

Отзыв

официального оппонента Белоусова Василия Ивановича на диссертацию Карайченцева Данилы Викторовича по теме: «**Совершенствование лабораторной диагностики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота**», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Актуальность темы. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота имеет глобальное распространение: регистрируется в странах Азии и Африки, в Австралии, Северной, Центральной и Южной Америке, Европе, в том числе и России. Болезнь наносит значительные экономические потери животноводству. Для эффективной борьбы с этой болезнью требуется своевременная диагностика, и наиболее эффективной является бактериологическая диагностика, направленная на выделение чистых культур возбудителя болезни и их идентификацию. Однако, как показывает практика из биологического материала больных животных кроме *Moraxella bovis* выделяются стафилококки, диплококки, эшерихии, протей, вирусы, риккетсии, микоплазмы, грибы и другая бактериальная флора. Указанные микроорганизмы подавляют рост основного возбудителя болезни.

Исходя из вышеизложенного, автором были поставлены **цель** совершенствовать лабораторную диагностику 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.

Вх. № 04

17 января 2017 г.

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.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Автор последовательно проводит исследования по конструированию плотной селективной питательной среды для изоляции из патологического материала *M. bovis*, испытывает созданную среду с целью выделения чистых культур возбудителя из смешанных культур, изучает эффективность плотной среды при исследовании материала из неблагополучных хозяйств в сравнении с традиционно применяемым кровяным агаром Хоттингера и изучает биологические свойства выделенных на плотной селективной среде возбудителей *M. bovis*. Также автором были изучены патогенные свойства культур *M. bovis*, выделенных на плотной среде в опытах на белых мышах и телятах и делает научно обоснованный вывод о возможности использования сконструированной среды в лабораторной практике вместо кровяного агара Хоттингера.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций. Представленные в диссертации обоснование и экспериментальный материал не вызывают сомнений в достоверности, заключение и практические предложения отражают результаты завершенной работы.

Научная новизна работы заключается в следующем: диссертантом было 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 (соответственно 23,15%, 21,10%, 38,42% и 2,5% высеваемых культур). 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 автором 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 - 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 - 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). 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 автором 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 2014 года, 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.

Оценка содержания диссертации. Диссертация Карайченцева Д.В. по своей структуре отвечает необходимым требованиям. Она 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.

Во «*Введении*» автор достаточно убедительно показывает актуальность темы и степень её разработанности, проводит обоснование поставленных им целей и задач.

В «*Обзоре литературы*», состоящем из пяти частей, диссертант достаточно подробно излагает общие сведения об инфекционном кератоконъюнктивите, о

питательных средах для изоляции культур *Moraxella bovis*, об основных биологических свойствах культур *Moraxella bovis*, отличающих их от морфологически сходной и сопутствующей микрофлоры, о

чувствительности культур *Moraxella bovis* и сопутствующей микрофлоры к антибактериальным и другим химиотерапевтическим препаратам, о патогенных свойствах культур *Moraxella bovis*.

Глава «*Собственные исследования*» включает изоляцию из патологического материала культур *Moraxella bovis* и сопутствующей микрофлоры на кровяном агаре Хоттингера.а. Определение чувствительности культур *Moraxella bovis* и сопутствующей микрофлоры к антибактериальным и другим химиотерапевтическим препаратам. Конструирование плотной

селективной питательной среды для изоляции и очистки культур *Moraxella bovis*.

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

Изучение биологических свойств культур *Moraxella bovis*, выделенных на плотной селективной питательной среде. Изучение патогенных свойств культур *Moraxella bovis*, изолированных на плотной селективной питательной среде.

Автор провел многочисленные обследования семи хозяйств в четырех областях Российской Федерации (Белгородской, Курской, Тамбовской, и Московской). Проведен клинический осмотр 1297 голов крупного рогатого скота, отобрано и исследовано 703 пробы патологического материала от животных с клиническими признаками инфекционного кератоконъюнктивита.

Диссертант с использованием кровяного агара Хоттингера *M. bovis* выделил 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% - 27,8%), *S. dublin* - 19,2% (9,5% - 33,3%), *Aspergillus Нигер* - 2,4% (0 - 6,6%).

Незначительный процент обнаружения возбудителя автор связывает 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*.

В связи с этим автор при разработке селективной питательной среды автор изучил чувствительность 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 диссертант изучил чувствительность сопутствующей микрофлоры к указанным препаратам и их комбинациям. При этом диссертант установил, 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 ($M \pm m$) при этом составили, $25,65 \pm 0,0603$ мкг/мл; $18,60 \pm 5,668$ мкг/мл и $19,90 \pm 6,00$ мкг/мл соответственно, а культуры *Aspergillus Нигер* - к резорцину $14,20 \pm 1,87$ мкг/мл.

Близкие по значениям результаты получили и при использовании спиктиномицина в сочетании с резорцином. МПК ($M \pm m$) для культур *E. coli*, *S. dublin*, *Staph. aureus*, *Aspergillus Нигер* составили $24,25 \pm 0,0904$ мкг/мл; $14,13 \pm 4,272$ мкг/мл; $15,10 \pm 4,534$ мкг/мл и $14,20 \pm 1,87$ мкг/мл соответственно, что свидетельствует об их чувствительности к этой комбинации антимикробных химиотерапевтических препаратов.

Таким образом, диссертанту удалось 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 автором при конструировании плотной селективной питательной среды для изоляции и очистки культур Мораксел.

При конструировании плотной селективной питательной среды для выделения Моракселл в качестве основы плотной селективной питательной среды автор испытал 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 диссертантом было установлено, 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 добавлены спиктиномицин до конечной концентрации в среде 10 мкг/мл и резорцин до конечной концентрации в среде 25 мкг/мл.

На следующем этапе автором была испытана эффективность разработанной плотной среды для выделения чистых культур *Moraxella bovis*. Экспериментально было приготовлено 18 смешанных культур равных объемов суточных бульонных культур мораксел, стафилококков, эшерихий и сальмонелл, а также смыва агара Сабуро культуры *Аспергиллус Нигер*. Посев на разработанную среду проводили методом Дригальского. Из всех 18

смесей культур микроорганизмов удалось получить рост моракселл на второй и третьей чашках. Причем в 72,2% случаев возбудитель выделен на среде в виде чистых культур моракселл, только в 27,8% случаев кроме моракселл выросли посторонние микроорганизмы.

Сравнительные испытания на практике предложенной автором питательной среды со средой, используемой ветеринарными лабораториями (кровяной агар Хоттингера). Из 583 проб патологического материала с использованием кровяного агара Хоттингера выделена 101 (17,32%) культур Моракселл, а с использованием предлагаемой селективной среды возбудитель болезни был выделен и идентифицирован в 285 образцах патологического материала (в 48,89% случаев). что свидетельствует о увеличении частоты выделения *Moraxella bovis* по что в 3 раза. Одновременно на селективной питательной среде снизилось количество культур сопутствующих микроорганизмов: стафилококков в 1,7 раза, эшерихий в 1,5 раза, сальмонелл в 1,6 раза, а аспергиллы Нигер на предлагаемой среде вообще не выявлялись (на кровяном агаре они выявлялись в №5 случаев).

В дальнейшем автор научно-обоснованно доказал, что применение плотной селективной питательной среды, содержащей в своем составе спиктиномицин и резорцин, для выявления в патологическом материале *M. bovis* как возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота не влечет за собой изменения его (возбудителя) основных биологических свойств и позволяет осуществлять достоверную видовую идентификацию *M. bovis*.

На заключительном этапе диссертант изучил патогенность *M. bovis*, изолированных на плотной селективной питательной среде изучали в опытах на 72 телятах 2-3-месячного возраста и на 104 белых беспородных мышях живой массой 14-16 г. Результаты экспериментального заражения показали, что заболеваемость среди телят в период с 8-го по 17 день после заражения составила 66,7%. Моракселлы были выделены от всех опытных телят спустя 23-25 дней после заражения. При экспериментальном заражении белых мышей признаки болезни появились через 10-15 часов после заражения, наблюдали 100% заболеваемость, гибель заболевших мышей составила 84,6%.

Таким образом, автор установил, что при заражении телят и белых мышей изолятами *M. bovis*, выделенными от крупного рогатого скота с клиническими признаками инфекционного кератоконъюнктивита, с использованием вновь разработанной плотной селективной для *M. bovis* питательной среды, испытанные изоляты обладают выраженными патогенными свойствами, вызывают болезнь у естественно восприимчивых телят и стопроцентную гибель белых мышей.

Замечания и предложения по диссертационной работе.

Однако наряду с общей положительной оценкой диссертационного исследования Карайченцева Д.В. имеются некоторые вопросы и пожелания, на которые следовало бы обратить внимание, в частности:

1. В диссертации и автореферате нет списка сокращений, хотя они присутствуют по тексту в указанных документах.

2. Автором выделено на кровяном агаре Хоттингера 23 культуры *M. bovis*, а чувствительность к антибактериальным препаратам изучали на 24 культурах. Требуется пояснения какую культуру микроорганизмов еще использовали в работе.

3. Чем можно объяснить низкую чувствительность *M. bovis* к спиктомицину и резорцину и высокую чувствительность к этим же препаратам стафилококков, эшерихий, сальмонелл и грибов. Это генетическая или приобретенная резистентность, и все ли выделенные культуры мораксел были одинаково резистентны к указанным веществам?

4. В технологию изготовления разработанной плотной селективной среды для выделения и идентификации мораксел следует добавить раздел контроля ее стерильности и пригодности (активности) для выделения указанных микроорганизмов.

5. Выявлены орфографические ошибки в названиях антибиотиков (стр 13 Автореферата) и по тексту диссертации (стр. 93, 97 и др.).

6. Предлагаем передать «Методические рекомендации по приготовлению и применению плотной селективной питательной среды для изоляции из патологического материала *M. bovis*-возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота и выделения его чистой культуры» в государственные ветеринарные лаборатории Российской Федерации для использования в повседневной практике при диагностике указанного заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Карайченцева Даниила Викторовича «Совершенствование лабораторной диагностики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота» представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, имеющую все признаки новизны, актуальности и практической значимости, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент:

Доктор ветеринарных наук, профессор,

Главный эксперт федерального

государственного бюджетного учреждения

«Центральная научно-методическая

ветеринарная лаборатория» (ФГБУ «ЦНМВЛ»)

Подпись

Подпись В.И. Белоусова заверяю:

Начальник отдела юридической и кадровой работы

10.01.2017 года

Белоусов Василий Иванович

В.И.Маршалкина