
РАЗДЕЛ 5

ЖИВОТНОВОДСТВО

УДК 619:57.083.1:579.844:616.9:617.711:636.2

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ, КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ИНФЕКЦИОННОГО КЕРАТОКОНЪЮНКТИВИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Карайченцев В.Н., Тучков Н.С.

Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина

Зуев Н.П., Скогорева А.М., Попова О.В.

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

Для культивирования *Moraxella bovis* было исследовано несколько питательных сред с добавлением в дополнительные компоненты для лучшего роста культур возбудителя. Получили морфологически и биохимически схожие культуры возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота с моксиареллами, описанными в литературе.

Ключевые слова: *Moraxella bovis*, питательная среда, идентификация, биохимические свойства, среда Хоттингера, инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота.

DEVELOPMENT OF METHODS FOR ISOLATION, CULTIVATION AND IDENTIFICATION OF THE CAUSATIVE AGENT OF INFECTIOUS KERATOCONJUNCTIVITIS IN CATTLE

Karaichentsev V.N., Tuchkov N.S.

Belgorod State Agrarian University named after V.Ya. Gorin

Zuev N.P., Skogoreva A.M., Popova O.V.

Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter I

For the cultivation of *Moraxella bovis*, several nutrient media were studied with the addition of additional components for better growth of the pathogen cultures. Morphologically and biochemically similar cultures of the causative agent of infectious bovine keratoconjunctivitis with moxarella described in the literature were obtained.

Key words: *Moraxella bovis*, nutrient medium, identification, biochemical properties, Hottinger medium, infectious bovine keratoconjunctivitis.

За рубежом основой питательных сред для изоляции и культивирования *Moraxella bovis* является триптиказо-соевый агар. Однако в процессе испытаний сред из триптиказо-соевого перевара отмечали нестандартность гидролиза, что приводило к изготовлению недоброкачественных питательных сред.

Moraxella bovis – это грамотрицательная коккобацилла, неподвижная, свободноживущая бактерия размером от 0,6 до 1,0 мкм в диаметре [3,4,5], лишенная жгутиков с различным количеством пили. *M. bovis* может использовать колониальную морфологию как способ адаптации к изменениям окружающей среды. Колонии могут чередоваться между распространяюще-корродирующей (SC) и некорродирующей (N) морфологиями. Более вирулентным и распространенным типом колонии является форма SC, которая растет в плоском цилиндрическом диске толщиной в несколько бактерий. Исследования показывают, что прокалывание агара во время посадки позволяет бактериям адаптироваться и расти на границе между чашкой Петри и агаром [6]. В зависимости от родительских клеток *M. bovis* форма, толщина и дисперсность колонии различаются относительно скорости роста [2].

Объекты и методы исследования

Патологический материал от больных кератоконъюнктивитом коров, телок и телят брали путем погружения стерильных ватных тампонов в серозно-гнойный экссудат под третьим веком пораженного глаза и сразу помещали в пробирку с бульоном и в термосе со льдом доставляли в лабораторию и не позднее 10-15 часов из проб делали высев на питательные среды.

В качестве основы среды нами испытаны: мясо-пептонный агар, сухой питательный агар из гидролизата кильки, перевар Хоттингера. Изучили влияние на рост *Moraxella bovis* на плотной среде дефибринированной крови барана, кролика, крупного рогатого скота, сыворотки крови крупного рогатого скота дифосфопиридинуклеотида и экстракта пекарских дрожжей [1].

Результаты и их обсуждение

Исследованиями установили, что использование в качестве основы для твердых и жидких питательных сред перевара Хоттингера наиболее полно отвечает ростовым потребностям *Moraxella bovis*. Экстракт пекарских дрожжей, сыворотка крови крупного рогатого скота, дефибринированная кровь барана, кролика, крупного рогатого скота значительно улучшали рост *Moraxella bovis*.

Для приготовления бульона Хоттингера основной перевар разводили дистиллированной водой до содержания в готовой среде 220-230 мг% аминного азота. К бульону добавляли 0,5% пептона, 0,3% химически чистого двузамещенного фосфата калия и 0,5% натрия хлористого, устанавливали рН 7,4-7,6 и стерилизовали. После автоклавирования рН среды составлял 7,2-7,4.

Для приготовления твердой среды при изоляции и культивировании *Moraxella bovis*, к бульону Хоттингера добавляли 2% агар-агара и стерилизовали. Перед использованием, в расплавленный агар добавляли 5% свежей дефибринированной крови барана и 10% дрожжевого экстракта.

При исследовании выделенных культур, морфологически и культурально схожих с моракселлами, получили следующие результаты. Все выделенные в разных хозяйствах из экссудата пораженных глаз культуры в мазках были представлены грамотрицательными, не-кислотоустойчивыми, полиморфными, аэробами, неподвижными, короткими и толстыми с закругленными концами бактериями, с характерным парным сочленением; некоторые штаммы приближены к кокковидной форме, они не имеют спор и капсул и встречаются преимущественно одиночно в парах или коротких цепочках, длиной 1,5-2,5 мкм, шириной 1,0-1,5 мкм. Они не давали роста на МПБ и МПА, но в бульоне Хоттингера с сывороткой крови крупного рогатого скота и дрожжевым экстрактом вызывали помутнение и осадок бактерий, характерных для R-формы. На кровяном агаре с дрожжевым экстрактом культуры формировали типичные R- колонии с зоной бета-гемолиза. Все выделенные культуры *Moraxella bovis*, не утилизировали ацетат натрия, не восстанавливали нитраты до нитритов, не ферментировали углеводы, не образовывали индол и не обладали подвижностью. Все культуры разжижали желатин в течение 48-72 часов, продуцировали каталазу, не образовывали индол. Они вызывали характерные для *Moraxella bovis* изменения в лакмусовом молоке. В условиях аэробноза они вызывали защелачивание молока, а в условиях анаэробноза - пептонизацию и закисление.

В результате такой избирательности поведения бактерий верхний слой лакмусового молока высотой до 0,5-1 см окрашивался в темно-синий цвет, средний слой - в светлосиний, а нижний слой - в белый с крупинками пептонизированного молока (табл. 1).

Таблица 1

Дифференциация выделенных культур *Moraxella bovis*

Дифференциальные тесты	Наименование микроорганизмов								
	<i>Moraxella bovis</i>								
	К-1	К-2	К-3	В-1	В-2	В-3	Н-1	Н-2	Н-3
Утилизация ацетата	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Восстановление нитратов	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Разжижение желатина	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Гемолиз на кровяном агаре	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Пептонизация лакмусового молока	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Свёртывание лакмусового молока	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ферментация углеводов	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Каталазная активность	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Образование индола	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Подвижность	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Выводы

Из всех проанализированных питательных сред, для культивирования подходит среда Хоттингера, как более всего отвечающая ростовым потребностям *Moraxella bovis*. А по совокупности морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств выделенные нами из экссудата пораженных глаз крупного рогатого скота разного возраста бактерии соответствуют признакам рода *Moraxella* и вида *Moraxella bovis* [7].

Список литературы

1. Карайченцев, В. Н. Лабораторная диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота [Текст] / В. Н. Карайченцев // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2005. - № 6. - С. 51-52.
2. Жмуров, Н. Г. Методы идентификации микобактерий / Н. Г. Жмуров, Н. Н. Жмуров, Н. П. Зуев // Ветеринарно-санитарные аспекты качества и безопасности сельскохозяйственной продукции: материалы III-й международной конференции по ветеринарно-санитарной экспертизе, Воронеж, 15 ноября 2018 года. Том 2. – Воронеж: Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I, 2019. – С. 209-211. – EDN XOCBJV.
3. Bergefur, Ann-Louise, and Karl-Erik Johansson. *Moraxella Bovis*. 2011. Photograph. <http://www.vetbact.org/vetbact/index.php?artid=67#>
4. "Genes and Mapped Phenotypes." National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine. Web. 19 Mar. 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
5. R, Craig. New Forest Eye. 2011. Photograph. <http://informedfarmers.com/new-forest-eye-in-beef-cattle/>
6. Highlander, Sarah K., and George M. Weinstock. "HGSC at Baylor College of Medicine." HGSC at Baylor College of Medicine. 27 June 2006. Web. 19 Mar. 2012. http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/microbial/microbial_detail.jsp?project_id=123.

7. Bart, T. Isolierung von Moraxellabovis bei Rindern mit Infektiöser Boviner Keratokonjunktivitis [Text] / T. Barth, K. Taurek, W Wittig // Monatshefte für Veterinärmedizin (Mh. Vet.-Med.). – 1986. – Bd. 41, № 10. – S. 329-330.
-

Карайченцев Виктор Николаевич, доктор ветеринарных наук, профессор, Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина
308503, Российская Федерация, Белгородская обл.,
Белгородский р-н, п. Майский, ул. Вавилова, 1
Телефон: 89611543588
E-mail: v.karaichentsev@yandex.ru

Зуев Николай Петрович, доктор ветеринарных наук, профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, эпизоотологии и паразитологии, Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I
394087, Российская Федерация, г. Воронеж, ул. Мичурина, д.1
Телефон: 89914057424,
E-mail: zuev_1960_nikolai@mail.ru

Скогорева Анна Михайловна, кандидат ветеринарных наук, доцент, Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I
394087, Российская Федерация, г. Воронеж, ул. Мичурина, д.1
Телефон: 89204369548
E-mail: annaskogoreva@mail.ru

Попова Ольга Петровна, кандидат ветеринарных наук, доцент, Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I
394087, Российская Федерация, г. Воронеж, ул. Мичурина, д.1
Телефон: 89192465327
E-mail: olgvet@yandex.ru

Тучков Никита Сергеевич, студент, Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина
308503, Российская Федерация, Белгородская обл.,
Белгородский р-н, п. Майский, ул. Вавилова, 1
Телефон: 89202071546,
E-mail: nikitaytuchkov@gmail.com