 26.
- 25. Карайченцев, В. Н. Определение нитратредуктазы у Moraxellabovis [Текст] / В. Н. Карайченцев // Ветеринария. 2005. № 11. С. 30-31.
- 26. Карайченцев, В. Н. Система мероприятий борьбе ПО инфекционным кератоконьюнктивитом крупного рогатого скота [Текст] / В. Н. Карайченцев // Актуальные проблемы ветеринарной медицины : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 60-летию фак. ветеринарной медицины УГСХА, Ульяновск, 25-26 сент. 2003 г.: в 2 ч. / Ульянов. гос. с.-х. акад. – Ульяновск, 2003. – Ч. 1. – С. 143.
- 27. Карайченцев, В. Н. Характеристика Moraxellabovis, выделенных от крупного рогатого скота [Текст] / В. Н. Карайченцев // Возрастная физиология и патология сельскохозяйственных животных : материалы междунар. науч. конф., посвящ. 90-летию проф. В. Р. Филиппова, Улан-Удэ, 25-27 июня 2003 г. : в 2 ч. / Правительство Республики Бурятия, М-во образования и науки РБ, М-во сел.хоз-ва и продовольствия РБ [и др.]. Улан-Удэ, 2003. Ч. 2. С. 118-119.
- 28. Карайченцев, В. Н. Этиология инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота [Текст] / В. Н. Карайченцев // Актуальные проблемы ветеринарной медицины : материалы междунар.

- науч.-практ. конф., посвящ. 60-летию фак. ветеринарной медицины УГСХА, Ульяновск, 25-26 сент. 2003 г.: в 2 ч. / Ульянов. гос. с.-х. акад. Ульяновск, 2003. Ч. 1. С. 122.
- 29. Кирьянов, Е. А. Колибактериоз животных и его профилактика [Текст] / Е. А. Кирьянов, А. Т. Больных ;Примор. с.-х. ин-т. Уссурийск [б.и.], 1986. 46 с.
- 30. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований [Текст] : учеб. для учащихся фельдшер.-лаборант. отд-ний мед. училищ / А. С. Лабинская. 4-е изд., перераб. и доп. Москва : Медицина, 1978. 394 с.
- 31. Лекарственные средства [Текст] : справ.лекарств. средств, отпускаемых по рецепту врача (фельдшера) при оказании доп. мед. помощи отдельным категориям граждан, имеющих право на получение гос. соц. помощи / Федер. служба по надзору в сфере здравоохранения и соц. развития ; отв. ред. Л. Е. Зиганшина. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2003- Вып. 3. Москва, 2006. 753 с.
- 32. Люцканов, М. Инфекциозенкератоконъюнктивит при младитеговеда = Инфекционный кератоконъюнктивит у молодняка крупного рогатого скота [Текст] / М. Люцканов // Ветеринарнасбирка. София, 1987. Т. 85, № 2. С. 30-31.
- 33. Механизмы устойчивости к хинолонам и современный уровень чувствительности клинически значимых микроорганизмов к офлоксацину [Текст] / С. В. Сидоренко, С. П. Резван, А. Н. Макарова [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. − 1996. − Т. 41, № 9. − С. 33-38.
- 34. Навашин, С. М. Рациональная антибиотикотерапия [Текст] : справ. / С. М. Навашин, И. П. Фомина. 4-е изд., перераб. и доп. Москва : Медицина, 1982. 495 с. : табл.
- 35. Практические аспекты современной клинической микробиологии [Текст] / Л. З. Скала, С. В. Сидоренко, А. Г. Нехорошева [и др.]. Тверь :Триада, 2004. 312 с.

- 36. Препарат для лечения и профилактики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота и способы его применения [Текст]: пат. 2381802 Рос. Федерация: МПК А61К 33/04, А61К 35/12, А61К 35/407, А61К 35/64, А61К 36/28, А61К 36/81, А61К 31/04 / Н. Н. Шкиль, Н. А. Шкиль, О. А. Рожков [и др.]; патентообладатель Гос. науч. учреждение «Инт эксперим. ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибир. отднияРоссельхозакад.» (ГНУ ИЭВСиДВ СО Россельхозакадемии). № 2008144233/15; заявл. 06.11.2008; опубл. 20.02.2010, Бюл. № 5. 7 с.
- 37. Результаты многоцентрового исследования чувствительности стафилококков к антибиотикам в Москве и Санкт-Петербурге [Текст] / С. В. Сидоренко, С. П. Резван, С. А. Грудинина [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. 1998. N 2. C. 15-25.
- 38. Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] : для биол. фак. ун-тов / М. Н. Пименова, Н. Н. Гречушкина, Л. Г. Азова [и др.] ; под ред. Н. С. Егорова. 2-е изд. Москва : МГУ, 1983. 221 с. : ил.
- 39. Русинов, А. Ф. Дифференциальная диагностика массового кератоконъюнктивита у крупного рогатого скота на животноводческих комплексах [Текст] / А. Ф. Русинов // Совершенствование мер борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных : темат. сб. науч. тр. / Харьков.с.-х. ин-т им. В. В. Докучаева ; Харьков. зоовет. ин-т им. Н. М. Борисенко ; отв. ред. В. К. Чернуха. Харьков, 1986. С. 64-67.
- 40. Русинов, А. Ф. Инфекционный кератоконъюнктивит у крупного рогатого скота [Текст] / А. Ф. Русинов // Ветеринария : респ. межведомств. темат. науч. сб. / М-во сел.хоз-ва УССР. Киев, 1983. Вып. 57. С. 23-24.
- 41. Русинов, А. Ф. Кератоконъюнктивитыу крупного рогатого скота в условиях современных животноводческих комплексов [Текст] / А. Ф Русинов // Ветеринария :респ. межведомств. темат. науч. сб. / Гос. агропром. ком. УССР. Киев, 1987. Вып. 62. С. 54-56.
- 42. Русинов, А. Ф. Массовые керато-конъюнктивиты у крупного рогатого скота и их диагностика [Текст] / А. Ф Русинов //

- Совершенствование мер борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных : темат. сб. науч. тр. / Харьков.с.-х. ин-т им. В. В. Докучаева ; Харьков. зоовет. ин-т им. Н. М. Борисенко ; отв. ред. В. К. Чернуха. Харьков, 1986. С. 15-21.
- 43. Русинов, А. Ф. Массовые кератоконъюнктивиты у крупного рогатого скота и их диагностика [Текст] / А. Ф Русинов // Болезни глаз сельскохозяйственных животных и методы лечения : учеб.пособие / А. Ф. Русинов ; Харьк. с.-х. ин-т им. В. В. Докучаева. Харьков, 1987. 106 с.
- 44. Сиволодский, Е. П. Ускоренное определение нитратредуктазынеферментирующих грамотрицательных бактерий [Текст] / Е. П. Сиволодский, М. Т. Кудакаев // Лабораторное дело. 1991. № 1. С. 61-63.
- 45. Справочник по клинической фармакологии и фармакотерапии [Текст] / под ред. И. С. Чекмана [и др.]. Стер.изд. Киев : Здоров'я, 1987. 733 с. : ил.
- 46. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования [Текст] / сост.: М. О. Биргер, Е. А. Ведьмина, В. В. Влодавец [и др.]; под ред. М. О. Биргера. 3-е изд., перераб. и доп. Москва : Медицина, 1982. 462 с. : ил.
- 47. Условно-патогенные микроорганизмы рода Moraxella [Текст] / О. Ю. Николаенко, Л. З. Гриценко, Н. В. Жадинский [и др.] // Медикосоциальные проблемы семьи. Донецк, 2011. Т. 16, № 1. С. 116-121.
- 48. Чувствительность к антибактериальным препаратам сальмонелл, выделенных из различных источников в Санкт-Петербурге и Ленинградской области [Текст] / Н. С. Козлова, В. П. Иванов, В. А. Кузьмин [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. − 1995. − Т. 40, № 3. − С. 35-42.
- 49. Чувствительность к антибиотикам микроорганизмов, выделенных от больных острыми кишечными инфекциями [Электронный ресурс] / О. В. Стольникова, В. А. Гречко, А. И. Носатенко [и др.] // Провизор. − 1999. − № 5. − Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/1999/N5/grechko.php.

- 50. Щербакова, Е. П. Зависимость иммунореактивности крупного рогатого скота от стресса в ООО «Агрофирма Калининское» Брединского района Челябинской области [Текст] / Е. П. Щербакова, Т. Н. Шмякина, П. Н. Щербаков // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2012. № 5 (91). С. 95-96.
- 51. Щербакова, Е. П. Совершенствование и повышение эффективности специфической профилактики конъюнктиво-кератита крупного рогатого скота [Текст] : автореф. дис. ... канд. ветеринар.наук : 06.02.04 / Е. П. Щербакова. Троицк, 2013. 19 с.
- 52. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных [Текст] : учебник для студентов высш. с.-х. учеб.заведений по спец. «Ветеринария» / ред. И. П. Конопаткин. Москва : Колос, 1984. 544 с. (Учебники и учеб.пособия для высш. с.-х. учеб. заведений).
- 53. A national survey of the clinical features, treatment and importance of infectious bovine keratoconjunctivitis [Text] / D. H. Slatter, M. E. Edwards, C. D. Hawkins [et al.] // Aust. Vet. J. − 1982. − Vol. 59, № 3. − P. 69-72.
- 54. Adinarayanan, N. Infectious bovine keratitis with special reference to isolation of Moraxella bovis [Text] / N. Adinarayanan, S. B. Singn // Vet. Res. 1961. Vol. 73. P. 694-696.
- 55. Aikman, J. G. Experimental production of infectious bovine keratoconjunctivitis [Text] / J. G. Aikman, E. M. Allan, J. E. Selman // Vet. Rec. − 1985. Vol. 117, № 10. P. 234-239.
- 56. Allen, J. A. A preliminary note on infectious keratitis [Text] / J. A. Allen // J. Am. Vet. Med. Assoc. 1919. Vol. 7, № 4. P. 307-313.
- 57. Annuar, B. O. Adherence of Moraxella bovis to cell cultures of bovine origin [Text] / B. O. Annuar, G. E. Wilcox // Res. Vet. Sci. − 1985. − Vol. 39, № 2. − P. 241-246.
- 58. Antibiotic susceptibility of Moraxella bovis recovered from outbreaks of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in Argentina, Brazil and Uruguay

- between 1974 and 2001 [Text] / F. R. Conceicao, D. M. Bertoncelli, O. B. Storch [et al.] // Braz.J.Microbiol. 2004. Vol. 35, № 4. P. 364-366.
- 59. Arora, A. K. Studies on Moraxella bovis isolated from cattle affected with or convalescing from infectious bovine keratokonjunctivitis [Text] / A. K Arora // Vet. Arh. − 1989. − Vol. 59, № 1. − P. 17-23.
- 60. Arora, A. K. Toxic effects of Moraxella bovis and their relationship to the pathogenesis of infectious bovine keratoconjunctivitis[Text] / A. K. Arora // Vet. Arh. 1982. Vol. 52, № 5. P. 175-182.
- 61. Arp, L. H.Bacterial infection of mucosal surfaces: an overview of cellular and molecular mechanisms [Text] / L. H. Arp // Virulence mechanisms of bacterial pathogens / ed. J. A. Roth. Washington, D.C., 1988. P. 3-27.
- 62. Barner, R. D. A study of Moraxella bovis and its relation to bovine keratitis [Text] / R. D Barner // Am. J. Vet. Res. 1952. Vol.13, № 47. P. 132-144.
- 63. Bart, T. Isolierung von Moraxellabovis bei Rindern mit Infektiöser Boviner Keratokonjunktivitis [Text] / T. Barth, K. Taurek, W Wittig // MonatsheftefürVeterinärmedizin (Mh. Vet.-Med.). − 1986. − Bd. 41, № 10. − S. 329-330.
- 64. Bateman, K. G. A field trial of a pilated Moraxella bovisbacterin for the preventions of infectious bovine keratoconjunctivitis [Text] / K. G. Bateman, K. E. Leslie, T. P. Scholl // Can. Vet. J. − 1986. − Vol. 27, № 1. − P. 23-27.
- 65. Bedford, P. G. C. Ocular diseases [Text] / P. G. C. Bedford // Bovine medicine: diseases and husbandry / eds. A. H. Andrews, R. W. Blowey, H. Boyd [et al.]. Oxford, 2004. P. 917-926.
- 66. Bekämpfung derinfektiösenKeratokonjunktivitis des Rindes in einerJungrinderaufzuchtanlagedurch den Einsatzeinesbestandsspezifischen Moraxella-bovis-Impfstoffes [Text] / O. Deja, W. Müller, H. Bocklisch [et al.] // MonatsheftefürVeterinärmedizin (Mh. Vet.-Med.). − 1987. − Bd. 42, № 12. − S. 501-505.

- 67. Burns, B. M. Bovine infectious keratokonjunctivitis in different cattle breeds [Text] / B. M. Burns, C. J. Howitt, C. R. Esdale // Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 1988. Vol. 17. P. 150-153.
- 68. Buswell, J. F. Benzathinecloxacillin as a single topical treatment for keratoconjunctivitis [Text] / J. F. Buswell, R. J. Rywater, G. R. Hewett // Br. Cattle Vet. Assoc. Proc. 1982/1983. P. 163-170.
- 69. Chandler, R. L. Exposure of bovine cornea to different strains of Moraxella bovis and to other bacterial species in vitro [Text] / R. L. Chandler, K. D. Smith, B. A. Turfrey // J. Comp. Pathol. − 1985. − Vol. 95, № 3. − P. 415-423.
- 70. Chemical composition of lipopolysaccharide from Moraxella bovis [Text] / F. S. Araujo, C. S. Alviano, J. Angluster [et al.] // Vet. Microbiol. 1989. Vol. 20, № 2. P. 165-171.
- 71. Clinical veterinary microbiology [Text] / P. J. Quinn, M. E. Carter, B. Markey [et al.]. Longon: Mosby-Year Book, 1994. 648 p.: ills.
- 72. Coleman, R. E.Factors affecting the deposition of regurgitated materials onto a substrate by Musca autumnalis [Text] / R. E. Coleman, R. R. Gerhardt // J.Agr.Entomol. 1987. Vol. 4, N_2 3. P. 185-188.
- 73. Cox, P. J. Infectious bovine keratoconjunctivitis recent progress [Text] / P. J. Cox. // Vet. annu. 1984. Vol. 24. P. 75-79.
- 74. Cox, P. J. Infectious bovine keratoconjunctivitis: isolation of Moraxella bovis from two groups of young beef cattle in fly control field trials during 1981 [Text] / P. J. Cox, J. S. Liddell, A. D. Mattinson // Vet. Rec. − 1984. − Vol. 115, № 2. − P. 29-32.
- 75. Das R. G. Incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in an organized exotic farm in Orissa / R. G. Das, R. K. Patnaik, R. P. Misra, J. N Chowlhury. // Indian j. anim. Health. 1988. 27 P.133-135.
- 76. Development and evaluation of a multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of Moraxella bovis, Moraxella bovoculi and Moraxella ovis in pure culture isolates and lacrimal swabs collected from

- conventionally raised cattle [Text] / H. G. Shen, S. Gould, J. Kinyon [et al.] // J. Appl. Microbiol. -2011. Vol. 111, No 5. P. 1037-1043.
- 77. Elad, D. Moraxella ovis in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in Israel [Text] / D. Elad, I. Yeruham, M. Bernstein // Zentralbl. Veterinarmed. B. − 1988. − Vol. 35, № 6. − P. 431-434.
- 78. Endemic suppurative infection in rabbits [Text] / T. Popova, V. Manov, K. Genova [et al.] // Experimental Pathology and Parasitology. 2004. Vol. 7, № 3. P. 36-39. (Second International Conference «Bacterial, viral and parasitic infections in human and veterinary medicine», Sofia, Iune, 13-15, 2003).
- 79. Erdeger, J. Moraxella bovis in adherens ozelliklerinin hucre kulturlerinde incelenmesi [Text] / J. Erdeger, N. Aydin, A. Erturk // Ankara Univ.Veter. Fak. Derg. 1995. Vol. 42, № 4. P. 547-551.
- 80. Ergebnissezur Charakterisierung von Moraxellabovis und immunprophylaktische Masnahmen bei der Infektiosen Bovine Keratokonjuktivitis [Text] / T. Bart, K. Taurek, R.-M. Nacke [et al.] // Monatshefte für Veterinärmedizin (Mh. Vet.-Med.). 1988. Bd. 43, № 18. S. 641-645.
- 81. Eugster A.R. Veterinary outlook / A. R. Eugster // Cattleman 1984. 7. 1 .48-67p.
- 82. Evaluation of a vaccine prepared with adherent Moraxella bovis for the control of infectious bovine keratoconjunctivitis [Text] / C. Gil-Turnes, R. S. M. Souza, F. L. Araújo // Proceedings Fourteenth World Congress on Diseases of Cattle, Dublin, Ireland, August 26-29, 1986 : 2 vol. / World Association for Buiatrics; eds. by P. J. Hartigan, M. L. Monaghan. Dublin, 1986.
- 83. Evaluation of cytokines as adjuvants of infectious bovine keratoconjunctivitis vaccines [Text] / F. A. di Girolamo, D. J. Sabatini, R. A. Fasan [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. − 2012. − Vol. 145, № 1-2. − P. 563-566.
- 84. Experimental infectious bovine keratoconjunctivitis: effects of feeding colostrum from vaccinated cows on development of pinkeye in calves [Text] /

- G. W. Pugh, T. J. McDonald, K. E. Kopecky [et al.] // Am. J. Vet. Res. 1980. Vol. 41, № 10. P. 1611-1614.
- 85. Frank S. K. Hydrolytic enzymes of Moraxella bovis [Text] / S. K. Frank, J. D. Gerber // J. Clin. Microbiol. − 1981. − Vol. 13, № 2. − P. 269-271.
- 86. Gil-Turnes, C. Comparison of the prevalence of infectious bovine keratoconjunctivitis in Aberdeen Angus and Charolais cattle [Text] / C. Gil-Turnes, H. Bischoff // Proceedings Fourteenth World Congress on Diseases of Cattle, Dublin, Ireland, August 26-29, 1986 : 2 vol. / World Association for Buiatrics; eds. by P. J. Hartigan, M. L. Monaghan. Dublin, 1986.
- 87. Gil-Turnes, C. Moraxella bovishemagglutinins: effect of carbohydrates, heating and erythrocytes [Text] / C. Gil-Turnes, G. A. Ribeiro // Can. J. Comp. Med. 1985. Vol. 49, № 1. P. 112-114.
- 88. Gil-Turnes, C. Serotypes and antibiotic sensitivity of Moraxella bovis isolated from an outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis [Text] / C. Gil-Turnes, I. M. Albuquerque // Can. J. Comp. Med. − 1984. − Vol. 48, № 4. − P. 428-430.
- 89. Gil-Turnes, C. Serotypes and Antibiotic Sensitivity of Moraxella bovis isolated from an Outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis / Gil C.Turnes // Cam. J. Comp. Med.. 1985. Vol. 49, № 4. P. 257-259.
- 90. Haemagglutination by Neisseria ovis isolated from the eyes of sheep [Text] / J. Varga, L. Fodor, I. Hajtós [et al.] // Zentralbl. Veterinarmed. B. 1987. Vol. 34, № 3. P. 211-215.
- 91. Hanna, A. A. T. An outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis in Abu-Tamer dairy farm in Iraq [Text] / A. A. T. Hanna, H. A. Hussin, A. K. A. Taha // J. Biol. Sci. Res. − 1984. − Vol. 15, № 1. − P. 1-8.
- 92. Hughes, D. E. Ultraviolet radiation and Moraxella bovis in the etiology of bovine infectious keratoconjunctivitis [Text] / D. E. Hughes, G. W. Pugh, T. J. McDonald // Am. J. Vet. Res. − 1965. − Vol. 26, № 115. − P. 1331-1338.

- 93. Infectious bovine keratoconjunctivitis in cattle vaccinated and medicated against Moraxella bovis before parturition [Text] / G. W. Pugh, K. E. Kopecky, W. G. Kvasnicka [et al.] // Am. J. Vet. Res. − 1982. − Vol. 43, № 2. − P. 320-325.
- 94. Infectious bovine keratoconjunctivitis: comparison of infection, signs of disease and weight gain in vaccinated versus nonvaccinated purebred Hereford heifer calves [Text] / G. W. Pughr, T. J. McDonald, K. E. Kopecky [et al.] // Can. J. Vet. Res. − 1986. − Vol. 50, № 2. − P. 259-264.
- 95. Infectious bovine keratoconjunctivitis: comparison of infection, signs of disease and weight gain in vaccinated versus nonvaccinated purebred Hereford heifer calves [Text] / G. W. Pugh, T. J. McDonald, K. E. Kopecky [et al.] // Can. J. Vet. Res. − 1987. − Vol. 50, № 2. − P. 145-149.
- 96. Infectious bovine keratoconjunctivitis: evidence for genetic modulation of resistance in purebred Hereford cattle [Text] / G. W. Pugh, T. J. McDonald, K. E. Kopecky [et al.] // Am. J. Vet. Res. − 1986. − Vol. 47, № 4. − P. 885-889.
- 97. Infectious bovine keratoconjunctivitis: evidence for genetic modulation of resistance in purebred Hereford cattle [Text] / G. W. Pugh, T. J. McDonald, K. E. Kopecky [et al.] // Am. J. Vet. Res. − 1988. − Vol. 47, № 4. − P. 753-757.
- 98. Jayappa, H. G. Pathogenicity and immunogenicity of piliated and nonpiliated phases of Moraxella bovis in calves [Text] / H. G. Jayappa, C. Lehr // Am. J. Vet. Res. 1986. Vol. 47, № 10. P. 2217-2221.
- 99. Kagonyera, G. M. Cytopathic effects of Moraxella bovis on cultured bovine neutrophils and corneal epithelial cells [Text] / G. M. Kagonyera, L. W. George, R. Munn // Am. J. Vet. Res. 1989. Vol. 50, № 1. P. 10-7.
- 100. Kagonyera, G. M. Effects of Moraxella bovis and culture filtrates on 51Cr-labeled bovine neutrophils [Text] / G. M. Kagonyera, L. W. George, M. Miller // Am. J. Vet. Res. 1989. Vol. 50, № 1. P. 18-21.

- 101. Kagonyera, G. M. Light and electron microscopic changes in corneas of healthy and immunomodulated calves infected with Moraxella bovis [Text] / G. M. Kagonyera, L. W. George, R Munn // Am. J. Vet. Res. − 1988. − Vol. 49, № 3. − P. 386-389.
- 102. Kodjo, A. Identification of Moraxella bovis and related species from calves with IBK and goats by qualitative genetic transformation assay [Text] / A. Kodjo, P. Exbrayat, Y. Richard // Zentralbl. Veterinarmed. B. − 1994. − Vol. 41, № 5. − P. 336-343.
- 103. Kopesky, K. E. Infectious bovine keratoconjunctivitis: contact transmission [Text] / K. E. Kopecky, G. W. Pugh, T. J. McDonald // Am. J. Vet. Res. 1986. Vol. 47, № 3. P. 622-624.
- 104. Kopesky, K. E. Influence of ontdor winter environment on the course of infectious bovine keratoconjunctivitis [Text] / K. E. Kopecky, G. W. Pugh, T. J. McDonald // Am. J. Vet. Res. 1981. Vol. 42, № 11. P. 1990-1992.
- 105. Kopesky, K. E. Wavelength of ultraviolet radiation that enhances onset of clinical infectious bovine keratoconjunctivitis [Text] / K. E. Kopesky, G. W. Pugh, D. E. Hughes // Am. J. Vet. Res. − 1980. − Vol. 41, № 9. − P. 1412-1415.
- 106. Lehr, C. Controlling bovine keratoconjunctivitis with a piliated Moraxella bovisbacterin [Text] / C. Lehr, H. G. Jayappa, R. A. Goodnow // Vet. Med. 1985. Vol. 80, № 9. P. 96, 98-100.
- 107. Lehr, C. Serologic and protective characterization of Moraxella bovis pili [Text] / C. Lehr, H. G. Jayappa, R. A. Goodnow // Cornell. Vet. − 1985. Vol. 75, № 4. P. 484-492.
- 108. Leidner J. Shut the lid on pink eye / J. Leidner// Pror. Farmer 1987. 4. 24. 27 P.102.
- 109. Lepper, A. W. D. Characterisation and quantitation of pilus antigens of Moraxella bovis by ELISA [Text] / A. W. D. Lepper, L. R. Hermans // Aust. Vet. J. 1986. Vol. 63, № 12. P. 401-405.

- 110. Lepper, A. W. D. Vaccination against infectious bovine keratoconjunctivitis: protective efficacy and antibody response induced by pili of homologous and heterologous strains of Moraxella bovis[Text] / A. W. D. Lepper // Aust. Vet. J. 1988. Vol. 65, N 10. P. 310-316.
- 111. Marrion, R. M. Detection of cell detachment activity induced by Moraxella bovis [Text] / R. M. Marrion, L. K. Riley // Am. J. Vet. Res. 2000. Vol. 61, № 9. P. 1145-1149.
- 112. Mazoch, M. Nakažlivýzánětrohovky a spojivkyskotu, terapie a porovnáníúčinnostiléčby [Text] / M. Mazoch // Veterinářství. 1984. Roč. 34, № 4. S. 173-174.
- 113. Mcconnel, C. S. Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy [Text] / C. S. Mcconnel, L. Shum, J. K. House // Aust. Vet. J. 2007. Vol. 85, № 1-2. P. 65-69.
- 114. Miller, R. B. Infectious bovinekeratoconjunctivitis: an update [Text] / R. B. Miller, W. H. Fales // Vet. Clin. North. Am. Large Anim. Pract. 1984. Vol. 6, № 3. P. 597-608.
- 115. Mitter, S. N. Contagious ophthalmia among cattle [Text] / S. N. Mitter // Vet. J. 1915. Vol. 71. P. 28-29.
- 116. Moore, L. J. Attachment of Moraxella bovis to calf corneal cells and inhibition by antiserum [Text] / L. J. Moore, J. M. Rutter // Aust. Vet. J. 1989. Vol. 66, N 2. P. 39-42.
- 117. NeueUntersuchungenzurAtiologie und Therapie der infektiosenKeratokonjunkivitis des Rindes [Text] / O. Dietz, J. Wehr, R. Thalmann [et al.] // Monatshefte für Veterinärmedizin (Mh. Vet.-Med.). − 1983. − Bd. 38, № 22. − S. 843-847.
- 118. Novak, S. Vyznam Moraxella bovis pri infek cnej keratokonjunktivitide mladeho dobytka[Text] / S. Novak, A. Konradova, l. Rejko // Veterinářství. 1985. Roč.35, № 10. S. 468-469.

- 119. Ostle, A. G. Immunogenicity of Moraxella bovishemolysin[Text] / A. G. Ostle, R. F. Rosenbusch // Am. J. Vet. Res. 1985. Vol. 46, № 5. P. 1011-1014.
- 120. Ostle, A. G. Outer membrane protein antigens of Moraxella bovis[Text] / A. G. Ostle, R. F. Rosenbusch // Am. J. Vet. Res. 1986. Vol. 47, N_{\odot} 7. P. 1419-1421.
- 121. Pedersen, K. B. Fimbriation and colony type of Moraxella bovis in relation to conjunctival colonization and development of keratoconjunctivitis in cattle [Text] / K. B. Pedersen, L. O. Froholm, K. Bovre // ActaPathol. Microbiol. Scand. B. Microbiol. Immunol. 1972. Vol. 80, № 6. P. 911-918.
- 122. Pinkeye . Beware oild remedies Cattlemen / Pinkeye . 1982. 45 6-8 p.
- 123. Prieto, C. I. Analyses of lipopolysaccharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraspecies diversity in Moraxella bovis isolated in Argentina [Text] / C. I. Prieto, O. M. Aguilar, O. M. Yantorno // Vet. Microbiol. − 1999. Vol. 70, № 3-4. P. 213-223.
- 124. Pugh, G. W. Experimental bovine infectious keratoconjunctivitis caused by sunlamp irradiation and Moraxella bovis infection: correlation of hamolytic ability and pathogenicity [Text] / G. W. Pugh, D. E. Hughes // Am. J. Vet. Res. − 1968. − Vol. 29, № 4. − P. 835-839.
- 125. Pugh, G. W. Experimental infectious bovine keratoconjunctivitis: efficacy of a vaccine prepared from nonhemolytic strains of Moraxella bovis [Text] / G. W. Pugh, T. J. McDonald, K. E. Kopecky // Am. J. Vet. Res. − 1982. − Vol. 43, № 6. − P. 1081-1084.
- 126. Pugh, G. W. Identification of bovine carriers of Moraxella bovis by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions [Text] / G. W. Pugh, T. J. McDonald // Am. J. Vet. Res. − 1986. − Vol. 47, № 11. − P. 2343-2345.
- 127. Pugh, G. W. Infectious bovine keratoconjunctivitis: enhancement of Moraxella bovis pili immunogenicity with diphtheria-tetanus toxoids and pertussis

- vaccine [Text] / G. W. Pugh, K. E. Kopecky, T. J. McDonald // Am. J. Vet. Res. 1984. Vol. 45, № 4. P. 661-665.
- 128. Pugh, G. W. Infectious bovine keratoconjunctivitis: subconjunctival administration of a Moraxella bovis pilus preparation enhances immunogenicity [Text] / G. W. Pugh, K. E. Kopecky, T. J. McDonald // Am. J. Vet. Res. − 1985. − Vol. 46, № 4. − P. 811-815.
- 129. Pugh, G. W. Moraxella [Text] / G. W. Pugh // Handbuch der bakteriellenInfektionenbeiTieren / hrsg.: H. Blobel, Th. Schliesser. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 1979-1985. Bd. 3. Jena, 1981. S. 214-248.
- 130. Pugh, G. W. The isolation and characterization of Moraxella bovis / G. W. Pugh, D. E. Hughes, T. J. McDonald // Am. J. Vet. Res. 1966. Vol. 27, № 119. P. 957-962.
- 131. Rogers, D. G. Conjunctival lesions caused by Moraxella bovis in gnotobiotic calves [Text] / D. G. Rogers, N. F. Cheville, G.W. Pugh // Vet. Pathol. 1987. Vol. 24, № 6. P. 554-559.
- 132. Rogers, D. G. Pathogenesis of corneal lesions caused by Moraxella bovis in gnotobiotic calves [Text] / D. G. Rogers, N. F. Cheville, G. W. Pugh // Vet. Pathol. 1987. Vol. 24, № 4. P. 287-295.
- 133. Rosenbusch, R. F. Influence of mycoplasma preinfection on the expression of Moraxella bovis pathogenicity [Text] / R. F. Rosenbusch // Am. J. Vet. Res. 1983. Vol. 44, № 9. P. 1621-1624.
- 134. Rosenbusch, R. F. Mycoplasma bovoculi infection increases ocular colonization by Moraxella bovis in calves [Text] / R. F. Rosenbusch, A. G. Ostle // Am. J. Vet. Res. 1986. Vol. 47, № 6. P. 1214-1216.
- 135. Sauyed A. M. Jornal of Vet. Med. Sci./ A. M. Sauyed Vol. 12. 2. 2013. 55-63 p.
- 136. Scanning electron microscope studies on preparations of bovine cornea exposed to Moraxella bovis [Text] / R. L. Chandler, R. G. Bird, M. D. Smith [et al.] // J. Comp. Pathol. 1983. Vol. 93, № 1. P. 1-8.

- 137. Stellmacher, H. Untersuchungen zur infektiösen bovine Keratokonjunktivitis beim Jungrind in der DDR [Text] / H. Stellmacher, G. Kehnscherper // Monatsheftefür Veterinärmedizin (Mh. Vet.-Med.). − 1988. − Bd. 43, № 10. − S. 340-342.
- 138. The Incidence of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in Kenyan Cattle and the Effectiveness of Treatment with Penicillin and Chloramphenicol [Text] / J. S. Wafula, S. W. Wakhusama, E. Nandokha [et al.] // Bull. Anim. Hith. Prod. Afr. 1985. Vol. 33. P. 265-269.
- 139. The role of face flies in an episode of infectious bovine keratoconjunctivitis [Text] / R. R. Gerhardt, J. W. Allen, W. H. Greene [et al.] // J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1982. Vol. 180, № 2. P. 156-159.
- 140. Thornsberry, C. Susceptibility of clinical bacterial isolates to ciprofloxacin in the United States [Text] / C. Thornsberry // Infection. 1994. Vol. 22, suppl. 2. P. S80-S89.
- 141. Umoh, J. U. Some epizootiological features of clinical bovine infectious keratoconjunctivitis in a university livestock farm, Zaria, Nigeria [Text] / J. U. Umoh, A. A. Adewuyi // Bull. Anim. Health Prod. Afr. − 1984. − Vol. 32, № 3. − P. 231-235.
- 142. Weech, G. M. Infectious bovine keratoconjunctivitis: bacteriologic, immunologic, and clinical responses of cattle to experimental exposure with Moraxella bovis [Text] / G. M. Weech , H. W. Renshaw // Comp. Immunol.Microbiol.Infect.Dis. -1983.-Vol.~6, Nol.~1.-P~81-94.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ФАНО РОССИИ

ФГБНУ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМ. Я.Р. КОВАЛЕНКО (ФГБНУ ВИЭВ)

Утверждаю

Председатель секции инфекционной патологии животных, академик РАН

мгу темия М.И.Гулюкин «18» wons 2014 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по приготовлению и применению плотной селективной питательной среды для изоляции из патологического материала культур Moraxella bovis — возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота и выделения его чистой культуры

Москва - 2014

Методические рекомендации разработаны доктором ветеринарных наук, профессором В.В. Субботиным, аспирантом Д.В.Карайченцевым.

Методические рекомендации предназначены для структурных подразделений ветеринарных лабораторий, занимающихся бактериологической диагностикой, структурных подразделений научно-исследовательских учреждений ветеринарного профиля, занимающихся проблемами бактериальных болезней животных, ветеринарных факультетов высших учебных заведений.

Рецензенты: доктор ветеринарных наук, зав Белгородским филиалом ВИЭВ В.Н.Скворцов; доктор ветеринарных наук, профессор М.А.Лучко

Методические рекомендации рассмотрены и одобрены на заседании секции Инфекционной патологии животных Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол № 3 от «15» июля 2014 г.).

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по приготовлению и применению плотной селективной питательной среды для изоляции из патологического материала культур Moraxella bovis — возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота и выделения его чистой культуры, которые рассмотрены и одобрены на заседании секции «Инфекционная патология животных» Отделения ветеринарной медицины РАСХН 15 июля 2014г., протокол №3.

Методические рекомендации разработаны доктором ветеринарных наук, профессором В.В. Субботиным, аспирантом Д.В. Карайченцевым.

Методические рекомендации предназначены для структурных подразделений лабораторий, бактериологической ветеринарных занимающихся диагностикой, научно-исследовательских структурных подразделений учреждений ветеринарного профиля, занимающихся проблемами бактериальных болезней животных, ветеринарных факультетов высших учебных заведений.

Ответственный за выпуск - ученый секретарь Совета ФГБНУ ВИЭВ, кандидат биологических наук Н.И.Ложкова.

Введение

В настоящее время, одной из сложных и актуальных проблем, в современной ветеринарной медицине, сдерживающих успешное развитие молочного И мясного животноводства, является инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, вызываемый Moraxella bovis. Это контагиозная, быстро распространяющаяся болезнь острая, характеризующаяся слезотечением, светобоязнью, гиперемией сосудов конъюнктивы, блефароспазмом, иридоспазмом, серозно-слизистым, а затем серозно-гнойным истечением ИЗ пораженных глаз, помутнением изъязвлением роговицы.

При первичном заносе возбудителя в стадо заболевает от 20 - 30 до 75 - 94% поголовья. Болеют животные всех половозрастных групп. В стационарно неблагополучных пунктах болеют преимущественно телята и молодняк до 12-24-месячного возраста, а заболеваемость колеблется в широком диапазоне в зависимости от вирулентности возбудителя и наличия предрасполагающих факторов.

Экономический ущерб обусловлен тем, что у коров, больных кератоконьюнктивитом, уменьшается молочная продуктивность, у телят - на 25-30% снижаются привесы, ухудшаются нагулы у животных, что является причиной приводящей их к яловости.

Успех мероприятий, направленных на профилактику и ликвидацию болезни во многом зависит от своевременной диагностики, которая основывается на анализе эпизоотических данных, клиническом обследовании животных с обязательным проведением лабораторных (бактериологических] исследований.

Основой лабораторных исследований является бактериологическая диагностика, направленная на выделение чистой культуры возбудителя и ее идентификацию. Однако при бактериологическом исследовании патологического материала кроме Moraxella bovis выделяются стафилококки, диплококки, тетракокки, эшерихии, протей, вирусы, риккетсии, микоплазмы, уреплазмы, другая бактериальная флора, сапрофитные грибы.

Большая часть перечисленных микроорганизмов менее требовательна к питательным средам и условиям культивирования, чем Moraxella bovis. Их быстрый рост и размножение на питательных средах ограничивает или полностью подавляет основного возбудителя болезни. В развитие случаев, инфекционному большинстве неблагополучных по даже В кератоконьюнктивиту хозяйствах, частота выделения Moraxella bovis из

патологического материала не превышает 20%, что существенно осложняет диагностику болезни, а, следовательно, разработку и реализацию необходимых лечебно-профилактических мероприятий.

настоящих Методических рекомендациях представлены методы приготовления и применения плотной селективной питательной среды для изоляции из патологического материала Moraxella bovis и выделения чистой культуры возбудителя из смешанных культур. Экспериментальные данные, полученные авторами, свидетельствуют о том, что использование настоящих методических рекомендаций при организации проведении И бактериологических исследований с целью постановки диагноза на инфекционный кератоконьюнктивит крупного рогатого скота позволяют увеличить частоту обнаружения Moraxella bovis в патологическом материале в среднем в 2,8 раза и за счет этого сократить сроки бактериологической диагностики, своевременно диагностировать заболевание, более эффективно выявлять больных животных и предупреждать распространение инфекции, повышать эффективность лечебно-профилактических мероприятий в целом.

- І. Приготовление плотной селективной питательной среды
- 1. Приготовление компонентов питательной среды
- 1.1. Приготовление перевара Хоттингера

В качестве основы плотной селективной питательной среды используют перевар Хоттингера. Его получают путем панкреатического гидролиза белков мяса говядины. Для этого мясо освобождают от жира, фасций и сухожилий, разрезают на небольшие кусочки (1-2 см3], которые опускают небольшими порциями в емкость с двойным по объему количеством кипящей водопроводной воды и кипят 10 – 15 минут, пока мясо не станет серым, что указывает на то, что белки свернулись. Обработанное указанным выше способом мясо пропускают через мясорубку и фарш переносят в

полученный мясной бульон, устанавливают рН содержимого емкости на уровне 8,0, после чего его охлаждают до 40°C и этой смесью заполняют стеклянные бутыли на 1/3 объема. Затем в бутыли вносят измельченную поджелудочную железу крупного рогатого скота из расчета 40 - 80 г на 1 литр смеси (или 10% по объему к объему взятой смеси) либо 5 - 10 г (0,5%) панкреатина. Полученную в бутылях смесь снова подщелачивают 0,4% - ным раствором натра едкого до рН 7,8 – 8,0, встряхивают и, при необходимости, повторяют такое подщелачивание через 30 – 40 минут. Для консервирования смеси в бутыли добавляют хлороформ из расчета 10 мл на 1 литр смеси (1 – 3%), плотно закрывают их резиновой пробкой и выдерживают при температуре 37°C в течение 10 суток. В первые 3 – 4 дня ферментации смесь в бутылях 3 раза в день встряхивают, приоткрывают бутыль, проверяют рН и, при необходимости, доводят величину рН до 7,8 - 8,0. В дальнейшем эту процедуру проводят один раз в день Последние 2 – 3 дня до окончания ферментации перемешивание прекращают, дают жидкости отстояться до просветления и образования осадка. Завершение ферментации белков определяют реакцией на триптофан .С этой целью в две пробирки наливают по 3-4 мл профильтрованного через бумагу гидролизата, затем в одну из пробирок вносят 3-4 капли бромной воды. При наличии триптофана перевар Хоттингера принимает розово-фиолетовый цвет, а в контрольной пробирке цвет не изменяется, остается желтым.

1.2. Приготовление растворов антибактериальных химиотерапевтических препаратов

В отдельных темных стерильных флаконах готовят следующие растворы:

- водный (на дистиллированной стерильной воде) 0,2%-ный раствор спиктиномицина (10 мкг препарата на 1 мл воды);

- водный (на дистиллированной стерильной воде) 0,5%-ный раствор резорцина (25 мкг препарата на 1 мл воды).

Растворы хранят в холодильнике при температуре 4 - 6°C. Срок хранения - один месяц.

- 2. Приготовление питательной среды
- 2.1. Берут 790 мл перевара Хоттингера с амминным азотом 220-230 мг% и добавляют в него 10 г пептона, 5 г натрия хлорида, 20 г агар-агара. Нагревают до расплавления агар-агара.
- 2.2. Среду фильтруют, разливают во флаконы, или колбы, или матры и стерилизуют автоклавированием при 0,8 атм. в течение 25 минут. После автоклавирования pH среды должна составлять 6,8 7,0.
- 2.3. Стерильную среду хранят при комнатной температуре в темном месте в течение двух недель или в холодильнике в течение месяца.
- 2.4. Перед употреблением среду расплавляют в водяной бане, охлаждают до температуры 45 50°С, добавляют в неё по 5 мл 0,2%-го раствора спиктиномицина и 0,5%-го раствора резоцина, приготовленных и хранившихся по п. 1.2, а также 10% дефибринированной крови крупного рогатого скота и 10% экстракта пекарских дрожжей. Приготовленную таким образом селективную питательную среду разливают в чашки Петри по 15 20 мл, дают агару застыть и используют для посевов.
- II. Порядок отбора проб патологического материала для бактериологических исследований

Патологический материал от крупного рогатого скота с клиническими признаками кератоконъюнктивита берут путем погружения стерильных ватных тампонов в серозно – слизистый или серозно – гнойный экссудат под

третьим веком пораженных глаз. Кроме серозно – слизистых или серозно - гнойных истечений из пораженных глаз в качестве патологического материала для бактериологических исследований можно использовать соскобы с конъюнктивы век, с глазного яблока и с роговицы.

Отобранный материал сразу помещают в пробирку с бульоном (МПБ или бульон Хоттингера) и в термосе со льдом доставляют в лабораторию.

III. Порядок посева патологического материала, условия культивирования посевов и учет результатов

Посевы проб патологического материала на плотную селективную питательную среду производят сразу после их доставки в лабораторию. Высевы осуществляют на 2-3 чашки Петри методом Дригальского. Посевы инкубируют в термостате при температуре 370С в течение 24-48 часов, после чего учитывают результаты.

Прежде всего, обращают внимание на наличие на поверхности среды плоских, круглых, вдавленных в среду, серо – белого цвета, диаметром 1-3 мм колоний, имеющих рыхлую консистенцию и окруженных в большинстве случаев узкой (0,5-1,0 мм) зоной полного гемолиза (бета-гемолиза). Такие колонии характерны для Moraxella bovis, поэтому из 2-3 таких колоний делают мазки, которые окрашивают по Грамму и микроскопируют.

При наличии в мазках грамотрицательных, полиморфных, коротких вплоть до кокков, толстых с закругленными краями бактерий, располагающихся одиночно, парами или в виде коротких цепочек из указанных колоний делают посевы на сывороточный бульон Хоттингера.

После 24-28 часов культивирования изучают рост на данном бульоне, готовят мазки, окрашивают по Грамму и микроскопируют. Предварительно к виду Moraxella bovis относят бактерии, которые на указанной среде растут в

виде помутнения среды (от незначительного до интенсивного) с образованием осадка серо-белого цвета, который при встряхивании разбивается, образуя равномерную мелкозернистую суспензию. Морфология клеток в мазках, окрашенных по Граму, должна быть аналогична таковой в мазках, приготовленных из колоний с плотной селективной питательной среды.

Окончательно к виду Moraxella bovis относят бактерии, с описанными выше морфологическими и тинкториальными свойствами при условии, что они не обладают подвижностью, не растут на простом агаре и бульоне, на средах с 6% натрия хлорида, Мак – Конки, с желчными солями и при температуре 6°C, не утилизируют натрия ацетат, не восстанавливают нитраты до нитритов, не ферментируют углеводы, не образовывают индол, желатин, обладают каталазной активностью, разжижают вызывают характерные для возбудителя изменения в лакмусовом молоке: в условиях аэробиоза вызывают защелачивание, В условиях анаэробиоза a пептонизацию и закисление молока. В результате такой избирательности поведения бактерий верхний слой лакмусового молока высотой до 0,5 – 1 см окрашивается в темно-синий цвет, средний слой - в светло-синий, а нижний слой - в белый с крупинками пептонизированного молока.

IV. Выделение чистых культур Moraxella bovis

2-3 капли загрязненных культур моракселл разводят изотоническим раствором в соотношении 1:10. На поверхность селективной среды в чашке Петри вносят 1 - 2 капли суспензии, которую тщательно растирают шпателем. Затем этим же шпателем засевают вторую и третью чашки. Дальнейший ход работы по выделению чистой культуры и идентификации Moraxella bovis осуществляют аналогично тому, как это описано в разделе III настоящих Методических рекомендаций.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Российская академия сельскохозяйственных наук Отделение ветеринарной медицины Секция инфекционной патологии животных

ВЫПИСКА

из протокола № 3 заседания секции Отделения ветеринарной медицины Российской академии сельскохозяйственных наук «Инфекционная патология животных»

От 15июля 2014 года

Присутствовали члены секции

Слушали: научное предложение «Методические рекомендации по приготовлению и применению плотной селективной питательной среды для изоляции из патологического материала культур Moraxellabovis — возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота и выделения его чистой культуры» представленное ФГБНУ Всероссийский научно — исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ФГБНУ ВИЭВ)

Разработчики: доктор ветеринарных наук, профессор В.В. Субботин, аспирант Д.В.Карайченцев.

Методические рекомендации предназначены для структурных подразделений ветеринарных лабораторий, занимающихся бактериологической диагностикой, структурных подразделений научно-исследовательских учреждений ветеринарного профиля, занимающихся проблемами бактериальных болезней животных, ветеринарных факультетов высших учебных заведений.

Рецензенты: доктор. ветеринарных наук, зав Белгородским филиалом ВИЭВ В.Н.Скворцов и доктор ветеринарных наук, профессор М.А.Лучко. Рецензии положительные, замечаний нет.

Постановили: одобрить научное предложение «Методические рекомендации по приготовлению и применению плотной селективной питательной среды для изоляции из патологического материала культур Moraxellabovis — возбудителя инфекционного кератоконьюнктивита крупного рогатого скота и выделения его чистой культуры» и представить на утверждение.

Председатель секции Академик РАН

All -

М.И. Гулюкин

Секретарь К.б.н.

Л.А.Иванова

приложение 3

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.Я.ГОРИНА»

308503, пос. Майский Белгородского района Белгородской области, ул. Вавилова, 1. Тел.(4722) 39-23-64, Fax.(4722) 39-22-62, E-mail:ihfo@bsaa.edu.ru

№ 709 ot « 04 » 04 2016 г.

Справка

Настоящая справка выдана Карайченцеву Даниле Викторовичу в том, что результаты его диссертационной работы на тему «Совершенствование лабораторной диагностики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота» используются в курсе лекций и при проведении лабораторно-практических занятий студентам факультета ветеринарной медицины Белгородского государственного аграрного университета имени В.Я. Горина.

Проректор по научной работе, доктор экономических наук

А.В. Колесников