



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности»
Диссертационный совет Д 006.069.01
141142, Московская обл., Щелковский р-н, пос. Биокомбината,
Тел/ Факс 8 (49656)7-32-63 e-mail: unitibp@mail.ru

Утверждаю

Директор ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
биологической промышленности»
академик РАН

А.Я. Самуйленко

«17» января 2017 года

ОТЗЫВ

Ведущей организации ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» на диссертацию Карайченцева Данилы Викторовича «Совершенствование лабораторной диагностики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота», представленной к защите на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Актуальность избранной темы. Диссертация Карайченцева Д.В. посвящена совершенствованию и практическому применению эффективной, достоверной диагностики кератоконъюнктивита крупного рогатого скота.

Чтобы повысить эффективность диагностики и лечения в системе организации противоэпизоотических мероприятий необходимо расширить ассортимент высокоэффективных диагностических средств и методов, лечебных препаратов, пригодных к использованию в лабораторных и полевых условиях.

В настоящее время среди болезней крупного рогатого скота особое место занимает инфекционный кератоконъюнктивит, который имеет широкое

распространение во многих странах и протекает в виде энзоотий и даже эпизоотий. Болезнь причиняет большой экономический ущерб странам с высокоразвитым молочным и мясным скотоводством, так как у коров, больных кератоконъюнктивитом, уменьшается молочная продуктивность, у телят – на 25-30% снижаются привесы, ухудшаются нагулы у животных, что является причиной приводящей их к яловости.

Заболеваемость может достигать 60-90% от числа восприимчивых животных. Многочисленными исследованиями установлено, что изоляция возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита *Moraxella bovis* из патологического материала на плотных питательных средах (обогащенных дефибрированной кровью крупного рогатого скота и дрожжевым экстрактом) представляет большие трудности. Это связано с тем, что уже на начальных стадиях болезни к основному возбудителю присоединяется большое количество условно-патогенной микрофлоры, которая существенно отягощает течение болезни. При бактериологическом исследовании патологического лабораторного материала, взятого с поверхности глазного яблока из пространства за третьим веком (серозно-слизистое, серозно-гнойное истечение), у больных кератоконъюнктивитом животных кроме *Moraxella bovis*, выделяются диплококки, стафилококки, протей, эшерихии, сальмонеллы, риккетсии, вирусы, хламидии, сапрофитные грибы, уреплазмы. Часто условно-патогенные микроорганизмы менее требовательны к питательным средам и условиям культивирования. Их быстрый рост и размножение на питательных средах ограничивает или полностью подавляет развитие основного возбудителя *Moraxella bovis* и удлиняют сроки выделения моракселл. По настоящее время нет 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.

Поэтому одним из существенных направлений совершенствования бактериологической диагностики кератоконъюнктивита крупного рогатого скота является разработка накопительной плотной селективной питательной среды для культивирования возбудителя.

Содержание работы.

Представленная соискателем работа построена по традиционному плану, 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. В приложении представлены копии листов документов, подтверждающих результаты отдельных этапов работы, их научную новизну и практическую значимость.

Во введении, диссертант обосновывает выбор темы и её актуальность, определяет цель и задачи работы, формулирует ее научную новизну и практическую значимость.

В разделе «Обзор литературы» дана характеристика инфекционного кератоконъюнктивита, представлены питательные среды для изоляции культур *Moraxella bovis*, основные биологические свойства культур *Moraxella bovis*, отличающие их от морфологически сходной и сопутствующей микрофлоры, чувствительность культур *Moraxella bovis* и сопутствующей микрофлоры к антибактериальным и химиотерапевтическим препаратам, в заключении автор анализировал патогенные свойства культур *Moraxella bovis*.

На основе данных литературы автор анализирует роль *Moraxella bovis* в этиологии патологии животных.

Приведённый обзор отражает настоящее состояние вопроса, одновременно показывает, что диссертант анализирует материал литературы и обосновывает

необходимость проведения настоящей работы.

В разделе «Материалы и методы» Карайченцев Д.В. представляет методики бактериологического исследования, руководствуясь наставлениями по лабораторной диагностике болезни, приводит количество и виды животных, подвергнутых исследованию.

В разделе «Собственные исследования» представлены результаты изоляции из патологического материала культур *Moraxella bovis* и сопутствующей микрофлоры на кровяном агаре Хоттингера, определена чувствительность культур *Moraxella bovis* и сопутствующей микрофлоры к антибактериальным и химиотерапевтическим препаратам. Автор диссертации провел конструирование плотной селективной питательной среды для изоляции и обогащения культуры *Moraxella bovis*. Для конструирования селективной питательной среды были подобраны компоненты питательной среды, стимулирующие рост и размножение моракселл, установлены антимикробные химиотерапевтические препараты, которые, будучи внесенными в питательную среду в необходимой концентрации, избирательно подавляли рост и размножение сопутствующей микрофлоры.

Полученная автором плотная селективная питательная среда использована для эффективной изоляции из патологического материала культур *Moraxella bovis*.

В результате проведённых исследований Карайченцев Д.В. предложил «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. Результаты экспериментальных исследований, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, используются в курсе лекций и при

проведении лабораторно-практических занятий студентам факультета ветеринарной медицины Белгородского Государственного аграрного университета имени В. Я. Горина.

В результате проведения производственных испытаний по оценке эффективности разработанной плотной селективной питательной среды было установлено, что она отвечает современным требованиям, и может быть рекомендована для внедрения в ветеринарную практику.

В разделе «Обсуждение», соискатель обобщил результаты исследований по изучаемым вопросам и провел сравнительный анализ данных. Это позволило сделать заключение, что внедрение в практику разработанных автором методик выделения микроорганизмов будет способствовать обеспечению эпизоотологического благополучия, улучшению качества ветеринарной диагностики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота в хозяйствах Российской Федерации.

В приложении представлены документы, утвержденные в установленном порядке.

Работа завершается 7 выводами, которые логически вытекают из результатов выполненной работы, и практическими предложениями.

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 Niger* (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 antimикробным 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 Niger* 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 эффективности установлено, что предложенная диссертантом среда нового состава позволяет повысить в 2,82 раза результативность бактериологических исследований патологического материала.

Практическая значимость работы.

Результаты исследований Карайченцева Д.В. представляют теоретическую и практическую ценность по использованию новых знаний для диагностики и оптимизации противоэпизоотических мероприятий против

инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота в хозяйствах Российской Федерации.

Результаты исследований Карайченцева Д.В. использованы при составлении методических рекомендаций, научно-нормативных документов, утверждённых в установленном порядке.

На основании полученных данных разработаны «Методические рекомендации по приготовлению и применению плотной селективной питательной среды для изоляции из патологического материала культуры *Moraxella bovis* – возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота и выделения его чистой культуры».

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.

Апробация результатов исследования и публикации работ.

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).

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

Замечания по работе.

В диссертационной работе встречаются опечатки, есть неудачные выражения. Считаем, что диссертант недостаточно полно описал раздел «Материалы и методы». Например, не указал: какие референтные штаммы микроорганизмов им использованы, какие источники получения музейных штаммов? Диссертант также не уточняет: при конструировании питательных сред применялся питательный агар для культивирования микроорганизмов, сухой (НПО «Питательные среды», г. Махачкала) или какого-то другого производителя? Для определения чувствительности к антибиотикам использовались стандартные бумажные диски производства объединения «Мосмедпром» им. Л.Я. Карпова или это был другой производитель? Общее количество бактериальных клеток устанавливали при помощи стандарта мутности ГНИИСК им. Л.А. Тарасевича или нефелометрически, используя калибровочную кривую?

А количество жизнеспособных бактериальных клеток определяли методом посева серийных десятикратных разведений исследуемой взвеси бактерий на поверхность плотной питательной среды или методом предельных разведений в жидкой питательной среде с вычислением концентрации микробных клеток методом наиболее вероятных чисел с использованием таблицы Мак-Креди (Н.С. Егоров, 1986)?

А как диссертант выбирал оптимальное соотношения исследуемых компонентов в составе базовых и селективных питательных сред? Может быть диссертант использовал метод ортогональных латинских прямоугольников (В.В. Бирюков, 1968)?

А как проведена автором диссертации оценка качества плотной селективной питательной среды?

Считаем, что оценку качества сконструированных питательных сред необходимо проводить по следующим показателям:

- чувствительность питательной среды;
- скорость роста, период генерации;

- выход бактериальных клеток на 1 мл среды;
- селективные свойства среды;
- сохранение стабильности биологических свойств культивируемого микроорганизма («Методические рекомендации к контролю питательных сред по биологическим показателям», 1980; Г. Шлегель 1987; Э. Джавец 1982).

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы нет.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

При исследовании патологического материала от крупного рогатого скота, предложенная диссидентом новая плотная селективная питательная среда эффективнее по сравнению с кровяным агаром Хоттингера в 2,82 раза. Использование данной среды позволяет повысить результативность бактериологических исследований патологического материала, сократить время выделения культур *Moraxella bovis*, своевременно поставить диагноз. Применение в ветеринарной практике разработанных диссидентом методических положений позволит более современными методами проводить выделение чистых культур *Moraxella bovis* и осуществлять необходимые лечебно-профилактические мероприятия. Автором диссертации определена целесообразность использования сконструированной селективной питательной среды для выделения *Moraxella bovis* из материала, контаминированного сопутствующей микрофлорой.

Заключение.

На основании анализа материалов диссертации можно сделать вывод, что работа выполнена на современном методическом уровне, содержание автореферата отражает материалы, изложенные в диссертации.

Диссертация Карайченцева Д.В. является научной квалификационной работой, в которой содержится решение задач по совершенствованию лабораторной диагностики инфекционного кератоконъюнктивита крупного

рогатого скота.

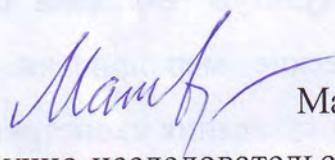
Работа по своей актуальности, методическому решению поставленных задач, объёму экспериментальных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов, полностью соответствует критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученой степени», утверждённого Постановлением №842 Правительства РФ от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Карайченцев Данила Викторович заслуживает присуждения искомой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией.

Диссертация и отзыв на диссертацию обсуждены, одобрены на научно-производственном совещании сотрудников отдела молекулярной биологии и вирусологии ФГБНУ ВНИТИБП (протокол №1 от 16 января 2017 г.).

16.01.2017 г.

Заведующая отделом
молекулярной биологии и вирусологии,
доктор биологических наук,
профессор, Лауреат Премии
Правительства РФ
в области науки и техники

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», (ФГБНУ «ВНИТИБП»),
141142, Московская обл., Щелковский р-н, пос. Биокомбината, дом 17,
e-mail: yunitibp@mail.ru, тел.(496) 56-7-32-63, (495)526-43-74



Матвеева Ирина Николаевна

Подпись Матвеевой И.Н. удостоверяю:

Учёный секретарь

ФГБНУ «ВНИТИБП»



Фролов Юрий Дмитриевич