

**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**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Москва -2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко»

**Научный руководитель:** доктор ветеринарных наук, профессор Субботин Владимир Викторович

**Официальные оппоненты:**

**Шахов Алексей Гаврилович**, доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, Заслуженный деятель науки Российской Федерации, Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, главный научный сотрудник

**Белоусов Василий Иванович**, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория», главный эксперт

**Ведущая организация:** ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 006. 033. 02 на базе ФГБНУ «Всероссийский научно - исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко» по адресу: 109428, Москва, Рязанский проспект, 24, к.1., тел. (495)970-03-67.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте ФГБНУ ВИЭВ – [www.viev.ru](http://www.viev.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук

И.Ю.Ездакова

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** 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 острая, контагиозная, быстро распространяющаяся болезнь, характеризующаяся слезотечением, светобоязнью, гиперемией сосудов конъюнктивы, блефароспазмом, иридоспазмом, серозно-слизистым, а затем серозно-гнойным истечением из пораженных глаз, помутнением и изъязвлением роговицы.

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 (Р.І. Сох, 1984; В.Н. Карайченцев, 2005; О.Ю. Николаенко и др., 2011; Е.П. Щербакова и др. 2012, 2013; А. М. Sauyed et. al., 2013).

Основой лабораторных исследований является бактериологическая диагностика, направленная на выделение чистой культуры возбудителя и ее идентификацию. Однако при бактериологическом исследовании патматериала кроме *M. bovis* выделяются стафилококки, диплококки, тетракокки, эшерихии, протей, вирусы, риккетсии, микоплазмы, уреплазмы, другая бактериальная флора, сапрофитные грибы. А.Ф. Русинов (1983), R.F. Rosenbusch, W.V Knudtson (1984) из исследуемого выделяли *Mycoplasma bovoculi*, *Ureaplasma* sp. и *M. bovis*.

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 развитие основного возбудителя болезни. В большинстве случаев даже в неблагоприятных по инфекционному кератоконъюнктивиту хозяйствах частота выделения *M. bovis* из патологического материала не превышает 20% (Р.І. Сох, 1984; Т. Bart et al., 1986; Н. Stellmacher, G.Kehnscherper, 1988; В.Н. Карайченцев, 2005), что существенно осложняет диагностику болезни, а, следовательно, разработку и реализацию необходимых лечебно-профилактических мероприятий.

Исходя из вышеизложенного представляется актуальным разработать плотную селективную питательную среду, которая позволила бы увеличить

частоту обнаружения *M. 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 *M. bovis*.

Для достижения поставленной цели были определены задачи:

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

2. Выделить чистые культуры *M. bovis* и идентифицировать сопутствующую микрофлору, высеваемую из патологического материала.

3. Изучить основные биологические свойства культур *M. bovis*, выделенных на кровяном агаре Хоттингера.

4. Изучить чувствительность к химиотерапевтическим препаратам вновь выделенных культур *M. bovis* и культур сопутствующих микроорганизмов, выделяемых из патологического материала.

5. Разработать рецептуру, изготовить и испытать плотную селективную питательную среду для изоляции из патологического материала *M. 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 *M. bovis*, изолированных на плотной селективной питательной среде.

8. Изучить патогенные свойства культур *M. bovis*, выделенных на плотной селективной питательной среде в опытах на телятах и белых мышах.

**Научная новизна.** Бактериологическими исследованиями установлено, что в неблагополучных по инфекционному кератоконъюнктивиту крупного рогатого скота хозяйствах Российской Федерации из патологического материала от больных животных кроме основного возбудителя (*M. bovis*) выделяются *E. coli*, *S. dublin*, *Staph. aureus*, *Aspergillus* Нигер (23,15%, 21,10%, 38,42% и 2,5% высеваемых культур соответственно). При этом частота обнаружения *M. bovis* на традиционно

используемой в настоящее время плотной питательной среде (кровяной агар Хоттингера) составила 17,32%.

При изучении чувствительности/устойчивости *M. bovis* и представителей сопутствующей микрофлоры к антимикробным химиотерапевтическим препаратам установлены различия по данным свойствам. Моракселлы проявили высокую чувствительность к моксифлоксацину (МПК 0,01 – 0,04 мкг/мл), офлаксоцину (МПК 0,04 – 0,08 мкг/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 *M. bovis*, *E. coli*, *S. dublin*, *Staph. aureus* спиктиномицина, составила соответственно 75,0 - 90,0 мкг/мл ( $80,25 \pm 1,042$  мкг/мл); 10,30 – 41,20 мкг/мл ( $25,65 \pm 0,0603$  мкг/мл); 11,20 - 44,80 мкг/мл ( $18,60 \pm 5,668$  мкг/мл); 11,90 – 47,60 мкг/мл ( $19,90 \pm 6,00$  мкг/мл), а резорцина - более 100,00 мкг/мл. *Aspergillus* Нигер проявили чувствительность к резорцину (МПК составила 9,80-18,60 мкг/мл ( $14,20 \pm 1,87$  мкг/мл)). МПК спиктиномицина в сочетании с резорцином в отношении вышеуказанных культур составила соответственно 37,6 - 75,2 мкг/мл ( $56,40 \pm 5,54$  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 ( $15,10 \pm 4,534$ ); 9,80-18,60 мкг/мл ( $14,20 \pm 1,87$  мкг/мл).

Выявленные у микроорганизмов различия в ходе данного этапа исследований послужили основой для разработки рецептуры плотной селективной питательной среды.

На основе разработанной рецептуры изготовлена плотная селективная питательная среда для изоляции из патологического материала *M. bovis* и выделения чистой культуры возбудителя из смешанных культур. При изучении ее эффективности установлено, что вышеуказанная 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.

**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 кератоконъюнктивита крупного рогато 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.

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 *M. 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.

**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 научно-производственной конференции «Проблемы 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, рыб и пчел», посвященной 50-летию со дня основания лаборатории лейкозологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтомофауны (г. Москва, ГНУ ВИЭВ).

**Основные положения работы, выносимые на защиту:**

- результаты бактериологических исследований патологического материала, полученного от крупного рогатого скота из хозяйств, неблагополучных по инфекционному кератоконъюнктивиту, вызываемому *M. bovis*, с использованием кровяного агара Хоттингера;

- основные биологические свойства свежевыделенных на кровяном агаре Хоттингера культур *M. bovis*, включая свойства, позволяющие дифференцировать их от сопутствующей микрофлоры (т.е. осуществлять видовую идентификацию);

- чувствительность/устойчивость культур *M. bovis* и сопутствующей микрофлоры к антимикробным химиотерапевтическим препаратам;

- рецептура плотной селективной для *M. bovis* питательной среды;

- экспериментальные данные об эффективности вновь разработанной плотной селективной питательной среды в сравнении с традиционно используемым при бактериологической диагностике инфекционного кератоконъюнктивита, вызываемого *M. bovis*, кровяным агаром Хоттингера;

- основные биологические и патогенные свойства культур *M. bovis*, выделенных с использованием вновь разработанной плотной селективной питательной среды.

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

**Объем и структура диссертации.** 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.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Материал и методы исследований**

Научные исследования проводили в период с 2008 по 2011 год на базе Государственного научного учреждения Всероссийского научно – исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени Я.Р.Коваленко, Белгородской Государственной 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 кератоконъюнктивита было отобрано и проанализировано 703 пробы патологического материала (серозно – слизистые, серозно – гнойные истечения из глаз).

При изучении патогенности *M. 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 учетом результатов бактериологического исследования.

Пробы патологического материала от животных с клиническими признаками кератоконъюнктивита 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 согласно «Методическим рекомендациям по лабораторной диагностике инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого *Moraxella bovis*», утвержденным Бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (2005).

Культуральные, морфологические, тинкториальные свойства *M. bovis* и сопутствующей микрофлоры (*E. coli*, *S. dublin*, *Staph. aureus* *Aspergillus* Нигер) изучали общепринятыми в микробиологии методами. Подвижность определяли в препаратах «раздавленная капля». В общей сложности в этих экспериментах было использовано чистых культур: моракселл - 409 (включая 23 ранее изолированных в неблагополучных по инфекционному кератоконъюнктивиту хозяйствах и хранившихся в лабораторных условиях, в камере бытового холодильника при температуре +4 – +6<sup>0</sup>С); стафилококков – 358; эшерихий – 223; сальмонелл – 199, *Aspergillus* Нигер – 3.

При изучении основных биологических свойств моракселл определяли их способность утилизировать ацетат на среде с солями аммония, восстанавливать нитраты до нитритов, разжижать желатин, образовывать индол, каталазу, расти при наличии в среде 6%-ной концентрации натрия хлорида, расти на агаре Мак-Конки и желчно-солевом агаре. Для определения способности сворачивать лакмусовое молоко посеvy инкубировали при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 48 – 72 часов, а для целей определения способности пептонизировать сгусток - семь суток при комнатной температуре (20-22<sup>0</sup>С), после чего учитывали результаты.

Ферментацию углеводов изучали путем высева по 2 – 3 капли бульонной культуры *M. 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<sup>0</sup>С в течение 24 часов.

Гемолитическую активность и психрофильные свойства *M. bovis* изучали посевом на кровяной агар Хоттингера. Часть посевов инкубировали при температуре 37°C, а часть при температуре 6°C в течение 24-48 часов.

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.

Определение чувствительности испытуемых микроорганизмов к 43-м антибактериальным химиотерапевтическим препаратам и их сочетаниям проводили 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 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°C 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.

В пробирки с питательной средой вносили по 0,2 мл суточной бульонной культуры *M. bovis*, что соответствовало по бактериальному стандарту 100 тыс. 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. За минимальную подавляющую концентрацию препарата (МПК) принимали среднюю арифметическую величину концентрации, рассчитанную по концентрации препарата в последней пробирке, где не отмечали рост и в следующей пробирке, где отмечен рост культуры.

В качестве основы плотной селективной питательной среды испытаны перевар Хоттингера, мясо–пептонный агар, сухой питательный агар из

гидролизата кильки. Было изучено влияние на рост моракселл на плотной среде дифосфопиридиннуклеотида, гемина, аутолизата пекарских дрожжей, сыворотки крови крупного рогатого скота.

Эффективность вновь разработанной плотной селективной питательной среды определяли путем параллельных высевов 583 проб патологического материала от клинически больных животных на эту среду и на кровяной агар Хоттингера.

При изучении патогенности моракселл мышей заражали подкожным введением  $0,5 \text{ см}^3$  суспензии суточной агаровой культуры концентрацией 5 млрд. микробных клеток в  $1 \text{ см}^3$ , телят – введением в нижний конъюнктивальный мешок левого глаза того же объема суспензии концентрацией 10 млрд микробных клеток в  $1 \text{ см}^3$ .

Среднюю арифметическую (M) 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  $P < 0,05$ .

## **2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **2.2.1. Изоляция из патологического материала культур *Moraxella bovis* и сопутствующей микрофлоры на кровяном агаре Хоттингера**

Патологический материал от крупного рогатого скота с клиническими признаками инфекционного кератоконъюнктивита брали путем погружения стерильных ватных тампонов в серозно – слизистый, серозно – гнойный экссудат под третьем 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  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24-48 часов, после чего учитывали результаты. Обращали внимание на наличие характерных для *M. bovis* 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). При наличии в мазках, приготовленных из таких колоний, грамтрицательных, полиморфных, коротких вплоть до кокков, толстых с закругленными краями бактерий, располагающихся одиночно, парами или в виде коротких цепочек из

указанных колоний делали посеvy на сыvороточный бульон Хоттингера для получения чистой культуры и дальнейшей идентификации микроорганизмов.

К виду *M. bovis* относили бактерии, 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°C, 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 аэробноза вызывали защелачивание, а в условиях анаэробноза – 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.

Из патологического материала, кроме *M. bovis*, выделяли и сопутствующую микрофлору (*Staph. aureus*, *E. coli*, *S. dublin*, *Aspergillus Нигер*). Их идентификацию осуществляли на основании характерных видовых свойств. Серологическую идентификацию сальмонелл проводили в РА на стекле при помощи сыvороток сальмонеллзньных О-комплексных и монорецепторных О- и Н- агглютинирующих (ФГУП «Курская биофабрика – фирма «Биок»). Результаты проведенных исследований, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты бактериологических исследований патологического материала от телят с клиническими признаками инфекционного кератоконъюнктивита

Наименование хозяйств	Кол-во исследованных образцов	Виды и количество выделенных микроорганизмов									
		<i>M.bovis</i>		<i>Staph. aureus</i>		<i>E.coli</i>		<i>S.dublin</i>		<i>Aspergillus Н.</i>	
		все-го	%	все-го	%	все-го	%	все-го	%	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	-	-
<b>ИТОГО</b>	<b>120</b>	<b>23</b>	<b>19,2</b>	<b>47</b>	<b>39,1</b>	<b>27</b>	<b>22,5</b>	<b>23</b>	<b>19,2</b>	<b>3</b>	<b>2,4</b>

Из данных таблицы 1 видно, с использованием кровяного агара Хоттингера *M. bovis* удалось выделить в 23 случаях из 120 исследованных материалов. Средняя частота обнаружения составила 19,2%, а в различных хозяйствах этот показатель варьировал в пределах от 16,7% до 22,2%. Средняя частота обнаружения *Staph. aureus* составила 39,1% и варьировала в пределах от 27,8% до 50%, *E. coli* – 22,5% (16,7% -о 27,8%), *S. dublin* - 19,2% (9,5% - 33,3%), *Aspergillus Нигер* - 2,4% (0 - 6,6%).

Незначительный процент обнаружения возбудителя мы связываем 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 *M. bovis*.

### 2.2.2. Определение чувствительности культур *Moraxella bovis* и сопутствующей микрофлоры к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам

Необходимым этапом при разработке селективной питательной среды является изучение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам с тем, чтобы выбрать те из них, которые бы избирательно подавляли на среде рост посторонней микрофлоры и в тоже время не угнетали развитие возбудителя болезни. Изучив чувствительность 24-х изолятов *M. bovis* к 43 препаратам и их комбинациям установили, что возбудитель 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±5,54). Исходя из этого изучили чувствительность сопутствующей микрофлоры к данным препаратам и их комбинации. Результаты опытов представлены в таблице 2.

Таблица № 2

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

№ п/п	Культуры	Спиктиномицин	Резорцин	Спиктиномицин + резорцин
-------	----------	---------------	----------	--------------------------

		Разброс величин МПК, мкг/мл	Среднее значение МПК, М±m	Разброс величин МПК, мкг/мл	Среднее значение МПК, М±m	Разброс величин МПК, мкг/мл	Среднее значение МПК, М±m
1	<i>Moraxella bovis</i>	75,00 – 90,00	80,25± 1,042	>100,00	-	37,60 - 75,20	56,40± 5,54
2	<i>Escherichia coli</i>	10,30- 41,20	25,65± 0,0603	>100,00	-	9,70-38,80	24,25± 0,0904
3	<i>Salmonella dublin</i>	11,20- 44,80	18,60± 5,668	>100,00	-	10,60- 31,80	14,13± 4,272
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	11,90- 47,60	19,90± 6,00	>100,00	-	11,30- 33,90	15,10± 4,534
5	<i>Aspergillus Нигер*</i>	-	-	9,80- 18,60	14,20± 1,87	9,80-18,60	14,20± 1,87

\* - n=3

Данные, представленные в таблице 2 свидетельствуют о том, что культуры *E. coli*, *S. dublin*, *Staph. aureus*, выделенные из патологического материала от животных больных инфекционным кератоконъюнктивитом в качестве сопутствующей основному возбудителю болезни микрофлоры были чувствительными к спиктиномицину. МПК (М±m) при этом составили, 25,65±0,0603 мкг/мл; 18,60±5,668 мкг/мл и 19,90±6,00 мкг/мл соответственно, а культуры *Aspergillus Нигер* - к резорцину 14,20±1,87 мкг/мл.

Близкие по значениям результаты получили и при использовании спектиномицина в сочетании с резорцином. МПК (М±m) для культур *E. coli*, *S. dublin*, *Staph. 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 *M. 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.

### **2.2.3. Конструирование плотной селективной питательной среды для изоляции и очистки культур *Moraxella bovis***

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.

Для придания питательной среде селективных в отношении *M. bovis* свойств, в нее добавляли спиктиномицин до конечной концентрации в среде 10 мкг/мл и резорцин до конечной концентрации в среде 25 мкг/мл.

#### **2.2.4. 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 *M. bovis* из смешанных культур. Для этого 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 питательную среду проводили методом Дригальского.

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, т.е. среда обладает селективными свойствами в отношении *M. bovis* свойствами.

Далее определили эффективность 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 кератоконъюнктивита (кровяной агар Хоттингера).

Для этого в хозяйствах, где неблагополучие по инфекционному кератоконъюнктивиту ранее было установлено и подтверждено нашими бактериологическими исследованиями, от животных с клиническими признаками поражения глаз отбирали пробы патологического материала и высевали одновременно на обе испытываемые питательные среды. Всего было исследовано 583 образца патологического материала.

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 мяско – пептонным бульоном и в термосе со льдом доставляли в лабораторию. В лаборатории в максимально короткий срок, но не позже 10 – 15 часов после доставки из проб делали высев на плотную селективную питательную среду и на кровяной агар Хоттингера. Чашки с посевами помещали в термостат и инкубировали при 37°C в течение 24 – 48 часов. Учет посевов и идентификацию высеваемых микроорганизмов осуществляли аналогично тому, как описано выше.

Данные, характеризующие частоту обнаружения *M. bovis* и сопутствующей микрофлоры в одних и тех же материалах, но на разных питательных средах, представлены в таблице 3.

Таблица 3

Эффективность различных питательных сред для изоляции *Moraxella bovis* из патологического материала

№ п/п	Среды	Исследовано проб	Выделено культур*	
			кол-во	%
<i>Moraxella bovis</i>				
1	плотная селективная питательная среда	583	285	48,89
2	кровяной агар Хоттингера	583	101	17,32
<i>Staphylococcus aureus</i>				
1	плотная селективная питательная среда	583	134	22,98
2	кровяной агар Хоттингера	583	224	38,42

Escherichia coli				
1	плотная селективная питательная среда	583	88	15,09
2	кровяной агар Хоттингера	583	135	23,15
Salmonella dublin				
1	плотная селективная питательная среда	583	76	13,04
2	кровяной агар Хоттингера	583	123	21,10
Aspergillus Нигер				
1	плотная селективная питательная среда	583	0	0
2	кровяной агар Хоттингера	583	18	3,1

\* - в единичных случаях выделялась и другая бактериальная микрофлора.

Данные таблицы 3 свидетельствуют о том, что при посевах 583 проб патологического материала на используемый традиционно для этих целей кровяной агар Хоттингера, *M. 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 кератоконъюнктивита крупного рогатого скота в 2,82 раза.

Одновременно 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% 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).

#### **2.2.5. Изучение биологических свойств культур *Moraxella bovis*, выделенных на плотной селективной питательной среде**

Практически важным на этом этапе исследований было выяснение возможности достоверной видовой идентификации *M. bovis*, выделенных на среде со спиктиномицином и резорцином, т.к. последние могут оказывать влияние на основные биологические свойства. Решение этой задачи включало изучение совокупности признаков с сопоставлением данных, полученных для культур, выделенных с использованием кровяного агара Хоттингера и с соответствующими литературными источниками.

Культуральные, ферментативные, морфологические и тинкториальные свойства *M. bovis*, выделенных с использованием кровяного агара Хоттингера и плотной селективной питательной среды различий не имели и характеризовались следующим. На кровяном агаре Хоттингера 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.

На сывороточном бульоне Хоттингера после 24-28 часов культивирования рост возбудителя характеризовался помутнением среды (от незначительного до интенсивного) с образованием осадка серо-белого 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.

*M. 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°C, 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 аэробноза вызывали защелачивание, а в условиях анаэробноза – 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. Основные тесты, позволяющие

дифференцировать *M. bovis* от других представителей рода *Moraxella*, представлены в таблице 4.

Из данных, представленных в таблице 4 видно, что бактерии ни одного из видов рода *Moraxella* не утилизируют ацетат, не образуют индол, не обладают подвижностью, но все они обладают каталазной активностью и, следовательно, данные тесты не могут использоваться для внутривидовой дифференциации моракселл. *M. bovis* и *M. lacunata* разжижают желатин, а представители иных видов этого рода данной способностью не обладают. Необходимо отметить, что *M. bovis* не восстанавливают нитраты и в большинстве случаев вызывают гемолиз на кровяном агаре, что отличает их по этим свойствам от видов *M. lacunata*, *M. nonliguenfaciens*, *M. phenylpyruvica* и *M. osloensis*. Кроме того, в качестве дифференциального теста может использоваться способность *M. bovis* пептонизировать и сворачивать лакмусовое молоко в отличие от бактерий вида *M. nonliguenfaciens*, которые такой способностью не обладают.

Таблица 4

Дифференциально-диагностические признаки бактерий рода *Moraxella*

№№ п/п	Дифференциальные тесты	Виды рода <i>Moraxella</i>				
		<i>bovis</i>	<i>lacunata</i>	<i>nonliguenfaciens</i>	<i>phenylpyruvica</i>	<i>osloensis</i>
1	Утилизация ацетата	-	-	-	-	-
2	Восстановление нитратов	-	+	+	+	+
3	Разжижения 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 *M. bovis* плотной селективной для возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита 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 *M. bovis*.

### **2.2.6. Изучение патогенных свойств культур *Moraxella bovis* изолированных на плотной селективной питательной среде**

Патогенность *M. bovis*, изолированных на плотной селективной питательной среде изучали в опытах на телятах 2-3-месячного возраста и на белых беспородных мышах живой массой 14-16 г.

Телят отбирали в хозяйствах, благополучных по инфекционному кератоконъюнктивиту. В опытные и контрольные группы включали животных без клинических признаков поражения глаз и при условии отрицательных результатов бактериологических исследований на выявление *M. bovis*. Всего сформировали 4 опытные и 4 контрольные группы по 9 животных в каждой. Для заражения использовали 4 выделенные нами в различных хозяйствах гемолитические культуры изолятов *M. bovis*. При этом в нижний конъюнктивальный мешок левого глаза опытных телят вводили 0,5 см<sup>3</sup> суспензии суточной агаровой культуры концентрацией 10 млрд. микробных клеток в 1 см<sup>3</sup>, а телятам контрольных групп - 0,5 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора. Результаты заражения представлены в таблице 5.

Таблица 5

#### Результаты экспериментального воспроизведения инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на телятах

Группы животных	Кол-во телят в группе	Условное обозначение изолята	Результаты заражения			
			заболело		не заболело	
			голов	%	голов	%
1 опыт	9	Д-1	6	66,7	3	33,3
2 контроль	9	-	0	0	9	100
3 опыт	9	К-1	6	66,7	3	33,3
4 контроль	9	-	0	0	9	100
5 опыт	9	В-1	6	66,7	3	33,3
6	9	-	0	0	9	100

контроль						
7 опыт	9	М-2	6	66,7	3	33,3
8 контроль	9	-	0	0	9	100

Из данных, представленных в таблице 5 видно, что в каждой из опытных групп заболело по 6 телят (66,7%). Клинические признаки заболевания аналогичные таковым, наблюдаемым при естественном заражении, 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. Ни у одного из контрольных животных клинических признаков болезни выявлено не было.

На этапе развития кератоконъюнктивита с серозно-гнойными истечениями (в большинстве случаев спустя 23-25 дней после заражения) у больных телят и у телят опытных и контрольных групп не имевших клинических признаков заболевания отбирали материал для бактериологических исследований. *M. bovis* удалось выделить из материала, полученного от всех 36 телят опытных групп, вне зависимости от того развивались или нет клинические признаки болезни.

Мышей заражали подкожным введением 0,5 см<sup>3</sup> суспензии суточной агаровой культуры концентрацией 5 млрд. микробных клеток в 1 см<sup>3</sup>. Контрольным животным подкожно вводили 0,5 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора. Результаты заражения представлены в таблице 6.

Таблица 6

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

Группы животных	Кол-во мышей в группе	Условное обозначение изолята	Результаты заражения			
			пало		выжило	
			голов	%	голов	%
1 опыт	13	Д-2	11	84,6	2	15,4
2 контроль	13	-	0	0	13	100
3 опыт	13	К-1	11	84,6	2	15,4
4 контроль	13	-	0	0	13	100
5 опыт	13	В-3	11	84,6	2	15,4
6 контроль	13	-	0	0	13	100
7	13	М-1	11	84,6	2	15,4

опыт						
8 контроль	13	-	0	0	13	100

Первые признаки заболевания животных отмечали уже спустя 10-15 часов после заражения (мышь становилась вялыми, отказывались принимать корм, зарывались в опилки, шерсть была взъерошенной). Данные признаки, выраженные в большей или меньшей степени, отмечали у 100% опытных мышей. При этом 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.

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

*M. bovis*, выделенными от крупного рагатого скота с клиническими признаками инфекционного кератоконъюнктивита, с использованием вновь разработанной плотной селективной для *M. 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%.

### 3. 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 кератоконъюнктивита 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 смешанных 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; дефибрированная кровь крупного рогатого скота – 10% к объему среды; экстракт пекарских дрожжей – 10% к объему среды; 0,2% -й раствор спиктиномицина – 5 см<sup>3</sup>; 0,5-й раствор резорцина – 5 см<sup>3</sup>.

6. При изучении эффективности плотной селективной питательной среды в условиях неблагоприятных по инфекционному кератоконъюнктивиту крупного рогатого скота хозяйств проведено исследование 583 проб патологического материала от животных с клиническими признаками болезни и установлено, что по сравнению с кровяным агаром Хоттингера частота выделения *Moraxella bovis* 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 с использованием вновь предложенной плотной селективной питательной среды, сохраняют типичные для рода *Moraxella* и вида *Moraxella bovis* культуральные, морфологические, тинкториальные и биохимические свойства. По своей патогенности для лабораторных животных (белых мышей) и крупного рогатого скота они не отличаются от бактерий, выделенных с использованием кровяного агара Хоттингера, что обуславливает возможность их использования для разработки средств специфической профилактики и диагностики болезни.

#### **4. 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 кератоконъюнктивита 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.

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...

## 5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Карайченцев В.Н. Выделение *Moraxella bovis* от крупного рогатого скота с инфекционным кератоконъюнктивитом / В.Н.Карайченцев, Д.В. Карайченцев // Сб. научных трудов - Краснодар, 2010, вып. № 19, - С. 25 -27.

2. Карайченцев В.Н. Диагностика и профилактика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / В.Н.Карайченцев, Д.В. Карайченцев // Сб. научных трудов - Краснодар, 2010, выпуск № 19, - С. 28-30.

3. Карайченцев В.Н. Мероприятия по профилактике инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / В.Н.Карайченцев, Д.В. Карайченцев // Сб. научных трудов - Краснодар, 2010, выпуск № 19, - С. 31-33.

4. Карайченцев В.Н. Изучение биохимических свойств культур *Moraxella bovis* / В.Н.Карайченцев, Д.В. Карайченцев // Мат. XIV межд. науч – произв. конф. «Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения» - Белгород, 2010, - С. 68.

5. Карайченцев В.Н. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота / В.Н.Карайченцев, Д.В. Карайченцев // Мат. XIV межд. науч – произв. конф. «Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения» - Белгород, 2010, - С. 69.

6. Субботин В.В. К вопросу о лабораторной диагностике инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого моракселлами / В.В.Субботин, Д.В. Карайченцев // Мат. науч – практ. конф. «Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел, посвященной 50 – летию со дня основания лаборатории лейкозологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтомофауны» - М.: ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко, 2011, - С. 200 - 203.

7. Субботин В.В. Плотная селективная питательная среда для выделения моракселл / В.В.Субботин, Д.В. Карайченцев, В.Н. Карайченцев // Ветеринарная патология – 2014 - № 2 - С. 27-31.

8. Субботин В.В. Биологические свойства выделенных культур *Moraxella bovis* / В.В.Субботин, Д.В. Карайченцев, В.Н. Карайченцев // Ветеринарная патология – 2014 - № 2 - С. 31-34.

9. Субботин В.В. Чувствительность к антибактериальным препаратам культур *Moraxella bovis* / В.В. Субботин, Д.В. Карайченцев, В.Н. Карайченцев // Международный вестник ветеринарии - 2014 - № 4 - С. 37-40.